



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

KATHERINE CHACÓN MADRID

**ESTUDO DOS EFEITOS DO SELÊNIO EM RELAÇÃO À PRODUÇÃO
DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E SELENOPROTEÍNAS EM
PLANTAS DE *ARABIDOPSIS THALIANA* NÃO MODIFICADAS E
MODIFICADAS GENETICAMENTE**

**CAMPINAS
2015**



KATHERINE CHACÓN MADRID

**ESTUDO DOS EFEITOS DO SELÊNIO EM RELAÇÃO À PRODUÇÃO
DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E SELENOPROTEÍNAS EM
PLANTAS DE *ARABIDOPSIS THALIANA* NÃO MODIFICADAS E
MODIFICADAS GENETICAMENTE**

*Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de
Química da Universidade Estadual de Campinas como
parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de
Mestra em QUÍMICA na área de QUÍMICA ANALÍTICA.*

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

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA POR KATHERINE CHACÓN MADRID, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. MARCO AURÉLIO ZEZZI ARRUDA.**

**CAMPINAS
2015**

Bolsa de financiamento**Agência:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP**Nº do Processo:** 2013 / 02810-0

Ficha catalográfica

Universidade Estadual de Campinas

Biblioteca do Instituto de Química

Simone Lucas Gonçalves de Oliveira - CRB 8/8144

Chacón Madrid, Katherine, 1986-

C344e Estudo dos efeitos do Selênio em relação à produção de espécies reativas de oxigênio e selenoproteínas em plantas de *Arabidopsis thaliana* não modificadas e modificadas geneticamente / Katherine Chacón Madrid. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Marco Aurélio Zezzi Arruda.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. *Arabidopsis thaliana*. 2. Selênio. 3. LC-ICP-MS. 4. Modificação genética. 5. Espécies reativas de oxigênio (ERO). I. Arruda, Marco Aurélio Zezzi. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Study of selenium's effects relative to the production of reactive oxygen species and selenoproteins in genetically modified and unmodified *Arabidopsis thaliana* plants

Palavras-chave em inglês:

Arabidopsis thaliana

Selenium

LC-ICP-MS

Genetic modification

Reactive oxygen species (ROS)

Área de concentração: Química Analítica**Titulação:** Mestra em Química na área de Química Analítica**Banca examinadora:**

Marco Aurélio Zezzi Arruda [Orientador]

Ricardo Antunes de Azevedo

Alessandra Sussulini

Data de defesa: 29-07-2015**Programa de Pós-Graduação:** Química

Dedicatória

*A meu pai celestial, a María Santíssima,
à minha mãe Rosa Elena, às minhas irmãs
Angie e Stephania, à minha sobrinha Geraldinne,
à minha família, que são o motor da minha vida:
seu amor, confiança e apoio incondicional fazem
que minhas metas se tornem triunfos. Amo vocês.*

*“Nada te turbe, nada te espante. Todo se pasa, Dios no se muda.
La paciencia todo lo alcanza. Quién a Dios tiene nada le falta.
Sólo Dios basta, sólo Dios basta, Aleluya”.*
Santa Teresa de Jesus.

Tudo posso naquele que me fortalece.
Filipenses 4:13

*Confie no Senhor de todo o teu coração e não te apóies em tua
própria inteligência; reconheça-o todos os teus caminhos, e Ele
endireitará as tuas veredas.*
Provérbios 3: 5-6

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por me mostrar cada dia seu eterno amor, sua misericórdia e sua companhia.

A minha mãe (Rosa Elena), minhas irmãs (Angie e Stephania), minha sobrinha (Geraldinne), a todos meus familiares, que apesar da distancia, me apóiam incondicionalmente e são uma das minhas grandes motivações para lutar por meus sonhos.

À Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, em especial ao Instituto de Química pela possibilidade de realização desta pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pela concessão da bolsa de estudo.

A meu orientador prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda, por todos os ensinamentos, oportunidades e confiança durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos professores prof. Dr. Gonçalo Pereira e sua colaboradora Dra. Marcela Salazar, prof. Dr. Carlos Ramos, prof. Dr. Ricardo Azevedo e sua técnica Dra. Salete, prof. Dr. Fábio Gozzo e sua aluna Tatiani, prof. Dr. Edvaldo Sabadini e seu aluno Guilherme, profa. Dra. Anita Marsaioli, sua aluna Bruna e técnica Priscila por terem permitido desenvolver parte deste trabalho utilizando a infraestrutura dos seus laboratórios.

A todos os professores que contribuíram para minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

À CPG e aos demais funcionários do Instituto de Química da UNICAMP que colaboraram de alguma maneira para realização deste trabalho. De um jeito especial um obrigadíssimo para os técnicos Ivanilce, Vanessa, Anna, Anne, Henrique, vocês me ajudaram solucionar dificuldades durante este trabalho.

Aos amigos que se tornaram família: Alejandra, Alejandro, Alexandra, Daniel, Javier, Josaphat, Laidy, Mónica, pela companhia, apoio e as “chocoaventuras” nos momentos de descontração. Vocês são a melhor torcida. Crescer junto com uma família como a nossa faz a diferença. Sou privilegiada por ter seu apoio e o seu carinho sincero.

A meu grande amigo, irmão Alejandro, sei que desde o céu me acompanha e fica feliz com meus triunfos, te adoro “mi Alegando hermoso”.

As minhas loucas filhas adotivas Alejandra e Laidy com quem aprendi compartilhar meus sonhos, metas, medos, rotina, noites e finais de semana trabalho, Ave Mariás, loucos passeios, risadas de estresse, raivas familiares. Deus abençoe os teus caminhos

A meus amigos Mónica e Javier, obrigada pelas orientações e acolhida na minha chegada. Foi coisa doida a adaptação, ter uma mão amiga cheia de amor faz diferença para iniciar as coisas e empreender novos caminhos.

Aos meus colegas amigos do Grupo de Espectrometria, Preparo de Amostra e Mecanização – GEPAM, que tive a oportunidade de conhecer ao longo deste período: Alejandra, Alejandro, Alessandra, Alisson, André, Bruna Campos, Bruna Maciel, Cícero, Daiane, Eraldo, Fernanda, Gustavo, Giovana, Giovanni, Hebert, Ivanilce, Javier, Jemmyson, João, Josiane, Juliana, Larissa, Mauver, Nadia, Odilon, Paola, Rodrigo, Silvana, Stacy, Tatiana, pela colaboração, risadas, coragem e paciência para aprender portunhol durante o desenvolvimento deste trabalho.

Sou muito grata a cada uma das pessoas que de maneira direta ou indireta contribuíram para que este trabalho se concretizasse. Obrigadíssima, Deus abençoe e devolva em maior quantidade tudo o que vocês fizeram por mim. Nada é possível sem um excelente grupo de trabalho.

RESUMO

Com o objetivo de avaliar os efeitos do selênio (Se) e/ou da modificação genética no metabolismo das plantas são realizados estudos de estresse oxidativo, resistência de acumulação de Se e análises metalômicas utilizando folhas de *Arabidopsis thaliana* modificadas geneticamente (MG) e não modificadas geneticamente (N-MG), e cultivadas em casa de vegetação com irrigação de selenito de sódio. As plantas MG e N-MG estudadas apresentam algumas diferenças devido à presença do selenito. As plantas N-MG, quando irrigadas com a dose superior de Se (308 µg), acumulam 17% menos Se e sofrem 5% a mais de redução no crescimento, refletida na menor quantidade de massa orgânica fresca das folhas, quando comparadas com as plantas MG. Além disso, ao comparar as plantas N-MG controle e as tratadas com Se, é observada uma redução até de um 10% na atividade da superóxido dismutase e um aumento de até 162% na concentração de malondialdeído. Entretanto, as folhas MG apresentam um 48% de aumento na atividade da superóxido dismutase e na produção de peróxido de hidrogênio na dose superior de Se, enquanto que a concentração de malondialdeído diminui em 11%. Por sua vez, a concentração de proteínas solúveis no extrato das folhas N-MG é maior em comparação às MG (ca. 33%), e não apresentam diferenças na presença do selenito, enquanto que as folhas MG apresentam uma diminuição de 32% na maior concentração de Se. No sistema LC-ICP-MS é possível o monitoramento do aumento nas áreas dos sinais das espécies de Se solúveis em água, nas folhas de *A. thaliana* N-MG irrigadas com uma solução de selenito de sódio, quando comparadas com as MG. Os resultados dos estudos das folhas de *A. thaliana* MG e N-MG, sob os diferentes tratamentos, permitem avaliar, tanto a modificação genética, quanto a presença do Se, as quais produzem efeitos sobre o metabolismo da planta, fazendo que ela produza uma maior concentração de espécies reativas de oxigênio. A modificação genética também confere uma maior resistência ao estresse oxidativo produzido pela presença do selenito. Além disso, é possível identificar variações no conjunto de compostos hidrofílicos, como, por exemplo, proteínas, entre as folhas de *A. thaliana* N-MG e MG controle e irrigadas com uma solução de selenito de sódio.

Palavras-chave: *Arabidopsis thaliana*, modificação genética, selênio, LC-ICP-MS, metalômica, espécies reativas de oxigênio (ERO).

ABSTRACT

In order to evaluate the effects of selenium (Se) and/or the genetic modification in plants metabolism, oxidative stress and resistance of Se accumulation studies and also metalomics analysis are performed using, *Arabidopsis thaliana* leaves, genetically modified (MG) and unmodified (N-MG), in a greenhouse and irrigated with sodium selenite. MG and N-MG plants show some differences due to the presence of selenite. The N-MG plants when irrigated with the highest dose of Se (308 µg), accumulate 17% less Se and had 5% more reduction in their growth (reflected in low amount of fresh organic mass of leaves), comparing with MG plants. In addition, when N-MG control plants are compared with those treated with Se, a reduction of up to 10% in the superoxide dismutases activity and an increase of 162% in malondialdehyde concentration are observed. Moreover, when the highest dose of Se is used, MG leaves show a significant increase (48%) in superoxide dismutases activity and production of hydrogen peroxide, and a decrease of 11% on the malondialdehyde concentration. However, the concentration of soluble protein in the extract of N-MG leaves is more than 33% higher compared with MG leaves, and no difference in the presence of selenite, while the MG leaves show a decrease of 32% in the highest concentration of Se. LC-ICP-MS system, allows the monitoring of the increase in the signal of selenium species soluble in water in N-MG *A. thaliana* leaves, irrigated with sodium selenite solution when it is compared with MG leaves data. Results of studies of MG and N-MG *A. thaliana* leaves, under different treatment conditions, allow to evaluate not only the genetic modification, but also the presence of selenium, which both effects play an important role in plant metabolism, such as a higher production of reactive oxygen species. The genetic modification also confers an increased on the plants resistance against the oxidative stress produced by the presence of selenite. Moreover, variations in the group of hydrophilic compounds, for instance, proteins, as possible identify between the *A. thaliana* MG and N-MG leaves control and irrigated with a solution of sodium selenite.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, genetic modification, Selenium, SEC-ICP-MS, metalomic, reactive oxygen species (ROS)

Lista de acrônimos e abreviaturas

AEX	do inglês, <i>Anion Exchange Chromatography</i> (cromatografia de troca aniônica)
ANOVA	do inglês, <i>Analysis of Variance</i> (análise de variância simples)
APX	ascorbato peroxidase
<i>A thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BSA	do inglês, <i>Bovine Serum albumin</i> (Albumina de Soro bovina)
<i>ca</i>	cerca de
CAT	catalase
Cis	cisteína
DAD	do inglês, <i>Diode Array Detector</i> (detector por arranjo de diodos)
dATP	do inglês, <i>Deoxyadenosine Triphosphate</i> (desoxiadenosina trifosfatada)
dCTP	do inglês, <i>Deoxycytidine Triphosphate</i> (desoxicitidina trifosfatada)
2-D DIGE	do inglês, <i>two-Dimensional Difference Gel Electrophoresis</i> (eletroforese bidimensional diferencial em gel de poliacrilamida)
dGTP	do inglês, <i>Deoxyguanosine Triphosphate</i> (desoxiguanosina trifosfatada)
DNA	do inglês, <i>Deoxyribonucleic Acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
dNTP	do inglês, <i>Nucleoside Triphosphate</i> (nucleósidos trifosfatados)
2-D PAGE	do inglês, <i>two-Dimensional Gel Electrophoresis</i> (eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida)
DTT	ditiotretitol
dTTP	do inglês, <i>Deoxythymidine Triphosphate</i> (desoxitimidina trifosfatada)
DRC	do inglês, <i>Dynamic Reaction Cell</i> (cela de reação e colisão)
EDTA	do inglês, <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> (ácido etilenodiaminotetracético)
ESI	do inglês, <i>Electrospray Ionization</i> (ionização por electrospray)
ERO	espécies reativas de oxigênio
FPLC	do inglês, <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> (cromatografia líquida rápida de proteínas)

GEPAM	Grupo de Espectrometria, Preparo de Amostras e Mecanização
GR	glutathione reductase
HCl	ácido clorídrico
ICP-MS	do inglês, <i>Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado)
IUPAC	do inglês, <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> (União Internacional de Química Pura e Aplicada)
LA	do inglês, <i>Laser Ablation</i> (ablação a laser)
LC	do inglês, <i>Liquid Chromatography</i> (cromatografia líquida)
LD	limite de detecção
LQ	limite de quantificação
MALDI	do inglês, <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i> (ionização/dessorção a laser assistida por matriz)
MDA	malondialdeído
Met	metionina
MG	modificado geneticamente
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MM	massa molecular
MRC	material de referencia certificado
MS	do inglês, <i>Mass Spectrometry</i> (espectrometria de massas)
MS/MS	espectrometria de massas em sequência
<i>m/z</i>	razão massa/carga
N-MG	não modificado geneticamente
OGM	organismos geneticamente modificados
pb	pares de base
PCR	do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia de Polimerase)
PF	do inglês, <i>Primer Forward</i> (oligonucleotídeos iniciadores)

pH	potencial hidrogeniônico
PMSF	do inglês, <i>Phenhylmethylsulfonyl Fluoride</i> (fluoreto de fenilmetilsulfonila)
PPO	polifenol oxidase
PR	do inglês, <i>Primer Reverse</i> (oligonucleotídeos iniciadores)
Prx	peroxiredoxina
PVP	polivinilpirrolidona
RF	rádio frequência
RPq	parâmetro de “Mathieu”, aplicado em Volt
RuBisCO	Ribulose-bisfosfato carboxilase oxigenase
SDS	do inglês, <i>Sodium Dodecil Sulfate</i> (dodecil sulfato de sódio)
SEC	do inglês, <i>Size Exclusion Chromatography</i> (cromatografia de exclusão por tamanho)
SeCis	selenocisteína
SeMet	selenometionina
SOD	superóxido dismutase
TFA	do inglês, <i>Trifluoroacetic Acid</i> (ácido trifluoroacético)
TOF	do inglês, <i>Time of Flight</i> (tempo de voo)
Tris	tris-hidroximetilaminometano
UPLC	do inglês, <i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência)
UV-VIS	do inglês, <i>Ultraviolet–Visible Spectroscopy</i> (Espectroscopia ultravioleta-visível)
Ve	volume de eluição

Lista de tabelas

Tabela 1. Principais interferências sofridas pelos isótopos estáveis de Selênio.....	32
Tabela 2. Condições de irrigação empregadas para o cultivo de <i>A. thaliana</i>	35
Tabela 3. Condições para a PCR das amostras.....	37
Tabela 4. Relação das concentrações de Se e seus interferentes nos MRC farinha de arroz (1568a <i>Rice fluor</i>) e sedimento marinho (<i>Marine sediment</i> PACS-2).	39
Tabela 5. Fatores de diluição para a determinação de Se total nas folhas.....	40
Tabela 6. Peso úmido médio por planta para cada grupo tratamento cultivado.	43
Tabela 7. Condições de operação da cela de reação e colisão para diferentes isótopos de Se.....	47
Tabela 8. Dados de quantificação das razões m/z monitoradas de Se utilizando CH ₄ e O ₂ como gás na cela de reação e colisão do ICP-MS.	48
Tabela 9. Condições de operação otimizadas do equipamento de ICP-MS para quantificação de Se nas amostras de folhas.	49
Tabela 10. Características das colunas cromatográficas.....	64
Tabela 11. Parâmetros instrumentais aplicados em LC.....	67
Tabela 12. Quantidade de Se presente nas frações coletadas após separação no sistema SEC-DAD.	84

Lista de figuras

Figura 1. <i>Arabidopsis thaliana</i> Columbia - 0.....	23
Figura 2. Modificação genética usando um sistema de vetor, mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	25
Figura 3. Amplificação exponencial do DNA usando PCR.	30
Figura 4. Configuração esquemática do ICP-MS.....	31
Figura 5. Cultivo de <i>Arabidopsis thaliana</i> MG e N-MG na casa de vegetação do IB/UNICAMP.....	43
Figura 6. Diferença de tamanho entre os tratamentos com Se das plantas N-MG.....	44
Figura 7. Comparação da cor amarela nas folhas controle e tratadas com dose superior de Se.	45
Figura 8. Gel de agarose 1% m/v, PCR do DNA N-MG, MG e vetor pCambia2300 (pC): <i>primer</i> específico para controle positivo do (A) gene <i>NPTII</i> , ~1000 pb (B) gene ubiquitina, ~100 pb. K1 e K2 são marcadores de massa molecular, 1 kb (<i>Life Technologies</i>) e 100 bp (<i>Thermo Scientific</i>) respectivamente. Fonte: obtida do aparelho Biosystems, $\lambda = 265$ nm.	46
Figura 9. Quantificação de Se nas folhas de <i>Arabidopsis thaliana</i> utilizando ICP-MS.....	50
Figura 10. Concentração de proteínas nas folhas de <i>A. thaliana</i> MG e N-MG e nos diferentes tratamentos: controle, dose de Se inferior e Se superior. Método de Bradford, $\lambda = 595$ nm. ..	51
Figura 11. Atividade da catalase nas folhas de <i>A. thaliana</i> MG e N-MG e nos diferentes tratamentos: controle, dose de Se inferior e dose de Se superior.	52
Figura 12. Atividade da superóxido dismutase (SOD) nas folhas de <i>A. thaliana</i> MG e N-MG e nos diferentes tratamentos: controle, dose de Se inferior e dose de Se superior.	53
Figura 13. Concentração do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) nas folhas de <i>A. thaliana</i> MG e N-MG e nos diferentes tratamentos: controle, dose de Se inferior e dose de Se superior.	54

Figura 14. Peroxidação de lipídeos, avaliada por meio da produção de malondialdeído (MDA), nas folhas de <i>A. thaliana</i> MG e N-MG, e nos diferentes tratamentos: controle, dose de Se inferior e dose de Se superior.	55
Figura 15. Quantificação das proteínas totais utilizando o kit 2D-Quanti. (A) comparação dos três métodos de extração e a variação da ressolubilização do precipitado na fase móvel (modificação do método 3), (B) Variação do volume total do tampão 30 mmol L ⁻¹ tris-HCl, pH 7,5 no segundo método de extração.....	70
Figura 16. Quantificação das proteínas totais do segundo método utilizando o kit 2D-Quanti. (A) Variação do solvente de extração: água, tampão 30 mmol L ⁻¹ tris-HCl pH, 7,5 e tampão 100 mmol L ⁻¹ acetato de amônio, pH 7,2. (B) comparação do uso do banho de ultrassom.	71
Figura 17. Cromatograma do extrato das folhas N-MG irrigadas com dose superior de Se. Coluna superdex 200, SEC-DAD, λ = 280 nm. Variação da vazão da fase móvel tampão 30 mmol L ⁻¹ tris-HCl, pH 7,5. 0,3 mL min ⁻¹ , 0,4 mL min ⁻¹ e 0,5 mL min ⁻¹	73
Figura 18. Cromatogramas do extrato das folhas N-MG irrigadas com dose superior de Se. SEC-DAD, λ = 280 nm, volume de injeção = 60 μ L. Variação da natureza e vazão da fase móvel utilizando coluna Superdex 75 10/300. Tampão 30 mmol L ⁻¹ tris-HCl, pH 7,5 e tampão 100 mmol L ⁻¹ acetato de amônio, pH 7,2. (A) 0,3 mL min ⁻¹ (B) 0,4 mL min ⁻¹ (C) 0,5 mL min ⁻¹ (D) 0,6 mL min ⁻¹	74
Figura 19. Cromatogramas SEC-DAD obtido no equipamento <i>FPLC</i> (ÄKTA purifier, p900). λ = 280 nm Volume de injeção = 250 μ L, vazão = 1 mL min ⁻¹ . Variação da força iônica utilizando coluna Superdex 75 10/300. (A) Tampão 30 mmol L ⁻¹ tris-HCl, pH 7,5 (B) 30 mmol L ⁻¹ tris-HCl + 100 mmol L ⁻¹ acetato de amônio, pH 7,5 (C) 30 mmol L ⁻¹ tris-HCl + 300 mmol L ⁻¹ acetato de amônio, pH 7,5.	75
Figura 20. Frações de <i>A. thaliana</i> N-MG coletadas de 4 injeções cromatográficas. (A) Tampão 30 mmol L ⁻¹ tris-HCl, pH 7,5 (B) tampão 100 mmol L ⁻¹ acetato de amônio, pH 7,2 (C) Avaliação semi-quantitativa de Se no ICP-MS, no modo <i>off-line</i>	76
Figura 21. Perfil cromatográfico de BSA, Se-cis e Se-met utilizando AEX-DAD, λ = 280 nm. (A) fase móvel A = tampão 10 mmol L ⁻¹ tris-HCl, pH 6,5 e B = A + 300 mmol L ⁻¹ de acetato de amônio. (B) fase móvel A = tampão 20 mmol L ⁻¹ tris-HCl, pH 6,5 e B = A + 300 mmol L ⁻¹ de acetato de amônio. Vazão 1 mL min ⁻¹ . Volume de injeção 50 e 100 μ L, respectivamente.	

Gradiente: 100% A (2 min), 80% A (2 min), 60% A (4 min), 40% A (5 min), 20% A (9 min), 0% A (15 min), 40% A (2 min), 80% A (2 min), 100% A (5 min)..... 77

Figura 22. Perfil cromatográfico de BSA, Se-cis e Se-met utilizando AEX-DAD, $\lambda = 280$ nm. (A) fase móvel foi A = 10 mmol L⁻¹ bicarbonato de amônio, pH 6,5 e B = A + 300 mmol L⁻¹ de acetato de amônio. (B) A = 20 mmol L⁻¹ bicarbonato de amônio, pH 6,5 e B = A + 200 mmol L⁻¹ de acetato de amônio. (C) A = 20 mmol L⁻¹ Bicarbonato de amônio, pH 6,5 e B = A + 300 mmol L⁻¹ de acetato de amônio. Vazão 1 mL min⁻¹. Volume de injeção 50 e 100 μ L, respectivamente. Gradiente: 100% A (2 min), 80% A (2 min), 60% A (4 min), 40% A (5 min), 20% A (9 min), 0% A (15 min), 40% A (2 min), 80% A (2 min), 100% A (5 min). 78

Figura 23. Diagrama esquemático do procedimento para análise das folhas de *A. thaliana*, empregando LC-ICP-MS..... 79

Figura 24. Concentração de proteínas nas folhas de *A. thaliana* MG e N-MG, controle e dose de Se superior, utilizado o Kit 2-D Quant, $\lambda = 480$ nm. 80

Figura 25. Cromatograma do extrato das folhas de *A. thaliana* MG e N-MG. Coluna Superdex 75 10/300, SEC-DAD, $\lambda = 280$ nm. Volume de injeção= 100 μ L, vazão= 1 mL min⁻¹, fase móvel= tampão 30 mmol L⁻¹ tris-HCl, pH 7,5. Tratamento (A) Controle (B) dose de Se superior. A região assinalada corresponde à faixa de exclusão molecular da coluna. 81

Figura 26. Cromatograma do extrato das folhas de *A. thaliana* controle e irrigadas com dose superior de Se. Coluna Superdex 75 10/300, SEC-DAD, $\lambda = 280$ nm. Volume de injeção= 100 μ L, vazão= 1 mL min⁻¹, fase móvel= tampão 30 mmol L⁻¹ tris-HCl, pH 7,5. (A) N-MG (B) MG. *A região assinalada corresponde à faixa de exclusão molecular da coluna..... 82

Figura 27. Cromatogramas de SEC-ICP-MS das folhas de *A. thaliana* (A) N-MG e (B) MG controle e irrigadas com Se. Na esquerda, os perfis de adsorção no UV, $\lambda = 280$ nm e na direita as contagens do isótopo ⁸⁰Se⁺. *A região assinalada corresponde à faixa de exclusão molecular da coluna e os números, de 1 até 5, indicam as frações que contêm Se..... 83

Apêndice 1. Figura do mapa do vetor pCAMBIA2300..... 98

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	21
1. REVISÃO DA LITERATURA	23
1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
1.2. Modificação genética.....	24
1.3. O selênio (Se).....	26
1.4. Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e o estresse oxidativo nas plantas.....	27
 CAPÍTULO I. Estudo da acumulação de Se e da produção de espécies reativas de oxigênio nas folhas de <i>Arabidopsis thaliana</i> modificadas e não modificadas geneticamente.....	29
1. ASPECTOS TEÓRICOS RELEVANTES.....	30
1.1. Técnicas analíticas empregadas	30
1.1.1. Detecção da modificação genética pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	30
1.1.2. Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).....	31
2. OBJETIVOS	33
2.1. Objetivo geral	33
2.2. Objetivos específicos	33
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	34
3.1. Preparo de soluções e limpeza de materiais	34
3.2. Aquisição das amostras.....	34
3.3. Condições do cultivo	35
3.4. Condições da técnica da PCR.....	36
3.5. Determinação da quantidade total de selênio utilizando ICP-MS	38

3.6.	Estudo da produção de espécies reativas de oxigênio, ERO, nas folhas de <i>A. thaliana</i>	40
3.7.	Análise da atividade enzimática	40
3.8.	Determinação da peroxidação de lipídeos e quantificação de peróxido de hidrogênio, H ₂ O ₂	41
3.9.	Avaliação estatística.....	42
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1.	Plantio da <i>Arabidopsis thaliana</i>	43
4.2.	Comprovação da modificação genética pela técnica da PCR	45
4.3.	Quantificação total de selênio utilizando ICP-MS	47
4.4.	Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio nas folhas de <i>A. thaliana</i>	50
4.4.1.	Determinações das atividades enzimáticas.....	51
4.4.2.	Determinação da peroxidação de lipídeos e quantificação de peróxido de hidrogênio.....	53
5.	CONCLUSÕES PARCIAIS	57

CAPÍTULO II. Emprego da cromatografia líquida no estudo metalômico comparativo das folhas da *Arabidopsis thaliana* não modificadas e modificadas geneticamente, irrigadas e não irrigadas com uma solução de selenito de sódio. 58

1.	REVISÃO DA LITERATURA	59
1.1.	Metalômica	59
1.2.	Técnicas analíticas empregadas	60
2.	OBJETIVOS	62
2.1.	Objetivo geral	62
2.2.	Objetivos Específicos	62
3.	PARTE EXPERIMENTAL.....	63

3.1.	Preparo de soluções e limpeza de materiais	63
3.2.	Amostras.....	63
3.3.	Colunas cromatográficas	63
3.4.	Métodos avaliados para a extração das proteínas.....	64
3.5.	Escolha das condições cromatográficas	65
3.5.1.	Primeira separação cromatográfica: Exclusão por tamanho (SEC)	65
3.5.2.	Segunda separação cromatográfica: Troca aniônica (AEX)	66
3.6.	Análise cromatográfica dos extratos proteicos das amostras	66
3.7.	Avaliação estatística.....	68
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.1.	Escolha do método de extração das proteínas	69
4.2.	Escolha das condições de separação cromatográficas.....	72
4.2.1.	Primeira separação cromatográfica, exclusão por tamanho (SEC)	72
4.2.2.	Segunda separação cromatográfica: Troca aniônica (AEX)	77
4.3.	Análise cromatográfica dos extratos proteicos das folhas de <i>A. thaliana</i>	79
5.	CONCLUSÕES PARCIAIS	85
	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	86
	REFERÊNCIAS	87
	APÊNDICE 1	98
	APÊNDICE 2	99

INTRODUÇÃO

A *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) é uma planta herbácea de pequeno porte que possui o menor genoma conhecido em plantas que apresentam flores. A total disponibilidade da sua sequência genômica faz que seja amplamente usada como um organismo modelo nos estudos de desenvolvimento das plantas sob condições endógenas ou exógenas ¹⁻³. Dessa maneira, a engenharia genética, que procura melhorar as características de um organismo por meio da inserção de fragmentos de DNA exógeno, recombinação, alteração e troca de genes ⁴⁻⁶, emprega a *A. thaliana* como um dos seus objetos de estudo. Isto resulta no aumento do número de linhagens geneticamente modificadas desta planta, bem como no aumento de pesquisas sobre os efeitos destas modificações no comportamento vegetal ⁷.

