



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES PROTÉICAS
E METALOPROTÉICAS EM SOJA APÓS O
PROCESSO DE MODIFICAÇÃO GENÉTICA**

Alessandra Sussulini

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda

CAMPINAS – SÃO PAULO
FEVEREIRO DE 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP

Su82a	<p>Sussulini, Alessandra. Avaliação das alterações protéicas e metaloprotéicas em soja após o processo de modificação genética / Alessandra Sussulini. – Campinas, SP: [s.n], 2007.</p> <p>Orientador: Marco Aurélio Zezzi Arruda.</p> <p>Mestrado- Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.</p> <p>1.Modificação genética. 2.Soja. 3.Proteínas. 4.Metaloproteínas. I. Arruda, Marco Aurélio Zezzi. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.</p>
-------	---

Título em inglês: Evaluation of protein and metalloprotein changes in soybean seed after genetic modification process.

Palavras-chaves em inglês: Genetic modification, Soybean seed, Proteins, Metalloproteins.

Área de concentração: Química Analítica.

Titulação: Mestre em Química Analítica.

Banca examinadora: Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda (orientador), Prof. Dra. Silvia Maria Sella (UFF), Profa. Dra. Ljubica Tasic (IQ-Unicamp).

Data de defesa: 15/02/2007

Dedico esta Dissertação de
Alestrado a tudo e a todos que, de
alguma forma, fizeram com que eu
tivesse força de vontade e ânimo
para continuar...

“É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo -se à derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota”.

(Theodore Roosevelt□

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas, em particular ao Instituto de Química, pela possibilidade da realização desta Dissertação de Mestrado, além da minha graduação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda, pela orientação e apoio durante todo o Mestrado e a Iniciação Científica.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), pela oportunidade da realização dos experimentos na linha de fluorescência de raios-X, particularmente ao Dr. Carlos Alberto Pérez, pelo suporte durante os experimentos e na interpretação dos resultados obtidos.

Ao Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin, por ceder as amostras de soja utilizadas neste trabalho e pela possibilidade da realização dos experimentos no Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas.

À Profa. Dra. Ljubica Tasic, com a qual tive o prazer de trabalhar no laboratório, pelas discussões a respeito de química de proteínas, eletroforese e espectrometria de massas.

Aos professores que me incentivaram ou foram como modelos durante toda a minha formação. Em especial, às professoras da Escola Técnica Estadual “Conselheiro Antônio Prado”, Maria Lúcia Braga Sanvido e Valquíria Terribili D’Almeida e aos professores da Universidade Estadual de Campinas, Dra. Inés Joekes, Dr. Pedro Luiz Onófrío Volpe e Dr. Rogério Custódio.

Aos amigos do Grupo de Espectrometria, Preparo de Amostras e Mecanização (GEPAM), inclusive aqueles que já não estão mais no grupo: Adriana, Aline Klassen, Aline Lopes, Américo, Ana Cristi, César, Clésia, Cristiana, Edenir, Eduardo, Eraldo, Fabíola, Geraldo, Jerusa, Luciana, Madson, Marcel, Marcelo, Nathália e Pedro, pela ótima convivência e companheirismo.

Aos colegas e ex-colegas de laboratório: André, Profa. Dra. Anne Hélène Fostier, Audrey, Gabriela, Gyda, Janaína, Prof. Dr. João Carlos de Andrade, Prof. Dr. José Alberto Fracassi da Silva, Paula e Socorro, pelo agradável convívio.

Aos funcionários do Instituto de Química que colaboraram para a realização deste trabalho, em especial ao pessoal da CPG.

À minha família (em especial ao meu pai, Alexandre), pelo carinho e por me ensinarem com exemplos que valores como a honestidade, a humildade e a persistência são aqueles que realmente importam na vida, ao contrário do que a sociedade atual mostra.

Aos amigos de longa data: Agnes, Daniel, Josy, Joyce, Sérgio Foltran e William, pela grande amizade, carinho, companheirismo, incentivo e pelos bons conselhos.

Também aos amigos mais recentes: Alle, Danilo, Malu, Maurício, Sérgio Goda e Tomás, pela amizade e bons momentos compartilhados.

Por fim, agradeço em especial ao Hugo que, além de oferecer-me todas as boas qualidades dos amigos, esteve muito presente no meu dia-a-dia, sendo um grande companheiro, sempre carinhoso e paciente, tanto nos bons quanto nos maus momentos que enfrentei durante estes últimos anos.

Enfim, agradeço a todos que colaboraram, de maneira direta ou não, para que o presente trabalho pudesse ser realizado.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Alessandra Sussulini
Data de nascimento: 05 de novembro de 1981
Naturalidade: Campinas/SP
E-mail: alesussulini@gmail.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2005-2007 Mestrado em Química Analítica
Universidade Estadual de Campinas

2005-2007 Licenciatura em Química
Universidade Estadual de Campinas

2001-2005 Bacharelado em Química
Universidade Estadual de Campinas

1997-2000 Curso técnico em Química
Escola Técnica Estadual "Conselheiro Antônio Prado"

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Artigos completos publicados, aceitos e submetidos:

- a) A. Sussulini, J.S. Garcia, M.A.Z. Arruda, *Microwave-assisted decomposition of polyacrylamide gels containing metalloproteins using mini-vials: an auxiliary tool for metallomics studies*, **Analytical Biochemistry** 361:1 (2007) 146-148, EUA.
- b) A. Sussulini, M.A.Z. Arruda, *Determinação de cromo (VI) por espectrometria de absorção atômica com chama após a extração e pré-concentração no ponto nuvem*, **Eclética Química** 31:1 (2006) 73-80, Brasil.
- c) A. Sussulini, C.A. Pérez, M.A.Z. Arruda, *Mapping of metallic ions bound to soybean seed proteins employing synchrotron radiation X-ray fluorescence*, **Activity Report 2005 (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron)**, Brasil.
- d) A. Sussulini, J.S. Garcia, M.F. Mesko, D.P. Moraes, E.M.M. Flores, C.A. Pérez, M.A.Z. Arruda, *Evaluation of soybean seed protein extraction focusing metalloprotein analysis*, **Microchimica Acta**, no prelo, Áustria.
- e) A. Sussulini, A.H. Iglesias, A.G. Lima, E.C. Figueiredo, F.M.V. Pereira, H.L. Fernandes, S.C.L. Pinheiro, M.I.M.S. Bueno, *Inorganic and organic evaluations of powdered fruit juices using X-ray spectroscopy and principal component analysis*, **Brazilian Journal of Food Technology**, submetido, Brasil.

Trabalhos apresentados em congressos:

- a) A. Sussulini, C.A. Pérez, M.A.Z. Arruda, *Mapeamento de íons metálicos ligados a proteínas de soja empregando SR-XRF*, **17ª Reunião Anual de Usuários do LNLS**, 12 e 13 de fevereiro de 2007, Campinas/SP.

- b) A. Sussulini, P.C. Pinto Neto, *Perspectivas de futuro dos estudantes do ensino médio*, **Fórum Permanente de Desafios do Magistério**, 31 de outubro de 2006, Campinas/SP.
- c) A. Sussulini, J.S. Garcia, M.A.Z. Arruda, *Decomposição em mini-frascos de géis de poliacrilamida contendo metaloproteínas*, **46º Congresso Brasileiro de Química**, 25 a 29 de setembro de 2006, Salvador/BA.
- d) A. Sussulini, A.H. Iglesias, A.G. Lima, E.C. Figueiredo, F.M.V. Pereira, H.L. Fernandes, S.C.L. Pinheiro, M.I.M.S. Bueno, *Sweeteners evaluations in powder fruit juices using X-ray scattering and PCA*, **10th International Conference on Chemometrics in Analytical Chemistry**, 10 a 15 de setembro de 2006, Águas de Lindóia/SP.
- e) A. Sussulini, J.S. Garcia, M.F. Mesko, D.P. Moraes, E.M.M. Flores, C.A. Pérez, M.A.Z. Arruda, *Otimização da extração das proteínas de soja para estudos metalômicos empregando SR-XRF, ICP OES e ICP-MS, após a separação por eletroforese em gel*, **29ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química**, 19 a 22 de maio de 2006, Águas de Lindóia/SP.
- f) A. Sussulini, M.A.Z. Arruda, *Comparison between two protein extraction methods for soybean seeds*, **7th International Symposium on Advances in Extraction Technologies**, 13 a 15 de novembro de 2005, Campinas/SP.
- g) A. Sussulini, M.A.Z. Arruda, *Chromium (III) determination by flame atomic absorption spectrometry after cloud point extraction in natural waters*, **7th International Symposium on Advances in Extraction Technologies**, 13 a 15 de novembro de 2005, Campinas/SP.
- h) A. Sussulini, M.A.Z. Arruda, *Estudo de diferentes sistemas baseados em ponto nuvem para a extração de cromo*, **XII Congresso Interno de Iniciação Científica**, 22 e 23 de setembro de 2004, Campinas/SP.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

- a) **Universidade Federal de Santa Maria** (Santa Maria/RS)
 Monitora da sessão de práticas do *VI Workshop sobre Preparo de Amostras* (abril de 2006)
- b) **Universidade Estadual de Campinas** (Campinas/SP)
 * Monitora de aula prática na disciplina Introdução ao Preparo de Amostras (QA914, dezembro de 2005)
 * Membro da comissão organizadora do *7th International Symposium on Advances in Extraction Technologies* (novembro de 2005)
 * Monitora da Unicamp de Portas Abertas (setembro de 2005)
 * Iniciação Científica, projeto *Estudo de diferentes sistemas baseados em ponto nuvem para a extração de cromo*, bolsa FAPESP (abril de 2003 a março de 2004)
 * Auxiliar didática nas disciplinas Química Geral Experimental (QG102, 1º semestre de 2002 e de 2004) e Química Geral (QG100, 2º semestre de 2004)
- c) **Escola Estadual “Dom João Nery”** (Campinas/SP)
 Estagiária na disciplina de Química do ensino médio (1º e 2º semestres de 2006)
- d) **Microbial - Laboratório de Análises Físico-Químicas e Microbiológicas Ltda.** (Campinas/SP)
 Estágio como técnica em Química (janeiro a outubro de 2000)

RESUMO

AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES PROTÉICAS E METALOPROTÉICAS EM SOJA APÓS O PROCESSO DE MODIFICAÇÃO GENÉTICA

Autora: Alessandra Sussulini

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda

Este trabalho de pesquisa consistiu na comparação entre dois tipos de soja [*Glycine max* (L.) Merrill], transgênica e não-transgênica, em termos proteômicos e metaloproteômicos. Primeiramente, as proteínas de soja foram extraídas utilizando-se um tampão extrator contendo Tris-HCl (pH 8,8), KCl, DTT, PMSF e SDS e, então, estas foram quantificadas pelo método de Bradford. Em termos de concentração de proteínas totais, os dois tipos de soja apresentaram resultados próximos, sendo encontrados $8,2 \pm 0,3 \text{ mg mL}^{-1}$ na soja transgênica e $11,0 \pm 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ na soja não-transgênica. A seguir, as proteínas de soja foram separadas por 2-D PAGE. O processo eletroforético foi otimizado, de modo a obter géis com uma boa resolução, e os perfis proteômicos dos dois tipos de soja avaliados foram comparados. Em géis obtidos na faixa de pI entre 4 e 7, a soja transgênica apresentou, em média, um maior número de *spots* protéicos (408 ± 27) do que a soja não-transgênica (397 ± 26) e a probabilidade de identidade entre o conjunto de proteínas para os dois tipos de soja foi de apenas 35,0%. Em uma etapa posterior, 10 *spots* protéicos foram retirados do gel de poliacrilamida, digeridos com tripsina e analisados por MALDI-TOF MS, de modo que as proteínas presentes nestes foram caracterizadas. As proteínas *LEA protein* e *early nodulin 75 (precursor)* apresentaram diferenças em sua expressão, conforme observado pelos diferentes volumes normalizados de seus *spots* nos géis de eletroforese para cada tipo de soja. Os íons metálicos Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} e Zn^{2+} foram mapeados em algumas proteínas de soja com o uso da técnica de SR-XRF, que detectou um maior número de íons metálicos na soja transgênica. A seguir, cálcio, cobre e ferro foram quantificados com o uso de uma técnica de espectrometria

atômica (ETAAS ou FAAS), naquelas proteínas onde estes foram detectados pela análise qualitativa por SR-XRF. Anteriormente à quantificação, os *spots* de proteínas passaram pelo processo de decomposição em mini-frascos assistida por radiação microonda, que também foi otimizado neste trabalho. Os resultados da análise quantitativa foram, em grande parte, coerentes com aqueles obtidos pela análise qualitativa e com as informações disponíveis em banco de dados de proteínas, quanto à presença de íons metálicos nas proteínas cuja caracterização foi realizada. As exceções encontradas foram com relação às proteínas *glycinin G2 (precursor)*, na qual a presença de ferro foi confirmada, e à proteína *chalcone synthase 2*, onde foi confirmada a presença de cálcio, cobre e ferro. Estes resultados, porém, não estão disponíveis no banco de dados de proteínas.

ABSTRACT

EVALUATION OF PROTEIN AND METALLOPROTEIN CHANGES IN SOYBEAN SEED AFTER GENETIC MODIFICATION PROCESS

Author: Alessandra Sussulini

Adviser: Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda

This research work consisted of comparison of two kinds of soybeans [*Glycine max* (L.) Merrill], transgenic and non-transgenic, using proteomics and metalloproteomics changes. Firstly, soybeans proteins were extracted with an extraction buffer containing Tris-HCl (pH 8.8), KCl, DTT, PMSF and SDS, and then they were quantified by the Bradford method. In terms of total protein concentration, both kinds of soybean seed showed a similar result: $8.2 \pm 0.3 \text{ mg mL}^{-1}$ for transgenic and $11.0 \pm 0.1 \text{ mg mL}^{-1}$ for non-transgenic soybeans. Afterwards, proteins were separated by 2-D PAGE. The electrophoretic process was optimized, in order to obtain gels with a good resolution, and the proteomic profiles of both kinds of soybeans evaluated were compared. In gels having the pI range 4 to 7, transgenic soybeans showed, on average, a greater number of protein spots in the gel (408 ± 27) than did the non-transgenic soybeans (397 ± 26) and the probability of identity between these protein groups was only 35.0%. In another step, 10 protein spots were cut out from the polyacrylamide gel, digested with trypsin, and subsequently characterized by MALDI-TOF MS. *LEA protein* and *early nodulin 75 (precursor)* showed differences in their expression, as observed by the different normalized volumes of their spots in the electrophoretic gels of each kind of soybeans. Metal ions such as Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} and Zn^{2+} were mapped in some protein spots using the SR-XRF technique, which detected a greater number of metal ions in transgenic soybeans. Calcium, copper and iron were quantified with an atomic absorption spectrometry technique (ETAAS or FAAS) in the proteins where those metal ions were detected by qualitative analysis by SR-XRF. Prior to quantification, protein spots were decomposed by microwave-

assisted decomposition in mini-vials, a process that was also optimized in this work. Mostly, the results of quantitative analyses agreed with those obtained by qualitative analyses as well as with the information available in the protein data bank about the presence of metal ions in the proteins whose characterization was done. The exceptions found are related to the proteins *glycinin G2 (precursor)*, in which the presence of iron was confirmed, and *chalcone synthase 2*, in which the presence of calcium, copper and iron was confirmed. Such data, however, are not available in the protein data bank.

ÍNDICE

LISTA DE ACRÔNIMOS E ABREVIATURAS.....	xviii
LISTA DE QUADROS.....	xxi
LISTA DE TABELAS.....	xxii
LISTA DE FIGURAS.....	xxiii
INTRODUÇÃO.....	01
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	03
<i>CAPÍTULO 1: ESTUDOS COMPARATIVOS DE PROTEÍNAS DE SOJA TRANSGÊNICA E NÃO-TRANSGÊNICA.....</i>	05
1. OBJETIVOS.....	06
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	06
2.1. Soja.....	06
2.1.1. Soja transgênica.....	08
2.2. Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida.....	09
2.2.1. Preparo de amostra para a separação por eletroforese bidimensional.....	11
2.3. Espectrometria de massas.....	13
2.3.1. MALDI-TOF MS.....	13
2.3.2. Digestão triptica.....	16

3. PARTE EXPERIMENTAL.....	19
3.1. Equipamentos e acessórios.....	19
3.2. Reagentes e soluções.....	19
3.3. Amostras.....	21
3.4. Extração das proteínas de soja.....	22
3.5. Determinação da concentração das proteínas totais pelo método de Bradford.....	22
3.6. Otimização do preparo de amostra para a separação por 2-D PAGE.....	23
3.7. Separação das proteínas por 2-D PAGE.....	23
3.8. Digestão trípica e caracterização de proteínas por MALDI-TOF MS.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1. Determinação da concentração de proteínas totais.....	26
4.2. Otimização da separação das proteínas por 2-D PAGE.....	28
4.3. Comparação entre os géis 2-D PAGE de soja transgênica e não-transgênica.....	30
4.4. Caracterização de proteínas por MALDI-TOF MS.....	34
5. CONCLUSÕES PARCIAIS.....	38
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

CAPÍTULO 2: ESTUDOS COMPARATIVOS DE METALOPROTEÍNAS DE SOJA TRANSGÊNICA E NÃO-TRANSGÊNICA.....	43
1. OBJETIVOS.....	44
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	44
2.1. Metaloproteínas e proteínas ligadas a metais.....	44
2.2. Metalômica.....	45
2.3. Fluorescência de raios-X com radiação síncrotron.....	47
2.4. Técnicas de espectrometria de absorção atômica para a quantificação de íons metálicos.....	48
2.5. Decomposição de amostras em sistema fechado com aquecimento por radiação microonda.....	50
2.5.1. Uso de mini-frascos.....	51
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	53
3.1. Equipamentos e acessórios.....	53
3.2. Reagentes e soluções.....	54
3.3. Mapeamento dos <i>spots</i> por SR-XRF.....	54
3.4. Decomposição dos <i>spots</i> protéicos em mini-frascos assistida por radiação microonda.....	55
3.5. Quantificação de cobre e ferro por ETAAS.....	56
3.6. Quantificação de cálcio por FAAS.....	56
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4.1. Mapeamento dos <i>spots</i> por SR-XRF.....	57

4.2. Otimização da decomposição em mini-frascos assistida por radiação microonda dos <i>spots</i> dos géis.....	61
4.3. Aplicabilidade e validação do método de decomposição em mini-frascos.....	63
4.4. Quantificação de íons metálicos nos <i>spots</i> protéicos por ETAAS e FAAS.....	64
5. CONCLUSÕES PARCIAIS.....	66
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
CONCLUSÕES FINAIS.....	71

LISTA DE ACRÔNIMOS E ABREVIATURAS

2-D PAGE	Eletoforese bidimensional em gel de poliacrilamida, do inglês, <i>two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis</i>
AAS	Espectrometria de absorção atômica, do inglês, <i>atomic absorption spectrometry</i>
AEBSF	Fluoreto de 4-(2-aminoetil)-benzenosulfonila, do inglês, <i>4-(2 aminoethyl)-benzenesulfonylfluoride</i>
CBB	Azul de Coomassie, do inglês, <i>Coomassie Brilliant Blue</i>
CHAPS	Sulfonato de 3-[(3-cloroamidopropil)-dimetilamônio]-1-propano, do inglês, <i>3-[(3-cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propanesulfonate</i>
CHCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico, do inglês, <i>α-cyano-4-hydroxycinnamic acid</i>
Da	Dalton (1 Da = $1,661 \cdot 10^{-24}$ g)
DNA	Ácido desoxirribonucléico, do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>
DTT	1,4-ditiotreitol
EPSPS	5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfatase sintase, do inglês, <i>5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase</i>
ESI-MS/MS	Espectrometria de massas em seqüência com ionização por <i>electrospray</i> , do inglês, <i>electrospray ionization tandem mass spectrometry</i>
ETAAS	Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica, do inglês, <i>electrothermal atomic absorption spectrometry</i>
FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês, <i>flame atomic absorption spectrometry</i>
FAES	Espectrometria de emissão atômica com chama, do inglês, <i>flame atomic emission spectrometry</i>
HG-AAS	Espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos, do inglês, <i>hydride generation atomic absorption spectrometry</i>

IEF	Focalização isoelétrica, do inglês, <i>isoelectric focusing</i>
IPG	Gradiente de pH imobilizado, do inglês, <i>immobilized pH gradient</i>
LC-MS/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em seqüência, do inglês, <i>liquid chromatography tandem mass spectrometry</i>
LD	Limite de detecção
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
LQ	Limite de quantificação
MALDI-TOF MS	Espectrometria de massas por tempo de voo com ionização por desorção a laser assistida por matriz, do inglês, <i>matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry</i>
M	Massa molar
MS	Espectrometria de massas, do inglês, <i>mass spectrometry</i>
pl	Ponto isoelétrico
PMF	Determinação da impressão digital pela massa de peptídeos, do inglês <i>peptide mass fingerprinting</i>
PMSF	Fluoreto de fenilmetanosulfonila, do inglês, <i>phenylmethanesulphonylfluoride</i>
PP	Polipropileno
PTFE	Politetrafluoretileno
RP-HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, do inglês, <i>reverse phase high performance liquid chromatography</i>
SA	Ácido sinapínico, do inglês, <i>sinapinic acid</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio, do inglês, <i>sodium dodecyl sulfat</i> e
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio, do inglês, <i>sodium dodecyl sulfat</i> e <i>polyacrilamide gel electrophoresis</i>

SR-TXRF	Fluorescência de raios-X por reflexão total excitada com radiação síncrotron, do inglês, <i>total reflection synchrotron radiation X-ray fluorescence</i>
SR-XRF	Fluorescência de raios-X com radiação síncrotron, do inglês, <i>synchrotron radiation X-ray fluorescence spectrometry</i>
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	<i>N,N',N,N'</i> -tetrametiletilenodiamina
TFA	Ácido trifluoroacético
TOF	Tempo de voo, do inglês, <i>time of flight</i>
TSFFAAS	Espectrometria de absorção atômica com nebulização térmica em tubo metálico aquecido na chama, do inglês, <i>thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry</i>
TXRF	Fluorescência de raios-X por reflexão total, do inglês, <i>total reflection X-ray fluorescence</i>

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1.1. Principais substâncias utilizadas na solubilização de proteínas [21].....12

QUADRO 1.2. Etapas do procedimento de digestão em gel das proteínas [24].....17

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1. Concentrações de proteínas totais (concentração \pm desvio padrão, n=3) e porcentagem de proteínas nas amostras de soja transgênica e não-transgênica.....	27
TABELA 1.2. Identificação das proteínas por MALDI-TOF MS.....	36
TABELA 2.1. Programas de aquecimento do forno de grafite para cobre e ferro.....	56
TABELA 2.2. Identificação dos íons metálicos presentes nas proteínas de soja transgênica e não-transgênica.....	60
TABELA 2.3. Programa do forno de microonda empregado na decomposição das amostras de proteínas contidas em gel de poliacrilamida (executado duas vezes).....	62
TABELA 2.4. Concentração dos íons metálicos para os quatro <i>spots</i> de proteínas selecionados, que foram preparados por meio da decomposição convencional (DC) e em mini-frascos (DMF); n = 3.....	64
TABELA 2.5. Concentração dos íons metálicos cálcio, cobre e ferro, para os <i>spots</i> de proteínas de soja transgênica (T) e não-transgênica (NT).....	66
TABELA 2.6. Limites de quantificação e detecção para o cálcio, cobre e ferro.....	66

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.1.** Representação dos processos que ocorrem durante a MALDI. Adaptada de Kinter e Sherman [24].....14
- FIGURA 1.2.** Representação do mecanismo de digestão em gel. Adaptada de Kinter e Sherman [24].....18
- FIGURA 1.3.** Eletroferogramas 2-D PAGE de (a) 1,5 mg de proteínas de soja comum, precipitadas com acetato de amônio em metanol e ressolubilizadas em tampão contendo uréia e tiouréia; (b) 1,5 mg de proteínas de soja comum, precipitadas com TCA em acetona e ressolubilizadas em tampão contendo uréia.....29
- FIGURA 1.4.** Eletroferograma 2-D PAGE de 300 µg de proteínas de soja comum.....30
- FIGURA 1.5.** Eletroferogramas 2-D PAGE para 300 µg de proteínas de semente de soja: (a) transgênica e (b) não-transgênica, em faixas de pI entre 3 e 10; (c) transgênica e (d) não-transgênica, em faixas de pI entre 4 e 7.....31
- FIGURA 1.6.** Eletroferogramas 2-D PAGE para 300 µg de proteínas de semente de soja: (a) transgênica e (b) não-transgênica, em faixa de pI entre 4 e 7. A proteína em destaque é mais expressa na soja não-transgênica que na soja transgênica e possui pI igual a 6,83 e M igual a 54,50 kDa.....33
- FIGURA 1.7.** Eletroferogramas 2-D PAGE para 300 µg de proteínas de semente de soja: (a) transgênica e (b) não-transgênica, em faixa de pI entre 4 e 7. A proteína em destaque é mais expressa na soja transgênica que na soja não-transgênica e possui pI igual a 4,37 e M igual a 27,03 kDa.....34