Este sistema modelo, também, tem sido uma importante ferramenta para analisar as respostas das plantas ao estresse ambiental, incluindo a seca, sal, temperaturas altas e baixas, e inclusive contaminação por metais ou metalóides, como cádmio (Cd) e selênio ⁸⁻¹⁰. Pesquisas de metais ou metalóides nos organismos são de grande importância devido a que muitas biomoléculas requerem a sua presença para a atividade funcional nos sistemas vivos. Desse modo, sabe-se que muitos metais, ou metalóides como selênio (Se), são necessários como micronutrientes, embora, em níveis excessivos, alguns podem ser tóxicos para o organismo ^{2,7,11,12}. No entanto, os processos pelos quais uma célula recebe, armazena e incorpora um metal como cofator, ainda não são totalmente esclarecidos ^{4,6}. Assim, diferentes áreas de pesquisa, como a metalômica, tentam solucionar perguntas relacionadas à assimilação, função, transporte e armazenamento dos metais nos organismos ^{2,4,6,13}.

Por tanto, este trabalho teve o objetivo de avaliar os efeitos do selênio (Se) e/ou da modificação genética no metabolismo das plantas de *Arabidopsis thaliana* modificadas geneticamente (MG) e não modificadas geneticamente (N-MG), cultivadas em casa de vegetação com irrigação de selenito de sódio. Para isso, foram feitos estudos de estresse oxidativo, resistência à acumulação de Se e análises metalômicas utilizando as folhas das plantas cultivadas.

Por conseguinte, é apresentado o método utilizado para avaliação das atividades de algumas enzimas envolvidas na eliminação de espécies reativas de oxigênio (ERO), como catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). Assim como a determinação das concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e de malondialdeído (MDA), este último usado como medida da peroxidação lipídica. Na análise de resistência das plantas acumulando

Se foi preciso realizar a otimização e a validação dos parâmetros no espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) para obter uma quantificação confiável do metalóide.

Finalmente, na etapa dos estudos metalômicos o conjunto básico de precauções que foram necessárias para minimizar erros vindos dos equipamentos ou métodos empregados foram: escolha do método de extração das proteínas hidrofílicas das folhas de *Arabidopsis thaliana* MG e N-MG, das condições de separação cromatográficas, no caso particular exclusão por tamanho (SEC) e troca aniônica (AEX) e dos parâmetros para a hifenação do LC-ICP-MS, para identificação de Se nas frações das amostras desta pesquisa.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. *Arabidopsis thaliana*

A *A. thaliana* é uma pequena planta herbácea da família *Brassicaceae* e do gênero *Arabidopsis* (vide Figura 1). O nome *thaliana* é devido à primeira pessoa que fez sua descrição botânica: Jojanner Thal, no século XVI, nas montanhas Harz, na Alemanha. Esta espécie possui mais de 750 ecótipos em todo o mundo devido à sua heterogeneidade genética natural, que é refletida em sua diversidade morfológica e fisiológica, de acordo com o seu *habitat* e em resposta às condições ambientais^{2,14-18}.



Figura 1. *Arabidopsis thaliana* Columbia - 0.

Fonte: obtida em câmera Olympus, modelo VH-210, e alterada em Paint.

Embora a *A. thaliana* não possua valor econômico, no âmbito científico, especialmente nos estudos ômicos de plantas (genômica, transcriptômica, metabolômica, metalômica, proteômica, entre outros)¹⁹⁻²¹, esta espécie apresenta-se como objeto de estudo pelas suas vantagens: sequência genômica completamente disponível, organizada em 5 cromossomos e 125 Mpb^{1,7,22}, menor genoma detectado em plantas com flores, curto ciclo de vida, pequeno tamanho que permite ter um grande número de plantas em um espaço reduzido, autofecundação, produção de sementes abundantes e facilidade de transformação genética^{1-3,14,15,22}.

1.2. Modificação genética

A modificação genética é a manipulação do genoma de um organismo fazendo uso de ferramentas biotecnológicas. Essas modificações englobam recombinação, alteração e/ou troca de genes, e até mesmo adição de genes de diferentes origens que, geralmente, têm como objetivo melhorar as características do organismo ²³⁻²⁵. Estes processos podem gerar organismos geneticamente modificados (OGM) ou organismos transgênicos. Os primeiros são o resultado de uma modificação aleatória do genoma utilizando alguma técnica laboratorial, já os organismos transgênicos são o produto da inserção de uma sequência de DNA exógeno utilizando uma técnica específica. É por isso, que os transgênicos podem ser chamados OGM, mas nem sempre um OGM é um transgênico ^{7,23,24}.

A inserção de fragmentos de DNA exógeno no genoma de uma planta pode ocorrer por transformações diretas, como a biobalística, eletroporação de protoplastos, adsorção mediada por polietilenoglicol, macro e micro-injeção, entre outras. Estes métodos utilizam processos físicos ou químicos que modificam as paredes da membrana celular para facilitar a transferência do gene exógeno. Por outro lado, as transformações indiretas usam um sistema de vetor mediado por agrobactérias para fazer a transferência do DNA ²³⁻²⁶.

A *A. thaliana* Columbia-0 (Col-0) utilizada nesta pesquisa foi transformada geneticamente utilizando a *Agrobacterium*, tal como foi descrito por Bechtold ^{27,28}. Para isto, uma solução contendo *Agrobacterium tumefaciens* carregando o vetor de interesse, vetor pCAMBIA2300 (vide apêndice 1), foi borrifada sobre plantas em estágios iniciais do florescimento para induzir a formação de uma infecção em forma de tumor na base do caule da planta, conhecido como doença de galha (Figura 2). Assim, é aproveitada a capacidade natural que tem esse patógeno para introduzir DNA nas plantas hospedeiras por meio da divisão celular desorganizada, semelhante a um tecido tumoral.

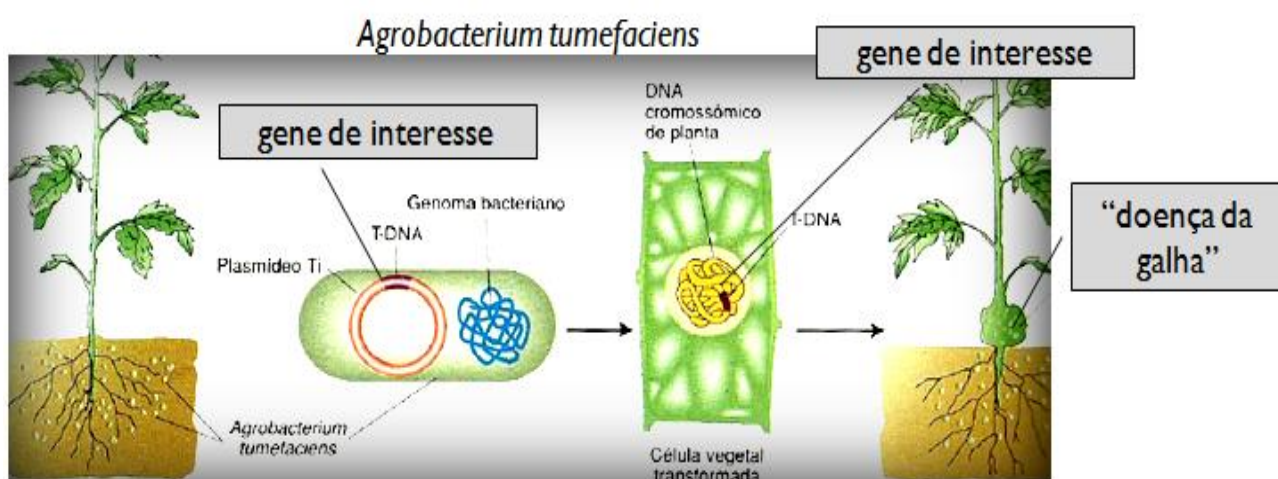


Figura 2. Modificação genética usando um sistema de vetor, mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.
 Fonte: adaptação de Griffiths *et al.*(2000)²⁹ e Maciel (2014)³⁰.

Os estudos das modificações genéticas em plantas, não apenas em *A. thaliana*, têm revelado mudanças no proteoma dos organismos, confirmando a associação direta das proteínas ao genoma, por serem essas o produto final dos genes ativos. Consequentemente, nessas pesquisas, também são evidenciadas alterações no metaloma, o qual representa a totalidade de espécies de metal ou metalóide em uma célula ou tecido^{4-6,8,20,31-36}.

Resultados do nosso grupo de pesquisa, GEPAM, relatam que sementes de soja transgênicas apresentam uma maior capacidade de assimilação de metais do solo, têm maior biodisponibilidade de alguns metais, além de mostrar um nível de estresse oxidativo mais elevado do que as sementes de soja não transgênicas^{5,6,32,33}. Maciel *et al.* (2014) mostraram que a modificação genética conferiu à planta de *Arabidopsis thaliana* uma maior resistência ao estresse oxidativo provocada pela irrigação de um sal de selênio (Se), quando comparado com a planta não modificada geneticamente e cultivada sob as mesmas condições de estresse⁸.

Essas diferenças, descritas pela literatura, nas plantas transformadas geneticamente comparadas com seu par não transformado, indicam que a modificação genética além de fornecer à planta alguma resistência à influência de um fator externo como, por exemplo, no caso da soja, um herbicida, ou no caso de algumas plantas de *A. thaliana*, a irrigação com metalóides como o Se, que também causam alterações em todo o metabolismo das plantas. Tal fato que confirma a importância dos estudos baseados na procura do entendimento dessas alterações no metabolismo da planta.

1.3. O selênio (Se)

Os organismos vivos são compostos por uma variedade de elementos essenciais, classificados como macronutrientes e micronutrientes, utilizados para o desenvolvimento dos mesmos. As plantas, organismos autotróficos, captam os nutrientes inorgânicos disponíveis no ambiente para a síntese de seus próprios componentes orgânicos³⁷.

O selênio é um metalóide considerado um micronutriente para alguns animais, bactérias e plantas, no entanto, pode tornar-se tóxico. Sua semelhança química com o S provoca substituições deste elemento por Se em compostos de importância biológica¹¹. Além disso, devido à pequena diferença entre a dose essencial e a tóxica, ele é considerado o mais tóxico entre os elementos essenciais^{12,38-40}.

Este elemento apresenta-se nos solos em diversas formas, de acordo com seu estado de oxidação: selenetos (Se^{-2}), selênio elementar (Se^0), selenito (SeO_3^{-2} , Se^{+4}) e selenato (SeO_4^{-2} , Se^{+6})⁴¹. Alguns estudos mostram que as plantas podem absorver selenato por meio dos transportadores de íons sulfatos das raízes. Enquanto que os íons selenito, possivelmente, são captados por difusão, ou por uso de transportadores de íons fosfato para sua posterior oxidação em selenato, que apresenta maior mobilidade e possibilita o transporte de Se até as partes aéreas das plantas^{39,42}.

Muitas plantas incorporam, de uma forma não específica, selenocisteína (SeCis) e selenometionina (SeMet), no lugar de cisteína (Cis) e metionina (Met), para sintetizar selenoproteínas, as quais têm funções essenciais para o crescimento das plantas. Essas formas orgânicas de Se (seleno-aminoácidos: SeCis e SeMet) surgem da substituição do enxofre (S) pelo Se no metabolismo do S^{11,12,38,43}. Embora as selenoproteínas tenham sido encontradas em uma gama variada de organismos, sua ocorrência e função no reino vegetal ainda não são bem compreendidas^{44,45}.

Algumas pesquisas têm revelado efeitos benéficos e tóxicos do Se no crescimento das plantas^{39,40,46-48}. Dependendo da sua concentração, o Se pode proteger a planta de estresses bióticos e abióticos, e ativar o sistema antioxidante, elevando a expressão da glutathione peroxidase. Wang *et. al.* (2013)⁴⁹, em seus trabalhos com arroz (*Oryza sativa* L.), encontraram que as plantas cultivadas com concentrações baixas de selenito de sódio cresceram rapidamente, enquanto que as plantas cultivadas com concentrações mais elevadas do mesmo sal apresentaram um atraso no crescimento⁴⁹⁻⁵¹. Adicionalmente, alguns estudos demonstram que o Se também possui importância nutricional para os humanos e tem

propriedades preventivas contra o câncer. O seu excesso ou sua deficiência pode afetar a saúde, sendo, portanto, necessária uma ingestão adequada de Se (a dose diária de Se recomendada para os humanos é de 55 - 200 $\mu\text{g g}^{-1}$)^{40,50}.

Embora se saiba que o Se compartilha as vias metabólicas do S nas plantas, estudos ainda tentam elucidar o conteúdo e a natureza das seleno-proteínas, inclusive nas plantas modificadas geneticamente e enriquecidas com diferentes formas químicas de Se, a fim de oferecer mais explicações das vias metabólicas dessas espécies e dos mecanismos de regulação dos efeitos benéficos e tóxicos desse elemento. Esses estudos também buscam aumentar as perspectivas acerca do valor nutricional das seleno-proteínas nos vegetais enriquecidos com Se, as quais parecem possuir efeito quimio-preventivo⁴⁵.

1.4. Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e o estresse oxidativo nas plantas

As plantas apresentam diferentes mecanismos de respostas para conseguirem se desenvolver frente às condições ambientais desfavoráveis (mudanças drásticas de temperatura, presença de contaminantes como, por exemplo, íons metálicos, modificações genéticas, entre outras). Os estresses abióticos e bióticos induzem diversas mudanças nas reações envolvidas na sinalização de defesa vegetal, mecanismos de sinalização celular ou no estresse oxidativo^{33,52,53}. Consequentemente, o metabolismo da planta, a expressão dos seus genes e/ou suas taxas de desenvolvimento podem ser alteradas⁵⁴.

O estresse oxidativo é devido à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), resultantes da ativação ou redução do oxigênio molecular (O_2), que causam danos celulares em organismos aeróbios quando em concentrações superiores a capacidade dos sistemas antioxidantes. As principais ERO são o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e radical hidroxila (OH^{\cdot})^{55,56}.

Os mecanismos de defesa antioxidantes (enzimas e outros compostos não enzimáticos) das plantas previnem ou diminuem o ataque das ERO, danos às proteínas, lipídeos e DNA. A função dos mecanismos é regular os níveis das ERO e outros radicais na célula, utilizando, por exemplo, enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione redutase (GR), ascorbato peroxidase (APX), peroxiredoxina (Prx), polifenol oxidase (PPO) e metabólitos, como a glutathione, ácido ascórbico, α -tocoferol e carotenóides^{33,54}.

Estudos de plantas geneticamente modificadas têm revelado que a própria modificação genética é um evento estressante para a planta. Alterações dos níveis de enzimas como APX, CAT, GR e SOD, além das alterações da expressão de proteínas de defesa vegetal, permitem concluir que as plantas transgênicas possuem a tendência de reestabelecer o equilíbrio interrompido pela alteração gênica ^{8,36}.

O estresse nas plantas causado por íons metálicos pode ser monitorado por meio de alguns parâmetros, como, alterações morfológicas e bioquímicas nos níveis de células e tecidos, e redução em seu desenvolvimento ^{52,57}. Por exemplo, os efeitos do estresse com o metalóide Se revelam uma atrofia no crescimento da raiz, redução da biomassa e da eficiência fotossintética, e até morte da planta ^{8,21,40,49,51,58-60}. Em contrapartida, o Se também tem mostrado efeitos benéficos no crescimento das plantas, pois em baixas concentrações promove o crescimento em plantas seleno-acumuladoras e não seleno-acumuladoras ^{49,61}, aumenta a capacidade antioxidante, reduz a peroxidação de lipídeos, aumentando a acumulação de amido e açúcares, e protege a planta de alguns agentes patogênicos herbívoros ^{39,49,61-63}. Além disso, tem sido identificado que em algumas plantas, o Se ajuda na desintoxicação de muitos metais pesados tóxicos, como cádmio (Cd), chumbo (Pb), arsênio (As) e antimônio (Sb) ⁶⁴⁻⁶⁶. No entanto, os mecanismos de regulação dos efeitos benéficos e tóxicos de Se nas plantas não são bem estabelecidos e entendidos, motivo pelo qual são importantes as pesquisas com este metalóide, tendo em vista o crescente interesse em vegetais enriquecidos com Se para consumo humano, incluindo o uso de transgênicos para atingir o propósito ^{39,61,67}.

CAPÍTULO I. Estudo da acumulação de Se e da produção de espécies reativas de oxigênio nas folhas de *Arabidopsis thaliana* modificadas e não modificadas geneticamente.

1. ASPECTOS TEÓRICOS RELEVANTES

1.1. Técnicas analíticas empregadas

1.1.1. Detecção da modificação genética pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR foi desenvolvida nos anos 80 por Kary Mullis e baseia-se na amplificação exponencial de uma sequência gênica de interesse em função dos ciclos aplicados a partir de uma pequena quantidade do DNA original ²⁴. Em outras palavras, é uma técnica que imita a duplicação do DNA *in vitro*.

Primeiramente, é desenhado e sintetizado um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), complementares às regiões da sequência gênica de cada fita do DNA de interesse. Em seguida, a amostra de DNA, previamente extraída, é incubada junto com os reagentes necessários para a síntese, incluindo os *primers* ⁶⁸.

O processo se dá variando a temperatura das três etapas de cada ciclo do ensaio: aquecimento para desnaturação das cadeias do DNA (aqui, as ligações de hidrogênio entre pares de bases nitrogenadas são quebradas), resfriamento para hibridização ou anelamento dos *primers* (aqui, as sequências dos *primers*, flanqueiam com especificidade ao segmento de DNA de interesse), e temperatura ótima da DNA-polimerase utilizada na síntese das novas fitas do DNA complementar. O conjunto dessas etapas corresponde a um ciclo da reação, e, feito repetidas vezes, produz o DNA idêntico à sequência da amostra original (Figura 3) ²³.

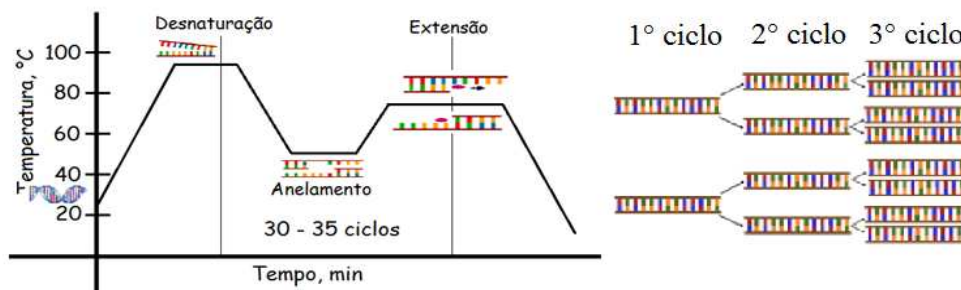


Figura 3. Amplificação exponencial do DNA usando PCR.

Fonte: adaptação <http://www.gmotesting.com/Testing-Options/Genetic-analysis>.

A confirmação do gene previamente amplificado pode ser feita pela estimativa do tamanho em pares de base (pb). Para tanto, é feita sua separação, junto com um marcador

padrão, em um gel de agarose que contém brometo de etídio (EtBr). O EtBr é um composto aromático, que quando intercalado aos ácidos nucleicos da amostra, e exposto aos raios UV, fluoresce proporcionalmente à quantidade de DNA presente ^{23,24}.

1.1.2. Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)

A técnica de ICP-MS tem sido amplamente aplicada a estudos de elementos em baixas concentrações, devido à sua seletividade, alto poder de resolução, caráter multielementar, rapidez nas análises, boa precisão e baixos limites de detecção. O processo de análise compreende na introdução da amostra, transporte até o plasma onde ocorre dessolvatação, vaporização, atomização e ionização. Em seguida, estes íons são focalizados por meio de lentes iônicas e direcionados para o analisador de massas, onde são separados em função da razão massa/carga (m/z) pelo analisador em um ambiente de alto vácuo. Geralmente, um quadrupolo é ideal para análises quantitativas (vide Figura 4) ⁶⁹⁻⁷¹.

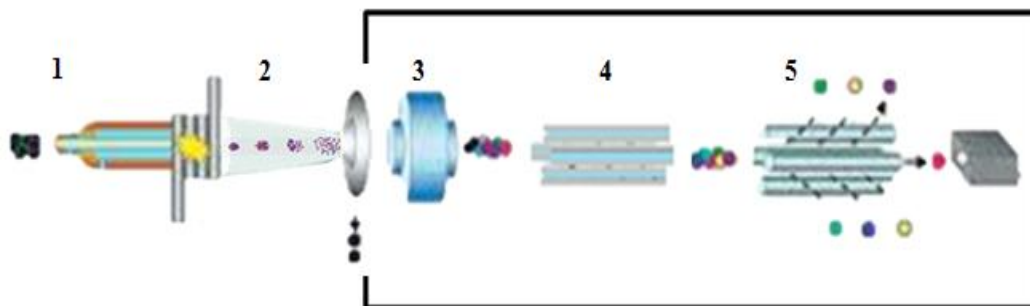


Figura 4. Configuração esquemática do ICP-MS.

Fonte: adaptação de <http://www.mst.or.jp/method/eachmethod/a0008.html>. **1.** Sistema de introdução da amostra **2.** Plasma **3.** Lentes iônicas **4.** Cella de reação e colisão **5.** Analisador de massas.

Na determinação de elementos por ICP-MS, a presença de interferências espectrais e não espectrais impedem que o sinal do isótopo de interesse seja linear com a sua concentração ⁷². As interferências espectrais são causadas por íons atômicos e/ou moleculares que apresentam a mesma massa nominal do isótopo do analito que estão associadas com o gás utilizado para formação do plasma, presentes nos componentes da matriz, solvente ou são provenientes do próprio ambiente. No entanto, as interferências não espectrais estão relacionadas com propriedades físicas da amostra (viscosidade, volatilidade, concentração de

sais ou compostos orgânicos, entre outros) que podem alterar a eficiência no transporte, nebulização e ionização da amostra no plasma ⁷³.

A forma mais eficiente em remover interferências espectrais é o uso de equipamentos de alta resolução, equipados com setor magnético. Outras soluções são a utilização de plasma frio e cela de reação e colisão ^{71,72,74,75}, sendo esta última proposta a mais destacada. Nesta, um gás de colisão e reação é introduzido na cela, localizada entre a óptica iônica e o analisador de massas (vide Figura 4), em uma região de vácuo, que permite reações de transferência de carga, transferência de próton ou oxidação. Os gases mais frequentemente usados na cela dinâmica de reação e colisão são CH₄, NH₃, H₂, He e O₂ ⁷².

A análise da habilidade das plantas em acumular Se, de uma forma confiável utilizando ICP-MS, não é um trabalho muito simples. Uma das principais causas é que a presença de interferências poliatômicas sofridas pelos isótopos estáveis de Se são devidas aos íons moleculares de argônio (Ar), que estão sempre presentes, independentemente do tipo de amostra. Por outra parte, a composição elementar das plantas pode trazer problemas na quantificação do metalóide, como, por exemplo, altos teores de Ca, Zn, Mo, Fe, entre outros, que geralmente formam íons moleculares (vide Tabela 1) ^{71,76,77}.

Tabela 1. Principais interferências sofridas pelos isótopos estáveis de Selênio.

Isótopo (abundância natural, %)	Interferentes
⁷⁴ Se ⁺ (0,89%)	³⁶ Ar ³⁸ Ar; ³⁶ Ar ³⁸ S; ⁴⁰ Ar ³⁴ S; ⁵⁶ Fe ¹⁸ O; ⁵⁸ Ni ¹⁶ O; ³⁷ Cl ₂
⁷⁶ Se ⁺ (9,36%)	³⁸ Ar ₂ ; ³⁶ Ar ⁴⁰ Ar; ⁴⁰ Ar ³⁶ S; ⁶⁰ Ni ¹⁶ O; ⁵⁸ Ni ¹⁸ O; ⁵⁹ Co ¹⁷ O
⁷⁷ Se ⁺ (7,63%)	³⁸ Ar ₂ H; ³⁶ Ar ⁴⁰ ArH; ⁴⁰ Ar ³⁷ Cl; ⁶¹ Ni ¹⁶ O; ⁶⁰ Ni ¹⁷ O; ⁵⁹ Co ¹⁸ O
⁷⁸ Se ⁺ (23,78%)	³⁸ Ar ⁴⁰ Ar; ³⁹ Ar ₂ ; ⁶² Ni ¹⁶ O; ⁶¹ Ni ¹⁷ O; ⁶⁰ Ni ¹⁸ O; ³⁸ Ar ⁴⁰ Ca ⁺
⁸⁰ Se ⁺ (49,61%)	⁴⁰ Ar ₂ ; ⁶² Ni ¹⁸ O; ⁶³ Cu ¹⁷ O; ⁶⁴ Zn ¹⁶ O; ³² S ¹⁶ O ₃ ; ⁴⁰ Ar ⁴⁰ Ca
⁸² Se ⁺ (8,73%)	⁴⁰ ArH ₂ ; ⁶⁴ Zn ¹⁸ O; ⁶⁶ Zn ¹⁶ O; ¹² C ³⁵ Cl ₂ ; ³³ S ¹⁶ O ₃ H ⁺ ; ³⁴ S ¹⁶ O ₃ ⁺ ; ⁴⁰ Ar ⁴² Ca

Equipamentos que contêm um quadrupolo para remoção de interferentes, como utilizado nesta pesquisa, permitem remover íons indesejáveis na quantificação de Se, utilizando a adição de um gás colisional ou reacional como metano, oxigênio ou monóxido de carbono ^{8,64,71,76,78,79}.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Analisar os efeitos da irrigação com selênio e/ou da modificação genética da planta de *A. thaliana*, por meio do estudo da acumulação de Se e da produção de espécies reativas de oxigênio.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Cultivar, em casa de vegetação, as plantas de *A. thaliana* MG e N-MG para obtenção da amostra.
- ✓ Comprovar a modificação genética nas plantas por PCR.
- ✓ Quantificar o conteúdo de Se nas folhas utilizando as condições ótimas de trabalho no ICP-MS.
- ✓ Estudar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) nos grupos de folhas de todos os tratamentos.
- ✓ Avaliar os efeitos do Se e/ou da modificação genética no metabolismo das plantas da *A. thaliana*.

3. PARTE EXPERIMENTAL

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 (*ca.* 18,2 MΩ cm), obtida a partir de um sistema de purificação de água Milli-Q Direct Q (Millipore, Estados Unidos).

Antes do uso, todos os materiais foram lavados e colocados em banho de Extran 2% v/v (Merck, Alemanha) por, no mínimo, 2 h. Posteriormente, foram lavados utilizando água deionizada e descontaminados em banho de ácido nítrico, HNO₃, 10% v/v (Merck, Alemanha) por, no mínimo, 12 h. Finalmente, foram enxaguados utilizando água deionizada, secos em estufa, exceto os materiais volumétricos, que foram secos à temperatura ambiente.

Para limpeza, descontaminação e descarte das amostras modificadas geneticamente e do material contaminado foi empregado hipoclorito de sódio por 12 h e posterior esterilização em autoclave, a 120 °C durante 20 minutos.

3.2. Aquisição das amostras

Para obtenção das folhas analisadas, as sementes modificadas geneticamente (MG) e não modificadas geneticamente (N-MG) utilizadas no cultivo das plantas foram da espécie *Arabidopsis thaliana*, doadas pelo Prof. Dr. Carlos H.I. Ramos (IQ/UNICAMP) e oriundas do trabalho de Gonçalves *et al.* (2012)²⁵, cujo ecótipo originário das plantas N-MG é Columbia (Col-0). Tanto as sementes N-MG como a cepa GV3101 (*Agrobacterium tumefaciens*) utilizada para a transformação das plantas, foram originalmente obtidas pelo Prof. Michel Vincentz (CBMEG/UNICAMP).

As sementes de *A. thaliana* MG utilizadas para obtenção das amostras foram obtidas de plantas transformadas indiretamente, mediante uso do *Agrobacterium tumefaciens* (processo descrito na seção 1.2). O vetor pCAMBIA2300 (Apêndice 1), utilizado na modificação do *Agrobacterium*, continha a porção de DNA transferida e integrada no genoma da planta que compreende a sequência de interesse, assim como de um gene de resistência a canamicina em plantas (*NPTII*) e sua sequência promotora (CAMV35S). Esta última responsável pela regulação da expressão do gene para a planta inteira²⁹.

O processo de modificação feito por Gonçalves no Instituto de Biologia da Unicamp tinha a finalidade de produzir uma planta transgênica por meio da inserção do gene da chaperona (Hsp90) de cana-de-açúcar para verificar a influência desta proteína no desenvolvimento vegetal, fenótipo e resistência a estresses ²⁵.

Devido ao uso de amostras geneticamente modificadas, este trabalho de pesquisa foi aprovado pela Comissão Interna de Biossegurança do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, com o protocolo MAZA2013-1 (vide Apêndice 2).

3.3. Condições do cultivo

Os cultivos da *A. thaliana* foram feitos na casa de vegetação do Laboratório de Genômica e Expressão do Instituto de Biologia da UNICAMP (LGE-IB/UNICAMP) entre os meses de agosto a outubro de 2013 e junho a julho de 2014. A temperatura durante o desenvolvimento das plantas foi regulada na faixa de 21 a 26 °C, com foto-período de 12 h.