FIGURA 1.8. Eletroferogramas 2-D PAGE para 300 µg de proteínas de semente de soja: (a) não-transgênica, em faixa de pI entre 3 e 10 e (b) transgênica, em faixa de pI entre 4 e 7. Os *spots* marcados foram analisados por MALDI-TOF MS.....35

FIGURA 1.9. Estrutura tridimensional da proteína (a) *β-conglycinin, β-chain (precursor)* e (b) *clavamate synthase-like protein At3g21360* [38].....37

FIGURA 1.10. Visão tridimensional dos *spots* da proteína *LEA protein*, para (a) soja transgênica e (b) soja não-transgênica.....37

FIGURA 1.11. Visão tridimensional dos *spots* da proteína *early nodulin 75 (precursor)*, para (a) soja transgênica e (b) soja não-transgênica.....38

FIGURA 2.1. Eletroferogramas 2-D PAGE para 300 µg de proteínas de semente de soja não-transgênica: (a) em faixa de pI entre 3 e 10 e (b) em faixa de pI entre 4 e 7. Os *spots* marcados foram analisados por SR-XRF.....57

FIGURA 2.2. Espectros de SR-XRF para: (a) *spot* 15, antes do processo de secagem, (b) *spot* 15, após o processo de secagem e (c) branco analítico (seco). Os picos em 2,9 e 3,2 keV referem-se ao Ar ($k\alpha$) e ao Ar ($k\beta$), respectivamente.....58

INTRODUÇÃO

A necessidade da determinação de espécies químicas individuais em sistemas biológicos ocorre especialmente quando estas são conhecidas por possuírem diferentes impactos e comportamentos no organismo, tais como a toxicidade, a mobilidade ou a biodisponibilidade [1]. Um exemplo disso é o fato de alguns íons metálicos, tais como Cd^{2+} e Pb^{2+} , serem tóxicos, enquanto outros, tais como Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+} , serem considerados essenciais na execução dos processos vitais [2], de acordo com a concentração em que estes se encontram no organismo.

Do ponto de vista químico, a ingestão, a acumulação, o transporte e a estocagem de íons metálicos, essenciais ou tóxicos, são efetuados pela presença de ligantes biológicos doadores de par eletrônico nas vizinhanças do íon metálico [3]. Tais ligantes biológicos podem ser proteínas ou enzimas, às quais os íons metálicos se ligam de modo característico e exercem seus efeitos como uma parte inerente do centro ativo ou estrutural das mesmas [2].

Os íons metálicos podem ser incorporados às proteínas de duas maneiras distintas: por uma ligação não-específica ou por uma ligação específica. No primeiro caso, a combinação dos íons metálicos com as proteínas se dá por meio de forças físicas, como as ligações iônicas e as forças de van der Waals. Já no segundo caso, esta combinação se dá por meio de ligações covalentes mais fortes, que dependem da conformação da proteína [2]. Em geral, as proteínas interagem fracamente com os íons monovalentes, tais como K^+ e Na^+ . Os íons divalentes, tais como Ca^{2+} e Mg^{2+} , apresentam interações moderadas com as proteínas. Já os íons de metais de transição, tais como Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} e Mo^{2+} , devido às suas características (densidade, raios atômicos pequenos e interações por meio de forças eletrostáticas), apresentam interações de coordenação mais fortes com as proteínas, sendo encontrados na maioria das metaloproteínas [4,5].

A regulação da assimilação e da incorporação de íons metálicos em baixas concentrações em uma célula é a base de muitas funções vitais em um organismo. Assim sendo, uma célula deve ser caracterizada não somente pelo

seu genoma e seu proteoma, mas também pela distribuição dos íons metálicos entre as diferentes biomoléculas, ou seja, pelo seu metaloma [6].

Na metalômica, o íon metálico ou as espécies metalóides presentes em um sistema biológico, nas formas livres ou complexadas, são definidos como metalomas [7]. A metalômica tem como principais objetivos a verificação da distribuição dos metalomas, bem como a elucidação dos aspectos fisiológicos e funcionais das biomoléculas que contenham íons metálicos em suas estruturas [8].

O estudo de sistemas contendo metaloproteínas ou proteínas ligadas a metais pode fornecer informações acerca de situações de estresse ambiental (biomarcadores), da qualidade e autenticação de alimentos, de diagnoses de doenças e da caracterização de interações entre metalodrogas e proteínas [1].

O esquema para a identificação e quantificação de metaloproteínas ou proteínas ligadas a metais inclui três componentes principais: (i) uma técnica de separação, que contribui para o isolamento das espécies-alvo da matriz, chamada componente de seletividade; (ii) um detector sensível para a quantificação dos elementos, chamado componente de sensibilidade e (iii) um detector específico para moléculas, visando sua caracterização, chamado componente estrutural [1].

Nesta Dissertação, a componente de seletividade utilizada foi a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida, as componentes de sensibilidade foram a fluorescência de raios-X com fonte de radiação síncrotron, a espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica e a espectrometria de absorção atômica com chama, e a componente estrutural foi a espectrometria de massas com ionização por desorção a laser assistida por matriz - tempo de voo.

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] e seus produtos foram, durante séculos, muito populares em países asiáticos. Ao adquirirem o rótulo de serem nutritivos, livres de colesterol e saudáveis, logo foram inseridos na cultura e dieta ocidentais [9]. O aumento do interesse no uso clínico das proteínas de soja, particularmente após a *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) comprovar sua atuação na prevenção de doenças cardíacas, tornou necessária uma investigação mais detalhada a respeito das características químicas dos produtos de soja, que são utilizados na nutrição humana [10].

A hipótese inicial desta Dissertação foi de que as modificações genéticas na soja deveriam gerar alterações não somente em nível proteômico mas, também, em nível metaloproteômico. A partir disso, o objetivo principal deste trabalho consistiu na avaliação dos efeitos da modificação genética tanto em nível proteômico como também em nível metaloproteômico.

Para tanto, os objetivos específicos desta Dissertação consistiram em associar a técnica da eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida a técnicas espectrométricas, possibilitando a obtenção de resultados de grande importância na identificação e quantificação de íons metálicos presentes em proteínas de sementes de soja, comparando-se dois tipos desta amostra (soja transgênica e soja não-transgênica) em termos de expressão protéica e quantidades de íons metálicos ligados às proteínas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] J.L. Gómez-Ariza, T. Garcia-Barrera, F. Lorenzo, V. Bernal, M.J. Villegas, V. Oliveira, *Use of mass spectrometry techniques for the characterization of metal bound to proteins (metallomics) in biological systems*, **Anal. Chim. Acta** 524 (2004) 15-22.
- [2] Y. Gao, C. Chen, P. Zhang, Z. Chai, W. He, Y. Huang, *Detection of metalloproteins in human liver cytosol by synchrotron radiation X-ray fluorescence after sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, **Anal. Chim. Acta** 485 (2003) 131-137.
- [3] J. Szpunar, *Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques*, **Analyst** 125 (2000) 963-988.
- [4] V.L. Herald, J.L. Heazlewood, D.A. Day, A.H. Millar, *Proteomic identification of divalent metal cation binding proteins in plant mitochondria*, **FEBS Lett.** 537 (2003) 96-100.
- [5] J.S. Garcia, C.S. Magalhães, M.A.Z. Arruda, *Trends in metal-binding and metalloprotein analysis*, **Talanta** 69 (2006) 1-15.
- [6] R. Lobinski, D. Schaumlöffel, J. Szpunar, *Mass spectrometry in bioinorganic analytical chemistry*, **Mass Spectrom. Rev.** 25 (2006) 255-289.

- [7] J. Szpunar, *Metallomics: a new frontier in analytical chemistry*, **Anal. Bioanal. Chem.** 378 (2004) 54-56.
- [8] H. Haraguchi, *Metallomics as integrated biometal science*, **J. Anal. At. Spectrom.** 19 (2004) 5-14.
- [9] H. Zhang, M. Takenaka, S. Isobe, *DSC and electrophoretic studies on soymilk protein denaturation*, **J. Therm. Anal. Calorim.** 75 (2004) 719-726.
- [10] E. Gianazza, I. Eberini, A. Arnoldi, R. Wait, C.R. Sirtori, *A proteomic investigation of isolated soy proteins with variable effects in experimental and clinical studies*, **J. Nutr.** 133 (2003) 9-14.

CAPÍTULO 1

ESTUDOS COMPARATIVOS DE PROTEÍNAS DE SOJA TRANSGÊNICA E NÃO-TRANSGÊNICA

1. OBJETIVOS

O objetivo deste Capítulo consiste na realização de estudos proteômicos comparativos para os dois tipos de soja avaliados: transgênica e não-transgênica. Para isso, primeiramente, foi otimizada a obtenção dos géis de eletroforese bidimensional e as imagens obtidas a partir destes géis foram analisadas por um programa específico. A seguir, foi feita a caracterização de algumas proteínas por MALDI-TOF MS.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica referente a este Capítulo aborda uma descrição sobre a soja e sua importância, bem como alguns aspectos a respeito do processo de modificação genética. A seguir, são descritas as técnicas de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida e de espectrometria de massas, que são amplamente empregadas em estudos proteômicos.

2.1. Soja

O interesse na soja e em seus derivados cresceu significativamente na última década, devido aos seus benefícios nutricionais e à saúde. Pesquisadores encontraram fitoquímicos nas sementes de soja, tais como as isoflavonas, que desempenham um importante papel na prevenção da osteoporose e cânceres influenciados por hormônios, bem como na atuação como fitoestrogênios em humanos. Sua capacidade de agir como antioxidante pode ser útil também na prevenção de danos oxidativos em tecidos vivos [1].

As sementes de soja contêm mais proteínas que qualquer outra cultura comercial. Aproximadamente 41% (em termos de massa seca) da semente de soja consiste em proteínas de armazenamento e 21% em óleo [2]. Os produtos primários resultantes do processamento da semente de soja são o óleo bruto e a farinha protéica [2]. A partir do óleo bruto, são produzidos o óleo refinado e a

lecitina de soja, que são usados principalmente para o consumo humano, e a farinha protéica é empregada na alimentação animal [2,3]. Além destas aplicações, a soja é também apontada como uma fonte alternativa de combustível. O biodiesel de soja já está sendo testado por instituições de pesquisa, como a Embrapa, e utilizado em diferentes cidades brasileiras [3].

Na literatura, são encontrados diversos estudos proteômicos utilizando a soja [2,4-6], sendo que a maioria deles é focada no estudo das proteínas glicinina e β -conglucina [2,4,5]. Estas são as proteínas mais abundantes da soja, correspondendo a cerca de 70 a 80% do total das proteínas, e são responsáveis pelas propriedades nutricionais, físico-químicas e fisiológicas das proteínas de soja [7]. Alguns trabalhos envolvendo estes estudos, reportados na literatura, serão discutidos a seguir.

Mujoo *et al.* [5] estudaram a contribuição das proteínas de armazenamento da soja (glicinina e β -conglucina) no rendimento e na textura do tofu, que é uma espécie de queijo de soja. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE acoplada com densitometria e por RP-HPLC. Foram estudadas sete variedades de soja utilizadas no preparo do tofu e estas foram correlacionadas com a sua textura e rendimento.

Gianazza *et al.* [6] fizeram uma comparação do proteoma de preparos dietéticos de proteínas de soja utilizados em estudos clínicos da hipercolesterolemia. Para isso, extratos de soja concentrados, que foram usados em estudos nos quais a redução da colesterolemia ocorreu, foram submetidos à separação das proteínas por 2-D PAGE e estas foram posteriormente caracterizadas por MALDI-TOF MS. Tal estudo comprovou que é necessária uma padronização na administração dos preparos protéicos para a realização de estudos clínicos, pois foram encontradas diferenças na expressão das proteínas.

Estes trabalhos mostram a importância da realização de estudos com a soja, especialmente em nível proteômico. Atualmente, um processo amplamente empregado na produção da soja e que pode ocasionar mudanças no proteoma deste vegetal é a sua modificação genética. A seguir, a soja obtida por meio deste processo será descrita com maiores detalhes.

2.1.1. Soja transgênica

Os organismos transgênicos são aqueles cujo genoma foi alterado pela introdução de fragmentos de DNA exógenos, ou seja, de genes provenientes de organismos de espécie diferente daquela do organismo alvo. Estes genes exógenos possuem a capacidade de conferir determinadas características de interesse ao organismo alvo [8].