Inicialmente, as sementes ficaram incubadas em água deionizada, a 4 °C por 2 dias. Para o plantio, cada vaso continha aproximadamente 90 g de uma mistura 1:1 de substrato (Tropstrato^{HT} Hortaliças, Vida VerdeTM) e vermiculita expandida (Terra MasterTM), previamente esterilizadas em autoclave ⁸. Dentro de cada vaso foram semeadas, em média, cinco sementes. Logo após, esses vasos foram colocados em bandejas envolvidas com plástico de cloreto de polivinila (PVC), para manter a umidade do meio. Depois de três dias, tempo mínimo para visualização do primeiro par de folhas, os plásticos foram perfurados para permitir o desenvolvimento da planta, mantendo-se a umidade.

Durante os primeiros 10 dias do cultivo, os vasos foram irrigados em dias alternados com a mesma quantidade de água deionizada. A planta mais desenvolvida foi mantida em cada vaso, e as demais descartadas. Após este tempo, as plantas MG e N-MG foram irrigadas com a mesma frequência e quantidade de solução característica de cada tratamento, de acordo com a Tabela 2. Cada um desses grupos continha, no total, 60 plantas.

Tabela 2. Condições de irrigação empregadas para o cultivo de *A. thaliana*.

Tratamento	Solução de irrigação	Massa de Se adicionada ao final do plantio (µg)
Controle	Água deionizada	0
Dose inferior de Se	15 µmol L ⁻¹ de Na ₂ SeO ₃	154
Dose superior de Se	30 µmol L ⁻¹ de Na ₂ SeO ₃	308

A fonte de Se, e a sua concentração, empregada no tratamento das plantas (Tabela 2), foi escolhida baseando-se em dados de estudos anteriores, desenvolvidos por Silva (2012) e Maciel (2014) em nosso grupo de pesquisa, com cultivos de Girassol e *A. thaliana* irrigados com uma solução de Se ^{8,80}.

Após seis semanas, em média, do início do plantio, as folhas foram recolhidas, lavadas com água deionizada e colocadas em sacos plásticos herméticos. Nitrogênio (N₂) líquido e gelo seco permitiram conservar as amostras antes de serem armazenadas no bio-freezer (modelo 356070, Forma Scientific) com temperatura registrada em -80 °C, para posterior etapa de análise.

3.4. Condições da técnica da PCR

Com a finalidade de confirmar a modificação genética das plantas MG, foi usada a técnica da PCR. O DNA das plantas N-MG foi o controle negativo do gene de interesse e o plasmídeo pCambia2300 foi o controle positivo, este ultimo originalmente utilizado no processo de modificação da planta. Foram utilizadas a polimerase GoTaq Flex e PTU, enzimas comerciais de simples manipulação e com alta especificidade de reação (altos rendimentos na amplificação), a fim de conseguir utilizar diferentes *primers*.

Neste sentido, foram testados os *primers* ubiquitina e *NPTII*, que correspondem a um *primer* comum da *A. thaliana* e a uma parte da sequência do vetor utilizado para a modificação genética responsável pela resistência da planta à canamicina, respectivamente ^{8,25}. A extração do DNA foi feita seguindo o protocolo originalmente descrito para a extração do RNA por Zeng & Yang (2002) ⁸¹ e modificado por Provost *et al.* (2007) ⁸². A precipitação foi substituída pela utilização de isopropanol por 12 h, seguida de lavagens consecutivas do precipitado com etanol. A concentração e qualidade do material genético obtido foram avaliadas com *Nanodrop 2000 instrument* (Thermo Scientific).

Com base nos dados de quantificação, o DNA foi diluído a 100 ng μL^{-1} para a PCR. As quantidades dos componentes para o PCR e a sequência do termociclador para cada *primer* utilizado são mostradas na Tabela 3.

Tabela 3. Condições para a PCR das amostras.

Primer	Mistura para PCR	Sequência do termociclador
Ubiquitina	2,0 µL tampão da polimerase (Promega)	94 °C por 5 min, para iniciar desnaturação; 35 ciclos: em 94 °C por 40 s (desnaturação); 55 °C por 30 s (anelamento) e 72 °C por 30 s (extensão); 72 °C por 7 min.
	0,6 µL MgCl ₂ 25 mmol L ⁻¹ (Promega)	
	0,6 µL dNTP's 10 mmol L ⁻¹ (Promega)	
	1 µL PF 5 mmol L ⁻¹ , <i>primer forward</i> (Promega)	
	1 µL PR 5 mmol L ⁻¹ , <i>primer reverse</i> (Promega)	
	1 µL DNA amostra, 100 ng µL ⁻¹	
	0,2 µL Polimerase (Go Taq Flex, Promega)	
	3,6 µL Água	
NPTII	1,0 µL tampão da polimerase (Promega)	94 °C por 5 min, para iniciar desnaturação; 30 ciclos: em 94 °C por 40 s (desnaturação); 56 °C por 40 s (anelamento) e 72 °C por 5 min (extensão); 72 °C por 7 min.
	0,6 µL dNTP's 10 mmol L ⁻¹ (promega)	
	1 µL PF 5 mmol L ⁻¹ , <i>primer forward</i> (Promega)	
	1 µL PR 5 mmol L ⁻¹ , <i>primer reverse</i> (Promega)	
	1 µL DNA amostra, 100 ng µL ⁻¹	
	0,2 µL Polimerase, (<i>Pfu</i> DNA, Promega)	
	5,2 µL Água	

Resumidamente, os elementos envolvidos na reação são basicamente os mesmos componentes do processo de replicação que ocorre nas células vivas, sendo eles: uma mistura dos nucleotídeos (desoxirribonucleotídeos trifosfatados, dNTPs) necessários para a síntese das novas fitas de DNA, desoxiadenosina trifosfatada (dATPs), desoxicitidina trifosfatada (dCTPs), desoxiguanosina trifosfatada (dGTPs) e desoxitimidina trifosfatada (dTTPs); uma enzima DNA-polimerase em solução tampão, responsável pela síntese das novas fitas de DNA; cloreto de magnésio (MgCl₂) que é o co-fator da reação; e dois iniciadores ou *primers*, que delimitam à região de amplificação (*primer forward*, PF e *primer reverse*, PR) ⁸³, vide Tabela 3.

Terminada a PCR, a separação dos fragmentos de DNA amplificados foi realizada em gel de agarose 1% m/v em 100 mL de solução tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA: 0,2 mol L⁻¹ tris-hidroximetil-aminometano, 5,7 mL de ácido acético e 50 mmol L⁻¹), contendo 4 µL de brometo de etídio 10 mg mL⁻¹. Foi utilizada uma voltagem de 90 V para a corrida eletroforética. A detecção foi realizada em exposição à radiação UV, em um comprimento de onda de 265 nm.

Todos os experimentos para confirmação da modificação genética nas plantas sob estudo foram desenvolvidos no LGE-IB/UNICAMP, dirigido pelo prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira.

3.5. Determinação da quantidade total de selênio utilizando ICP-MS

A presença de interferentes na quantificação de Se por ICP-MS exigiu a otimização de um método para a sua determinação, visando a sua aplicação nos estudos metalômicos das folhas de *A. thaliana* MG e N-MG e na avaliação dos efeitos da modificação genética, por meio da comparação da acumulação e resistência das plantas à irrigação com selenito de sódio. O equipamento utilizado foi um ICP-MS modelo ELAN[®] DRC-e, PerkinElmer, EUA.

Primeiramente, foram escolhidas as condições de trabalho da cela de reação e colisão, do equipamento de ICP-MS, para remoção dos íons interferentes dos isótopos de Se e, conseqüentemente, a otimização das condições para quantificação do metalóide foi realizada. Para tanto, foram preparadas soluções padrão de Se e os principais interferentes de seus isótopos, em diferentes proporções: 1:4 e 1:10.

Em seguida, foram feitas medidas das contagens de Se em cada solução para cada parâmetro: RPq (0,4 – 1,0 V), vazão do gás da cela (0,4 - 1,5 mL min⁻¹) e natureza do gás de reação e colisão (CH₄ e O₂) para diferentes isótopos de Se (*m/z* 77, 78, 80, 82). Quando o gás da cela era O₂ também foi avaliado o ⁹⁶SeO⁺. Com isso, foi calculada a relação de contagens de Se de cada *m/z* monitorada, em função de cada parâmetro variado, utilizando a Equação 1. Assim, foram escolhidas as condições favoráveis da cela para quantificação de Se, para cada *m/z* monitorada.

$$\text{Relação contagens de Se} = \frac{\text{Contagens de Se da solução padrão de Se}}{\text{Contagens de Se da solução de interferentes}}$$

Equação 1. Cálculo da relação de contagens de Se das soluções padrões.

Para avaliar a exatidão da determinação e quantificação de Se foram feitas curvas de calibração externa, utilizando uma solução padrão para o ICP de 1000 mg L⁻¹ de Se (Merck, Alemanha), sob as condições favoráveis da cela para cada isótopo. Foi determinada a concentração de Se nos materiais de referência certificado (MRC) farinha de arroz (1568a *Rice fluor*) e sedimento marinho (*Marine sediment* PACS-2). Para isso, 150 mg de cada MRC foram diretamente pesadas em frascos de politetrafluoretileno e submetidas à decomposição ácida utilizando 0,5 mL de H₂O₂ e 6,0 mL de ácido nítrico (HNO₃). Foi empregado um forno micro-ondas do tipo cavidade, (Provecto Analítica, Jundiaí, Brasil) com magnetron operando

na frequência de 2453 ± 13 MHz e potência nominal de 1200 W, com um programa de operação de 5 min @ 400 W; 8 min @ 790 W; 4 min @ 320 W.

As soluções obtidas após a decomposição foram levadas até quase secura (*ca.* 80 °C), filtradas e retomadas em um volume que permitisse atingir uma concentração de, no máximo, 1% v/v de HNO₃. Posteriormente, foram realizadas as determinações quantitativas de Se nos dois MRCs^{64,76}. O primeiro MRC continha uma baixa relação entre as concentrações de Se e aquelas espécies que podem provocar interferências e, o segundo MRC, uma alta relação, como mostrado na Tabela 4.

Tabela 4. Relação das concentrações de Se e seus interferentes nos MRC farinha de arroz (1568a *Rice flour*) e sedimento marinho (*Marine sediment* PACS-2).

Farinha de arroz		Sedimento marinho	
Se (mg kg ⁻¹)	Interferentes (mg kg ⁻¹)	Se (mg kg ⁻¹)	Interferentes (mg kg ⁻¹)
0,38±0,04	Cu (2,4 ± 0,3)	0,92±0,22	Cu (310 ± 12)
	Zn (19,4 ± 0,5)		Zn (364 ± 23)
	Mo (1,46 ± 0,08)		Ni (40 ± 2)
	Ca (0,0118 ± 0,0006 %*)		Co (11,5 ± 0,3)
			Mo (5,4 ± 0,3)
			Ca (2,0 ± 0,2 %*)

*Concentração em porcentagem de massa (%)

O método de decomposição, empregado no preparo da amostra para quantificação de Se, já havia sido utilizado em nosso grupo de pesquisa para decomposição de outros materiais de origem vegetal e determinações de diferentes analitos, incluindo Se^{76,77}. O uso de dois diferentes MRCs teve o propósito de testar a robustez das condições de trabalho no ICP-MS, por meio da comparação dos resultados de quantificação de Se em amostras que contem baixa e alta concentração de interferentes.

Finalmente, para a quantificação de Se presente nas folhas de *A. thaliana* realizou-se, primeiramente, homogeneização do material vegetal, macerando-o com N₂ líquido. Em seguida, este foi seco, até obtenção de massa constante, utilizando uma estufa com temperatura ajustada a 37 °C. Para o preparo da amostra foi seguido o protocolo previamente descrito, utilizado na decomposição do MRC. As soluções obtidas após a decomposição foram levadas até quase secura (*ca.* 80 °C), filtradas e retomadas utilizando solução 1% v/v de HNO₃ até um volume de 10 mL. Posteriormente, foram empregadas as condições ótimas encontradas para o trabalho no ICP-MS, aplicando um fator de diluição para as amostras, de acordo com os fatores mostrados na Tabela 5.

Tabela 5. Fatores de diluição para a determinação de Se total nas folhas.

Tratamento	Quantidade total de Se irrigado (μg)	Fator de diluição
Controle	0	3
Dose inferior de Se	154	50
Dose superior de Se	308	50

3.6. Estudo da produção de espécies reativas de oxigênio, ERO, nas folhas de *A. thaliana*

As análises dos estudos enzimáticos e a determinação de H_2O_2 e peroxidação lipídica nas folhas de *A. thaliana* sob estudo foram realizadas no laboratório de Genética e Bioquímica de Plantas, localizado no departamento de Genética na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), Universidade de São Paulo, Piracicaba, sob a supervisão do Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo.

3.7. Análise da atividade enzimática

Para determinação da atividade das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) foi necessário realizar a extração das proteínas do material vegetal. Para isso, aproximadamente, 1,0 g de folhas de cada grupo em estudo foram homogeneizados com N_2 líquido, utilizando almofariz e pistilo. Em seguida, foram maceradas durante 10 min com 3 mL do tampão de extração, 100 mmol L^{-1} de fosfato de potássio a pH 7,5 (KH_2PO_4 99,4% e K_2HPO_4 99,5%, J.T. Baker, México), 1 mmol L^{-1} de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, Mallinckrodt U.S.P. GenAR), 3 mmol L^{-1} de ditioneitol (DTT, 99%, GE Healthcare Life Sciences, Alemanha) e 4% m/v de polivinil-polipirrolidona (PVPP, Synth). Após a extração, procedeu-se à centrifugação a 1000 rpm durante 30 min, 4 °C. O sobrenadante foi coletado e armazenado no bio-freezer para posterior determinação das proteínas solúveis e das atividades enzimáticas.

O método de Bradford (1976) foi utilizado para quantificação das proteínas nos extratos das folhas. Para isso, foi utilizado, como padrão de proteína, a BSA, e um comprimento de onda de 595 nm para as leituras. Então as atividades enzimáticas foram calculadas ⁸⁴.

A atividade da CAT foi determinada de acordo ao método proposto por Azevedo *et al.* (1998) ⁸⁵. O ensaio foi realizado a 25 °C, utilizando 1 mL de tampão de fosfato de potássio

100 mmol L⁻¹ pH 7,5; 25 µL de H₂O₂ (30%, Merck) e 25 µL de extrato proteico. A decomposição do H₂O₂, monitorada espectrofotometricamente com o decréscimo da absorbância a 240 nm durante um minuto, permitiu determinar a atividade dessa enzima, a qual é expressa em µmol de H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ de proteína. O coeficiente de extinção utilizado para o cálculo da atividade foi 39,4 mmol L⁻¹ cm⁻¹.

A atividade da SOD foi determinada pela capacidade da enzima em inibir a foto-redução do cloreto de nitrotetrazólio azul (NBT) em presença da luz, como proposto no método de Giannopolis *et al.* (1977)⁸⁶, e modificado por Azevedo *et al.* (1998)⁸⁵. A reação foi realizada em um volume de 3 mL de uma solução composta de 75 µmol L⁻¹ NBT, 5 µmol L⁻¹ de riboflavina, 13 mmol L⁻¹ de metionina, 0,1 mmol L⁻¹ EDTA, tampão de fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 7,8 e 30 µL do extrato das folhas. Esse meio de reação foi iluminado com lâmpadas fluorescentes durante 5 min. Em seguida, foi determinada a atividade da SOD em um espectrofotômetro a 560 nm. Os resultados foram expressos em unidades de SOD mg⁻¹ de proteína.

3.8. Determinação da peroxidação de lipídeos e quantificação de peróxido de hidrogênio, H₂O₂

Para determinação da peroxidação de lipídeos e quantificação de H₂O₂, foram homogeneizados 0,4 g de tecido foliar fresco em banho de gelo com 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% m/v, contendo aproximadamente 20% de PVPP. Depois de perfeita homogeneização, o extrato foi centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos a 4 °C, e, posteriormente, utilizado na determinação de H₂O₂ e peroxidação lipídica.

A peroxidação de lipídeos foi avaliada por meio da produção de metabólitos reativos ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), principalmente malondialdeído (MDA) baseado nos trabalhos de Heath *et al.* (1968) e Buege *et al.* (1978)^{87,88}. Neste método, à uma alíquota de 0,25 mL do sobrenadante, extraído do material vegetal, como foi descrito anteriormente, foi adicionado 1 mL de TCA (20%) contendo 0,5% de TBA. A mistura foi deixada em banho-maria a 95 °C por 30 min, e, posteriormente, resfriada em gelo por 10 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 min. Uma vez atingida a temperatura ambiente, foram feitas as leituras em um espectrofotômetro a 535 e 600 nm. Os resultados foram expressos em nmol de MDA g⁻¹ de matéria fresca, utilizando como coeficiente de extinção, 155 mmol L⁻¹ cm⁻¹.

Para a determinação do conteúdo de H_2O_2 foi utilizado o método de acordo com Alexieva *et al.* (2001) ⁸⁹. Para tanto, foram retirados 0,2 mL do sobrenadante, do extrato previamente obtido, e foi adicionado 0,2 mL de tampão fosfato de potássio 100 mmol L^{-1} pH 7,5 e 0,8 mL de iodeto de potássio (KI) 1 mol L^{-1} . A solução foi deixada em banho de gelo por 1 h, no escuro. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 390 nm. A quantidade de peróxido de hidrogênio foi obtida a partir de uma curva de calibração com concentrações conhecidas de H_2O_2 .

3.9. Avaliação estatística

Os resultados das medidas foram expressos como média \pm desvio padrão das replicatas para cada determinação. As diferenças significativas entre os valores das folhas N-MG e MG, para um mesmo tratamento, foram determinadas utilizando o teste estatístico *t* de *Student* com $p < 0,05$. Entretanto, as diferenças significativas entre os valores devido à presença do Se (comparação da mesma amostra sob as condições dos diferentes tratamentos) foram determinadas pela análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey, utilizando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Plantio da *Arabidopsis thaliana*

A esterilização do solo foi necessária para o desenvolvimento das plantas na casa de vegetação, para eliminar as hifas de fungos que se unem à raiz do vegetal, visando prevenir que as mesmas atrapalhem no procedimento de absorção do Se ^{8,64}. Os procedimentos de vernalização das sementes e de esterilização do solo, bem como dos materiais utilizados no cultivo, demonstraram-se adequados, visto os bons resultados obtidos em relação ao desenvolvimento das plantas da *A. thaliana* na casa de vegetação (Figura 5).



Figura 5. Cultivo de *Arabidopsis thaliana* MG e N-MG na casa de vegetação do IB/UNICAMP.
Fonte: obtida em câmera Olympus, modelo VH-210.

Após a coleta das amostras, feita antes da floração da planta, para evitar que o Se passasse para as novas estruturas, determinou-se a massa úmida média por planta para cada tratamento (relação entre massa total de folhas e o número de plantas). A quantidade de plantas por tratamento foi de 36 (vide Tabela 6).

Tabela 6. Peso úmido médio por planta para cada grupo tratamento cultivado.

Tratamento	Quantidade total de Se irrigado (μg)	Massa úmida média por planta (g pl^{-1})	
		N-MG	MG
Controle	0	5,54	6,00
Dose inferior de Se	154	4,94	5,99
Dose superior de Se	308	4,47	5,16

Ao analisar os dados da Tabela 6, observou-se que a massa úmida média das plantas controle e as tratadas com a dose inferior de Se apresentaram pouca diferença, principalmente

entre as plantas MG. Assim, pode-se inferir que esta dose de Se não se mostrou tóxica para a planta, uma vez que as propriedades fisiológicas, em nível macroscópico, não apresentaram sinal de estresse, o que foi refletido na produção da massa folhar, Figura 6.

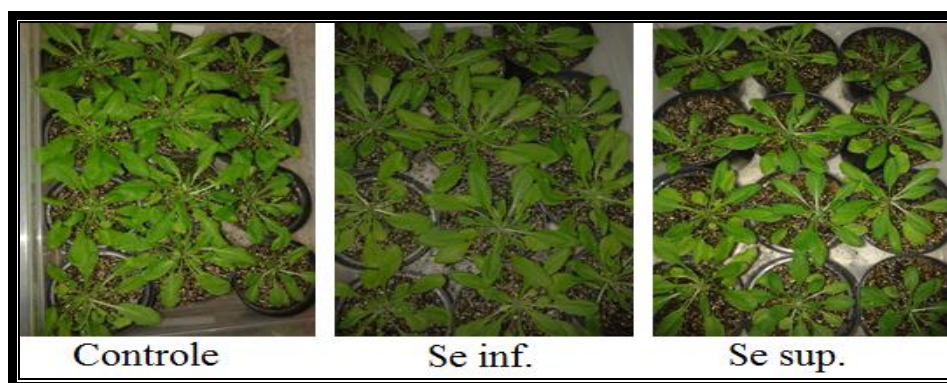


Figura 6. Diferença de tamanho entre os tratamentos com Se das plantas N-MG
Fonte: obtida em câmera Olympus, modelo VH-210.

A diferença percebida entre as massas úmidas médias das plantas controle e as tratadas com dose superior de Se confirmam que a presença de Se, na concentração utilizada, afeta o desenvolvimento da planta, em termos de massa orgânica, como mostrado na Figura 6. Este fato também foi encontrado na pesquisa de Wang *et al.* (2012), onde altas concentrações de Se atrasaram o desenvolvimento do arroz. Na pesquisa da Maciel *et al.* (2014), as plantas de *A. thaliana* N-MG controle apresentaram uma maior abundância nas proteínas RuBisCo e Chaperonin Hsp60, quando comparadas com as plantas tratadas com Se. Estas duas proteínas contribuem para o processo de assimilação de CO₂ no ciclo de Calvin ^{8,51}.

Adicionalmente, quando são comparadas as plantas MG e N-MG, pode-se perceber que as MG sempre tiveram uma maior massa úmida média, principalmente as tratadas com Se. As concentrações de selenito de 154 µg e 308 µg diminuíram a massa úmida média em 11% e 19%, respectivamente, nas folhas N-MG, e 0,2% e 14%, respectivamente, para as folhas MG (vide Tabela 6). Isto mostra que as plantas MG conseguiram se desenvolver mais facilmente na presença do estresse abiótico (sal de Se), revelando serem mais resistentes às condições utilizadas nesta pesquisa. A modificação genética produziu uma resposta diferente da planta frente ao estresse, resultado também encontrado, em nível proteômico, por Maciel *et al.* (2014) ⁸.

Ao longo do desenvolvimento do cultivo observou-se que as plantas irrigadas com maior quantidade de Se ficaram com um maior número de folhas amareladas e com um tamanho menor, como mostrado nas Figuras 6 e 7. Além disso, seu sistema radicular sempre

foi menos desenvolvido em comparação a outros tratamentos, tanto para as plantas MG como para as N-MG. As evidências de estresse que as plantas apresentaram, devido ao Se, já foram reportadas em outros estudos proteômicos em plantas como arroz, *Arabidopsis thaliana* e girassol, entre outras. Naqueles estudos, as proteínas envolvidas com estresse oxidativo e defesa vegetal são diferenciais por se encontrar em maior abundância nos tratamentos com Se 8,49,51,64.

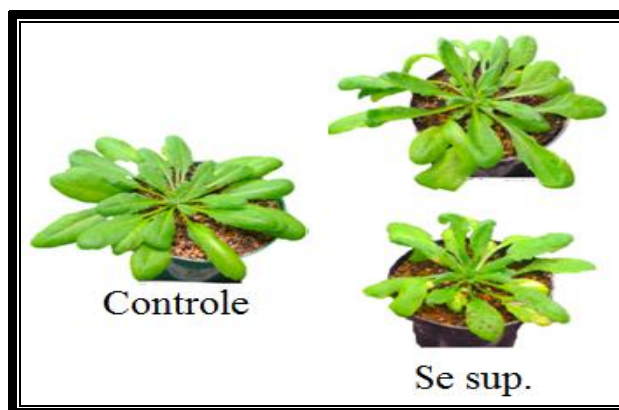


Figura 7. Comparação da cor amarela nas folhas controle e tratadas com dose superior de Se.

As observações encontradas durante os cultivos confirmam que o Se tem efeitos benéficos e tóxicos nas plantas, dependendo da sua concentração e da natureza da planta 40,49,51. Além disso, é possível perceber a resistência que a modificação genética, realizada nas plantas utilizadas nesta pesquisa (Gonçalves *et. al* 2012) ²⁵, produz na *A. thaliana* MG durante seu desenvolvimento na presença do selenito, quando comparada com as plantas N-MG sob as mesmas condições.

4.2. Comprovação da modificação genética pela técnica da PCR

Com o objetivo de confirmar a modificação genética nas plantas estudadas, foi realizada uma PCR do DNA, previamente extraído e quantificado como descrito na seção 4.3., das folhas da *A. thaliana*, utilizando o *primer NPTII* (gene responsável da resistência à canamicina nas plantas). Além disso, foram feitas análises utilizando Ubiquitina, *primer* específico para um gene comum, presente nesta planta.

Na Figura 8 A, no primeiro PCR é mostrada uma amplificação de aproximadamente 1000 bp nas amostras MG e no vetor pCambia2300 (desenhado para o procedimento da modificação genética), controle positivo da reação. As amostras N-MG não tiveram esta

amplificação, confirmando que as amostras utilizadas neste trabalho são diferentes: um grupo não modificado geneticamente, que não tem o gene para resistência à canamicina, e outro modificado geneticamente, resistente à canamicina.

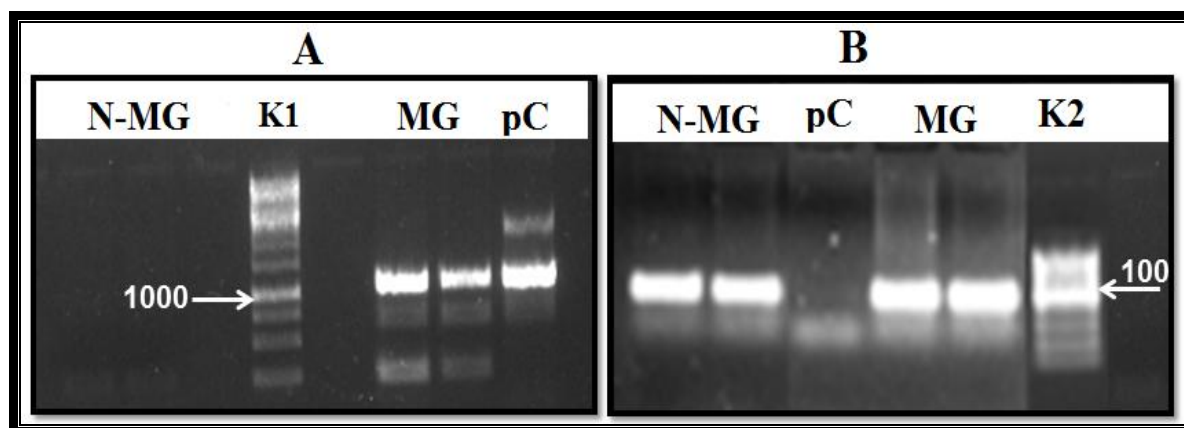


Figura 8. Gel de agarose 1% m/v, PCR do DNA N-MG, MG e vetor pCambia2300 (pC): *primer* específico para controle positivo do (A) gene *NPTII*, ~1000 pb (B) gene ubiquitina, ~100 pb. K1 e K2 são marcadores de massa molecular, 1 kb (*Life Technologies*) e 100 bp (*Thermo Scientific*) respectivamente. Fonte: obtida do aparelho Biosystems, $\lambda = 265$ nm.

No segundo PCR, Figura 8 B, é mostrada a amplificação ao redor de 100 bp do gene ubiquitina para as amostras MG e N-MG. Para o vetor pCambia2300 (utilizado como controle negativo nesta reação) esta amplificação, de 100 pb, não foi evidente devido ter sido desenhado no laboratório para realizar a modificação genética. Mostrando que os dois grupos de plantas testadas neste trabalho são *A. thaliana*.

Deve-se ressaltar que além dos *primers* anteriormente mostrados, foram testados outros, como o Hsp90. Esta sequência é da chaperona molecular Hsp90 da cana-de-açúcar, que era o objetivo do processo de transgenia de Gonçalves (2012)²⁵ para as plantas utilizadas nesta pesquisa. No entanto, não foi possível a amplificação deste gene, provavelmente devido a este gene estar em níveis reduzidos, ou o processo de transgenia não ter sido exitoso.

Entretanto, os resultados de Gonçalves (2012) e Maciel (2014)^{8,25} mostraram diferenças na germinação, comprimento de raízes, produção de proteínas entre as plantas de *A. thaliana* N-MG e MG. Assim, e somado os resultados da PCR e as diferentes análises descritas nesta dissertação, pode-se afirmar que as plantas têm o seu genoma modificado e que esta alteração está permitindo que a planta MG apresente comportamento diferencial, quando comparada com a planta N-MG.

Vale à pena lembrar que os organismos geneticamente modificados (OGM) são produtos de uma técnica de laboratório, que, de alguma forma, altera o seu genoma, enquanto

que um organismo transgênico é o resultado de uma técnica específica de inserção de uma sequência de DNA de outra espécie. Assim, não se pode afirmar que as plantas desta pesquisa sejam transgênicas, mas é correto afirmar que se classificam como OGM^{29,90,91}.

4.3. Quantificação total de selênio utilizando ICP-MS

Antes da determinação do conteúdo total de Se nas folhas de *A. thaliana*, foi necessário otimizar as condições de trabalho no ICP-MS, principalmente os parâmetros da cela de reação e colisão, visando a eliminação dos interferentes para os isótopos monitorados de Se.

Uma vez analisada a relação de contagens de Se entre as soluções padrões de Se e interferentes para cada razão m/z , foram escolhidos os valores encontrados de vazão e RPq para cada isótopo de Se, como mostrado na Tabela 7. Estas condições foram aquelas na qual a relação de contagens de Se apresentou um maior valor, devido a que se pode inferir que as contagens de Se serem provenientes principalmente da solução padrão de Se, e não das contagens devido às interferências.

Tabela 7. Condições de operação da cela de reação e colisão para diferentes isótopos de Se.

Isótopos monitorados	Tipo de gás	Vazão do gás (mL min ⁻¹)	RPq (V)
⁸² Se ⁺	Metano	0,7	0,4
⁷⁷ Se ⁺ , ⁷⁸ Se ⁺ , ⁸⁰ Se ⁺	Metano	0,7	0,8
⁸⁰ Se ¹⁶ O ⁺	Oxigênio	0,8	0,6
⁷⁷ Se ⁺ , ⁷⁸ Se ⁺ , ⁸⁰ Se ⁺ , ⁸² Se ⁺	Oxigênio	0,8	0,8

Para validação das condições encontradas para quantificação de Se, foram feitas curvas de calibração externa monitorando cada isótopo com as suas condições favoráveis da cela (vide Tabela 7). Em seguida, a exatidão da determinação foi calculada empregando-se os MRC de farinha de arroz e sedimento marinho, os quais foram previamente decompostos (vide Tabela 8). O uso de dois diferentes MRC teve o propósito de testar a robustez das condições de trabalho no ICP-MS, por meio da comparação dos resultados de quantificação de Se em amostras que contêm baixa e alta concentração de interferentes.

Tabela 8. Dados de quantificação das razões m/z monitoradas de Se utilizando CH_4 e O_2 como gás na cela de reação e colisão do ICP-MS.

Isótopo monitorado (abundância natural, %)	Gás na cela	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Farinha de arroz	Sedimento marinho
			% Recuperação	% Recuperação
$^{77}\text{Se}^+$ (7,63%)	CH_4	0,94	106 ± 6	112 ± 3
	O_2	0,94	80 ± 18	108 ± 41
$^{78}\text{Se}^+$ (23,78%)	CH_4	0,43	95 ± 8	118 ± 3
	O_2	1,74	87 ± 19	139 ± 12
$^{80}\text{Se}^+$ (49,61%)	CH_4	0,20	104 ± 9	96 ± 6
	O_2	2,43	111 ± 8	155 ± 50
$^{82}\text{Se}^+$ (8,73%)	CH_4	0,33	119 ± 13	593 ± 15
	O_2	2,07	87 ± 8	162 ± 21
$^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$	O_2	0,91	482 ± 3	ND*

*ND: não determinado

A faixa de concentração na determinação de Se esteve entre 0,5 a $20 \mu\text{g L}^{-1}$, e obtiveram-se coeficientes de correlação (r^2) superiores a 0,998 para todas as m/z de Se testadas. Além disso, foram obtidos limites de quantificação entre 0,20–2,43 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Tabela 8). O LD e o LQ instrumental foram definidos em termos do desvio-padrão de medidas do branco. O LD foi obtido de acordo com o critério 3δ ($3 \times$ desvio padrão de 20 medidas do branco dividido pela inclinação da curva), e o LQ de acordo com o critério 10δ ($10 \times$ desvio padrão de 20 medidas do branco dividido pela inclinação da curva) ⁹².

Baseando-se nos resultados das porcentagens de recuperação obtidos para os dois MRCs estudados (Tabela 8), foi escolhido o CH_4 como gás de reação e colisão e as razões m/z 78 e 80 para quantificar o Se, uma vez que estas duas razões apresentaram porcentagens de recuperação satisfatórias (medida da exatidão da determinação), independente do MRC utilizado. Também se pôde confirmar que a metodologia de decomposição da amostra foi apropriada para obter resultados reprodutíveis.

Quando foram analisadas as porcentagens de recuperação obtidas para as outras razões m/z de Se, nas diferentes condições de trabalho, pôde-se perceber que a eliminação dos interferentes não foi boa para conseguir uma quantificação confiável de Se. Por exemplo, a porcentagem de recuperação de Se, monitorando o isótopo de m/z 82, variou em uma faixa de 87 a 119% (com baixa concentração de interferentes) até 162 a 593% (com alta concentração de interferentes), utilizando como gás da cela CH_4 e O_2 , respectivamente. Este fato mostra que as interferências afetam, em maior proporção, a determinação de Se para aqueles isótopos de menor abundância natural sob as condições trabalhadas.

Uma vez otimizada e verificada a exatidão do método de quantificação de Se, utilizando ICP-MS, as folhas da *A. thaliana* MG e N-MG controle foram decompostas, em quadruplicata, bem como aquelas irrigadas com uma dose inferior e superior de selenito de sódio. Os parâmetros operacionais otimizados do ICP-MS encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9. Condições de operação otimizadas do equipamento de ICP-MS para quantificação de Se nas amostras de folhas.

Parâmetros de operação do equipamento de ICP-MS			
Câmara de nebulização		Ciclônica	
Nebulizador		Meinhard®	
Potência RF (W)		1250	
Fluxo do gás nebulizador - Ar (L min ⁻¹)		0,95 (otimizado diariamente)	
Fluxo do gás auxiliar - Ar (L min ⁻¹)		1,40	
Medidas			
Modo de leitura		Peak hopping	
Dwell time (ms)		50	
Tempo morto do detector (ns)		60	
Sweeps		40	
Tempo de integração (ms)		2000	
Replicatas		5	
Faixa da curva de calibração externa (µg L ⁻¹)		0,5-20	
Condições de operação otimizadas para cela de reação e colisão			
Isótopo monitorado	Gás da cela	Vazão do gás (mL min ⁻¹)	RPq (V)
⁷⁸ Se ⁺ , ⁸⁰ Se ⁺	Metano	0,7	0,8

A assimilação do Se aumentou significativamente, tanto nas folhas das plantas MG, quanto nas N-MG, quando comparados os tratamentos estudados: controle, Se inferior e Se superior (vide Figura 9). As folhas MG apresentaram uma maior concentração de Se em todos os tratamentos, 130%, 19% e 17%, respectivamente. Maciel *et. al* (2014) ⁸ evidenciaram de uma forma semi-quantitativa o mesmo comportamento para *A. thaliana*. Naquele trabalho, imagens da distribuição do Se nas folhas obtidas por ablação a *laser* acoplada ao ICP-MS (LA(i)-ICP-MS) mostraram um maior teor de Se nas folhas MG, quando comparadas com as folhas N-MG.

As diferenças entre as concentrações de Se obtidas nas folhas MG e N-MG mostram que a modificação genética, feita por Gonçalves *et al.* (2012) ²⁵, além de produzir alterações durante o desenvolvimento da planta irrigada com Se (como foi descrito na seção 5.1.), e modificar o proteoma ⁸, oferece características diferenciais na acumulação de Se nas plantas.

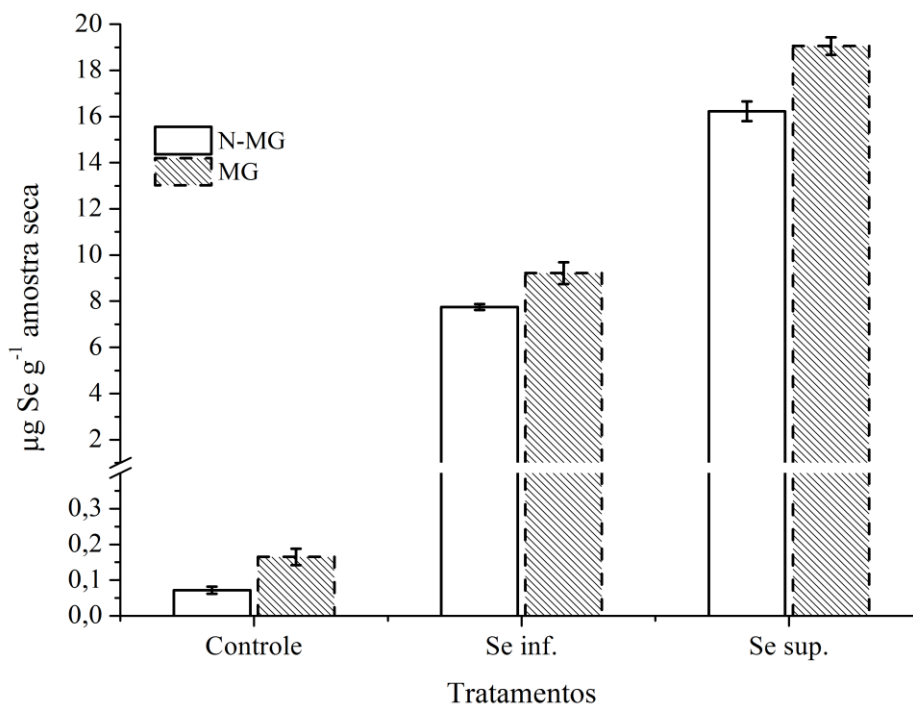


Figura 9. Quantificação de Se nas folhas de *Arabidopsis thaliana* utilizando ICP-MS.

Os resultados confirmaram que a *A. thaliana* é uma planta que acumula Se em concentrações similares às aquelas plantas que captam e assimilam Se classificadas como não seleno-acumuladoras, como, por exemplo, o arroz (1-10 µg de Se g⁻¹ de massa seca) ^{11,50}. Estas plantas utilizam as vias metabólicas do S para captar e metabolizar o Se, diferentemente das vias utilizadas pelas plantas seleno-acumuladoras ^{11,50}.

4.4. Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio nas folhas de *A. thaliana*

Os registros bibliográficos indicam que as exposições das plantas aos estresses bióticos e abióticos podem estimular a biossíntese de ERO. Consequentemente, ocorre modificação das atividades das enzimas que atuam na proteção das células e compartimentos sub-celulares vegetais. As alterações nas atividades enzimáticas podem ser devidas às diversas mudanças nas reações envolvidas na sinalização de defesa vegetal, ou em mecanismos de sinalização celular ou no estresse oxidativo ^{33,52,53}.

Com tudo isso, e para continuar com os estudos dos efeitos do Se e/ou da modificação genética nas plantas de *A. thaliana*, foram avaliadas as atividades de algumas enzimas

envolvidas na eliminação de ERO, como CAT e SOD. Além disso, foi determinada a concentração de H_2O_2 e de MDA, este último como medida da peroxidação lipídica.

4.4.1. Determinações das atividades enzimáticas

Os cálculos das atividades enzimáticas nos extratos das folhas da *A. thaliana* exigiram a determinação da quantidade de proteínas solúveis em cada amostra. Para isso, foi utilizado o método de Bradford e os resultados se encontram na Figura 10. É possível ver, nesta figura, que a concentração de proteínas para as plantas N-MG entre os tratamentos (controle, Se inferior e Se superior) não apresentaram diferenças significativas. Isto mostra que a presença de Se nas plantas N-MG não alterou a produção das proteínas extraídas com o método utilizado para determinação das atividades enzimáticas, descrito na seção 4.5.1.

Nas plantas MG, a presença de Se na dose superior diminuiu (*ca.* 32%) a concentração das proteínas solúveis, quando comparada com as proteínas das folhas controle.

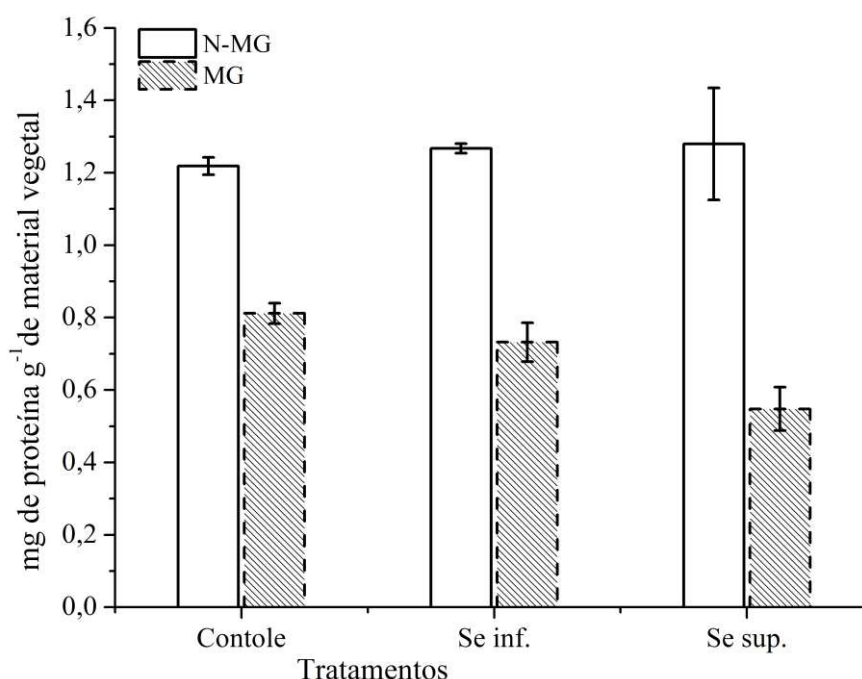


Figura 10. Concentração de proteínas nas folhas de *A. thaliana* MG e N-MG e nos diferentes tratamentos: controle, dose de Se inferior e Se superior. Método de Bradford, $\lambda = 595$ nm.

Quando analisados os valores da concentração de proteínas entre as folhas N-MG e MG, percebe-se uma diferença significativa, maior que 33%, favorecendo as N-MG. Os

resultados mostram que a modificação genética está alterando a concentração das proteínas solúveis no extrato obtido sob as condições utilizadas para análises da atividade enzimática.

Nas condições de tratamento aplicadas neste trabalho, tanto a modificação genética como a presença de selenito não produziram efeito significativo na atividade da catalase, Figura 11, levando-se em consideração os desvios obtidos e os resultados de análises utilizando os testes estatísticos *t* de *Student*, para análise dos efeitos da transgenia, e ANOVA seguido de teste de Tukey, para análise dos efeitos de Se em cada amostra, com $p < 0,05$.

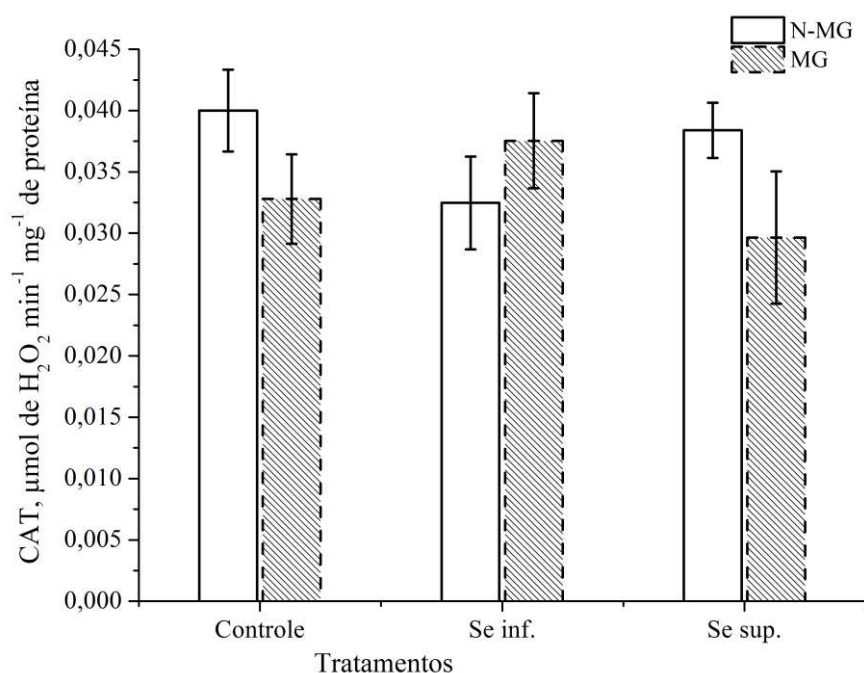


Figura 11. Atividade da catalase nas folhas de *A. thaliana* MG e N-MG e nos diferentes tratamentos: controle, dose de Se inferior e dose de Se superior.

A atividade da SOD (vide Figura 12) nas folhas N-MG diminuiu significativamente com o incremento da quantidade de Se utilizada na irrigação, 4% e 10% respectivamente. Isto mostrou que a presença de Se, nas concentrações utilizadas, tem um efeito benéfico durante o desenvolvimento das plantas N-MG, porque diminui a concentração dos radicais superóxidos, refletida no descenso da atividade da SOD.

Nas plantas MG, observou-se que a dose de Se inferior diminuiu em 7% a atividade da SOD, enquanto que a dose superior do selenito promoveu o aumento (48%) da sua atividade. É evidente que a modificação genética, estudada neste trabalho, fez com que a planta reagisse diferente, frente ao estresse externo e devido à presença de selenito. A planta MG, para o tratamento de Se na dose superior, apresentou uma maior produção do radical superóxido,

consequentemente, o estresse oxidativo neste grupo estudado aumentou, sendo necessário que a planta ativasse seu sistema de defesa para tentar entrar novamente em equilíbrio.

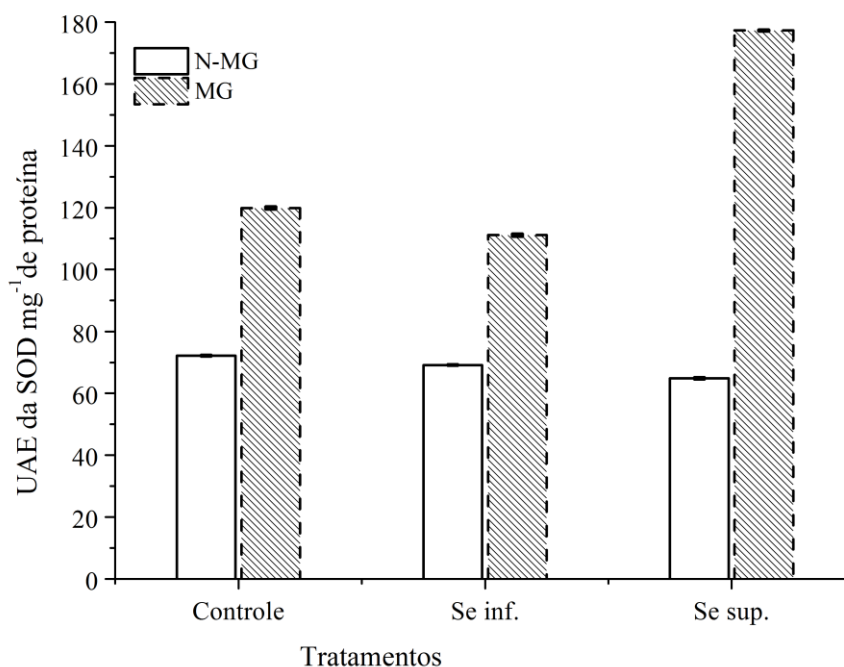


Figura 12. Atividade da superóxido dismutase (SOD) nas folhas de *A. thaliana* MG e N-MG e nos diferentes tratamentos: controle, dose de Se inferior e dose de Se superior.

No caso da análise da atividade da SOD em cada grupo tratamento, os valores para as folhas MG sempre foram significativamente maiores comparadas com as folhas N-MG, 66%, 61% e 173%, respectivamente. Este fato mostra que a modificação genética induziu a produção do radical superóxido, consequentemente, fazendo com que a planta apresente um maior estresse oxidativo, tendo-se em conta que a SOD é uns dos constituintes da primeira linha de defesa da planta contra ERO, e que ela pode ser utilizada como um indicador do estresse oxidativo ⁹³.

4.4.2. Determinação da peroxidação de lipídeos e quantificação de peróxido de hidrogênio.

Nos resultados da concentração de H₂O₂ (Figura 13) foi evidente que o Se na dose superior teve efeito significativo no aumento da produção do peróxido nas plantas MG (48%). O resultado é coerente com o aumento da atividade da SOD para o mesmo tratamento, Figura

12, devido ao H_2O_2 ser um dos produtos de reação desta enzima, para eliminação do radical peróxido^{55,94}.

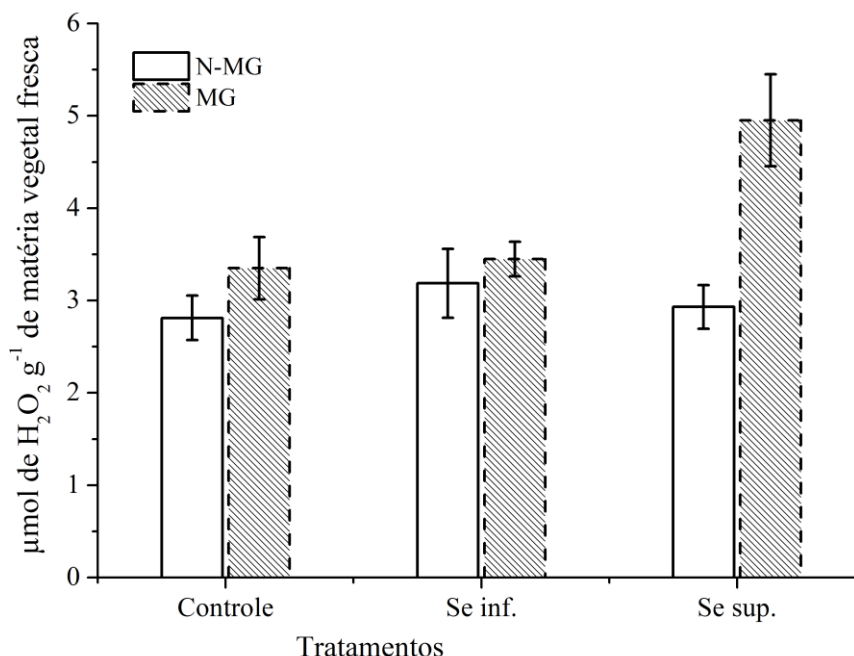


Figura 13. Concentração do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas folhas de *A. thaliana* MG e N-MG e nos diferentes tratamentos: controle, dose de Se inferior e dose de Se superior.

O fato de não haver uma alteração significativa de H_2O_2 devido à presença de selenito nas plantas N-MG e levando em consideração a resposta da atividade da SOD (sempre superior nas plantas MG), pode-se concluir que a modificação genética induz um maior estresse oxidativo, refletido no aumento da produção de peróxido de hidrogênio e radicais superóxidos. Além disso, a diferença de 19% da concentração de H_2O_2 , entre as folhas MG e N-MG controle, continua revelando a contribuição da modificação genética na produção de ERO.

A falta de diferença significativa nos valores de H_2O_2 entre as folhas MG e N-MG no tratamento de Se inferior, e somado aos resultados vistos na atividade da SOD para o mesmo tratamento (Figuras 12 e 13, respectivamente), permite concluir que o Se, nesta concentração, não favoreceu o estresse oxidativo, avaliado a partir da concentração do peróxido nas plantas. No entanto, a dose superior de selenito foi responsável pela diferença na concentração de H_2O_2 (69%) para as folhas MG, quando comparadas com as N-MG. É evidente que a modificação genética, somada à presença de uma concentração maior de Se produziram um maior estresse oxidativo na planta.

A peroxidação de lipídeos, avaliada por meio da produção de metabólitos reativos ao TBA (principalmente MDA), revelou um aumento na concentração do MDA para as plantas N-MG, com o aumento da concentração do Se de 45% e 162%, para as plantas irrigadas com dose de Se inferior e dose superior, respectivamente (vide Figura 14). Neste caso, percebeu-se que o Se teve maior ocorrência nos danos oxidativos nas células das folhas N-MG. Este fato mostra que o mecanismo de proteção contra as ERO nas plantas N-MG, produzidas pelo Se, podem estar envolvendo rotas metabólicas de outras enzimas ou mecanismos não enzimáticos.

Quando é analisada a concentração de MDA nas folhas MG para os diferentes tratamentos, observa-se um aumento de 25% no grupo com Se inferior, enquanto que as folhas tratadas com a dose superior de Se apresentou uma diminuição de 11%. O último resultado mostra que a planta ativou seu sistema de defesa degradando o MDA, produto do estresse do Se e da modificação genética. A ausência de aumento na atividade da enzima SOD no tratamento com a dose inferior de Se explica o aumento da concentração de MDA, consequentemente, o aumento nos danos nas células devido às ERO.

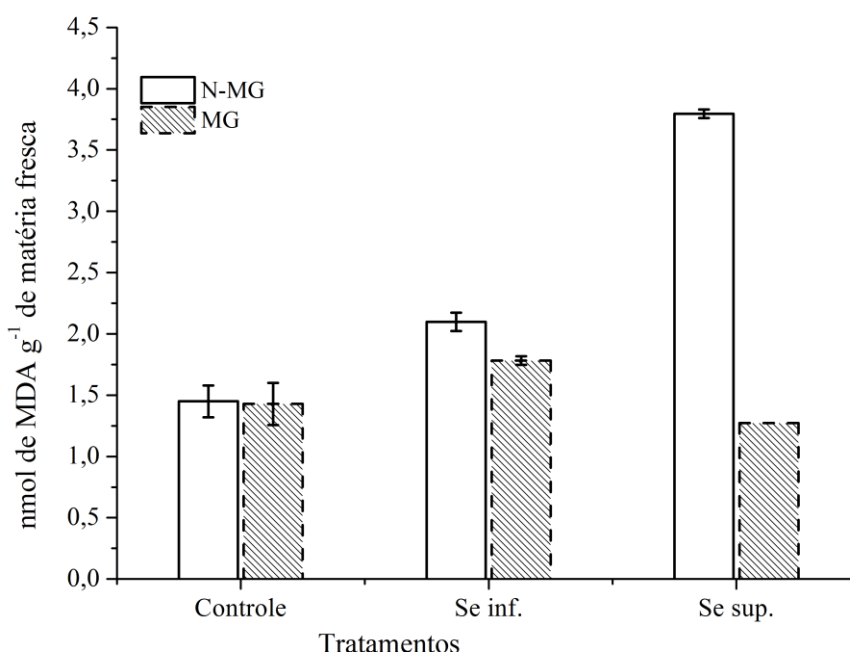


Figura 14. Peroxidação de lipídeos, avaliada por meio da produção de malondialdeído (MDA), nas folhas de *A. thaliana* MG e N-MG, e nos diferentes tratamentos: controle, dose de Se inferior e dose de Se superior.

Os resultados de peroxidação lipídica mostram que as plantas MG têm mais resistência ao estresse oxidativo devido à presença de Se. Elas conseguem ativar mais rapidamente seu

sistema de degradação do MDA, protegendo a planta contra os danos oxidativos na membrana das células. Dados similares foram obtidos por Ohno *et. al* (2012) ⁶¹, quando estudaram os mecanismos de assimilação de Se, na forma química de selenato, em plantas de *A. thaliana* (ecotipo *wassilewskija-2*) modificadas geneticamente com um gene de um transportador de enxofre. Eles evidenciaram que as plantas MG apresentaram uma diminuição da concentração de MDA devido ao aumento na concentração de Se, enquanto que as plantas N-MG tiveram um aumento na concentração de MDA.

É interessante também comentar que, nos estudos proteômicos feitos por Maciel *et. al* (2014) ⁸, foram obtidos resultados que também indicam que as plantas MG respondem melhor ao estresse oxidativo. No trabalho, eles conseguiram identificar proteínas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo (defesa vegetal), as quais estavam em maior abundância no grupo de folhas de *A. thaliana* MG tratadas com Se (que correspondia à dose do grupo de plantas tratadas com Se superior desta dissertação), quando comparadas com as plantas N-MG sob as mesmas condições.

5. CONCLUSÕES PARCIAIS

As condições do cultivo da *Arabidopsis thaliana* foram ótimas para a obtenção da amostra, assim como para analisar algumas diferenças na fisiologia nos grupos de plantas, seja pela presença do sal de selênio, da modificação genética ou pela combinação dos dois fatores.

Foi possível confirmar o processo de modificação genética no DNA das plantas MG, permitindo que o trabalho fosse feito com dois grandes grupos de plantas: as MG e N-MG.

Foi possível também determinar a quantidade de Se total nas folhas da *A. thaliana* MG e N-MG com os diferentes tratamentos. Isto foi feito devido à boa escolha do método de decomposição da amostra e do procedimento de otimização das condições de operação do ICP-MS, principalmente das condições da cela de reação e colisão, assim como dos isótopos de Se monitorados.

As plantas MG e N-MG estudadas apresentaram algumas diferenças no tocante à presença do selenito. As plantas N-MG acumularam menor quantidade de Se, sofreram maior redução no crescimento (refletido na menor quantidade de massa orgânica fresca das folhas). Com o aumento da concentração de Se reduziram significativamente a atividade da SOD e aumentaram a concentração de MDA. Entretanto, as folhas MG apresentaram um aumento significativo na atividade da SOD e na produção de H_2O_2 , na dose superior de Se, enquanto que a concentração de MDA, na mesma condição, apresentou uma diminuição significativa. Assim, com os resultados das quantidades de Se acumulado, proteínas solúveis, H_2O_2 , MDA e a diferença nas atividades da SOD nas plantas MG e N-MG, nas condições dos diferentes tratamentos, conseguiu-se perceber que tanto a modificação genética, como a presença do Se, produzem efeitos sobre o metabolismo da planta, fazendo que ela produza uma maior concentração de espécies reativas de oxigênio. Além disso, também foi possível perceber que a modificação genética produziu maior resistência à planta ao estresse oxidativo devido à presença do selenito.