A introdução, a eliminação e/ou o remanejamento de genes podem alterar o mecanismo de produção de proteínas no organismo modificado, fazendo com que ele (i) passe a sintetizar novas substâncias; (ii) deixe de produzir proteínas que, antes da modificação genética, eram expressas; ou, até mesmo, (iii) sintetize maiores quantidades de substâncias já presentes neste organismo [8].

A soja denominada *Roundup Ready*, modificada por técnicas de engenharia genética e desenvolvida pela empresa Monsanto (EUA), é um dos organismos transgênicos mais amplamente comercializados [8]. Esta soja é tolerante ao herbicida *Roundup*, cujo princípio ativo é o glifosato [N-(fosfometil) glicina], e é obtida por meio da inserção do gene *cp4 epsps* (número de patente US5633435) da bactéria *Agrobacterium* sp. tipo CP4 [9,10].

O modo de ação do glifosato consiste na alteração de diferentes processos bioquímicos vitais nas plantas, tais como a biossíntese de aminoácidos, de proteínas e de ácidos nucleicos [11]. O herbicida *Roundup* não é seletivo, sendo capaz de eliminar boa parte das plantas no campo, sejam elas ervas daninhas ou não [8,12].

O glifosato é o único herbicida que atua bloqueando o mecanismo do shikimato, por meio da inibição da enzima EPSPS (EC 2.5.1.19). A inibição desta enzima resulta na redução da síntese de aminoácidos aromáticos e na desregulação do metabolismo do shikimato nas plantas [11,12]. A proteína CP4 EPSPS, presente na soja transgênica devido à inserção do gene bacteriano, é funcionalmente similar a EPSPS produzida pelas plantas não-transgênicas, porém, esta possui uma menor afinidade pelo glifosato [10]. Desta forma, o

princípio ativo do herbicida *Roundup* não é capaz de anular a função desta enzima e, portanto, as plantas transgênicas sobrevivem à aplicação do herbicida [8].

Kim *et al.* [9] examinaram as alterações na proteína CP4 EPSPS encontrada em sementes de soja transgênica, utilizando-se como controle a CP4 EPSPS purificada, produzida em *Escherichia coli* clonada. A presença da proteína foi detectada em soja transgênica por 2-D PAGE e esta foi caracterizada por MALDI-TOF MS e ESI-MS/MS, com o auxílio de bancos de dados de proteínas. A detecção desta proteína por 2-D PAGE foi baseada em seu ponto isoelétrico e em sua massa molar característica, de 5,1 e 47,5 kDa, respectivamente.

Em um estudo recente, McCann *et al.* [10] compararam a soja transgênica e não-transgênica em termos dos níveis de proximatos, lecitina, inibidor de tripsina e isoflavonas. Estes analitos, que são componentes representativos da base nutricional e são biologicamente ativos na soja, foram monitorados durante três anos. Os resultados obtidos mostraram que a composição da soja transgênica permanece substancialmente equivalente àquela da soja não-transgênica.

Em estudos proteômicos, uma das técnicas de separação de proteínas mais empregadas é a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida, que será descrita a seguir.

2.2. Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida

A eletroforese em gel é uma técnica de alta resolução empregada na caracterização de sistemas biológicos e na seleção de *spots* específicos de proteínas para posterior seqüenciamento e identificação. Esta técnica relaciona-se à migração de partículas carregadas em um determinado meio, sob a influência de um campo elétrico contínuo [13]. Do ponto de vista eletroforético, as propriedades mais importantes das proteínas são a sua massa molar, a sua carga e a sua conformação. Estes fatores são os que influenciam diretamente na velocidade de migração das mesmas ao longo da corrida eletroforética, podendo ser citados, também, o campo elétrico aplicado e a viscosidade do meio [14].

A poli(acrilamida) é uma matriz de gel muito comum, por ser um material quimicamente inerte, transparente e estável em uma ampla faixa de pH, temperatura e força iônica. Ela é formada pela copolimerização entre a acrilamida e a *N,N'*-metilenobisacrilamida, na presença de persulfato de amônio e TEMED [13,14].

Na eletroforese em gel de poli(acrilamida) em sistema desnaturante na presença de SDS, o surfactante é usado para desnaturar as proteínas, antes da aplicação do campo elétrico. O SDS, sendo uma molécula anfifílica, interfere nas interações hidrofóbicas que normalmente estabilizam as proteínas e estas, em geral, assumem uma forma cilíndrica na presença do mesmo. Além disso, a carga negativa que o SDS transfere para as proteínas mascara as suas cargas intrínsecas. Assim sendo, as proteínas tratadas com SDS possuem formas similares e razões massa/carga parecidas e, desta maneira, a SDS-PAGE é capaz de separar as proteínas de acordo com as suas massas molares [15,16].

A eletroforese com focalização isoelétrica tem como objetivo separar as proteínas de acordo com seus pontos isoelétricos, sendo que o ponto isoelétrico é o pH no qual uma molécula apresenta uma carga de rede igual a zero [15]. Durante a IEF, um gradiente de pH é formado e as espécies carregadas, sob a influência de um campo elétrico, movem-se através do gel até atingirem seus pontos isoelétricos, quando não irão mais migrar [14,15,17].

A eletroforese em gel bidimensional combina o poder de resolução da SDS-PAGE com a IEF [15]. Esta técnica separa, portanto, as proteínas de acordo com duas propriedades diferentes: na primeira dimensão, a IEF separa as proteínas de acordo com seus pontos isoelétricos e, na segunda dimensão, a SDS-PAGE separa as proteínas de acordo com suas massas molares [15,18]. Cada ponto (*spot*) resultante no gel de 2-D PAGE corresponde a uma espécie protéica presente na amostra [18].

O preparo da amostra prévio à eletroforese bidimensional é uma etapa essencial no processo de separação das proteínas, conforme mostra a discussão a seguir.

2.2.1. Preparo de amostra para a separação por eletroforese bidimensional

Um preparo de amostra apropriado é absolutamente necessário para a obtenção de uma boa resolução na separação das proteínas por 2-D PAGE. Para isso, as proteínas da amostra devem ser desnaturadas, desagregadas, reduzidas e solubilizadas de modo a atingir um completo rompimento das interações moleculares e garantir que cada *spot* presente no gel represente uma proteína individual [19,20]. Devido à grande diversidade de tipos de proteínas em uma amostra e suas origens, um procedimento ótimo deve ser determinado empiricamente para cada tipo de amostra [18].

Primeiramente, as células do material biológico devem ser rompidas para que as proteínas intracelulares sejam analisadas. O rompimento celular pode ser do tipo mecânico (por exemplo, maceração ou sonicação) ou químico (por exemplo, enzimático ou na presença de detergentes) [18]. Com este procedimento, as proteínas são removidas do seu ambiente natural, ficando expostas a muitos agentes que podem danificá-las de maneira irreversível. Por este motivo, o rompimento celular deve ser realizado rapidamente e em baixas temperaturas [19,20]. Durante ou após o rompimento celular, alguns compostos interferentes, tais como proteases, sais, lipídeos, ácidos nucléicos, polissacarídeos, pigmentos fenólicos e/ou proteínas muito abundantes, devem ser removidos ou inativados [19,20]. Os compostos interferentes afetam a solubilização e/ou o processo eletroforético por se ligarem às proteínas que serão analisadas (o que prejudica a separação das mesmas) ou por prejudicarem o processo eletroforético em si [20].

As proteases devem ser inativadas para prevenir a proteólise, ou seja, a degradação de proteínas, o que pode comprometer os resultados obtidos na separação por 2-D PAGE. Para isso, são utilizados inibidores de protease, tais como o PMSF e o AEBSF [18,19].

Outros interferentes na separação eletroforética tais como sais, surfactantes e lipídeos, são separados seletivamente por meio do procedimento de precipitação

das proteínas. Os métodos mais comumente utilizados são a precipitação com solução de acetato de amônio em metanol, com acetona ou com solução de TCA em acetona [18].

Após o rompimento celular e a remoção dos compostos interferentes, os polipeptídeos individuais devem ser desnaturados e reduzidos, rompendo as interações intra e intermoleculares, e também solubilizados, mantendo as propriedades de carga [19]. Para isso, a solubilização das proteínas deve ser conduzida em um tampão contendo surfactantes, agentes caotrópicos e redutores, bem como inibidores de protease. O Quadro 1.1 mostra os principais reagentes utilizados com esta finalidade e quais as funções que eles desempenham [19-21].

Quadro 1.1. Principais substâncias utilizadas na solubilização de proteínas [21]

Componentes do tampão	Exemplos	Finalidade
Surfactantes	SDS, CHAPS e Triton X-100	Extração integral de proteínas e solubilização de proteínas pouco solúveis.
Agentes redutores	DTT e β -mercaptoetanol	Manter os resíduos de cisteína reduzidos.
Inibidores de protease	PMSF, pepstatina e leupeptina	Inibir a proteólise dos aminoácidos serina, aspártico e cisteína, respectivamente.
Agentes caotrópicos	Uréia e tiouréia	Quebrar as ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Evitar agregações indesejáveis e formação de estrutura secundária.

Após a separação das proteínas, a etapa precedente é a caracterização das mesmas, que é feita com o uso da espectrometria de massas. Esta técnica é descrita a seguir.

2.3. Espectrometria de massas

A espectrometria de massas tem se tornado uma ferramenta essencial na química de proteínas moderna, devido não apenas à sua sensibilidade (tipicamente, na faixa de pmol a fmol), mas também ao conteúdo total de informações fornecido pela técnica [22,23].

Os espectrômetros de massas consistem em uma fonte de íons, um analisador de massas, um detector de íons e uma unidade de aquisição de dados [23]. Os princípios da espectrometria de massas podem ser contemplados pelas quatro funções de um espectrômetro de massas: (i) ionização, onde a molécula de interesse é carregada, resultando na formação de um íon positivo ou negativo; (ii) separação dos íons de acordo com suas relações massa-carga (m/z); (iii) medida da massa, de acordo com algum parâmetro físico e (iv) medida da abundância, baseada na altura ou área do pico obtido [22].

Na identificação de proteínas, dois diferentes métodos de ionização da amostra são comumente empregados. A MALDI-TOF MS é empregada na obtenção da “impressão digital” (*fingerprint*) de peptídeos e proteínas. Já a ESI-MS/MS, geralmente hifenada à separação por HPLC, é utilizada na elucidação da seqüência peptídica e identificação da proteína correspondente [22].

De acordo com os objetivos desta Dissertação, a MALDI-TOF MS foi empregada na caracterização das proteínas separadas por 2-D PAGE e será enfocada no tópico seguinte.

2.3.1. MALDI-TOF MS

A primeira etapa do método de MALDI consiste em dissolver os peptídeos da amostra em uma solução de um composto, chamado de matriz, e aplicá-los em uma placa. Conforme o solvente da mistura seca, a matriz cristaliza e as moléculas dos peptídeos são incluídas dentro dos cristais da matriz, por co-cristalização. A matriz deve estar em excesso em relação à amostra e absorver radiação, de modo que quando um laser atinge o *spot* matriz/amostra, a energia é

absorvida primeiramente pela matriz. Esta energia é transferida da matriz para a amostra de uma maneira suave, de modo que o processo de ionização não ocasiona a fragmentação dos peptídeos. O efeito da energia do laser é produzir uma pluma da matriz, que carrega os íons do analito para uma fase gasosa [16,18]. Uma visão geral dos processos associados com a MALDI está representada na Figura 1.1. O mecanismo da MALDI não é bem definido, porém, o efeito geral do processo é produzir íons dos peptídeos intactos, sem fragmentação [24].

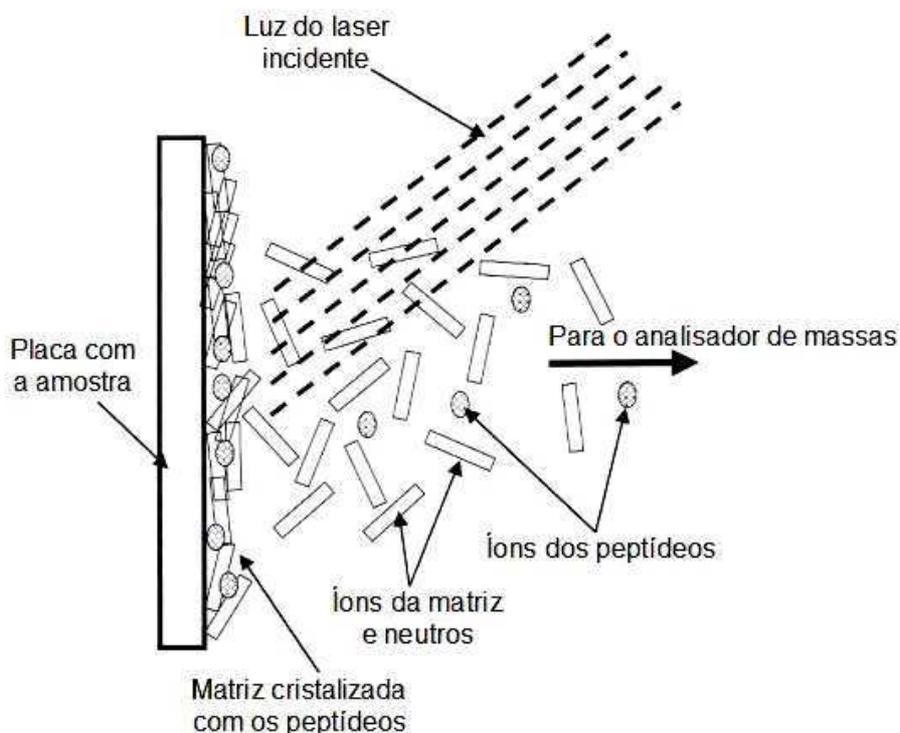


Figura 1.1. Representação dos processos que ocorrem durante a MALDI. Adaptada de Kinter e Sherman [24].