CAPÍTULO II. Emprego da cromatografia líquida no estudo metalômico comparativo das folhas da *Arabidopsis thaliana* não modificadas e modificadas geneticamente, irrigadas e não irrigadas com uma solução de selenito de sódio.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Metalômica

A análise das espécies metálicas e metalóides totais dentro de um organismo (células, tecidos e outros) é definida como metalômica. Quando se exploram as funções dos metais ligados a proteínas, refere-se, então, à metalo-proteômica ^{2,4,6,13,36}.

As metalo-proteínas são formadas pela ligação entre um metal e uma proteína de um órgão, tecido ou fluido biológico, e possuem funções que dependem das interações entre os dois. Quando o metalóide ligado é o Se, as proteínas são chamadas seleno-proteínas, e estas são as principais proteínas de interesse desta pesquisa ^{40,95}. Sua presença nas plantas é feita durante o processo de síntese de proteínas, onde incorporam, de forma não específica, as espécies orgânicas de Se (SeCis e SeMet) no lugar dos aminoácidos essenciais de enxofre, Cis e Met.

Embora as seleno-proteínas tenham sido encontradas em uma variada gama de organismos, sua ocorrência e função no reino vegetal ainda não são bem compreendidas ^{44,45}. Estudos ainda tentam elucidar o conteúdo e a natureza das seleno-proteínas, inclusive nas plantas modificadas geneticamente e enriquecidas com diferentes formas químicas de Se, a fim de oferecer mais explicações das vias metabólicas dessas espécies e dos mecanismos de regulação dos efeitos benéficos e tóxicos desses compostos. Esses estudos também buscam aumentar as perspectivas acerca do valor nutricional das seleno-proteínas nos vegetais enriquecidos com Se, para o possível efeito quimio-preventivo que possam ter ⁴⁵.

As técnicas mais comumente utilizadas para este tipo de investigação baseiam-se, principalmente, na separação das proteínas por eletroforese bidimensional em gel (2-D-PAGE) ^{8,77,96}, ou eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) ⁹⁷, seguida por detecção de selênio via ablação a laser acoplado ao espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (LA-ICP-MS). Uma alternativa é utilizar a separação por técnicas de cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (LC-ICP-MS) ^{45,70,98,99}. Para a identificação das seleno-proteínas são utilizadas principalmente a espectrometria de massas com sistemas de ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) ou ionização por eletrospray (ESI) ^{45,70,96,98-100}.

1.2. Técnicas analíticas empregadas

Os trabalhos em metalômica utilizam técnicas hifenadas devido à necessidade de identificar e determinar as diferentes espécies de metal presente em pequenas quantidades em um sistema. O termo “técnicas hifenadas” faz referência ao acoplamento entre duas ou mais técnicas analíticas para a obtenção de resultados mais eficientes. Quando combinadas, deverão gerar informações diferentes, ou seja, ortogonais ^{2,4,69,101–104}.

Entre as técnicas mais utilizadas nos estudos metalômicos, encontram-se os sistemas de separação cromatográfico e/ou eletroforético, seguido de uma detecção sensível e precisa. Por exemplo, LC-ICP-MS e UPLC-ESI-MS/MS, acoplam uma técnica eficiente de separação com uma técnica que fornece informação adicional sobre a composição e estrutura química dos componentes da amostra, respectivamente. A escolha das técnicas hifenadas depende do objetivo do trabalho ^{2,4,69,101}.

A Cromatografia Líquida (LC) é uma técnica que separa uma mistura em seus componentes individuais usando diferentes modos de separação, tais como: troca iônica (IEX), exclusão por tamanho (SEC), afinidade (AF), interação hidrofóbica (HIC), fase reversa (RP) e fase normal. A identificação das proteínas separadas é feita, geralmente, por uma grande variedade de analisadores de MS, utilizados de acordo com o objetivo do trabalho ^{101–104}.

A técnica de ICP-MS permite alcançar limites de detecção e quantificação baixos, além de oferecer a possibilidade de se obter informações isotópicas que podem ser utilizadas para identificação e quantificação das espécies. No entanto, a fonte de ionização do ICP-MS é altamente energética e impossibilita a caracterização estrutural porque gera íons elementares. Portanto, são necessárias, para complementar a detecção elementar, outras técnicas de MS com fontes de ionização mais suaves, como a MALDI ou ESI, usadas frequentemente em estudos de biomoléculas ^{4,9,36,38,45}.

Além disso, a técnica de ICP-MS pode ser acoplada às técnicas de separação para detectar vestígios de espécies, como, neste caso, o Se, mesmo em matrizes complexas, como sangue ou extrato de plantas ^{51,76}. Para a separação, identificação e quantificação dos metais presentes em proteínas, a técnica de LC-ICP-MS é uma das mais utilizadas. O fluxo da fase móvel do LC é semelhante ao fluxo dos nebulizadores comuns para ICP-MS, facilitando o processo de hifenação entre os dois. Entretanto, os eluentes do LC devem possuir baixas concentrações de solventes orgânicos e sais. A presença de altas concentrações de sais na fase

móvel (>2%) pode causar a deposição dos mesmos no nebulizador e nos cones, levando à diminuição do sinal analítico. Além disso, uma grande quantidade de solventes orgânicos na fase móvel do LC causa instabilidade no plasma, podendo inclusive extingui-lo^{2,5,69,101–104}.

A cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) acoplada à ICP-MS é uma ferramenta muito útil para a detecção de metalo-biomoléculas em amostras de tecidos ou fluidos. As moléculas são separadas de acordo com seu tamanho e forma. A SEC é uma técnica menos efetiva na separação comparada a outras técnicas de cromatografia líquida. No entanto, fornece informações de grande valor quando as amostras são fluidos biológicos e não causa alterações nas metalo-biomoléculas^{2,4,38,103,104}. Sendo assim, a SEC é aplicada como primeiro método de separação das frações que contém as metalo-proteínas de interesse no sistema de cromatografia líquida multidimensional desta pesquisa.

O aumento no poder de resolução é relevante no estudo das metalo-proteínas. Por esse motivo, a segunda coluna para separação dos extratos proteicos das folhas MG e N-MG de *A. thaliana*, usada a fim de melhorar o grau de pureza das espécies de Se para sua posterior identificação por MS, é a cromatografia de troca aniônica (AEX). Nessa técnica, a separação ocorre de acordo com a carga das biomoléculas. O mecanismo de retenção envolve atração eletrostática entre os analitos e os grupos funcionais da fase estacionária, com cargas opostas^{4,45,105}.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Utilizar a separação cromatográfica para analisar as mudanças no metaloma das folhas de *Arabidopsis thaliana* não modificadas e modificadas geneticamente (N-MG e MG), ambas irrigadas com uma solução de selenito de sódio frente a uma condição controle.

2.2. Objetivos Específicos

- Escolher o método de extração das proteínas das folhas de *A. thaliana*.
- Determinar as condições de trabalho para a primeira e segunda separação cromatográfica: SEC e AEX.
- Analisar os extratos proteicos das folhas de *A. thaliana* MG e N-MG: controle e irrigadas com selenito de sódio, utilizando LC-ICP-MS.
- Avaliar os efeitos do Se e/ou da modificação genética no metaloma das plantas da *A. thaliana*.

3. PARTE EXPERIMENTAL

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 (*c.a.* 18,2 MΩ cm), obtida a partir de um sistema de purificação de água Milli-Q Direct Q (Millipore, Estados Unidos).

Antes do uso, todos os materiais foram lavados e colocados em banho de extran 2% v/v (Merck, Alemanha), por, no mínimo, 2 h. Posteriormente, foram lavados utilizando água deionizada e descontaminados em banho de ácido nítrico, HNO₃, 10% v/v (Merck, Alemanha) por, no mínimo, 12 h. Finalmente, foram enxaguados utilizando água deionizada, e secos em estufa, exceto os materiais volumétricos, que foram secos à temperatura ambiente.

Para limpeza, descontaminação e descarte das amostras modificadas geneticamente e material contaminado, foi empregado hipoclorito de sódio por 12 h, e posterior esterilização em autoclave, a 120 °C durante 20 minutos.

As soluções tampão utilizadas como fase móvel tiveram ajuste de pH antes de avolumar. Uma vez preparadas, as soluções das amostras e fases móveis para LC foram filtradas utilizando filtros de seringa em PVDF (Sartorius) e sistema de filtração em vidro ao vácuo com membrana (Sartorius) de porosidade 0,22 µm, respectivamente. Em seguida, para desgaseificação das mesmas foi utilizado um banho de ultrassom (ULTRASONIK, NEY).

3.2. Amostras

As amostras analisadas foram folhas de *A. thaliana* MG e N-MG do grupo controle e as irrigadas com a dose superior de selenito de sódio, cultivadas como descrito no item 4.2 do Capítulo 1.

3.3. Colunas cromatográficas

As colunas cromatográficas empregadas foram de exclusão por tamanho e troca aniônica com as características mostradas na Tabela 10.

Tabela 10. Características das colunas cromatográficas.

Coluna	Tipo de separação	Dimensões	Pressão máxima	Faixa de exclusão molecular
Superdex 200 10/300 GL, GE	Exclusão por tamanho	10 x 300-310 mm, tamanho de partícula 13 µm	218 psi	10 – 600 kDa
Superdex 75 10/300 GL, GE	Exclusão por tamanho	10 x 300-310 mm, tamanho de partícula 13 µm	261 psi	3 – 70 kDa
PRP-X500, Hamilton	Troca aniônica	150 x 4,6 mm, tamanho de partícula 7 µm	5000 psi	Não aplica

3.4. Métodos avaliados para a extração das proteínas

Três procedimentos para a extração das proteínas nas folhas de *A. thaliana* foram avaliados, a fim de trabalhar de uma forma adequada com a técnica de SEC-ICP-MS. Para os procedimentos testados, 600 mg das amostras de folhas foram congeladas com N₂ líquido e pulverizadas a partículas finas com o auxílio de almofariz e pistilo. O material macerado recebeu a adição do tampão de extração de interesse.

O primeiro procedimento foi baseado no trabalho de Chan *et al.* (2010)³⁸, onde foram adicionados, ao material vegetal, 2,0 mL de solução tampão 30 mmol L⁻¹ de cloreto de 2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol (tris-HCl) pH 7,5, contendo 2% de dodecilsulfato de sódio (SDS) e 0,1 mmol L⁻¹ de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF). A mistura foi agitada por 2 h, e o material insolúvel foi removido por centrifugação durante 10 min a 10000 rpm, usando uma ultra-centrífuga Bio-Spin-R (BioAgency, São Paulo, Brasil).

O segundo procedimento baseou-se nos trabalhos de Mataveli *et al.* (2012) e Gomes *et al.* (2013)^{4,76}, com modificações. Neste, as amostras foram maceradas durante 10 min com a fase móvel utilizada para as separações cromatográficas (tampão 100 mmol L⁻¹ acetato de amônio, pH 7,2 e tampão 30 mmol L⁻¹ tris-HCl, pH 7,5). A mistura foi colocada em tubos de vidro e sonicada durante 15 min. A suspensão foi centrifugada por 10 min a 10000 rpm e 4 °C, para remover o sobrenadante. Este procedimento foi repetido três vezes, e o sobrenadante de cada re-extração foi reunido e conservado em freezer (- 20 °C).

O último procedimento consistiu naquele clássico empregado com muito sucesso para extrações de proteínas em tecidos vegetais. Ele foi baseado no trabalho desenvolvido por Delapace *et al.* (2006)¹⁰⁶ e alterado por Maciel *et al.* (2014)⁸, com modificações no procedimento de solubilização do precipitado. A amostra moída em N₂ líquido foi macerada durante 10 min com 4 mL do tampão extrator, que é composto de 0,7 mol L⁻¹ de sacarose, 50

mmol L⁻¹ de EDTA, 0,1 mol L⁻¹ de KCl, 10 mmol L⁻¹ de tioureia, 50 mmol L⁻¹ de DTT e 2 mmol L⁻¹ PMSF dissolvidos em tampão tris-HCl 0,5 mol L⁻¹ pH 7,5. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 10 min a 10000 rpm e 4 °C, o sobrenadante foi coletado, misturado com 5,0 mL do tampão extrator saturado com fenol e agitado por efeito vortex durante 10 min. A mistura foi centrifugada por 10 min a 8000 rpm e 4 °C. A fase fenólica (fase superior) foi coletada e extraída duas vezes com adição de 5,0 mL de tampão de extração. Cada extrato foi centrifugado durante 10 min a 8000 rpm e 4 °C. No final, após extrações sucessivas, as proteínas presentes na fase fenólica foram precipitadas com acetato de amônio 0,1 mol L⁻¹ em metanol a -20 °C durante 24 h, seguido por centrifugação por 10 min a 10000 rpm e 4 °C. O precipitado foi lavado com 0,5 mL em duas ocasiões com acetato de amônio 0,1 mol L⁻¹ em metanol, e depois, lavado com 0,5 mL de acetona gelada. Finalmente, o precipitado foi seco com nitrogênio gasoso e solubilizado na fase móvel.

Para a determinação da quantidade total das proteínas nos extratos das folhas da *A. thaliana* foi utilizado o Kit 2-D Quant (GE Healthcare). A solução padrão deste kit consistiu em 2,0 mg mL⁻¹ de Soro de Albumina Bovina (BSA). A determinação de proteínas totais foi baseada na ligação específica dos íons cobre com as proteínas, cuja absorbância máxima ocorre no comprimento de onda $\lambda = 480$ nm.

3.5. Escolha das condições cromatográficas

Os extratos proteicos foram analisados usando um sistema LC-DAD, composto por um cromatógrafo líquido de alta eficiência, Perkin Elmer (Série 200, Sheldon, Estados Unidos), incluindo uma bomba quaternária, auto amostrador, forno de colunas, degaseificador a vácuo e software Chromera. O detector usado foi do tipo arranjos de diodos (DAD) serie 200, Perkin Elmer. A coleta das frações, usando um coletor de frações Gilson Inc (Middletown, EUA), foi feita em intervalos de tempo que representavam a eluição de frações contendo Se, previamente identificadas usando ICP-MS (modelo ELAN DRC-e, PerkinElmer, Shelton, EUA).

3.5.1. Primeira separação cromatográfica: Exclusão por tamanho (SEC)

Para conseguir uma separação eficiente, e visando evitar os problemas que podem ocorrer quando são utilizadas grandes quantidades de solvente orgânico e sais nas análises por

ICP-MS, foram avaliadas algumas condições de trabalho no sistema cromatográfico, tais como: o volume de injeção da amostra, a vazão e composição da fase móvel. As fases móveis testadas foram: tampão acetato de amônio (98,9%, J.T. Backer) 100 mmol L⁻¹ a pH 7,2 (pH ajustado com ácido acético, J.T. Baker), tampão tris-HCl (99,8%, GE Healthcare) 30 mmol L⁻¹ a pH 7,5 (pH ajustado com ácido clorídrico, Merck) e tampão fosfato (fosfato de potássio monobásico e bibásico, 99,5% J.T. Baker) 50 mmol L⁻¹, 0,15 mmol L⁻¹ NaCl (99,5% Sigma) pH 7,0.

3.5.2. Segunda separação cromatográfica: Troca aniônica (AEX)

Objetivando melhorar a separação e, conseqüentemente, as chances de identificação das proteínas associadas ao Se, as frações contendo o metalóide (provenientes da primeira separação cromatográfica), foram novamente separadas utilizando uma segunda coluna. Dessa forma, foi necessário testar algumas condições de trabalho no sistema cromatográfico, tais como: o volume de injeção da amostra, a vazão e a composição da fase móvel. Pensando no seguinte passo, em relação à identificação utilizando nanoLC-MS/MS, onde a presença de altas concentrações de sais pode afetar a ionização das proteínas, foram testadas dos tipos de fases móveis:

A₁ = 10 e 20 mmol L⁻¹ Tampão tris-HCl (99,8%, GE Healthcare) pH 6,5

A₂ = 10 e 20 mmol L⁻¹ Bicarbonato de amônio (99,5%, Fluka) pH 6,5

B = A + (100 até 300 mmol L⁻¹) de acetato de amônio

O gradiente para cada teste variou entre 0 e 100% de B, em tempos de corrida diferentes.

3.6. Análise cromatográfica dos extratos proteicos das amostras

Uma vez escolhidos o método de extração das proteínas, as condições de separação cromatográfica e detecção de Se no ICP-MS, foram feitas as extrações de 1,0 g de folhas MG e N-MG (controle e irrigadas com Se).

Posteriormente, foram obtidos os cromatogramas da primeira coluna cromatográfica acoplada com o ICP-MS (SEC-ICP-MS) para conseguir separar as proteínas e identificar os tempos de retenção dos sinais que contêm Se. O eluente de dez injeções da amostra foi coletado em intervalos de tempo correspondente à eluição das frações que continham Se. Em

seguida, o conjunto dessas frações foi congelado em N₂ líquido e seco, usando o liofilizador (Christ, modelo Alpha 12LD, Alemanha).

As frações liofilizadas foram ressolubilizadas em um volume de 500 µL de água para sua posterior injeção na segunda coluna cromatográfica, AEX-ICP-MS com o objetivo de aumentar a resolução dos sinais da primeira separação e tentar aumentar as possibilidades de identificação das seleno-proteínas. Nas Tabelas 9 e 11 são apresentadas as condições instrumentais aplicadas para a separação e detecção dos sinais cromatográficos de Se por LC-ICP-MS.

Tabela 11. Parâmetros instrumentais aplicados em LC.

Condições de separação cromatográfica	
1ª separação cromatográfica	
Coluna	Superdex 75 10/300 GL
Fase móvel	Tampão 30 mmol L ⁻¹ tris-HCl, pH 7,5
Vazão	0,5 mL min ⁻¹ (SEC-ICP-MS) e 1,0 mL min ⁻¹ (SEC-DAD)
Tempo de corrida	75 min (SEC-ICP-MS) e 45 min (SEC-DAD)
Volume de injeção	100 µL
2ª separação cromatográfica	
Coluna	PRP-X500
Fase móvel	A = Tampão 10 mmol L ⁻¹ tris-HCl pH 6,5 B = A + 300 mmol L ⁻¹ de acetato de amônio
Vazão	1 mL min ⁻¹
Tempo de corrida	32 min
Gradiente	100% A (2 min), 80% A (2 min), 60% A (2 min), 40% A (3 min), 20% A (4 min), 0% A (10 min), 40% A (2 min), 80% A (2 min), 100% A (5 min).
Volume de injeção	100 µL

Sob as mesmas condições de análise das amostras, foi realizada a calibração da coluna SEC utilizando a injeção em duplicata dos padrões de proteínas globulares: BSA (66 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), inibidor de tripsina (20 kDa), α-lactoalbumina bovina (14 kDa) e aprotina (6,5 kDa). Para determinação da curva de calibração foi calculado o logaritmo da massa molecular (MM) das proteínas em função de seus volumes de eluição (Ve), tempo de retenção de cada padrão multiplicada pela vazão utilizada. Com isso, foi obtida a Equação 2, utilizada para calcular a estimativa das massas molares dos sinais cromatográficos. O coeficiente de correlação linear foi 0,994.

$$\log MM = -6,819 Ve + 21,06$$

Equação 2. Curva de calibração da coluna SEC.

3.7. Avaliação estatística

Os resultados das medidas foram expressos como média \pm desvio padrão das replicatas para cada determinação. As diferenças significativas entre dois valores foram determinadas utilizando o teste estatístico *t* de *Student* com $p < 0,05$. Enquanto que as diferenças significativas entre mais de dois valores foram determinados pela análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey, utilizando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Escolha do método de extração das proteínas

Para o estudo metalômico, o primeiro grande passo a ser escolhido foi o método de extração das proteínas. Nesse sentido, o extrato das folhas N-MG irrigadas com a dose superior do Se foram utilizadas para isto.

Os três procedimentos de extração comparados já tinham sido utilizados anteriormente para análises de seleno-compostos em plantas. O primeiro foi utilizado por Chan *et al.* (2010)³⁸ para a análise de sementes de plantas de soja irrigadas com Se, utilizando LC-ICP-MS. O segundo método é uma combinação dos procedimentos do nosso grupo de pesquisa, GEPAM, para extração de proteínas das sementes de soja e folhas de girassol^{4,76}, utilizando LC-ICP-MS. O terceiro procedimento, utilizado também em nosso grupo, é um procedimento clássico empregado com muito sucesso para extrações de proteínas em tecidos vegetais e alterado por Maciel *et al.* (2014)⁸. O último procedimento teve uma modificação na solubilização do precipitado, devido, principalmente, ao fato de que o sistema de separação e determinação das espécies de Se usados nesta pesquisa não aceitam grandes quantidades de sais e solventes orgânicos. Por isso, foram feitos esforços para tentar solubilizar as proteínas precipitadas utilizando a própria fase móvel. Para a quantificação das proteínas totais em todos os extratos de cada método foi utilizado o kit 2D-Quanti.

Como primeira avaliação quando foi feita a comparação da concentração de proteínas extraídas com cada um dos três procedimentos, sem a etapa de precipitação de proteínas após a extração, é possível ver que os valores são muito próximos, principalmente quando são comparados o primeiro e o terceiro método (vide Figura 15A), os quais contêm maiores teores de sais e solventes orgânicos (como descrito no item 9.4).

Pensando no sistema SEC-ICP-MS, utilizado nesta dissertação, foram precipitadas as proteínas do extrato do terceiro método (extração com fenol) e solubilizadas na fase móvel do sistema cromatográfico escolhido (tampão tris-HCl 30 mmol L⁻¹ pH 7,5) como tentativa de limpeza do extrato. A quantidade de proteínas, para este método (Mét. 3 mod.), mostrou um teor baixo com a diminuição de 99%, quando comparado com o valor obtido sem precipitação das mesmas (Figura 15 A). Com isso, foi descartada a possibilidade de utilizar a fase móvel do sistema cromatográfico para re-solubilizar as proteínas precipitadas, extraídas com o terceiro procedimento.

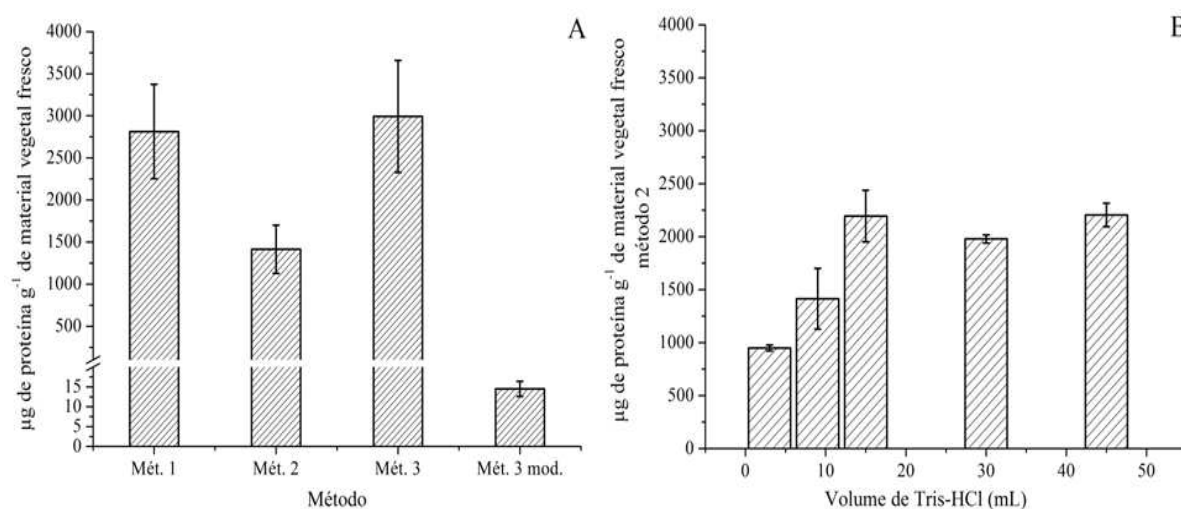


Figura 15. Quantificação das proteínas totais utilizando o kit 2D-Quant. **(A)** comparação dos três métodos de extração e a variação da ressolubilização do precipitado na fase móvel (modificação do método 3), **(B)** Variação do volume total do tampão 30 mmol L⁻¹ tris-HCl, pH 7,5 no segundo método de extração.

Na tentativa de aumentar a quantidade de proteínas totais extraídas com o segundo procedimento, que tem um conteúdo de sais mais baixo, foram testadas diferentes quantidades de solução extratora tampão 30 mmol L⁻¹ tris-HCl pH 7,5, fase móvel utilizada na primeira separação cromatográfica, SEC (vide Figura 15 B).

Ao analisar esta figura, nota-se que os volumes totais de tampão extrator de 15, 30 e 45 mL permitiram obter quantidades de proteínas estatisticamente iguais aos valores obtidos com os métodos 1 e 3 da Figura 15 A. Embora os desvios padrão obtidos usando os volumes de 30 e 45 mL foram menores, quando comparados com o desvio de 15 mL, o uso de uma quantidade dois e três vezes maior de solução extratora criou a necessidade de um tempo mais longo para concentração das proteínas, além de aumentar a concentração do sal no extrato final, que seria posteriormente analisado na SEC-ICP-MS. Por este motivo, o volume de 15 mL apresenta mais vantagens para fazer o método de extração de proteínas no segundo método.

Uma vez avaliada a possibilidade de melhorar a extração de proteínas utilizando a mesma fase móvel do sistema cromatográfico, foram testadas, sob as mesmas condições do segundo procedimento de extração descrito no item 9.4, mais duas possíveis soluções extratoras: água e tampão 100 mmol L⁻¹ de acetato de amônio pH 7,2. As quantidades de proteínas extraídas, na Figura 16 A, evidenciam que o tampão 30 mmol L⁻¹ de tris-HCl pH 7,5

foi a melhor opção para extrair as proteínas das folhas da *A. thaliana*, além de conseguir extrair uma maior quantidade de Se, como será mostrado na seção 10.2.1 e na Figura 20.

Continuando com o objetivo de aumentar a quantidade de proteínas extraídas com o segundo método de extração, foi testado o uso da técnica de ultrassom. Esta ferramenta permite fazer extrações rápidas e efetivas, sendo que, para o caso particular das selenoproteínas, o risco de perda do metalóide é baixo, devido a que o Se é incorporado pelas plantas na estrutura primária das proteínas durante seu processo de síntese^{11,12,38,43}.

Os resultados da quantidade de proteínas extraídas utilizando o ultrassom foram maiores quando comparadas com a extração com almofariz e pistilo, agitação manual (vide Figura 16 B).

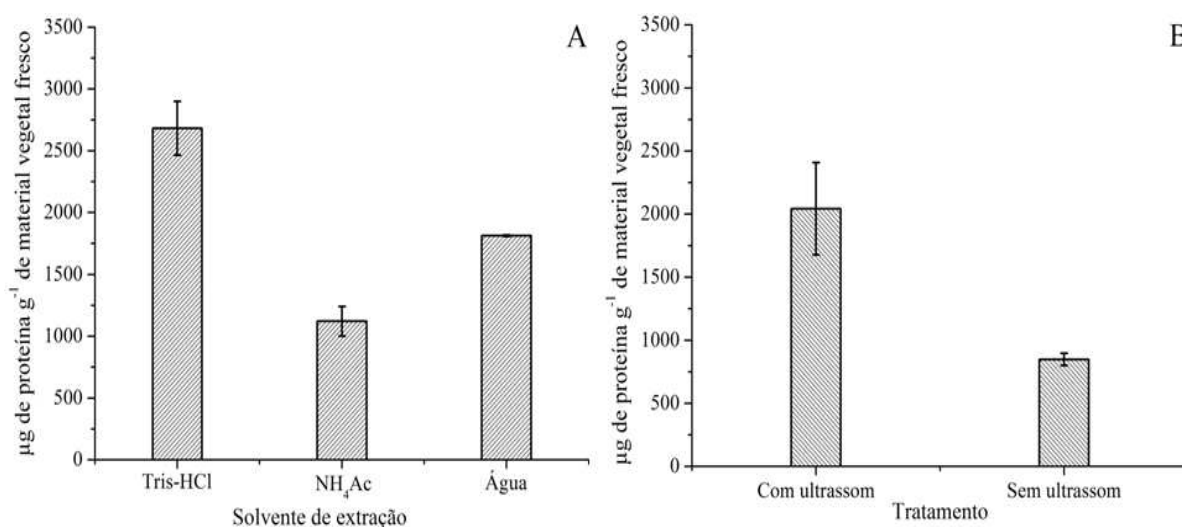


Figura 16. Quantificação das proteínas totais do segundo método utilizando o kit 2D-Quanti. **(A)** Variação do solvente de extração: água, tampão 30 mmol L^{-1} tris-HCl pH, 7,5 e tampão 100 mmol L^{-1} acetato de amônio, pH 7,2. **(B)** comparação do uso do banho de ultrassom.

Com os resultados das diferentes condições de extração avaliadas para o segundo método de extração de proteínas hidrofílicas (extração utilizando a fase móvel), foram determinados: o tempo de homogeneização da amostra (5 min); tempo no banho de ultrassom (15 min); número de extrações consecutivas (3, cada uma com 5 mL de solução extratora); volume total de extrato (15 mL); natureza (tris-HCl); concentração (30 mmol L^{-1}) e pH (7,5) da solução extratora.

4.2. Escolha das condições de separação cromatográficas

4.2.1. Primeira separação cromatográfica, exclusão por tamanho (SEC)

Para determinar as condições do trabalho, empregando o mecanismo de exclusão por tamanho (SEC) acoplado ao ICP-MS (para o monitoramento dos sinais de Se), teve-se que levar em conta que os eluentes do sistema cromatográfico precisavam ser tolerados tanto pelo plasma quanto pelo sistema de entrada do espectrômetro de massas^{69,101,103}. As diferentes condições cromatográficas foram testadas utilizando-se os extratos proteicos das folhas N-MG com dose superior do Se e como solvente extrator a mesma fase móvel.

Primeiramente, foi testada a faixa de trabalho de exclusão molecular. Para isso, foram feitos testes utilizando a coluna SEC Superdex 200 10/300, variando a vazão da fase móvel entre 0,3 até 0,6 mL min⁻¹, sempre controlando para que a pressão não fosse maior que a pressão limite da coluna (vide Tabela 10). Também foi variada a natureza das fases móveis: água, tampão 100 mmol L⁻¹ acetato de amônio, pH 7,2^{4,76}; tampão 10 - 30 mmol L⁻¹ tris-HCl, pH 7,0 - 8,0³⁸ e tampão 50 mmol L⁻¹ fosfato, 150 mmol L⁻¹ NaCl, pH 7,0 (recomendada pelo fabricante).

Com as condições avaliadas, descritas anteriormente, não foi possível conseguir sinais cromatográficos com resolução a partir dos extratos proteicos das folhas N-MG, utilizadas para os testes. As variações dos cromatogramas do extrato proteico da Figura 17, obtido utilizando como fase móvel tampão tris-HCl, é um exemplo dos perfis cromatográficos obtidos com as fases móveis testadas.

Ao observar o cromatograma exemplo da Figura 17, a presença de um único sinal, com diferentes tempos de retenção e largura, para cada vazão de fase móvel usado, fez inferir que a ampla faixa de exclusão da coluna (10 até 600 kDa) não permitiu ter resolução para as proteínas solúveis do extrato analisado, e que, muito possivelmente, os tamanhos das proteínas, presentes nos extratos aquosos das folhas da *A. thaliana*, devem ser semelhantes.

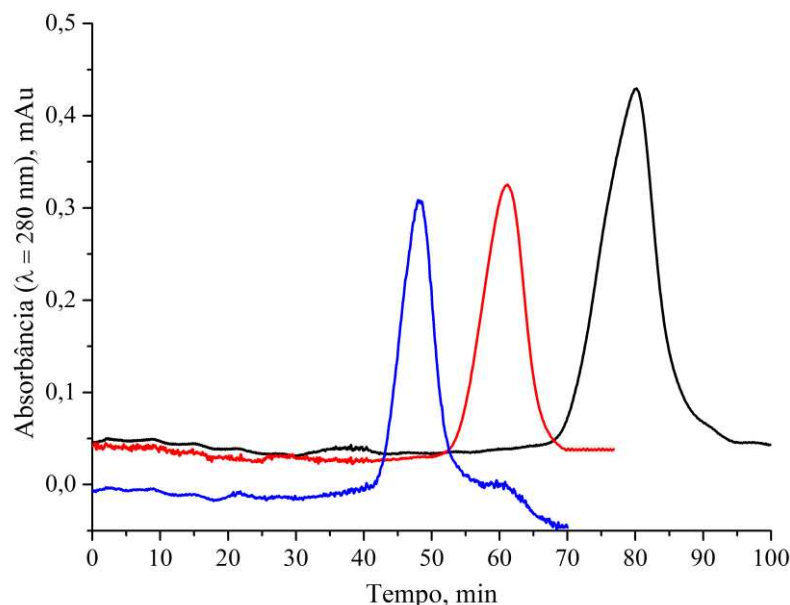


Figura 17. Cromatograma do extrato das folhas N-MG irrigadas com dose superior de Se. Coluna superdex 200, SEC-DAD, $\lambda = 280$ nm. Variação da vazão da fase móvel tampão 30 mmol L⁻¹ tris-HCl, pH 7,5. 0,3 mL min⁻¹, 0,4 mL min⁻¹ e 0,5 mL min⁻¹.

Visando obter um maior número de sinais no cromatograma, ou seja, uma melhor resolução cromatográfica das proteínas foi utilizada a coluna SEC Superdex 75 10/300. Esta coluna possui uma menor faixa de exclusão molecular 3 - 70 kDa. As vazões e tipos de fases móveis testadas foram as mesmas usadas anteriormente com a coluna Superdex 200 10/300. Também foi controlado que a pressão de trabalho não fosse maior que a pressão limite da coluna, Tabela 10.

As fases móveis testadas que permitiram obter um maior número de sinais cromatográficos, utilizando uma menor concentração do sal, foram o tampão 100 mmol L⁻¹ acetato de amônio pH 7,2^{4,76} e o tampão 30 mmol L⁻¹ tris-HCl pH 7,5³⁸ (Figura 18). Neste caso, o número de sinais obtidos no perfil cromatográfico foi maior quando comparado com os obtidos usando a coluna Superdex 200 10/300, Figura 17.

O cromatograma obtido usando como fase móvel tampão 30 mmol L⁻¹ tris-HCl pH 7,5 mostrou uma maior separação das proteínas, refletido no maior número de sinais. A variação da vazão da fase móvel não alterou o número de sinais no cromatograma, mas os tempos de retenção e a largura dos sinais diminuíram, com consequente melhora do tempo de corrida cromatográfico.

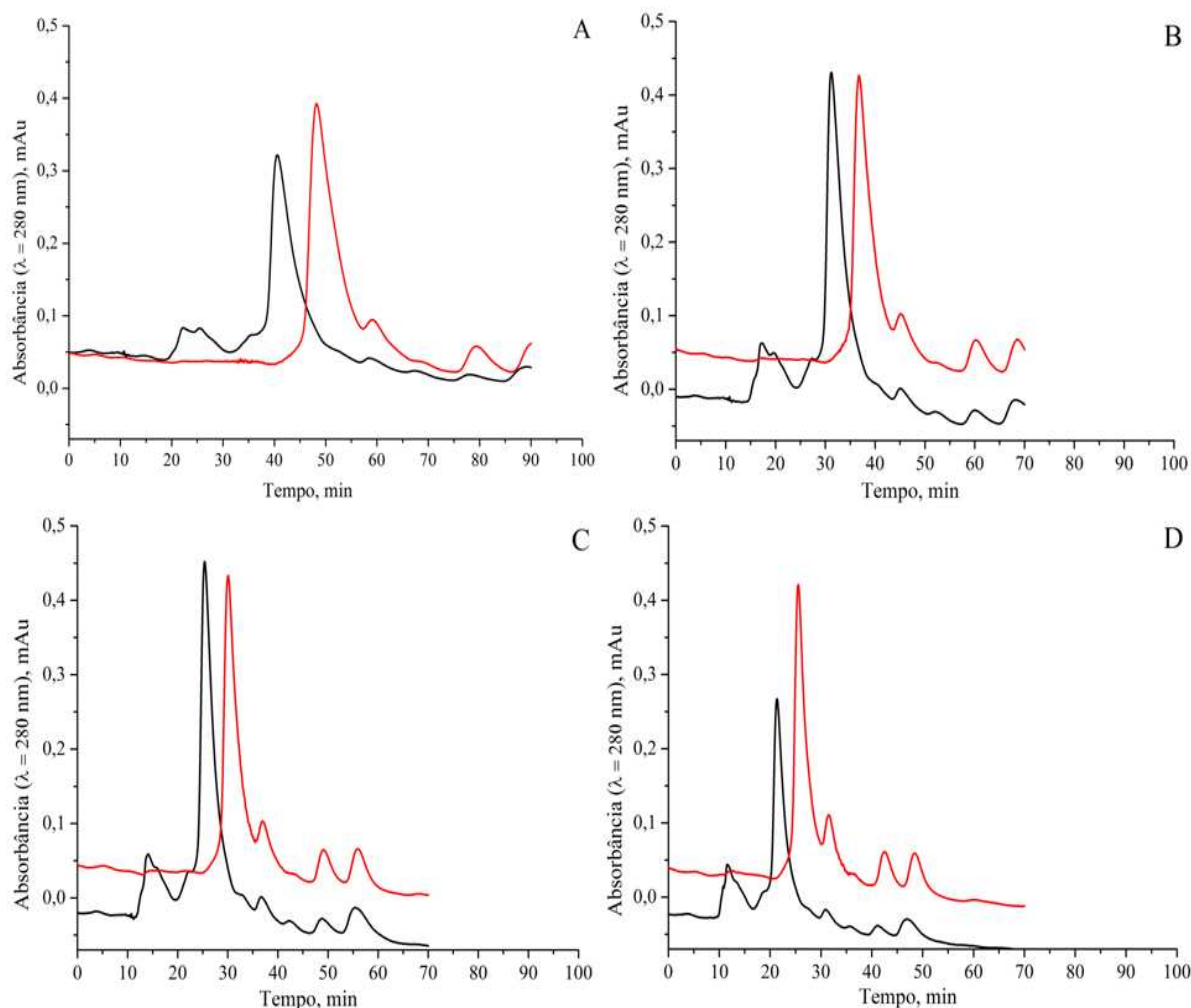


Figura 18. Cromatogramas do extrato das folhas N-MG irrigadas com dose superior de Se. SEC-DAD, $\lambda = 280$ nm, volume de injeção = 60 μ L. Variação da natureza e vazão da fase móvel utilizando coluna Superdex 75 10/300. **Tampão 30 mmol L⁻¹ tris-HCl, pH 7,5 e tampão 100 mmol L⁻¹ acetato de amônio, pH 7,2.** (A) 0,3 mL min⁻¹ (B) 0,4 mL min⁻¹ (C) 0,5 mL min⁻¹ (D) 0,6 mL min⁻¹.

As poucas diferenças entre os cromatogramas obtidos com as duas fases móveis da Figura 18 são compreensíveis devido à similaridade das suas forças iônicas, o que faz com que a coluna SEC exiba efeitos eletrostáticos e hidrofóbicos similares nos dois casos. Neste caso, no intuito de obter uma maior variação e, possivelmente, um aumento dos sinais cromatográficos, a força iônica da fase móvel foi alterada. Para isso, foram feitas misturas das soluções de tris-HCl e acetato de amônio, 30 mmol L⁻¹ tris-HCl e 100 - 300 mmol L⁻¹ acetato de amônio pH 7,5, Figura 19.

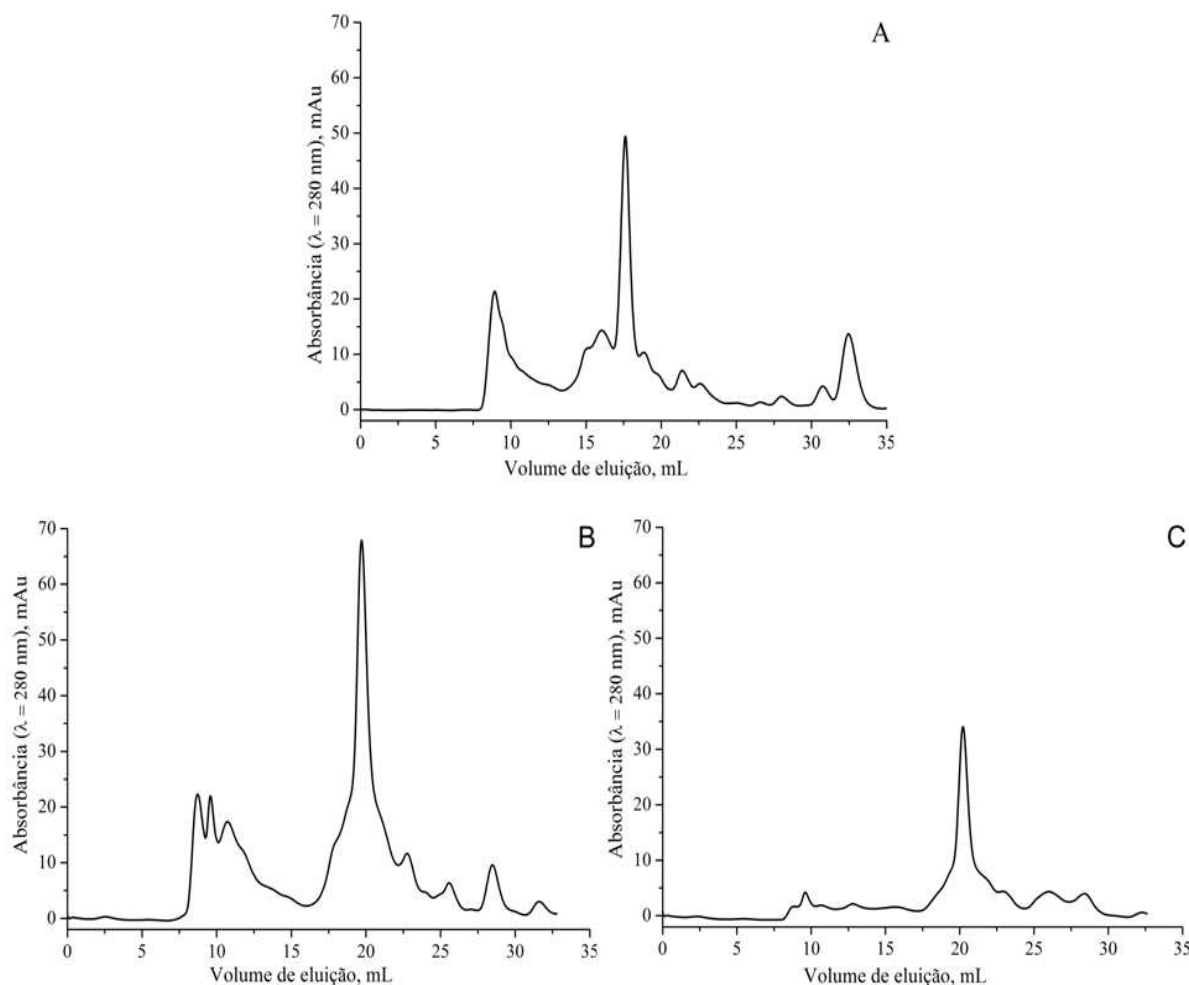


Figura 19. Cromatogramas SEC-DAD obtido no equipamento *FPLC* (ÄKTA purifier, p900). $\lambda = 280$ nm Volume de injeção = $250 \mu\text{L}$, vazão = 1 mL min^{-1} . Variação da força iônica utilizando coluna Superdex 75 10/300. (A) Tampão 30 mmol L^{-1} tris-HCl, pH 7,5 (B) 30 mmol L^{-1} tris-HCl + 100 mmol L^{-1} acetato de amônio, pH 7,5 (C) 30 mmol L^{-1} tris-HCl + 300 mmol L^{-1} acetato de amônio, pH 7,5.

No entanto, o uso destas fases móveis não foi viável, devido a que não aumentaram significativamente o número de sinais cromatográficos. Além disso, a presença de altas concentrações de sais na fase móvel pode gerar problemas da detecção de Se no ICP-MS e na posterior identificação das proteínas utilizando o LC-ESI-MS/MS^{69,103}. Cabe esclarecer que as análises relativas ao aumento da força iônica na fase móvel foram feitas em um equipamento diferente, cromatógrafo FPLC ÄKTA purifier, p900 (do inglês *Fast Protein Liquid Chromatography*), mas utilizando a mesma coluna e condições trabalhadas no cromatógrafo líquido Perkin Elmer, Série 200.

Uma vez escolhidas as condições de trabalho para uma boa separação das proteínas solúveis nos extratos das folhas e a posterior análise do Se no ICP-MS, foram coletadas as frações correspondentes a quatro corridas cromatográficas com vazão de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ e volume de injeção de $60 \mu\text{L}$ para as fases móveis de tampão 100 mmol L^{-1} acetato de amônio

pH 7,2 e o tampão 30 mmol L⁻¹ tris-HCl pH 7,5. Em seguida, estas foram analisadas no equipamento de ICP-MS, no modo *off-line*, para conhecer, de forma semi-quantitativa, as frações que continham Se em quantidades detectáveis (vide Figura 20).

Os resultados obtidos mostram que as maiores contagens de Se estão nas frações F4, F5, e F6 para o tampão tris-HCl, e na fração F2 para o tampão de acetato de amônio, como mostrado na Figura 20. Para cada caso, com o objetivo de verificar qualquer contaminação vinda do sistema de extração, foram determinados os sinais dos brancos de cada fase móvel (mesma solução extratora de proteínas).

Como se pode observar, as maiores contagens de Se foram registradas quando foi utilizada como fase móvel e solução extratora o tampão 30 mmol L⁻¹ tris-HCl pH 7,5. Com este resultado e com os dados da quantificação das proteínas (Figura 16 A, seção 10.1), o tampão tris-HCl foi, então, a melhor opção. Ele oferece condições favoráveis para o sistema de SEC-ICP-MS e a quantidade de proteínas e Se extraídas foi maior, quando comparada com a outra fase móvel.

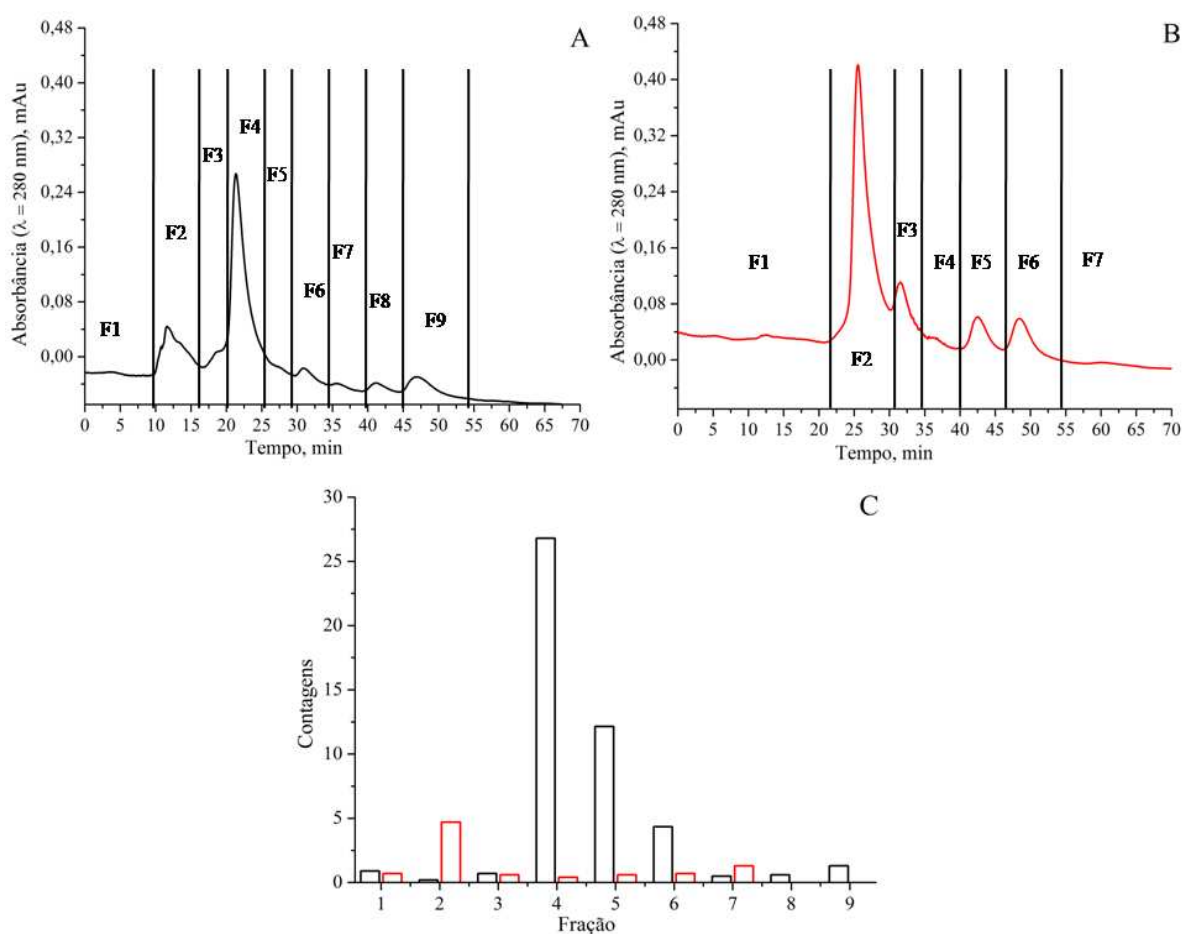


Figura 20. Frações de *A. thaliana* N-MG coletadas de 4 injeções cromatográficas. (A) **Tampão 30 mmol L⁻¹ tris-HCl, pH 7,5** (B) **tampão 100 mmol L⁻¹ acetato de amônio, pH 7,2** (C) Avaliação semi-quantitativa de Se no ICP-MS, no modo *off-line*.

4.2.2. Segunda separação cromatográfica: Troca aniônica (AEX)

Com perspectivas na melhora da separação, e, conseqüentemente, aumento das possibilidades de identificação de proteínas associadas ao Se, foi necessário testar algumas condições de trabalho no sistema cromatográfico escolhido para a segunda separação. As condições foram preliminarmente escolhidas fazendo uma obtenção de sinais cromatográficos dos padrões da BSA e dois seleno-compostos (seleno-cisteína e seleno-metionina).

As variações da fase móvel foram tanto no tipo de solvente, concentração dos mesmos, vazão através da coluna e proporções entre as duas soluções que constituíam a fase móvel. Isso foi realizado com a finalidade de tentar obter um perfil cromatográfico com maior resolução de picos, em um tempo curto de corrida, e com condições que permitissem, posteriormente, a identificação das proteínas das frações separadas contendo Se.

As fases móveis testadas já foram utilizadas em estudos metalômicos de plantas^{4,49}, além disso, possuem vantagens práticas para serem usadas: tanto o tampão tris, como o bicarbonato, são fases móveis compatíveis com a fase móvel da primeira separação cromatográfica, e podem ser utilizados como solvente no passo de digestão com tripsina, etapa previa à identificação das proteínas dos sinais cromatográficos.

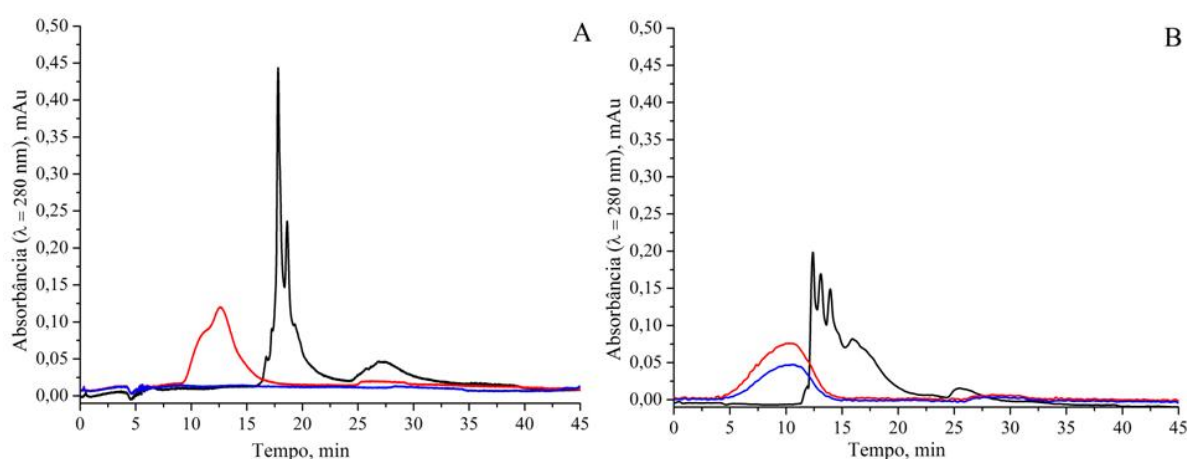


Figura 21. Perfil cromatográfico de BSA, Se-cis e Se-met utilizando AEX-DAD, $\lambda = 280$ nm. (A) fase móvel A = tampão 10 mmol L⁻¹ tris-HCl, pH 6,5 e B = A + 300 mmol L⁻¹ de acetato de amônio. (B) fase móvel A = tampão 20 mmol L⁻¹ tris-HCl, pH 6,5 e B = A + 300 mmol L⁻¹ de acetato de amônio. Vazão 1 mL min⁻¹. Volume de injeção 50 e 100 μ L, respectivamente. Gradiente: 100% A (2 min), 80% A (2 min), 60% A (4 min), 40% A (5 min), 20% A (9 min), 0% A (15 min), 40% A (2 min), 80% A (2 min), 100% A (5 min).

Após analisar os perfis cromatográficos, da BSA, Se-Cis e Se-met obtidos por meio das variações das condições de trabalho na troca aniônica (vide Figuras 21 e 22), foi realizada uma escolha preliminar. A primeira condição foi a fase móvel composta de duas soluções uma A = tampão 20 mmol L⁻¹ tris-HCl, pH 6,5 e uma B = A + 300 mmol L⁻¹ de acetato de amônio, Figura 21 B. Outra escolha foi a fase móvel composta de A = bicarbonato de amônio 10 mmol L⁻¹ pH 6,5 e B = A + 300 mmol L⁻¹ de acetato de amônio, Figura 22 A.

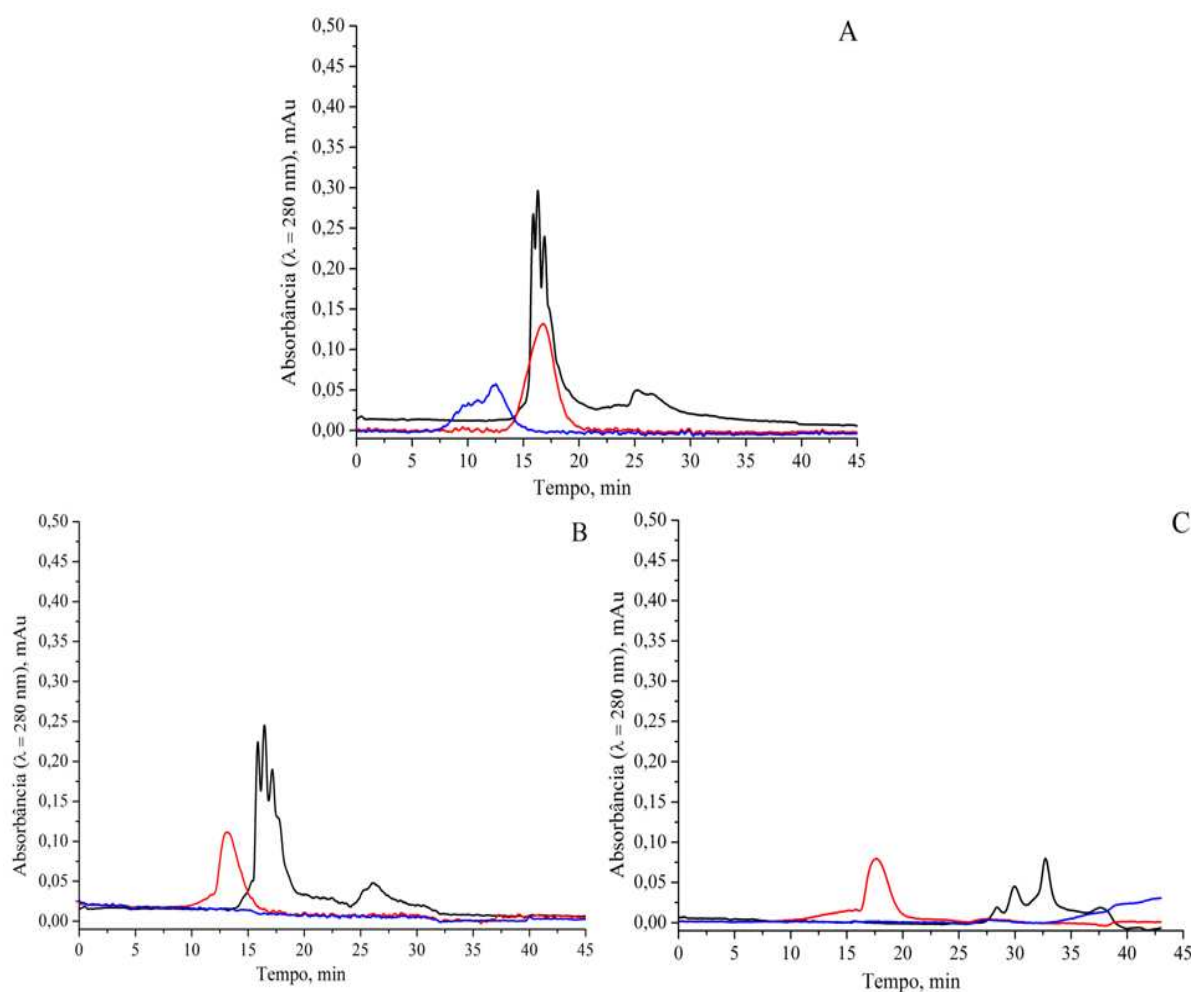


Figura 22. Perfil cromatográfico de **BSA**, **Se-cis** e **Se-met** utilizando AEX-DAD, $\lambda = 280$ nm. **(A)** fase móvel foi A = 10 mmol L⁻¹ bicarbonato de amônio, pH 6,5 e B = A + 300 mmol L⁻¹ de acetato de amônio. **(B)** A = 20 mmol L⁻¹ bicarbonato de amônio, pH 6,5 e B = A + 200 mmol L⁻¹ de acetato de amônio. **(C)** A = 20 mmol L⁻¹ Bicarbonato de amônio, pH 6,5 e B = A + 300 mmol L⁻¹ de acetato de amônio. Vazão 1 mL min⁻¹. Volume de injeção 50 e 100 μ L, respectivamente. Gradiente: 100% A (2 min), 80% A (2 min), 60% A (4 min), 40% A (5 min), 20% A (9 min), 0% A (15 min), 40% A (2 min), 80% A (2 min), 100% A (5 min).