Estes íons são posteriormente separados por TOF, onde os íons acelerados, a partir de um ponto fixo, passam por um tubo. Os íons mais leves, ou seja, com uma menor relação massa/carga, passam mais rapidamente pelo tubo do que os íons mais pesados (com uma maior relação massa/carga) e, a partir deste princípio, o tempo de passagem pelo tubo até atingir o detector é utilizado para determinar a relação massa/carga dos íons [22].

As vantagens da MALDI-TOF MS são a fácil automação, a análise de um grande número de amostras em um curto período de tempo, a identificação da proteína depender apenas da comparação exata das massas dos peptídeos e a interpretação dos espectros ser simples, uma vez que a MALDI produz, majoritariamente, íons monocarregados [22,23]. Apesar destas vantagens, é preciso atenção na remoção dos interferentes da amostra e na calibração dos espectros produzidos [22].

A MALDI-TOF MS foi utilizada para caracterizar uma proteína ligada a cobre, que foi isolada de um molusco asiático (*Littorina brevicula*), que é altamente resistente a uma grande faixa de concentrações de metais pesados e cujas proteínas ligadas a metais são induzidas na presença de cádmio e zinco [25]. A massa molar desta proteína, obtida pela análise por MALDI-TOF MS foi de 11,38 kDa, o que a diferencia da metalotioneína comum de moluscos. Com esta informação, sugeriu-se que a expressão de proteínas específicas ligadas a metais adiciona proteção contra cada metal pesado em condições de poluição severas.

Natarajan *et al.* [26] aplicaram uma abordagem proteômica para a separação, identificação e comparação de duas proteínas de estocagem majoritárias, a β -conglucina e a glicina, em sementes de soja nativa (*Glycine soja*) e cultivada (*Glycine max*). Neste estudo, os perfis protéicos foram avaliados usando três diferentes fitas de gradiente de pH imobilizado (pH 3,0-10,0, 4,0-7,0 e 6,0-11,0) na eletroforese bidimensional e as proteínas de estocagem foram identificadas pela combinação da MALDI-TOF MS com a LC-MS/MS.

A primeira etapa nos experimentos de seqüenciamento de proteínas consiste em dividir a proteína de interesse em uma série representativa de peptídeos [24]. O método mais comum para produzir peptídeos visando a análise por espectrometria de massas, é a digestão da proteína com enzimas proteolíticas, em geral, a tripsina, e esta será abordada a seguir.

2.3.2. Digestão triptica

A digestão proteolítica de uma proteína é uma etapa crítica no seqüenciamento por espectrometria de massas porque é nela que são gerados os peptídeos com massas molares dentro da faixa de massas dos espectrômetros, sendo a fragmentação feita de maneira eficiente. Para a análise por espectrometria de massas, a digestão é freqüentemente realizada com a protease tripsina (EC 3.4.21.4), porém outros agentes proteolíticos podem ser usados, caso necessário [24].

A tripsina cliva as ligações peptídicas de proteínas após os grupos carbonila dos resíduos de lisina (K) e arginina (R), exceto quando estas ligações são com resíduos de prolina (P), ou seja, ligações K-P ou R-P. A tripsina é o reagente mais utilizado nos experimentos de seqüenciamento por espectrometria de massas por ter um custo de produção relativamente baixo, por possuir uma alta atividade proteolítica, por produzir peptídeos pequenos (na faixa de 600 a 2500 Da) e por poder ser covalentemente modificada, de modo a minimizar os processos de autodigestão ou autólise [23,24].

Existem dois tipos de digestão proteolítica: em gel ou em solução. A digestão em gel é assim chamada porque a proteína é processada e digerida enquanto está contida em um *spot* de gel de poliacrilamida. Já a digestão em solução é aplicada em proteínas ou mistura de proteínas que se encontram em solução e a separação eletroforética não é utilizada [24].

Na maioria das aplicações proteômicas, a digestão é feita mais adequadamente pelo tratamento da proteína em um *spot* de gel 2-D PAGE. Ao utilizar a digestão em gel, é possível estabelecer uma relação direta entre as observações feitas pelos experimentos eletroforéticos e os peptídeos digeridos. O protocolo de digestão em gel consiste basicamente em seis etapas, descritas no Quadro 1.2.

A Figura 1.2 ilustra o mecanismo que permite a recuperação dos peptídeos a partir de uma proteína imobilizada em gel de poliacrilamida. Antes da digestão, a proteína encontra-se imobilizada no gel de poliacrilamida por precipitação, que

ocorre nas etapas de fixação do procedimento de coloração do gel. Por causa desta imobilização, a proteína não pode difundir do gel durante as etapas de lavagem, desidratação e reidratação. Após a digestão trípica, os peptídeos formados podem difundir através da poliacrilamida por causa do seu tamanho relativamente pequeno e estes podem ser recuperados por extração [24].

Quadro 1.2. Etapas do procedimento de digestão em gel das proteínas [24]

Etapa	Reagentes empregados	Função
Retirada do <i>spot</i> protéico do gel e lavagem	Bicarbonato de amônio 25 mmol L ⁻¹ em acetonitrila 5% (v/v) e bicarbonato de amônio 25 mmol L ⁻¹ em acetonitrila 50% (v/v)	Separar o <i>spot</i> da proteína de interesse, remover surfactantes e/ou sais residuais, bem como o corante
Secagem dos <i>spots</i>	Acetonitrila	Preparar os <i>spots</i> para a reação de digestão
Digestão com tripsina	Tripsina	Clivar as ligações K-X e R-X, onde X é qualquer aminoácido, exceto a prolina
Extração dos peptídeos e lavagem	TFA 0,2% (v/v)	Coletar os peptídeos produzidos pela digestão
Captura dos peptídeos em uma coluna C ₁₈	-	Limpeza da amostra pela eliminação de moléculas de massa molar baixa
Eluição da amostra	TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila 50% (v/v)	Eluição dos peptídeos retidos na coluna, em tampão compatível com MS

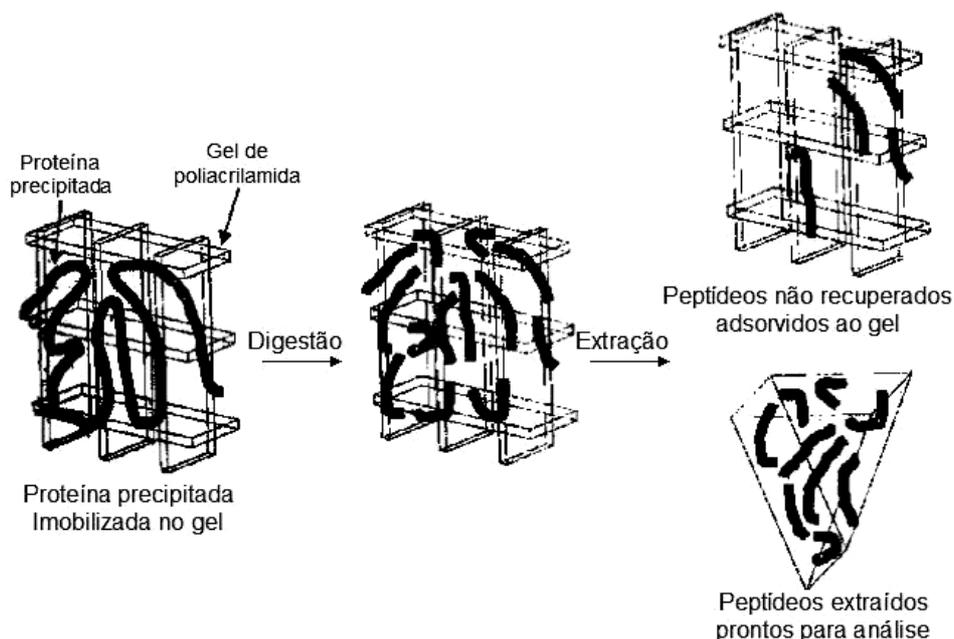


Figura 1.2. Representação do mecanismo de digestão em gel. Adaptada de Kinter e Sherman [24].

Em ambos os tipos de digestão de proteínas, em solução ou em gel, é necessário evitar a contaminação da amostra, pois espécies de baixa massa molar produzem um maior ruído à análise ou podem atrapalhar na identificação da amostra [24]. Uma solução para este problema é a limpeza da amostra anteriormente à análise por espectrometria de massas. Este processo é feito por meio de uma extração em fase sólida em microescala, usando ponteiras comercialmente disponíveis como as *ZipTips* (Millipore) empacotadas com fase estacionária. Tais ponteiras permitem que os peptídeos fiquem retidos na fase estacionária enquanto os sais são removidos e, então, os peptídeos são eluídos e podem ser levados para análise [22].

Para a análise por MALDI-TOF MS, a mistura de peptídeos obtida pela digestão trípica é misturada com uma solução de matriz. Esta matriz é utilizada para proteger os peptídeos de uma possível fragmentação, causada pela incidência direta do feixe do laser. No caso da análise de peptídeos, o CHCA ou o SA, são as matrizes comumente utilizadas [22].

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Equipamentos e acessórios

- Balança analítica, modelo 260 (Mettler, Bedford, EUA)
- Espectrofotômetro UV/Visível, modelo B582 (Micronal, São Paulo, Brasil)
- Espectrômetro de massas, modelo M@LDI-QTOF (Waters-Micromass, Manchester, Inglaterra)
- Estufa (Quimis, Diadema, Brasil)
- Fonte de corrente contínua, modelo EPS1001 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia)
- Mesa agitadora, modelo Q225M (Quimis, Diadema, Brasil)
- Misturador vortex, modelo M-37600 (Thermolyne, Dubuque, EUA)
- Placa aquecedora (Quimis, Diadema, Brasil)
- Potenciômetro, modelo DM20 (Digimed, São Paulo, Brasil)
- *Scanner*, modelo ImageScanner™ II (GE Healthcare, Uppsala, Suécia)
- Sistema de purificação Milli-Q, modelo Quantum™ cartridge (Millipore, Molsheim, França)
- Sistema para eletroforese 2-D PAGE, modelo Ettan™ Daltsix (GE Healthcare, Uppsala, Suécia)
- Ultracentrífuga, modelo Bio-Spin-R (BioAgency, São Paulo, Brasil)
- Vidrarias de uso rotineiro em laboratório de química analítica

3.2. Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água desionizada (18,2 MΩ cm), obtida por um sistema de purificação Milli-Q, e reagentes de grau analítico. Os frascos plásticos, vidrarias e demais utensílios de laboratório foram descontaminados por meio de imersão em ácido clorídrico 10% (v/v), por 12 h. Depois, o material foi lavado três vezes com água Milli-Q e seco a temperatura ambiente. A seguir, é apresentada a lista completa dos reagentes utilizados:

- Acetato de amônio, $C_2H_7NO_2$, $M = 77,08 \text{ g mol}^{-1}$ (Mallinckrodt, Xalostoc, México)
- Acetona, C_2H_6O , $M = 58,08 \text{ g mol}^{-1}$ (Synth, Diadema, Brasil)
- Acetonitrila, C_2H_3N , $M = 41,05 \text{ g mol}^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Ácido acético glacial, $C_2H_4O_2$, $M = 60,05 \text{ g mol}^{-1}$ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA)
- Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico, $C_{10}H_7NO_3$, $M = 189,17 \text{ g mol}^{-1}$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA)
- Ácido clorídrico, HCl , $M = 36,46 \text{ g mol}^{-1}$ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA)
- Ácido fosfórico 85%, H_3PO_4 , $M = 98,00 \text{ g mol}^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Ácido trifluoroacético, $C_2HF_3O_2$, $M = 114,03 \text{ g mol}^{-1}$ (Mallinckrodt, Xalostoc, México)
- Acrilamida, C_3H_5NO , $M = 71,08 \text{ g mol}^{-1}$ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia)
- Agarose grau biologia molecular (BioAgency, São Paulo, Brasil)
- Albumina de soro bovino (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Anfólitos de pH 3 a 10 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia)
- Azul de bromofenol, $C_{19}H_9Br_4NaO_5S$, $M = 691,94 \text{ g mol}^{-1}$ (BioAgency, São Paulo, Brasil)
- Azul de Coomassie G-250, $C_{47}H_{50}N_3NaO_7S_2$, $M = 854,03 \text{ g mol}^{-1}$ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA)
- Cloreto de potássio, KCl , $M = 74,55 \text{ g mol}^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Ditiotreitól, $C_4H_{10}O_2S_2$, $M = 154,24 \text{ g mol}^{-1}$ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia)
- Dodecil sulfato de sódio, $C_{12}H_{25}NaO_4S$, $M = 288,28 \text{ g mol}^{-1}$ (Synth, Diadema, Brasil)
- Etanol, C_2H_6O , $M = 46,07 \text{ g mol}^{-1}$ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA)
- Éter de petróleo, p.e. 35-60°C (Mallinckrodt, Xalostoc, México)
- Fluoreto de fenilmetanosulfonila, $C_7H_7FO_2S$, $M = 174,19 \text{ g mol}^{-1}$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA)

- Glicerol 87%, $C_3H_8O_3$, $M = 92,09 \text{ g mol}^{-1}$ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia)
- Iodoacetamida, C_2H_4INO , $M = 184,96 \text{ g mol}^{-1}$ (Amersham, Biosciences, Uppsala, Suécia)
- Glicina, $C_2H_5O_2N$, $M = 75,07 \text{ g mol}^{-1}$ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia)
- Kit para digestão trípica dos géis *In-Gel Digest_{ZP} Kit* (Millipore, Molsheim, França)
- Metanol, CH_4O , $M = 32,04 \text{ g mol}^{-1}$ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA)
- *N, N'*-metilenobisacrilamida, $C_7H_{10}N_2O_2$, $M = 154,17 \text{ g mol}^{-1}$ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia)
- *N, N', N, N'*-tetrametiletilenodiamina, $C_6H_{16}N_2$, $M = 116,20 \text{ g mol}^{-1}$ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA)
- Óleo mineral (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia)
- Padrão protéico de massa molar (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia)
- Sulfato de amônio, $H_8N_2O_4S$, $M = 132,14 \text{ g mol}^{-1}$ (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil)
- Sulfonato de 3-(3-cloroamidopropil-dimetilamônio)-1-propano, $C_{32}H_{58}N_2O_7S$, $M = 614,88 \text{ g mol}^{-1}$ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia)
- Tiouréia, CH_4N_2S , $M = 76,12 \text{ g mol}^{-1}$ (Synth, Diadema, Brasil)
- Tris-hidroximetil amino metano, $C_4H_{11}O_3N$, $M = 121,14 \text{ g mol}^{-1}$ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia)
- Uréia, CH_4N_2O , $M = 60,06 \text{ g mol}^{-1}$ (BioAgency, São Paulo, Brasil)

3.3. Amostras

As amostras de soja utilizadas nas etapas de otimização de procedimentos experimentais, denominadas como soja comum, foram adquiridas em um mercado local, na cidade de Campinas/SP. Já as amostras de soja transgênica e não-transgênica, foram obtidas por meio do Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin e fornecidas pela Monsanto do Brasil. A soja transgênica utilizada neste trabalho é

aquela denominada *Roundup Ready*, cujo processo de modificação genética consiste na inserção do gene *cp4 epsps* (número de patente US5633435) da bactéria *Agrobacterium* sp. tipo CP4, que gera a proteína CP4 EPSPS e torna a planta resistente à ação do glifosato (princípio ativo do herbicida *Roundup*) [9,10].

3.4. Extração das proteínas de soja

O procedimento de extração das proteínas foi executado de acordo com aquele proposto por Sussulini *et al.* [27]. As sementes de soja foram congeladas em nitrogênio líquido e maceradas com o auxílio de um almofariz e um pistilo. Para cada 100 mg da soja moída, adicionou-se 1 mL de éter de petróleo e, então, o solvente foi deixado em contato com a amostra durante 15 min, sob leve agitação. O solvente foi removido com o auxílio de uma pipeta e a amostra foi novamente macerada com nitrogênio líquido. Este processo foi repetido por mais duas vezes. A seguir, as proteínas foram extraídas da amostra pela maceração desta com 1 mL de uma solução contendo Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ (pH 8,8), cloreto de potássio 1,5 mmol L⁻¹, DTT 10 mmol L⁻¹, PMSF 1,0 mmol L⁻¹ e SDS 0,1% (m/v). O extrato protéico obtido foi, então, agitado por 10 min, em banho de gelo, e os materiais insolúveis foram removidos por centrifugação durante 5 min, a 5000 *g* e a 4 °C. O sobrenadante contendo as proteínas foi coletado em tubos do tipo Eppendorf e armazenado a -20 °C.

3.5. Determinação da concentração das proteínas totais pelo método de Bradford

A concentração de proteínas totais foi determinada de acordo com o método de Bradford [28], empregando albumina de soro bovino como padrão. As amostras foram diluídas adequadamente com solução de Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ (pH 8,8). Em cubetas de plástico, foram adicionados 200 µL do extrato protéico diluído e 2,5 mL do reagente de Bradford. O reagente de Bradford consiste em uma mistura do corante CBB G-250 0,01% (m/v), etanol 5% (v/v) e ácido fosfórico 10%

(v/v). Após 5 min de reação, foi determinada, em triplicata, a absorvância das amostras a 595 nm, utilizando um espectrofotômetro UV/Visível. A curva analítica de calibração foi feita a partir de um padrão de albumina de soro bovino na faixa de concentração entre 5 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, diluído com o mesmo tampão utilizado na diluição das amostras.

3.6. Otimização do preparo de amostra para a separação por 2-D PAGE

Com o intuito de remover possíveis interferentes no processo eletroforético (tais como sais e surfactantes aniônicos) presentes no extrato protéico, dois procedimentos de precipitação das proteínas foram avaliados. O primeiro consistiu na precipitação com acetato de amônio 0,1 mol L⁻¹ em metanol e o segundo na precipitação com TCA em acetona. Em ambos os casos, a precipitação foi conduzida durante 1 h, a -20 °C. As proteínas foram, então, coletadas por centrifugação a 5000 g (4 °C) por 10 min e o precipitado foi lavado duas vezes com solução gelada (12 °C) de acetato de amônio 0,1 mol L⁻¹ em metanol, duas vezes com acetona a 80% (v/v) gelada e, finalmente, uma vez com etanol a 70% (v/v), também gelado.

3.7. Separação das proteínas por 2-D PAGE

Para a obtenção do gel de eletroforese bidimensional, uma massa de 300 μg de proteínas de soja foi ressolubilizada. No caso da precipitação com acetato de amônio, o tampão de ressolubilização constituiu em uma solução de uréia 7 mol L⁻¹, tiouréia 2 mol L⁻¹, CHAPS 2% (m/v), anfólitos 0,5% (v/v) em pH variando de 3 a 10 e azul de bromofenol 0,002% (m/v) e, no caso da precipitação com TCA, o tampão de ressolubilização foi similar, apenas substituiu-se a mistura de uréia e tiouréia por uréia 8 mol L⁻¹. A seguir, realizou-se a centrifugação da solução resultante por 2 min a 5000 g, de modo a remover qualquer resíduo sólido que ainda permanecesse na amostra.

A primeira dimensão do processo eletroforético (IEF) foi executada em uma fita de 13 cm, sendo que esta fita continha um gel de poliacrilamida onde o gradiente de pH foi formado pela presença de anfólitos. Para a focalização isoelétrica, foram aplicados 250 μL da amostra ressolubilizada em um aparato sobre o qual a fita foi colocada. Foram adicionados cerca de 900 μL de óleo mineral sobre a fita e esta foi reidratada a temperatura ambiente por 12 h. Após este período, a fita foi levada ao sistema focalizador e o programa contendo quatro etapas foi aplicado: (1) 500 V até 500 Vh, (2) 1000 V até 800 Vh, (3) 10000 V até 11300 Vh e (4) 10000 V até 3000 Vh. O programa todo durou, em média, 4,5 h.

Ao término da focalização, a fita foi equilibrada em duas etapas. Na primeira delas, foram usados 10 mL de solução contendo uréia 6 mol L^{-1} , SDS 2% (m/v), glicerol 30% (v/v), Tris-HCl 50 mmol L^{-1} (pH 8,8), azul de bromofenol 0,002% (m/v) e DTT 2% (m/v). Esta etapa é denominada redução e sua finalidade é manter as proteínas em suas formas reduzidas [18]. Na segunda etapa, foi utilizada uma solução de composição similar, porém, neste caso, o DTT foi substituído por iodoacetamida 2,5% (m/v). Esta etapa é denominada alquilação e sua finalidade é alquilar os grupos tióis das proteínas, prevenindo que elas sejam reoxidadas durante o processo eletroforético [18]. Cada uma destas etapas durou 15 min e foi realizada sob leve agitação.

Após o equilíbrio da fita, foi realizada a segunda dimensão do processo eletroforético (SDS-PAGE). Para isso, a fita foi aplicada em um gel de poliacrilamida 12,5% (m/v) previamente preparado em placa de 180 x 160 x 1,5 mm. Foi colocado sobre o gel, ao lado da fita, um pedaço de papel de filtro contendo 10 μL de um padrão de massa molar contendo as proteínas β -fosforilase (97,0 kDa), albumina (66,0 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa). A fita e o papel de filtro foram vedados com uma solução quente de agarose 0,5% (m/v), de modo a garantir o contato destes com o gel de poliacrilamida. A corrida eletroforética foi efetuada em duas etapas: (1) 90 V, 25 mA gel^{-1} e 100 W, durante 30 min e (2) 250 V, 25 mA gel^{-1} e 100 W, durante 5 h. Após este período, as proteínas foram reveladas empregando-se o corante Coomassie coloidal [29], que consiste em

uma solução de sulfato de amônio 8% (m/v), ácido fosfórico 1,6% (v/v), CBB G-250 0,08% (m/v) e metanol 25% (v/v). Antes de ser adicionado o corante, as proteínas foram fixadas, durante 1 h, empregando-se uma solução contendo ácido acético 10% (v/v) e etanol 40% (v/v). O corante ficou em contato com o gel durante 48 h e depois foi removido por lavagens com água desionizada.

O gel obtido foi, por fim, escaneado e sua imagem foi analisada pelo programa de tratamento de imagens *ImageMaster 2D Platinum* (GeneBio, Genebra, Suíça), versão 6.0, que permite obter uma estimativa dos pontos isoelétricos e das massas molares das proteínas separadas, bem como calcular o número de *spots* obtidos no gel de eletroforese.

3.8. Digestão trípica e caracterização de proteínas por MALDI-TOF MS

Primeiramente, os *spots* de proteínas a serem caracterizados por MALDI-TOF MS foram recortados do gel de poliacrilamida e cada um deles foi colocado em um pocinho de uma placa, denominada *Zip Plate* (Millipore), na qual foi realizada a digestão trípica.

A digestão trípica foi executada com o uso de um *kit* específico (*In-Gel Digest_{ZP} Kit*) que, além de digerir a proteína, também purifica os peptídeos obtidos. Esta purificação é feita por meio de uma micro-coluna C₁₈, presente na saída de cada pocinho da placa, que retém moléculas de baixa massa molar que podem interferir na análise dos espectros de massas.

As amostras resultantes da digestão trípica foram preparadas para as análises por MS utilizando-se o método da “gota seca” (do inglês, *dried droplet*). As amostras foram acidificadas pela adição de TFA 0,1% (v/v), em um volume duas vezes maior que aquele das amostras, aplicadas em uma micro-placa de MALDI previamente limpa e esta foi deixada à temperatura ambiente por alguns minutos, de modo que o volume das gotas fosse reduzido por evaporação. A matriz CHCA foi preparada a 1% (m/v) em uma mistura de água/acetona 1:1 (v/v) contendo TFA 0,1% (v/v) e, então, 1 µL desta solução foi adicionada às

amostras, deixando-se secar a temperatura ambiente. Os espectros de massas foram obtidos no modo positivo (LDI+), utilizando os seguintes parâmetros: voltagem de pulso de 2557 V, voltagem na fonte de 15 kV, voltagem *reflectron* de 2000 V, uma retardação no tempo de focalização de 750 ns, uma taxa de disparo do laser de nitrogênio de 20 Hz, 12 disparos por espectro, período da amostra de 0,5 ns, sensibilidade do sinal a 100,0 mV e a placa de micro canal ajustada a 1800 V. Todos os espectros de massas foram processados em arquivos de lista de picos, com extensão *.pkl, pelo programa *ProteinLynxGlobalServer*, versão 2.2.5 (Waters, Manchester, Inglaterra).