As duas condições escolhidas foram testadas com os extratos proteicos das folhas da *A. thaliana* para conferir qual delas permitiria obter um maior número de sinais cromatográficos da amostra, e, desta forma, ampliar as possibilidades de identificação de

proteínas associadas ao Se, permitindo, então, analisar as mudanças no metaloma, principalmente em termos das proteínas ou seleno-proteínas solúveis em água.

4.3. Análise cromatográfica dos extratos proteicos das folhas de *A. thaliana*

Uma vez escolhido o método de extração das proteínas das folhas de *A. thaliana*, as condições de separação dos extratos proteicos e a identificação de Se (Tabela 9, Capítulo 1), foram analisadas as folhas MG e N-MG, controle e irrigadas com a dose superior de selenito de sódio. O esquema do processo é mostrado na Figura 23.

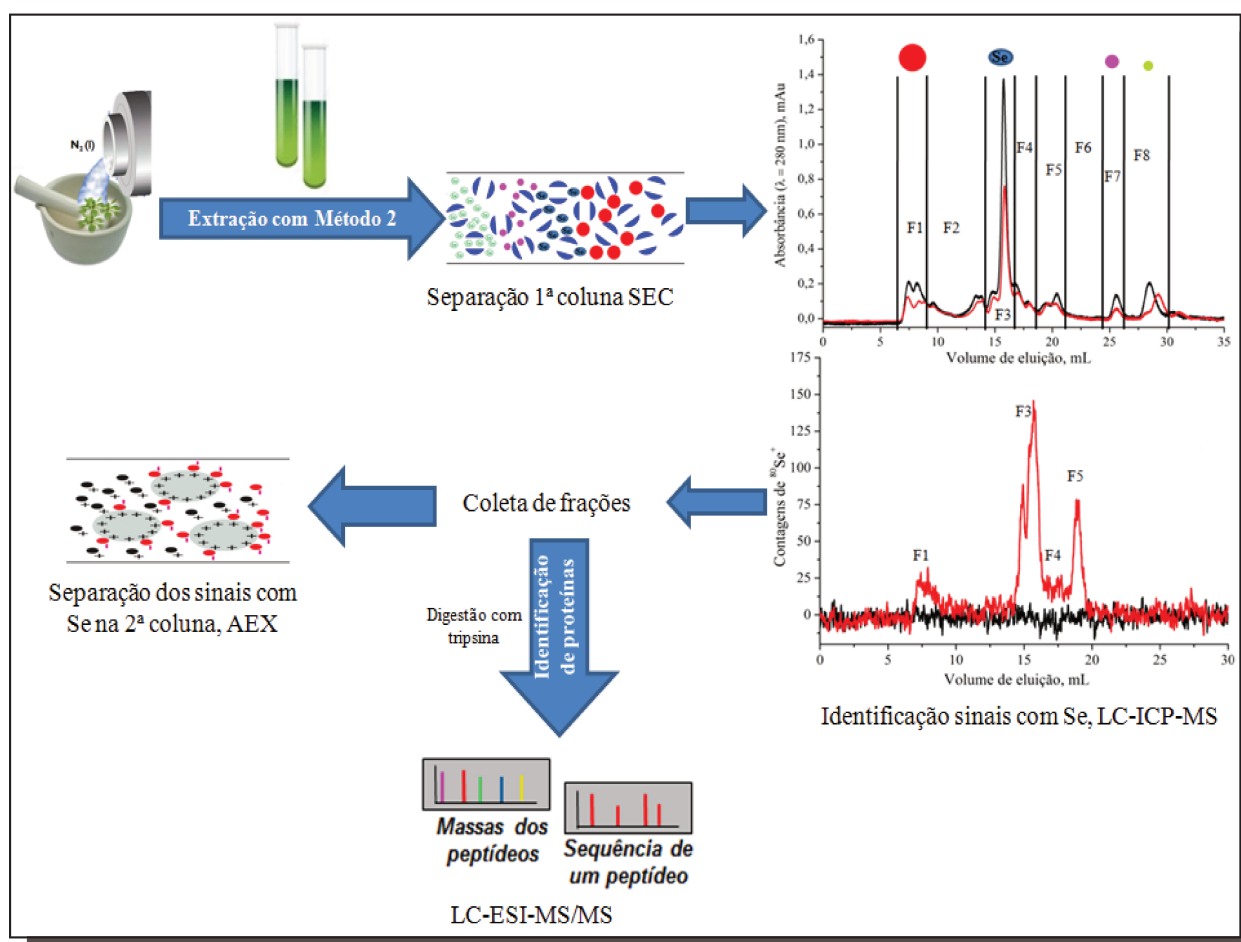


Figura 23. Diagrama esquemático do procedimento para análise das folhas de *A. thaliana*, empregando LC-ICP-MS.

Resumidamente, *ca.* 1 g de material vegetal homogeneizado com N_2 líquido foi submetido à extração de proteínas com banho de ultrassom, utilizando como solução extratora a mesma fase móvel, posteriormente usada na separação cromatográfica. Os extratos proteicos

filtrados e quantificados foram injetados no sistema SEC-ICP-MS, para identificar a presença de Se nos sinais cromatográficos. Em seguida, foram coletadas as frações que continham Se, de dez injeções do extrato. Estas foram liofilizadas, ressolubilizadas em 500 μL de água, e centrifugadas por 10 min a 4 °C a 6000 rpm. Posteriormente, elas foram injetadas novamente em uma segunda coluna cromatográfica (AEX), acoplada com o ICP-MS, tentando melhorar a separação.

No processo de preparo da amostra, a quantificação das proteínas, solúveis na solução aquosa, das folhas de *A. thaliana*, usando o kit 2-D Quanti, mostrou novamente (como foi obtido com o método de Bradford, no Capítulo 1 Figura 10) uma diferença significativa de 16 e 34%, entre as folhas N-MG e MG nos dois grupos tratamento controle e Se superior, respectivamente (vide Figura 24), confirmando que a modificação genética, utilizada nesta pesquisa, afetou a produção de proteínas hidrofílicas.

Além disso, é possível avaliar que a presença de Se não afetou significativamente a concentração das proteínas hidrofílicas nas plantas N-MG, enquanto que nas plantas MG, uma maior concentração de Se fez diminuir em 26% a quantidade destas proteínas. Este fato permite reafirmar que o metabolismo da planta modificada geneticamente foi alterado, e, conseqüentemente, sua resposta frente ao selenito é diferente, quando comparada com a planta N-MG.

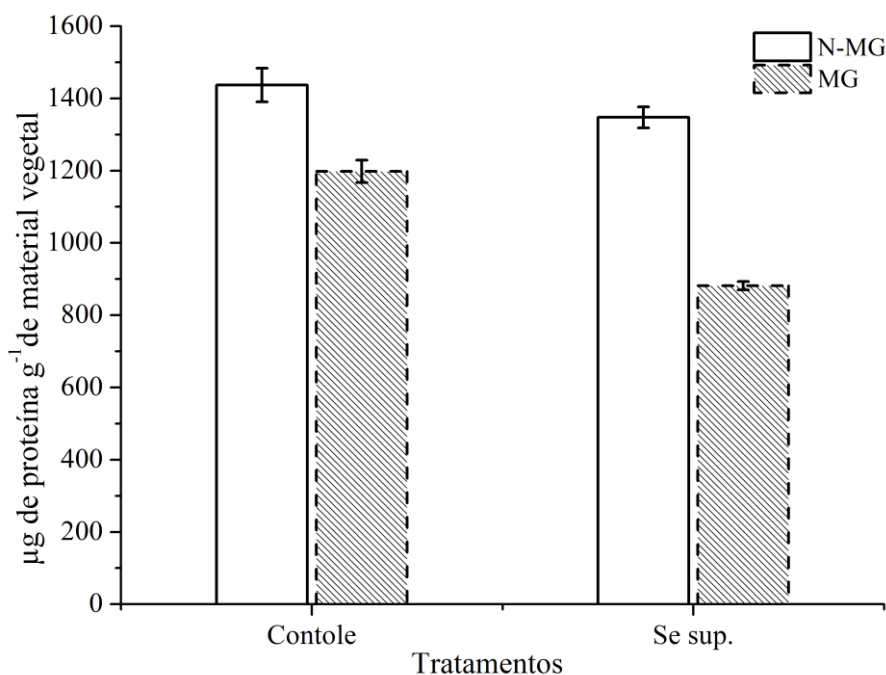


Figura 24. Concentração de proteínas nas folhas de *A. thaliana* MG e N-MG, controle e dose de Se superior, utilizado o Kit 2-D Quant, $\lambda = 480$ nm.

Continuando com a análise das amostras N-MG e MG controle e irrigadas com Se, nas Figuras 25 e 26 são apresentados os perfis dos sinais cromatográficos no sistema SEC-DAD. Ao analisar os cromatogramas, tendo em conta a faixa de exclusão molecular da coluna (região assinalada nas figuras, Ve 8,9 até 16,8 mL), pode-se classificar as proteínas em seus tamanhos moleculares, sendo: biomoléculas de elevada massa molecular (>70 kDa, sinais localizados antes da região assinalada nas figuras) e baixa massa molecular (<3 kDa, sinais depois da região de exclusão). Então, note-se que as folhas de *A.thaliana* N-MG e MG possuem um número maior de compostos de baixa massa molecular.

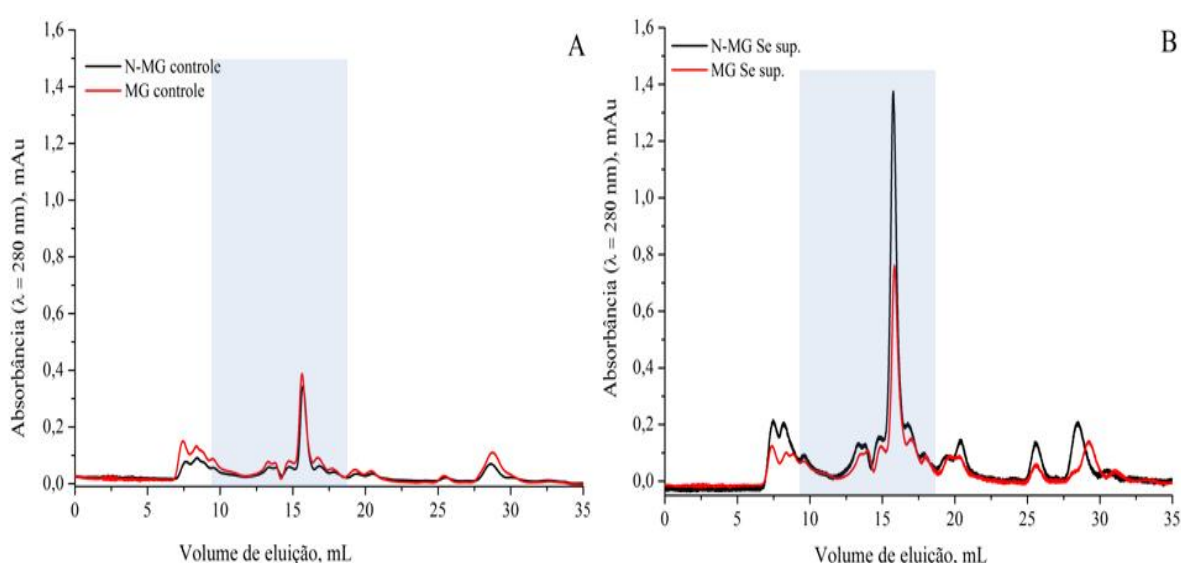


Figura 25. Cromatograma do extrato das folhas de *A. thaliana* MG e N-MG. Coluna Superdex 75 10/300, SEC-DAD, $\lambda = 280$ nm. Volume de injeção= 100 μ L, vazão= 1 mL min⁻¹, fase móvel= tampão 30 mmol L⁻¹ tris-HCl, pH 7,5. Tratamento (A) Controle (B) dose de Se superior. A região assinalada corresponde à faixa de exclusão molecular da coluna.

A obtenção das massas moleculares foi baseada no cálculo da equação da curva de calibração da coluna de SEC (Equação 2), na qual, para estimar a massa molecular, se supõe uma separação estritamente baseada na exclusão molecular (efeito mecânico), sem considerar as possíveis interações do analito com a fase estacionária da coluna (efeitos químicos ou eletrostáticos) ¹⁰⁵. Quando observados os cromatogramas das amostras (Figuras 25 e 26), pode-se pensar que existam interações entre as moléculas solúveis e a fase estacionária. Os sinais cromatográficos que saem depois do volume da coluna (*ca.* 24 mL) revelam esta interação, já que é necessário um volume maior de fase móvel para conseguirem eluir. Posto isto, não é possível confirmar a MM das proteínas nos cromatogramas das amostras, mas pode-se ter uma possível estimativa da mesma.

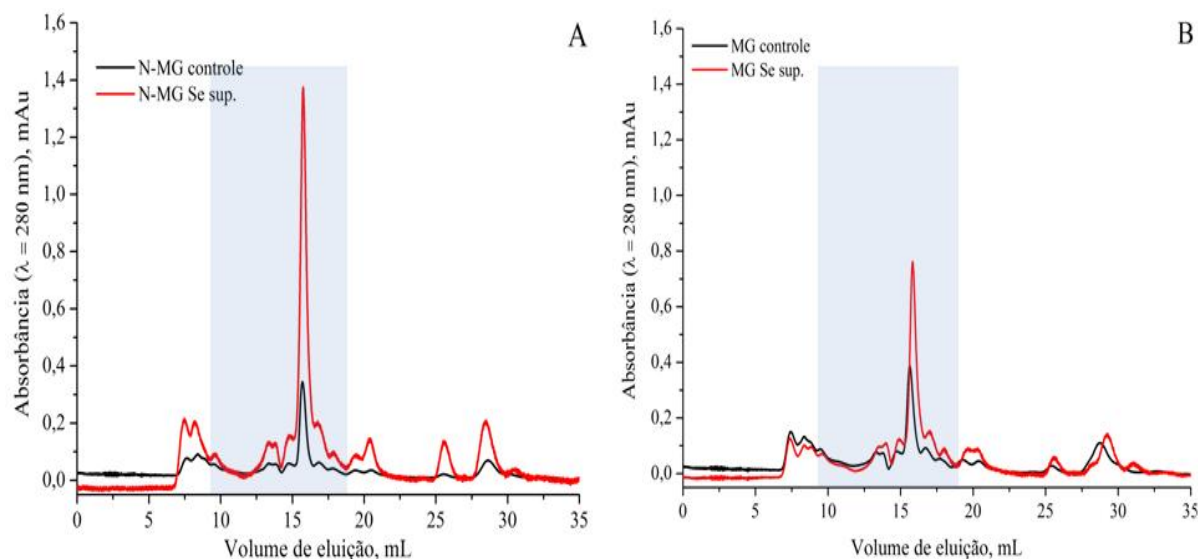


Figura 26. Cromatograma do extrato das folhas de *A. thaliana* controle e irrigadas com dose superior de Se. Coluna Superdex 75 10/300, SEC-DAD, $\lambda = 280$ nm. Volume de injeção= 100 μ L, vazão= 1 mL min^{-1} , fase móvel= tampão 30 mmol L^{-1} tris-HCl, pH 7,5. (A) N-MG (B) MG. *A região assinalada corresponde à faixa de exclusão molecular da coluna.

Ainda, em relação à análise dos cromatogramas, nota-se que os extratos das folhas N-MG e MG não mostraram diferenças significativas quanto à forma e no número de picos, Figura 25. No entanto, a presença de Se, tanto nas plantas N-MG e MG, aumentou a intensidade (consequentemente as áreas) dos sinais quando comparados com os das amostras controle (vide Figura 26). Também é perceptível que o aumento da intensidade é maior para as plantas N-MG, mostrando que o metabolismo das plantas modificadas geneticamente foi alterado. Além disso, e somado aos dados da produção de ERO (vide item 5.4 Capítulo 1) pode-se pensar que essa modificação conferiu maior resistência à planta, frente ao estresse que o selenito produz a ela. Isso é devido às variações na produção de biomoléculas hidrofílicas, que absorvem em um comprimento de onda (λ) de 280 nm, estarem em menor quantidade que nas plantas N-MG (Figuras 25 e 26).

Analisando os perfis dos sinais de Se obtidos empregando detecção por ICP-MS, nota-se que o Se nas folhas de *A. thaliana* N-MG e MG liga-se, preferencialmente, a compostos de MM de 3 a 70 kDa (Figura 27); porém, este também apresentou sinal nas moléculas de elevada MM, bem como nas de baixa MM. Assim, um total de cinco frações foi obtido, com concentrações detectáveis de Se nas amostras irrigadas com o metalóide.

O selênio presente na fração de MM inferior sugere que este esteja coordenado a pequenos compostos como, por exemplo, metabólitos hidrofílicos, utilizados pela planta para seu processo de assimilação e/ou detoxificação do metalóide^{9,38,107,108}. Na literatura, pesquisadores utilizando diferentes métodos de extração com o sistema de LC-ICP-MS, têm

mostrado a presença de espécies de Se de baixa MM em uma grande variedade de vegetais enriquecidos com este metalóide, sendo os mais frequentes a selenometionina, selenocisteína, Se-metilselenocisteína e selenoaçúcares^{38,46,107,108}. SeMet e SeCis são geralmente consideradas os precursores da formação das seleno-proteínas^{11,12,38,43}.

Quando analisados os sinais de Se (ICP-MS) com o cromatograma de UV nas amostras MG e N-MG da Figura 27, percebe-se que a área do sinal de Se, para as duas amostras tratadas com selenito, não possuem diferenças significativas. No entanto, as áreas dos sinais no UV, principalmente o terceiro sinal que corresponde à maior quantidade de Se, mostram um maior aumento nas folhas N-MG.

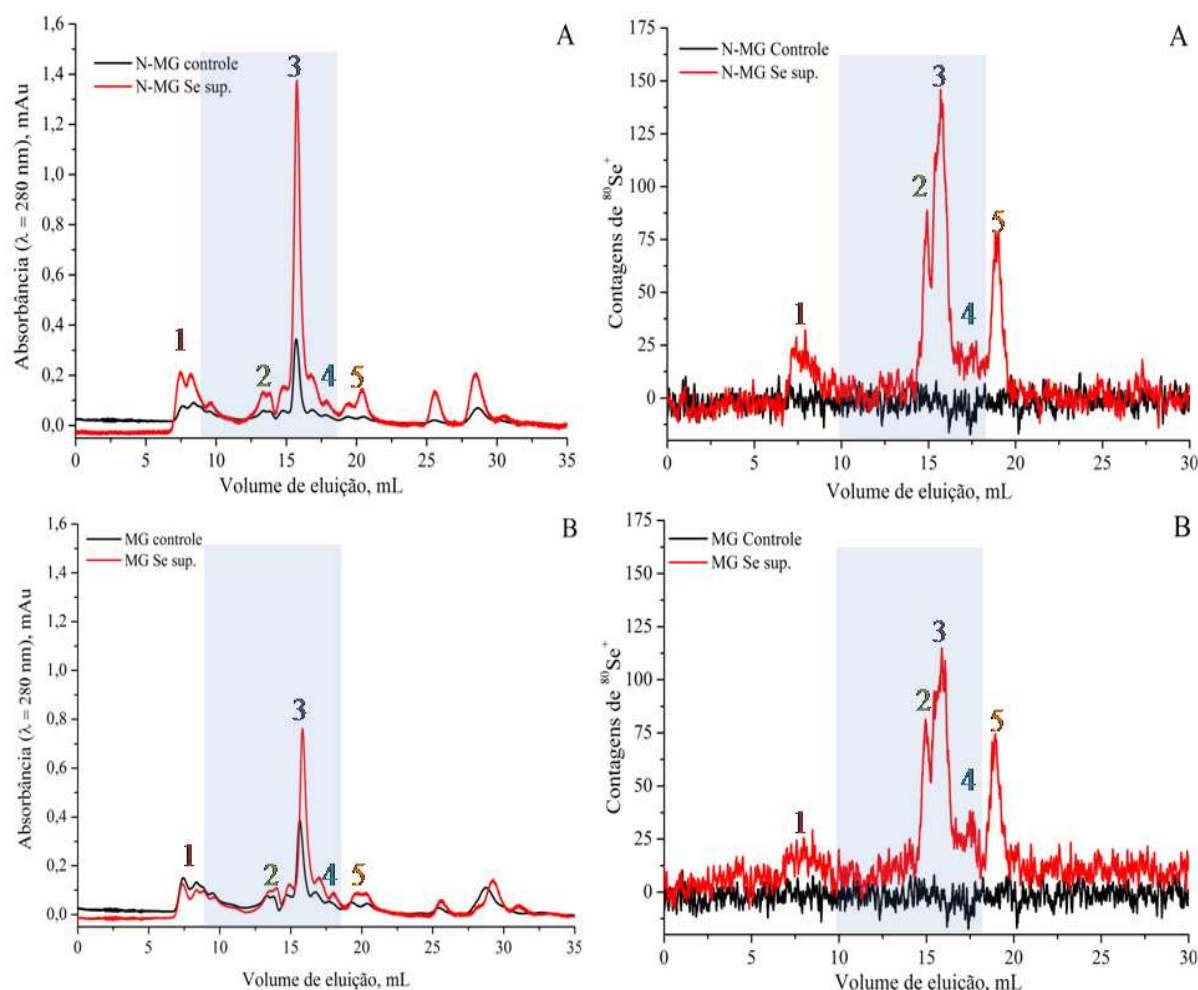


Figura 27. Cromatogramas de SEC-ICP-MS das folhas de *A. thaliana* (A) N-MG e (B) MG controle e irrigadas com Se. Na esquerda, os perfis de adsorção no UV, $\lambda = 280$ nm e na direita as contagens do isótopo $^{80}\text{Se}^+$. *A região assinalada corresponde à faixa de exclusão molecular da coluna e os números, de 1 até 5, indicam as frações que contêm Se.

Tendo em conta o número de sinais nos perfis cromatográficos dos extratos hidrofílicos das folhas de *A. thaliana* N-MG e MG, controle e irrigadas com Se, é possível notar que cada sinal é um conjunto de compostos com MM muito parecidas que não foram separadas devido ao baixo poder de resolução das colunas de exclusão por tamanho. Sendo assim, as cinco frações coletadas contendo Se, foram submetidas novamente à separação cromatográfica, agora, na modalidade de troca aniônica.

Mesmo coletando-se frações correspondentes a dez injeções da amostra, não foi possível a obtenção de sinais utilizando a coluna de troca aniônica, PRP-X500 (empregada na separação de proteínas), em nenhum dos dois detectores utilizados, UV-Vis e ICP-MS. Assim, foi determinada a concentração de Se nas frações diluídas cinco vezes, utilizando os parâmetros do ICP-MS da Tabela 9 no Capítulo 1, obtendo os valores indicados na Tabela 12.

Tabela 12. Quantidade de Se presente nas frações coletadas após separação no sistema SEC-DAD.

Parâmetros da curva de calibração		
Faixa de concentração	0,5-20 µg L ⁻¹	
LD	0,038 µg L ⁻¹	
LQ	0,127 µg L ⁻¹	
r ²	0,999	
Concentração de Se nas frações (µg L ⁻¹)		
Nº da fração	N-MG Se sup.	MG Se sup.
1	3,62	4,68
2	4,84	4,67
3	10,6	8,50
4	3,41	3,76
5	3,14	2,97

Confirmado, mais uma vez, a presença de Se nas frações, foi possível pensar que a ausência de sinais de Se no detector de ICP-MS (que possui uma maior capacidade de detecção), correspondente às frações coletadas da SEC, pode ser pelo fato que a coluna AEX conseguiu separar, ainda mais, em várias frações os seleno-compostos que não foram resolvidos pelo mecanismo de exclusão por tamanho, da primeira coluna. Consequentemente, a concentração dos compostos que absorvem a 280 nm, e que contêm Se nas novas frações separadas por troca aniônica, está abaixo do limite de detecção dos detectores empregados. Além disso, a presença de altas concentrações de sais na fase móvel pode ter contribuído para diminuição do sinal analítico no ICP-MS ^{2,69,101-103}.

5. CONCLUSÕES PARCIAIS

Os cuidados na escolha do método de extração das proteínas hidrofílicas, das condições de separação cromatográficas, no caso particular SEC e AEX, e dos parâmetros para a hifenação do LC-ICP-MS para identificação de Se nas frações das amostras, compõem o conjunto básico de precauções que são necessárias em estudos bioanalíticos, em que são analisadas amostras complexas, como o caso de extratos proteicos de vegetais, como ferramenta para minimizar erros advindos dos equipamentos ou métodos empregados.

O sistema LC-ICP-MS permitiu monitorizar e comparar as espécies de Se solúveis em água das folhas de *A. thaliana* N-MG e MG irrigadas com uma solução de selenito de sódio frente à uma situação controle, o qual permitiu concluir que tanto a modificação genética, como a presença de Se, não alteraram o número e a forma dos sinais nos cromatogramas, obtidos utilizando a separação de exclusão por tamanho. No entanto, a presença de Se nas plantas aumentou a intensidade (consequentemente as áreas) dos sinais dos compostos solúveis das folhas N-MG e MG, quando comparados com o tratamento controle. Porém, quando comparadas entre MG e N-MG, o aumento foi mais perceptível nas folhas N-MG. Assim, pode-se pensar que a presença do Se está afetando, de uma forma mais significativa, a produção de moléculas solúveis em água, as quais, possivelmente, são utilizadas pela planta como mecanismo de detoxicação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os resultados dos estudos em folhas de *Arabidopsis thaliana* MG e N-MG, sob as condições dos diferentes tratamentos com selenito de sódio, permitiram concluir que tanto a modificação genética como a presença do Se têm efeitos sobre o metabolismo da planta, fazendo com que ela produza uma maior concentração de espécies reativas de oxigênio, e altere a concentração das moléculas solúveis em água.

Notou-se, também, que a modificação genética foi responsável pela maior resistência da planta ao estresse oxidativo produzido pela presença de selenito, a qual foi perceptível devido à maior capacidade de produção de massa úmida de folhas, menor indício de clorose nas folhas, aumento na atividade de enzimas como a SOD, diminuição na concentração de MDA e menores mudanças no perfil dos sinais cromatográficos. Porém, análises de outras enzimas ou compostos orgânicos, encarregados da defesa da planta, poderiam ser determinados como complemento da informação já obtida nesta dissertação, desta forma tentar contribuir na resposta das dúvidas da função oxidante ou antioxidante do Se nas plantas.

Além disso, o estudo das folhas de *A. thaliana* N-MG e MG, irrigadas com uma solução de selenito de sódio frente a uma situação controle e utilizando SEC-DAD-ICP-MS, revelou a existência de várias espécies de Se, que devem ser isoladas e purificadas para identificação, empregando, por exemplo, nanoLC-ESI-MS/MS, com a finalidade de conhecer as mudanças no metaloma, principalmente em termos de seleno-compostos hidrofílicos.

REFERÊNCIAS

- (1) Wienkoop, S.; Baginsky, S.; Weckwerth, W. *Arabidopsis thaliana* as a model organism for plant proteome research. *J. Proteomics* **2010**, *73* (11), 2239–2248.
- (2) Timerbaev, A. R. Determination of metal species in biological samples: From speciation analysis to metallomics. *J. Anal. Chem.* **2012**, *67* (2), 214–221.
- (3) Schmid, M.; Davison, T. S.; Henz, S. R.; Pape, U. J.; Demar, M.; Vingron, M.; Schölkopf, B.; Weigel, D.; Lohmann, J. U. A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat. Genet.* **2005**, *37* (5), 501–506.
- (4) 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 2D-HPLC-ICP-MS and ESI-MS/MS. *Metallomics* **2012**, *4* (4), 373–378.
- (5) 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* (12), 1501.
- (6) 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* **2010**, *2* (12), 800.
- (7) Seth, C. S. A Review on Mechanisms of Plant Tolerance and Role of Transgenic Plants in Environmental Clean-up. *Bot. Rev.* **2011**, *78* (1), 32–62.
- (8) Maciel, B. C. M.; Barbosa, H. S.; Pessôa, G. S.; Salazar, M. M.; Pereira, G. A. G.; Gonçalves, D. C.; Ramos, C. H. I.; Arruda, M. A. Z. Comparative proteomics and metallomics studies in *Arabidopsis thaliana* leaf tissues: Evaluation of the selenium addition in transgenic and nontransgenic plants using two-dimensional difference gel electrophoresis and laser ablation imaging. *Proteomics* **2014**, *14* (7-8), 904–912.
- (9) Montes-Bayón, M.; Grant, T. D.; Meija, J.; Caruso, J. a. Selenium in plants by mass spectrometric techniques: developments in bio-analytical methods. *J. Anal. At. Spectrom.* **2002**, *17* (9), 1015–1023.

- (10) Sadi, B. B. M.; Vonderheide, A. P.; Gong, J.-M.; Schroeder, J. I.; Shann, J. R.; Caruso, J. a. An HPLC-ICP-MS technique for determination of cadmium-phytochelatins in genetically modified *Arabidopsis thaliana*. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2008**, *861* (1), 123–129.
- (11) Zhang, L.; Ackley, A. R.; Pilon-Smits, E. a H. Variation in selenium tolerance and accumulation among 19 *Arabidopsis thaliana* accessions. *J. Plant Physiol.* **2007**, *164* (3), 327–336.
- (12) Tinggi, U. Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review. *Toxicol. Lett.* **2003**, *137* (1-2), 103–110.
- (13) Kieffer, P.; Dommes, J.; Hoffmann, L.; Hausman, J.-F.; Renaut, J. Quantitative changes in protein expression of cadmium-exposed poplar plants. *Proteomics* **2008**, *8* (12), 2514–2530.
- (14) [Http://herbarivirtual.uib.es/cas-uv/especie/6202.html](http://herbarivirtual.uib.es/cas-uv/especie/6202.html). Herbario Virtual del Mediterráneo Occidental <http://herbarivirtual.uib.es/cas-uv/especie/6202.html> (data de acesso maio 2, **2014**).
- (15) [Http://www.seresmodelicos.csic.es/planta.html](http://www.seresmodelicos.csic.es/planta.html). Seres modélicos entre la naturaleza y en el laboratório <http://www.seresmodelicos.csic.es/planta.html> (data de acesso maio 2, **2014**).
- (16) Bomblies, K.; Yant, L.; Laitinen, R. a; Kim, S.-T.; Hollister, J. D.; Warthmann, N.; Fitz, J.; Weigel, D. Local-scale patterns of genetic variability, outcrossing, and spatial structure in natural stands of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* **2010**, *6* (3), e1000890.
- (17) Hunter, B.; Bomblies, K. Progress and Promise in using *Arabidopsis* to Study Adaptation, Divergence, and Speciation. *Arabidopsis Book* **2010**, *8*, e0138.
- (18) Koornneef, M.; Alonso-Blanco, C.; Vreugdenhil, D. Naturally occurring genetic variation in *Arabidopsis thaliana*. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2004**, *55*, 141–172.
- (19) Higashi, Y.; Hirai, M. Y.; Fujiwara, T.; Naito, S.; Noji, M.; Saito, K. Proteomic and transcriptomic analysis of *Arabidopsis* seeds: molecular evidence for successive processing of seed proteins and its implication in the stress response to sulfur nutrition. *Plant J.* **2006**, *48* (4), 557–571.

- (20) Carneiro, J. M. T.; Chacón-Madrid, K.; Maciel, B. C. M.; Arruda, M. A. Z. *Arabidopsis thaliana* and omics approaches: a review. *J. Integr. OMICS* **2015**, 5 (1), 1–16.
- (21) Van Hoewyk, D.; Takahashi, H.; Inoue, E.; Hess, A.; Tamaoki, M.; Pilon-Smits, E. a H. Transcriptome analyses give insights into selenium-stress responses and selenium tolerance mechanisms in *Arabidopsis*. *Physiol. Plant.* **2008**, 132 (2), 236–253.
- (22) The Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **2000**, 408 (6814), 796–815.
- (23) Voet, D.; Voet, J. G. *Bioquímica*, 4th ed.; Artmed: Porto Alegre, **2013**.
- (24) Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of biochemistry*, 5th ed.; Freedman and Company: New York, **2009**.
- (25) Gonçalves, D. C.; Ramos, C. H. I.; Pereira, G. a G. Estudos iniciais de interações da HSP90 através da caracterização funcional de um transgênico e biofísica de uma co-chaperona, Universidade Estadual de Campinas, **2012**.
- (26) Santarém, E. R. Métodos Eficientes para transformação genética de plantas. *Rev. Ciência Tecnol.* **1977**, 15, 81–90.
- (27) Bechtold, N.; Ellis, J.; Pelletier, G. In plant *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Comptes rendus l'Académie des Sci.* **1993**, 316 (10), 1194–1199.
- (28) Clough, S. J.; Bent, a F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **1998**, 16 (6), 735–743.
- (29) Griffiths, A. J.; Miller, J. H.; Suzuki, D. T.; Lewontin, R. C.; Gelbart, W. M. *An Introduction to Genetic Analysis*. W. H. Freeman **2000**.
- (30) Maciel, B. C. M. Proteômica e metalômica comparativa em folhas de *Arabidopsis Thaliana* transgênicas e não transgênicas, Universidade Estadual de Campinas, 2014.
- (31) Vidal, N.; Barbosa, H.; Jacob, S.; Arruda, M. Comparative study of transgenic and non-transgenic maize (*Zea mays*) flours commercialized in Brazil, focussing on proteomic analyses. *Food Chem.* **2015**, 180, 288–294.

- (32) Brandão, A. R.; Barbosa, H. S.; Arruda, M. A. Z. Image analysis of two-dimensional gel electrophoresis for comparative proteomics of transgenic and non-transgenic soybean seeds. *J. Proteomics* **2010**, 73 (8), 1433–1440.
- (33) Barbosa, H. S.; Arruda, S. C. C.; Azevedo, R. A.; Arruda, M. A. Z. New insights on proteomics of transgenic soybean seeds: evaluation of differential expressions of enzymes and proteins. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 402 (1), 299–314.
- (34) Garcia, J. S.; Magalhães, C. S. De; Arruda, M. A. Z. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. *Talanta* **2006**, 69 (1), 1–15.
- (35) Nishiyama, T.; Fujita, T.; Shin-I, T.; Seki, M.; Nishide, H.; Uchiyama, I.; Kamiya, A.; Carninci, P.; Hayashizaki, Y.; Shinozaki, K.; et al. Comparative genomics of *Physcomitrella patens* gametophytic transcriptome and *Arabidopsis thaliana*: implication for land plant evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, 100 (13), 8007–8012.
- (36) Arruda, M. A. Z.; Azevedo, R. A.; Barbosa, H. D. S.; Mataveli, L. R. V.; Oliveira, S. R.; Arruda, S. C. C. Comparative Studies Involving Transgenic and Non-Transgenic Soybean : What is Going On. In *A Comprehensive Survey of International Soybean Research - Genetics, Physiology, Agronomy and Nitrogen Relationships*; Board, J. E., Ed.; InTech: Brasil, **2010**; pp 583–613.
- (37) Da Silva, M. A. O.; Garcia, J. S.; de Souza, G. H. M.; Eberlin, M. N.; Gozzo, F. C.; Arruda, M. A. Z. Evaluation of sample preparation protocols for proteomic analysis of sunflower leaves. *Talanta* **2010**, 80 (4), 1545–1551.
- (38) Chan, Q.; Afton, S. E.; Caruso, J. A. Selenium speciation profiles in selenite-enriched soybean (*Glycine Max*) by HPLC-ICPMS and ESI-ITMS. *Metallomics* **2010**, 2 (2), 147–153.
- (39) Kaur, N.; Sharma, S.; Kaur, S.; Nayyar, H. Selenium in agriculture : a nutrient or contaminant for crops ? *Arch. Agron. Soil Sci.* **2014**, 60 (12), 1593–1624.
- (40) Van Hoewyk, D. A tale of two toxicities: malformed selenoproteins and oxidative stress both contribute to selenium stress in plants. *Ann. Bot.* **2013**, 112 (6), 965–972.
- (41) World Health Organization. *Selenium in Drinking-water*; 4 ed.; Geneva, **2011**.

- (42) Pilon-Smits, E. A. H.; Quinn, C. F. Selenium Metabolism in Plants. In *Cell Biology of Metals and Nutrients*; Hell, R., Mendel, R.-R., Eds.; Springer, **2010**; pp 225–241.
- (43) Barnett, J. P.; Scanlan, D. J.; Blindauer, C. a. Protein fractionation and detection for metalloproteomics: challenges and approaches. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402* (10), 3311–3322.
- (44) Mounicou, S.; Vonderheide, A. P.; Shann, J. R.; Caruso, J. a. Comparing a selenium accumulator plant (*Brassica juncea*) to a nonaccumulator plant (*Helianthus annuus*) to investigate selenium-containing proteins. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386* (5), 1367–1378.
- (45) Chan, Q.; Caruso, J. A. A metallomics approach discovers selenium-containing proteins in selenium-enriched soybean. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403* (5), 1311–1321.
- (46) Pyrzynska, K. Selenium speciation in enriched vegetables. *Food Chem.* **2009**, *114* (4), 1183–1191.
- (47) Lopez Heras, I.; Palomo, M.; Madrid, Y. Selenoproteins: the key factor in selenium essentiality. State of the art analytical techniques for selenoprotein studies. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400* (6), 1717–1727.
- (48) Hawrylak-Nowak, B.; Matraszek, R.; Pogorzelec, M. The dual effects of two inorganic selenium forms on the growth, selected physiological parameters and macronutrients accumulation in cucumber plants. *Acta Physiol. Plant.* **2015**, *37* (2), 41.
- (49) Wang, Y.; Wang, X.; Ngai, S.; Wong, Y. Comparative Proteomics Analysis of Selenium Responses in Selenium-Enriched Rice Grains. *J. Proteome Res.* **2013**, *12*, 808–820.
- (50) Sors, T. G.; Ellis, D. R.; Salt, D. E. Selenium uptake, translocation, assimilation and metabolic fate in plants. *Photosynth. Res.* **2005**, *86*, 373–389.
- (51) Wang, Y.-D.; Wang, X.; Wong, Y. Proteomics analysis reveals multiple regulatory mechanisms in response to selenium in rice. *J. Proteomics* **2012**, *75* (6), 1849–1866.

- (52) Garcia, J. S.; Gratão, P. L.; Azevedo, R. A.; Arruda, M. A. Z. Metal contamination effects on sunflower (*Helianthus annuus* L.) growth and protein expression in leaves during development. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54* (22), 8623–8630.
- (53) Arruda, S. C. C.; Barbosa, H. D. S.; Azevedo, R. A.; Arruda, M. A. Z. Comparative studies focusing on transgenic through cp4EPSPS gene and non-transgenic soybean plants: an analysis of protein species and enzymes. *J. Proteomics* **2013**, *93*, 107–116.
- (54) Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* **2002**, *7* (9), 405–410.
- (55) Scandalios, J. G. Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. *Plant Physiol.* **1993**, *101* (1), 7–12.
- (56) Kosová, K.; Vítámvás, P.; Prášil, I. T.; Renaut, J. Plant proteome changes under abiotic stress--contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *J. Proteomics* **2011**, *74* (8), 1301–1322.
- (57) Garcia, J. S.; Souza, G. H. M. F.; Eberlin, M. N.; Arruda, M. A. Z. Evaluation of metal-ion stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves through proteomic changes. *Metallomics* **2009**, *1* (1), 107–113.
- (58) El Kassis, E.; Cathala, N.; Rouached, H.; Fourcroy, P.; Berthomieu, P.; Terry, N.; Davidian, J.-C. Characterization of a selenate-resistant *Arabidopsis* mutant. Root growth as a potential target for selenate toxicity. *Plant Physiol.* **2007**, *143* (3), 1231–1241.
- (59) Cui, S.; Hu, J.; Guo, S.; Wang, J.; Cheng, Y.; Dang, X.; Wu, L.; He, Y. Proteome analysis of *Physcomitrella patens* exposed to progressive dehydration and rehydration. *J. Exp. Bot.* **2012**, *63* (2), 711–726.
- (60) Akbulut, M.; Cakir, S. The effects of Se phytotoxicity on the antioxidant systems of leaf tissues in barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* **2010**, *48* (2-3), 160–166.
- (61) Ohno, M.; Uraji, M.; Shimoishi, Y.; Mori, I. C.; Nakamura, Y.; Murata, Y. Mechanisms of the Selenium Tolerance of the *Arabidopsis thaliana* Knockout Mutant

- of Sulfate Transporter SULTR1;2. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2014**, 76 (5), 993–998.
- (62) Qing, X.; Zhao, X.; Hu, C.; Wang, P.; Zhang, Y.; Zhang, X.; Wang, P.; Shi, H.; Jia, F.; Qu, C. Selenium alleviates chromium toxicity by preventing oxidative stress in cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *Pekinensis*) leaves. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2015**, 114, 179–189.
- (63) Feng, R.; Wei, C.; Tu, S. The roles of selenium in protecting plants against abiotic stresses. *Environ. Exp. Bot.* **2013**, 87, 58–68.
- (64) Da Silva, M. A. O.; de Andrade, S. A. L.; Mazzafera, P.; Arruda, M. A. Z. Evaluation of sunflower metabolism from zinc and selenium addition to the culture: A comparative metallomic study. *Int. J. Mass Spectrom.* **2011**, 307 (1-3), 55–60.
- (65) Tang, H.; Liu, Y.; Gong, X.; Zeng, G.; Zheng, B.; Wang, D.; Sun, Z.; Zhou, L.; Zeng, X. Effects of selenium and silicon on enhancing antioxidative capacity in ramie (*Boehmeria nivea* (L.) Gaud.) under cadmium stress. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, 22 (13), 9999–10008.
- (66) Malik, J. A.; Goel, S.; Kaur, N.; Sharma, S.; Singh, I.; Nayyar, H. Selenium antagonises the toxic effects of arsenic on mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb.) plants by restricting its uptake and enhancing the antioxidative and detoxification mechanisms. *Environ. Exp. Bot.* **2012**, 77, 242–248.
- (67) Perez-Clemente, R. M.; Vives, V.; Zandalinas, S. I.; Lopez-Climent, M. F.; Munoz, V.; Gomez-Cadenas, A. Biotechnological Approaches to Study Plant Responses to Stress. *Biomed Res. Int.* **2013**, 1–10.
- (68) Cordeiro, M. C. R. *Engenharia genética conceitos, ferramentas e aplicações*, 1 ed.; Embrapa Cerrados, Ed.; Embrapa Cerrados: Planaltina, **2003**.
- (69) Mounicou, S.; Szpunar, J.; Lobinski, R. Inductively-coupled plasma mass spectrometry in proteomics, metabolomics and metallomics studies. *Eur. J. Mass Spectrom. (Chichester, Eng).* **2010**, 16 (3), 243–253.

- (70) Bianga, J.; Szpunar, J. ICP-MS-assisted identification of selenium-containing proteins in 2D gels using a new capillary HPLC – ICP MS interface and Orbitrap tandem mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **2013**, 28, 288–292.
- (71) Thomas, R. *Practical guide to ICP-MS: a tutorial for beginners*, 2nd ed.; CRC press, Ed.; Taylor & Francis: Boca Raton, 2008.
- (72) Tanner, S. D.; Baranov, V. I.; Bandura, D. R. Reaction cells and collision cells for ICP-MS: A tutorial review. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **2002**, 57 (9), 1361–1452.
- (73) Evans, E. H.; Giglio, J. J. Interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry. A review. *J. Anal. At. Spectrom.* **1993**, 8 (1), 1.
- (74) Beauchemin, D. Inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2004**, 76 (12), 3395–3416.
- (75) Jakubowski, N.; Moens, L.; Vanhaecke, F. Sector field mass spectrometers in ICP-MS. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **1998**, 53 (13), 1739–1763.
- (76) Gomes, E. da S.; 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* **2013**, 110, 53–57.
- (77) Da Silva, M. A. O.; Arruda, M. A. Z. Identification of selenium in the leaf protein of sunflowers by a combination of 2D-PAGE and laser ablation ICP-MS. *Microchim. Acta* **2011**, 176 (1-2), 131–136.
- (78) Mounicou, S.; Szpunar, J.; Lobinski, R. Metallomics: the concept and methodology. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38 (4), 1119–1138.
- (79) Baxter, I. Ionomics: The functional genomics of elements. *Brief. Funct. Genomics* **2010**, 9 (2), 149–156.
- (80) Da Silva, M. A. O.; Arruda, M. A. Z. Avaliação da influência do selênio e zinco no metabolismo do girassol por meio de um estudo metalômico. **2012**, pp 1–225.

- (81) Zeng, Y.; Yang, T. A. O. RNA Isolation From Highly Viscous Samples Rich in Polyphenols and Polysaccharides. *Plant Mol. Biol. Report.* **2002**, *20* (December), 417a – 417e.
- (82) Le Provost, G.; Herrera, R.; Paiva, J. A.; Chaumeil, P.; Salin, F.; Plomion, C. A micromethod for high throughput RNA extraction in forest trees. *Biol. Res.* **2007**, *40* (3), 291–297.
- (83) Oliveira, M. C. D. S.; Regitano, L. C. D. A.; Roesse, A. D.; Anthonisen, D. G.; Patocínio, E.; Parma, M. M.; Scagliusi, S. M. M.; Timóteo, W. H. B.; Jardim, S. N. *Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de dna por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase*; Embrapa Pecuária Sudeste, Ed.; São Carlos, Brasil, **2007**.
- (84) Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- (85) Azevedo, R. A.; Alas, R. M.; Smith, R. J.; Lea, P. J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiol. Plant.* **1998**, *104* (2), 280–292.
- (86) Giannopolitis, C. N.; Ries, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* **1977**, *59* (2), 309–314.
- (87) Heath, R. L.; Packer, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* **1968**, *125* (1), 189–198.
- (88) Buege, J. A.; Aust, S. D. *Biomembranes - Part C: Biological Oxidations*; Methods in Enzymology; Elsevier, **1978**; Vol. 52.
- (89) Alexieva, V.; Sergiev, I.; Mapelli, S.; Karanov, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and Wheat. *Plant. Cell Environ.* **2001**, *24*, 1337–1344.

- (90) Monsanto.
<http://www.monsanto.com/newsviews/pages/glossary.aspx#transgenicorganism>. (data de acesso fevereiro 18, **2015**).
- (91) Centro de Genética Molecular. www.cgm.icb.ufmg.br/oquesao.php. (data de acesso novembro 25, **2014**).
- (92) Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Wood, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2002**, 74 (5), 835–855.
- (93) Grene, A. R.; Erturk, N.; Heath, L. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* **2002**, 53 (372), 1331–1341.
- (94) Inzé, D.; Montagu, M. Van. Oxidative stress in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1995**, 6 (2), 153–158.
- (95) Lu, J.; Holmgren, A. Selenoproteins. *J. Biol. Chem.* **2009**, 284 (2), 723–727.
- (96) Tastet, L.; Schaumlöffel, D.; Lobinski, R. ICP-MS-assisted proteomics approach to the identification of selenium-containing proteins in selenium-rich yeast. *J. Anal. At. Spectrom.* **2008**, 23, 309–317.
- (97) Bianga, J.; Touat-Hamici, Z.; Bierla, K.; Mounicou, S.; Szpunar, J.; Chavatte, L.; Lobinski, R. Speciation analysis for trace levels of selenoproteins in cultured human cells. *J. Proteomics* **2014**, 108, 316–324.
- (98) Jitaru, P.; Prete, M.; Cozzi, G.; Turetta, C.; Cairns, W.; Seraglia, R.; Traldi, P.; Barbante, C. Speciation analysis of selenoproteins in human serum by solid-phase extraction and affinity HPLC hyphenated to ICP-quadrupole MS. *J. Anal. At. Spectrom.* **2008**, 23, 402–406.
- (99) Encinar, J. R.; Ouerdane, L.; Buchmann, W.; Tortajada, J.; Lobinski, R.; Szpunar, J. Identification of Water-Soluble Selenium-Containing Proteins in Selenized Yeast by Size-Exclusion-Reversed-Phase HPLC / ICPMS Followed by MALDI-TOF and Electrospray Q-TOF Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2003**, 75 (15), 3765–3774.
- (100) Vogiatzis, C. G.; Zachariadis, G. A. Tandem mass spectrometry in metallomics and the involving role of ICP-MS detection: a review. *Anal. Chim. Acta* **2014**, 819, 1–14.

- (101) Wilson, I. D.; Brinkman, U. A. T. Hyphenation and hypernation The practice and prospects of multiple hyphenation. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1000*, 325–356.
- (102) Nischwitz, V.; Michalke, B.; Kettrup, a. Identification and quantification of metallothionein isoforms and superoxide dismutase in spiked liver extracts using HPLC-ESI-MS offline coupling and HPLC-ICP-MS online coupling. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *375* (1), 145–156.
- (103) Szpunar, J.; Lobinski, R.; Prange, A. Hyphenated techniques for elemental speciation in biological systems. *Appl. Spectrosc.* **2003**, *57* (3 A), 102–112.
- (104) Prange, A.; Schaumlöffel, D. Hyphenated techniques for the characterization and quantification of metallothionein isoforms. *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *373* (6), 441–453.
- (105) Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. *Fundamentos de Cromatografia*; UNICAMP, Ed.; Campinas, **2006**.
- (106) Delaplace, P.; van der Wal, F.; Dierick, J.-F.; Cordewener, J. H. G.; Fauconnier, M.-L.; du Jardin, P.; America, A. H. P. Potato tuber proteomics: comparison of two complementary extraction methods designed for 2-DE of acidic proteins. *Proteomics* **2006**, *6* (24), 6494–6497.
- (107) Aureli, F.; Ouerdane, L.; Bierla, K.; Szpunar, J.; Prakash, N. T.; Cubadda, F. Identification of selenosugars and other low-molecular weight selenium metabolites in high-selenium cereal crops. *Metallomics* **2012**, *4* (9), 968.
- (108) Sugihara, S.; Kondo, M.; Chihara, Y.; Yuji, M.; Hattori, H.; Yoshida, M. Preparation of selenium-enriched sprouts and identification of their selenium species by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, *68* (1), 193–199.

APÊNDICE 1

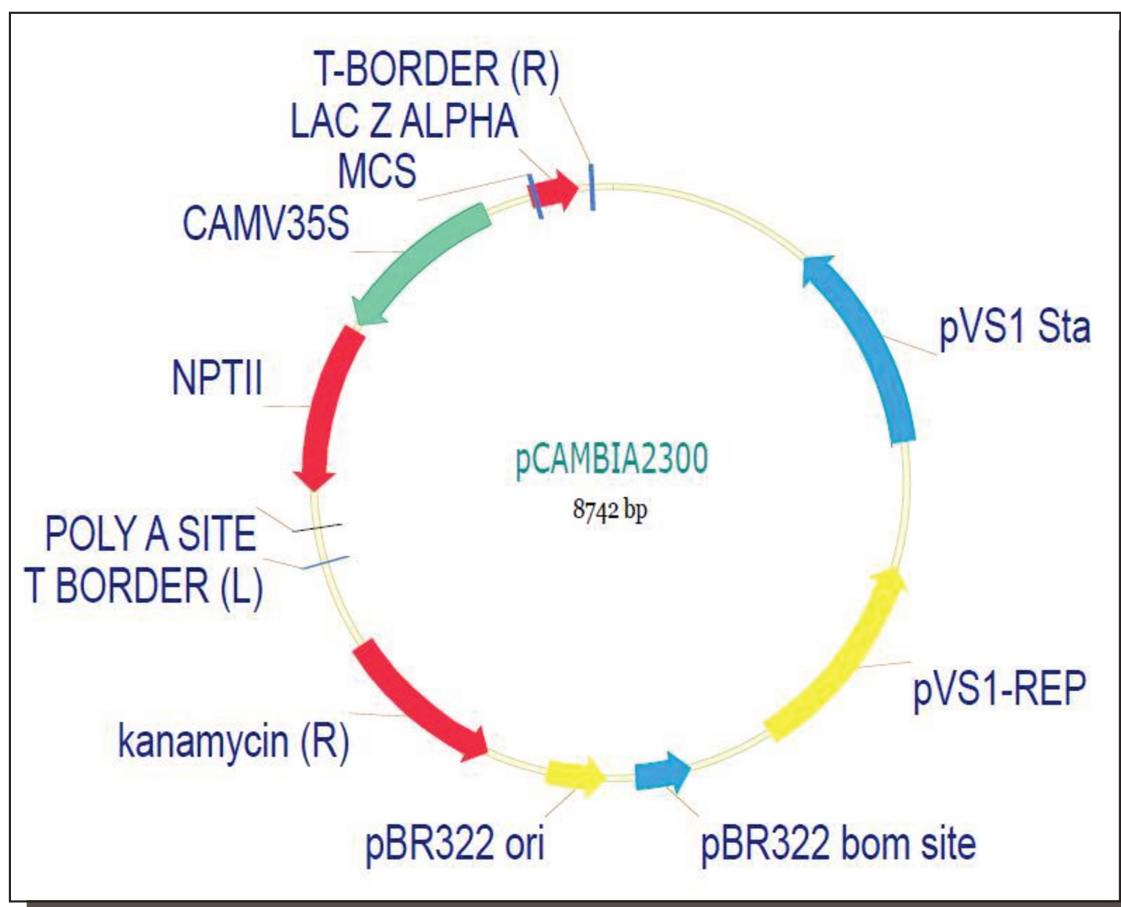


Figura do mapa do vetor pCAMBIA2300. Fonte: www.cambia.org

O vetor contém origem de replicação em bactérias (pBR322 ori), região de replicação pVS1 (pVS1-REP) e estabilidade pVS1 (pVS1Sta) para replicação em *Agrobacterium*. As bordas, esquerda (T-Border(L)) e direita (T-Border(R)), compreendem a porção de DNA transferida e integrada no genoma da planta. Também possui gene de resistência a canamicina em bactérias (*kanamycin* (R)) e plantas (*NPTII*), sendo o último controlado por CAMV35S. No lacZ possui múltiplos sítios de clonagem.

APÊNDICE 2



COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

Cx. Postal 6154 - Campinas - 13083-970 SP - BRASIL
<http://www.iqm.unicamp.br>



Solicitação/Protocolo: MAZA2013-1

Nome do (a) aluno (a): Katherine Chacón Madrid
Nível: Mestrado
Período: agosto/2013 a agosto/2015
Nome do (a) orientador (a): Marco Aurélio Zezzi Arruda

Título: Estudo dos efeitos do selênio em relação à produção de espécies reativas de oxigênio e seleno-proteínas em plantas de *Arabidopsis thaliana* não modificadas e modificadas geneticamente.

Resumo: Visando o estudo dos efeitos da modificação genética, bem como tentar obter mais explicações dos mecanismos de regulação dos efeitos benéficos e tóxicos de selênio (Se) nas plantas. O objetivo desta pesquisa consistiu em analisar as mudanças, principalmente no metaloma em termos de seleno-proteínas solúveis em água, das folhas de *Arabidopsis thaliana* não modificadas e modificadas geneticamente (N-MG e MG), ambas irrigadas com uma solução de selenito de sódio frente a uma condição controle. Para tanto, este trabalho relata um método para extração, separação e identificação de proteínas contendo Se em um extrato de folhas de *A. thaliana* modificada geneticamente (MG) e não modificada (N-MG), controle e irrigadas com uma solução de selenito de sódio. Empregando para isso, um sistema cromatográfico de separação (LC) hefenado com um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) para separação das proteínas e detecção do metalóide selênio, respectivamente. A identificação das proteínas, das frações coletadas contendo Se, foi feita utilizando a técnica de nano-LC-MS/MS. Além disso, o estudo dos efeitos do Se e da modificação genética na *A. thaliana* MG e N-MG também foram avaliados mediante análise das mudanças no desenvolvimento das plantas em função da massa úmida média e das diferenças na cor apresentada nas folhas das plantas para cada grupo tratamento. Assim como foi avaliado por meio da comparação da capacidade de acumulação do metalóide nas folhas, da atividade enzimática (catalase, CAT, e superóxido dismutase, SOD), da concentração de peróxido de hidrogênio e da peroxidação lipídica (avaliada pela determinação do conteúdo de melonaldeído, MD) apresentada nos grupos tratamento desta pesquisa: MG-controle, MG-Se inferior, MG-Se superior, N-MG-controle, N-MG-Se inferior e N-MG-Se superior.

* Volume de cultura: cada grupo tratamento (MG e N-MG controle e tratadas com Se) tem aproximadamente 200g de material fresco vegetal. Cada experimento de extração de proteínas utiliza aproximadamente 1g de material fresco vegetal.

* Descrição dos procedimentos de limpeza descontaminação e descarte: as amostras transgênicas sólidas e ponteiros contaminadas são colocadas no descarte identificado como "Risco Biológico". As amostras transgênicas líquidas são tratadas com hipoclorito de sódio por 12h e armazenadas no frasco identificado como "Risco Biológico". Posteriormente os descartes são descontaminados via calor úmido em autoclave. Os solos utilizados no plantio de transgênicos são descontaminados em autoclave antes de serem descartados.

O projeto de pesquisa acima descrito, a ser conduzido pelo(a) aluno(a) de mestrado Katherine Chacón Madrid, recebeu autorização desta Comissão Interna de Biossegurança.

Presidente em exercício da CIBio-IQ: Carlos H. I. Ramos

cibio@iqm.unicamp.br
Fone: 55-19-3521-3001