A identificação das proteínas foi executada por meio de uma busca em banco de dados, utilizando as massas dos peptídeos e as intensidades geradas pelo pós-processamento dos espectros de massas, realizado com o uso do programa *ProteinLynxGlobalServer*. O banco de dados das seqüências expressas identificadas (do inglês, *expressed sequence tags*) utilizado foi aquele disponível em ftp://ftp.tigr.org/pub/data/plantta/Glycine_max e este foi adicionado ao programa *ProteinLynxGlobalServer*, de modo a gerar uma fase aberta de leitura (do inglês, *open reading frame*) concisa dos aminoácidos das proteínas. As listas de picos monoisotópicas foram processadas com os seguintes parâmetros de busca: arquivo de entrada do banco de dados GLYCINEMAX-1.0, uma clivagem perdida, digestão tríptica e carbamidometilação como modificação na cisteína. A tolerância ao erro na busca foi ajustada a 10 ppm, com um estado de carga $[M + H]^+$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação da concentração de proteínas totais

A primeira avaliação comparativa entre a soja transgênica e a não-transgênica foi realizada em termos da concentração de proteínas totais presente nestas amostras, utilizando-se o método de Bradford [28].

Este método é baseado na interação entre as moléculas do corante CBB G-250 e os grupos ácidos e básicos das proteínas. Este corante liga-se, preferencialmente, aos resíduos de aminoácidos básicos e aromáticos (especialmente a arginina, na superfície da proteína). As moléculas do corante apresentam interações mais fracas com os resíduos de histidina, lisina, tirosina, triptofano e fenilalanina [30,31]. O comportamento da ligação entre o corante e as proteínas é atribuído às forças de van der Waals e às interações hidrofóbicas [30]. Uma limitação deste método é a baixa sensibilidade para detectar peptídeos pequenos, ou seja, proteínas com massas molares menores que 5,0 kDa [30,31].

Os resultados das concentrações de proteínas totais determinadas, bem como a porcentagem de proteínas presente nas amostras, estão mostrados na Tabela 1.1.

Tabela 1.1. Concentrações de proteínas totais (concentração \pm desvio padrão, $n=3$) e porcentagem de proteínas nas amostras de soja transgênica e não-transgênica

Amostra	Concentração / mg mL⁻¹	Porcentagem de proteínas / %
Soja transgênica	8,2 \pm 0,3	41 \pm 2
Soja não-transgênica	11,0 \pm 0,1	54,9 \pm 0,9

Os resultados obtidos mostram que as concentrações de proteínas totais determinadas nas duas amostras foram próximas, sendo que a soja não-transgênica apresentou um valor de concentração de proteínas totais maior que a soja transgênica. A porcentagem de proteínas nas amostras encontra-se um pouco acima da faixa descrita na literatura, que se estima entre 35 a 40% [5], porém, este resultado parece não ser tão significativo em se tratando de amostras biológicas.

4.2. Otimização da separação das proteínas por 2-D PAGE

De modo a obter géis de eletroforese bidimensional com boa resolução, é necessário que a amostra seja submetida a um processo de limpeza, no qual os surfactantes, os sais e os lipídeos, que são os principais interferentes no processo eletroforético, sejam removidos seletivamente, por meio da precipitação das proteínas [18,21]. Para estabelecer uma limpeza e recuperação das proteínas de maneira mais efetiva, dois métodos de precipitação foram testados, e estes foram comparados por meio da análise das imagens dos géis obtidos por 2-D PAGE. As amostras utilizadas nesta etapa de otimização foram de soja comum.

Conforme mostram os géis da Figura 1.3, é possível verificar que a separação das proteínas ocorreu de maneira eficiente, mesmo comparando-se os diferentes métodos de preparo da amostra. Na Figura 1.3 (a), na qual é mostrado um gel onde as proteínas de soja foram precipitadas com solução de acetato de amônio em metanol e ressolubilizadas em tampão contendo uréia e tiouréia, foram observados 237 *spots* de proteínas. Já na Figura 1.3 (b), na qual é mostrado um gel onde as proteínas de soja foram precipitadas com solução de TCA em acetona e ressolubilizadas em tampão contendo somente uréia, foram observados 138 *spots* de proteínas. Comparando-se as Figuras 1.3 (a) e (b), nota-se que as proteínas que foram perdidas durante a precipitação com solução de TCA em acetona são aquelas que possuem menores massas molares. Tais fatos levam à conclusão de que o método de precipitação empregando solução de acetato de amônio em metanol, com ressolubilização em tampão contendo uréia e tiouréia é o mais eficiente na recuperação das proteínas de soja.

Vale ressaltar que a alteração na composição dos tampões de ressolubilização não foi um fator que afetou a quantidade de *spots* de proteínas encontrada nos géis, uma vez que a solubilização das proteínas em ambos os casos foi completamente eficiente, de modo que nenhuma partícula sólida restou na solução obtida, mesmo após a centrifugação.

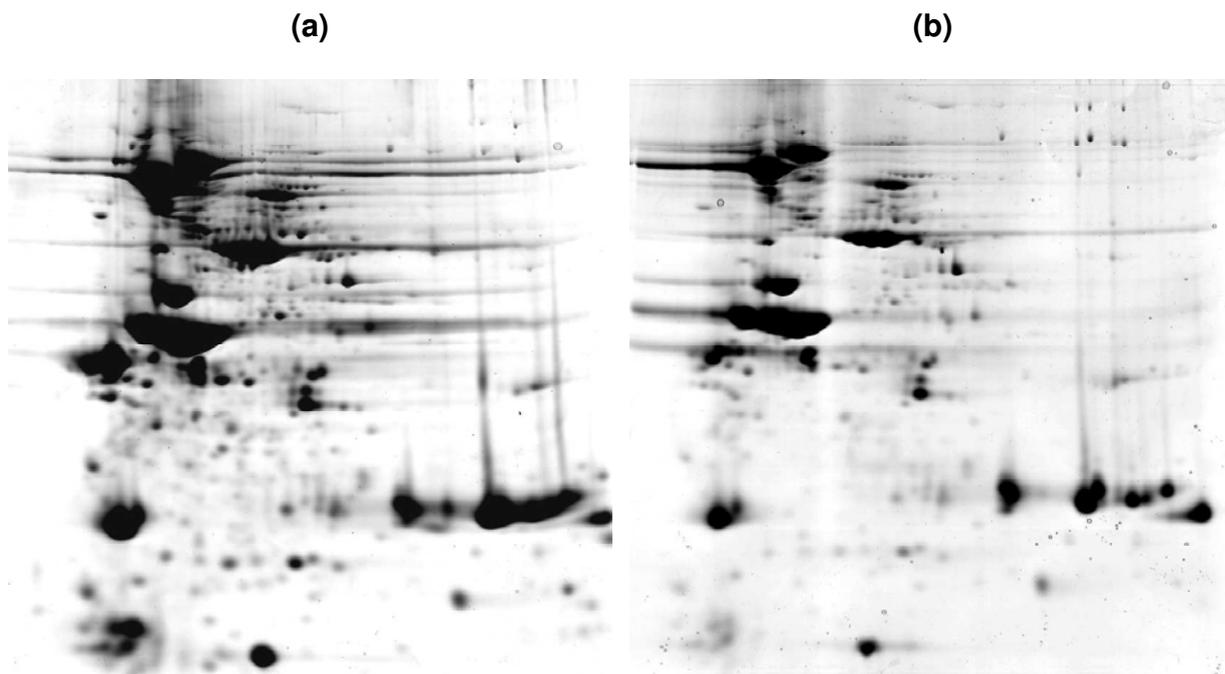


Figura 1.3. Eletroferogramas 2-D PAGE de (a) 1,5 mg de proteínas de soja comum, precipitadas com acetato de amônio em metanol e ressolubilizadas em tampão contendo uréia e tiouréia; (b) 1,5 mg de proteínas de soja comum, precipitadas com TCA em acetona e ressolubilizadas em tampão contendo uréia.

A partir deste estudo, otimizou-se, portanto, o método de preparo de amostra visando a separação das proteínas de soja por 2-D PAGE. Um gel de eletroforese, no qual foi aplicada uma menor quantidade de proteínas da amostra, visando minimizar os problemas de resolução, é mostrado na Figura 1.4.

O número de *spots* obtidos neste caso foi de 153, que é menor do que aquele obtido no gel da Figura 1.3 (a), no qual a amostra foi preparada nas mesmas condições, porém foi aplicada em maior concentração. Tal fato mostra que, ao buscar uma melhor resolução na separação das proteínas reduzindo a concentração da amostra, ocorre uma perda na visualização das proteínas que se encontram em menor abundância na mesma. Assim sendo, a condição otimizada para a obtenção dos géis de eletroforese bidimensional foi estabelecida com a aplicação de 300 μ g de proteínas de soja, precipitadas previamente com uma solução de acetato de amônio em metanol e ressolubilizadas em tampão contendo uréia e tiouréia.

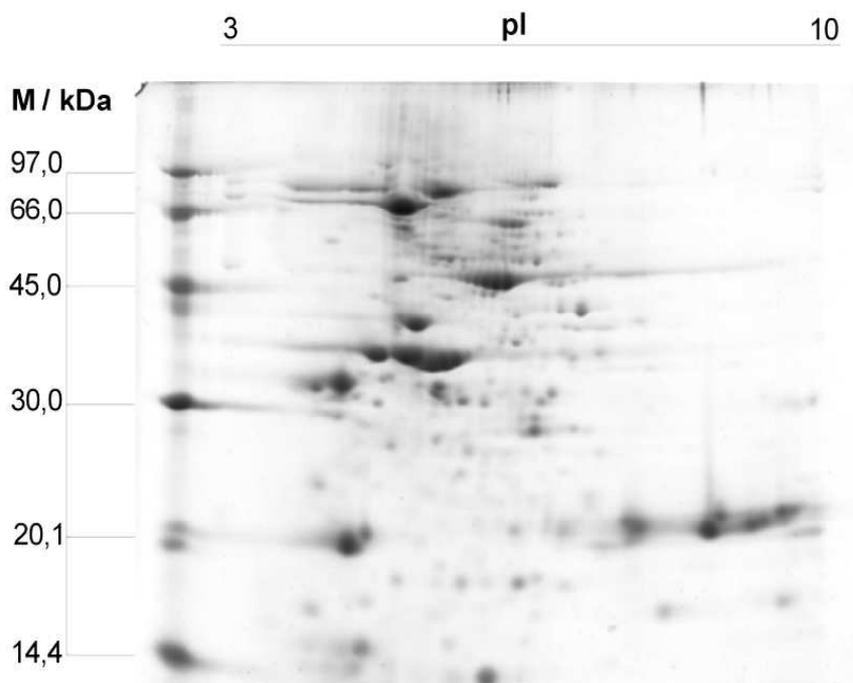


Figura 1.4. Eletroferograma 2-D PAGE de 300 µg de proteínas de soja comum.

4.3. Comparação entre os géis 2-D PAGE de soja transgênica e não-transgênica

De modo a avaliar as modificações em nível protéico entre os dois tipos de sementes de soja, transgênica e não-transgênica, foram obtidos géis de eletroforese bidimensional para estas amostras. A quantidade de proteínas aplicada nos géis foi a mesma (300 µg) e, para uma melhor visualização das proteínas presentes em maior abundância nas amostras, foram obtidos géis em diferentes faixas de pI, conforme mostra a Figura 1.5.

Ao comparar o número de *spots* entre a mesma amostra em diferentes faixas de pI, observa-se que o número de *spots* obtidos é maior na faixa de pI entre 4 e 7, mostrando que houve uma melhora significativa na resolução da separação das proteínas quando uma faixa de pI mais estreita foi utilizada.

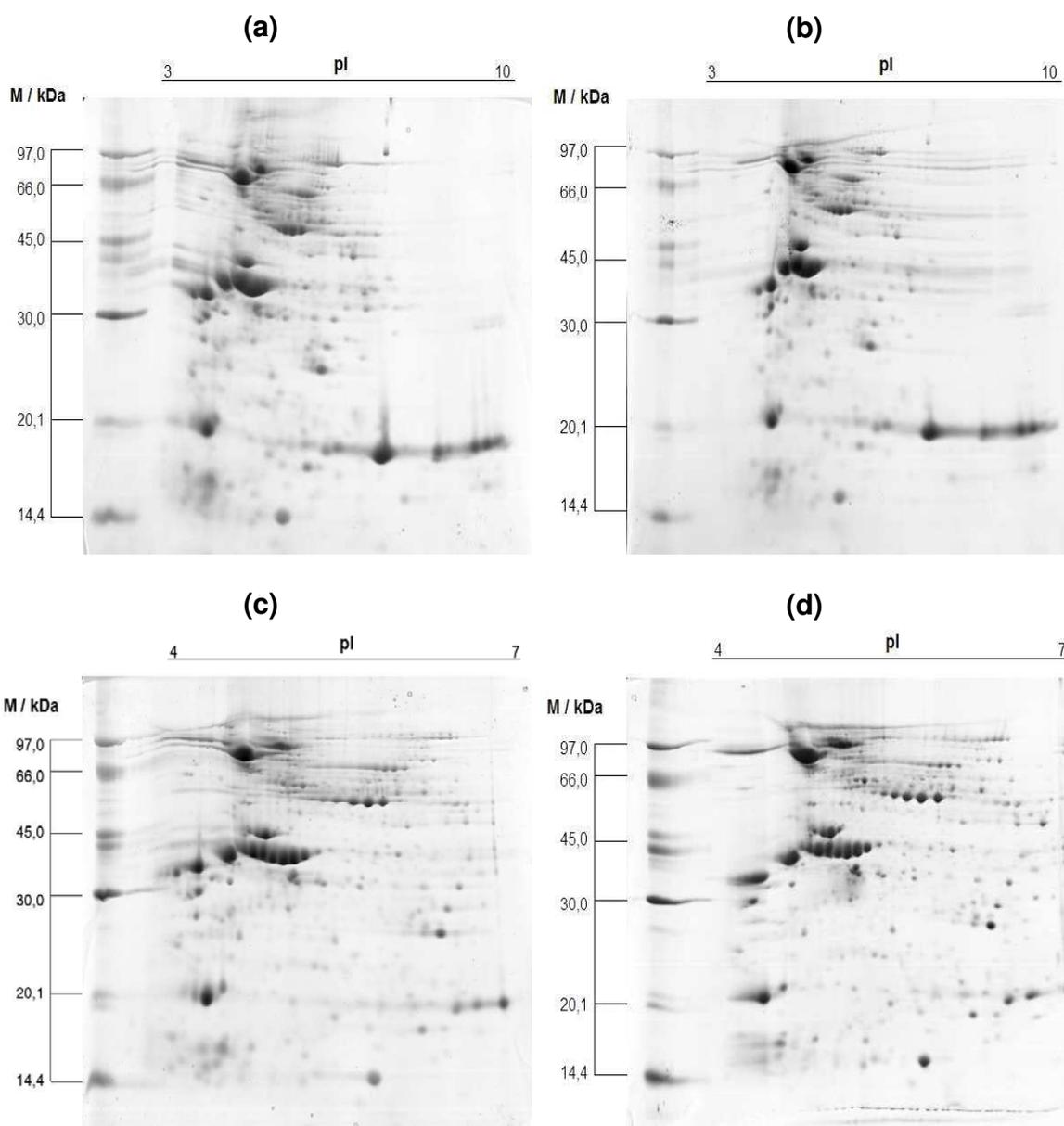


Figura 1.5. Eletroferogramas 2-D PAGE para 300 μg de proteínas de semente de soja: (a) transgênica e (b) não-transgênica, em faixas de pI entre 3 e 10; (c) transgênica e (d) não-transgênica, em faixas de pI entre 4 e 7.

Na faixa de pI entre 3 e 10, foram calculados 371 ± 44 spots para a amostra de soja transgênica e 263 ± 32 spots para a amostra de soja não-transgênica. Na faixa de pI entre 4 e 7, foram calculados 408 ± 27 spots para a amostra de soja transgênica e 397 ± 26 spots para a amostra de soja não-transgênica. Em todos os casos, os géis foram feitos em replicatas ($n = 4$). Comparando-se os números

de *spots* dos dois tipos da amostra obtidos para uma mesma faixa de pI, pode-se afirmar que a soja transgênica apresenta um maior número de proteínas do que a soja não-transgênica. Isso porque, ao passar pelo processo de modificação genética, o genoma do organismo é alterado pela introdução de fragmentos de DNA exógenos, ou seja, genes provenientes de um organismo de espécie diferente da espécie do organismo alvo, o que pode ocasionar modificações em nível protéico [8].

Na faixa de pI entre 3 e 10, a soja comum, utilizada no processo de otimização da obtenção dos géis de eletroforese (vide item 4.2 deste Capítulo), apresentou um número de *spots* menor que aqueles obtidos para a soja transgênica e não-transgênica. Tal fato mostra que a origem do produto (ambiente) e as condições de armazenamento também influenciam no número total de *spots* das amostras.

Com o uso do programa de análises de imagens *ImageMaster 2D Platinum*, foi feita a sobreposição das imagens dos géis para as replicatas ($n = 4$) de cada amostra, bem como entre os dois tipos de soja. Para os géis de soja transgênica, a probabilidade de identidade entre os mesmos foi de $77 \pm 2\%$ na faixa de pI entre 4 e 7 e de $68 \pm 3\%$ na faixa de pI entre 3 e 10. Já para os géis de soja não-transgênica, a probabilidade de identidade entre os mesmos foi de $79 \pm 4\%$ na faixa de pI entre 4 e 7 e de $71 \pm 5\%$ na faixa de pI entre 3 e 10. Estes resultados mostram que a obtenção dos géis foi bastante reprodutível, uma vez que uma probabilidade de identidade acima de 50% é considerada ótima [32].

Quando as imagens dos géis de soja transgênica e não-transgênica na faixa de pI entre 3 e 10 foram sobrepostas, a probabilidade de identidade entre os géis foi de 65,2%, indicando uma baixa diferença entre o conjunto de proteínas dos dois tipos da amostra nesta faixa de pI. Entretanto, quando as imagens dos géis da soja transgênica e não-transgênica na faixa de pI entre 4 e 7 foram sobrepostas, a probabilidade de identidade entre os géis foi de apenas 35,0%, indicando que o conjunto de proteínas dos dois tipos da amostra apresenta uma diferença significativa, nesta faixa de pI.

Outra observação que pôde ser feita a partir da comparação das imagens dos géis de eletroforese bidimensional, é que algumas proteínas apresentaram diferenças em sua expressão, conforme pode ser verificado nas Figuras 1.6 e 1.7. A diferença na expressão das proteínas é observada a partir do volume normalizado dos *spots*, fornecido pelo programa de análise de imagens dos géis.

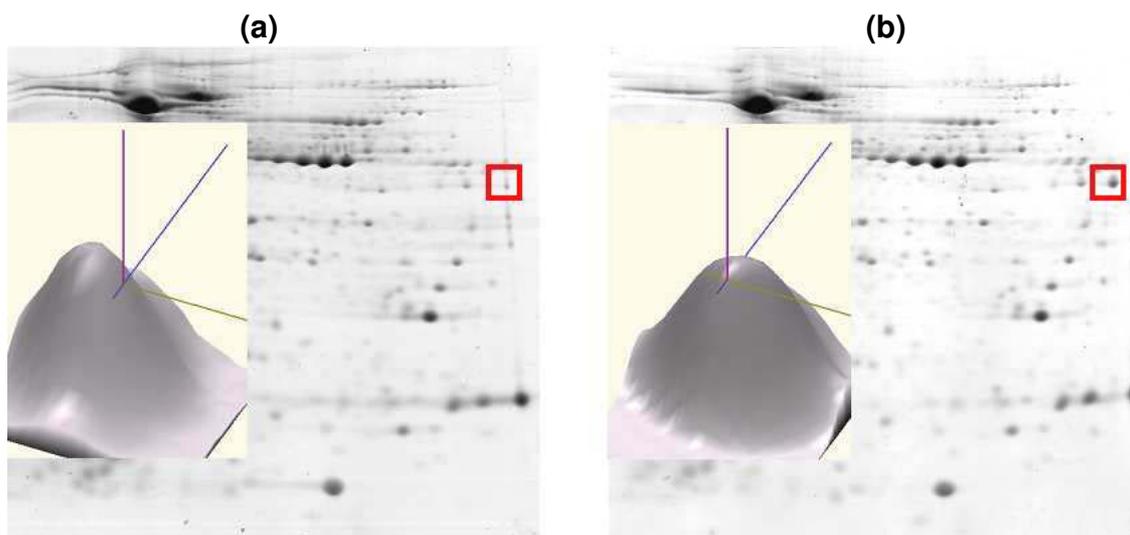


Figura 1.6. Eletroferogramas 2-D PAGE para 300 μ g de proteínas de semente de soja: (a) transgênica e (b) não-transgênica, em faixa de pI entre 4 e 7. A proteína em destaque é mais expressa na soja não-transgênica que na soja transgênica e possui pI igual a 6,83 e M igual a 54,50 kDa.

Na Figura 1.6, são mostrados os eletroferogramas para os dois tipos de soja, sendo que, em destaque, está uma proteína (pI igual a 6,83 e M igual a 54,50 kDa) que apresentou uma maior expressão na soja do tipo não-transgênica (volume normalizado = $0,39 \pm 0,01$) do que na soja transgênica (volume normalizado = $0,05 \pm 0,01$). Já na Figura 1.7, são também mostrados os eletroferogramas para os dois tipos de soja, sendo que, em destaque, está uma proteína (pI igual a 4,37 e M igual a 27,03 kDa) que apresentou uma maior expressão na soja do tipo transgênica (volume normalizado = $0,81 \pm 0,01$) do que na soja não-transgênica (volume normalizado = $0,33 \pm 0,03$).

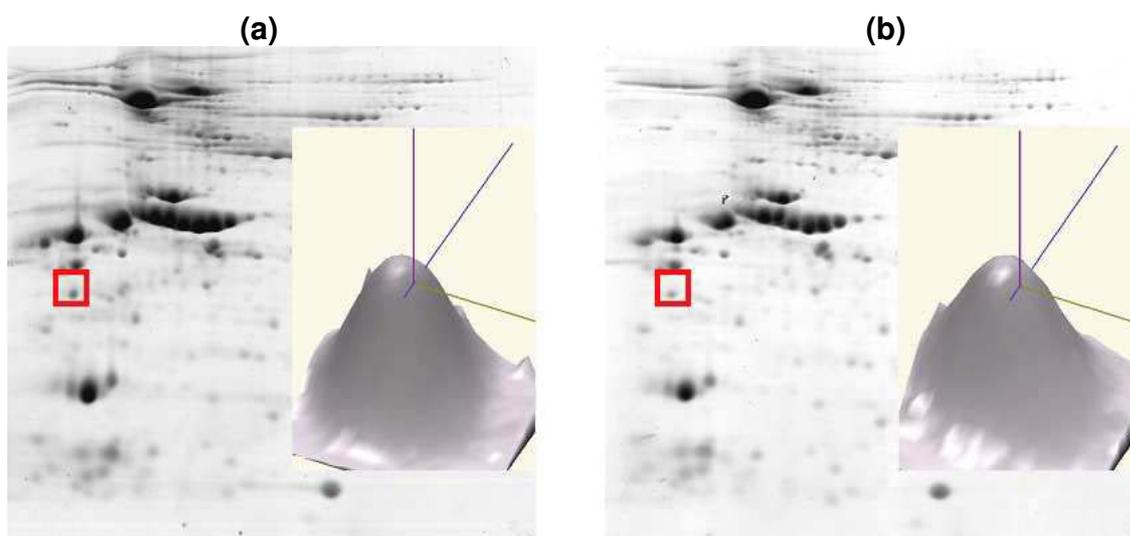


Figura 1.7. Eletroferogramas 2-D PAGE para 300 μg de proteínas de semente de soja: (a) transgênica e (b) não-transgênica, em faixa de pI entre 4 e 7. A proteína em destaque é mais expressa na soja transgênica que na soja não-transgênica e possui pI igual a 4,37 e M igual a 27,03 kDa.

Tais observações mostram claramente que a expressão de algumas proteínas, como aquelas referentes às Figuras 1.6 e 1.7, é afetada pelo processo de modificação genética de maneira aleatória, sendo que em alguns casos as proteínas apresentam um aumento em sua expressão e, em outros casos, uma redução em sua expressão.

4.4. Caracterização de proteínas por MALDI-TOF MS

A caracterização de 10 proteínas de soja foi realizada utilizando-se a MALDI-TOF MS, sendo que estas apresentaram uma boa porcentagem de probabilidade de identificação (acima de 60%). As proteínas foram caracterizadas por meio da técnica da PMF, que consiste na comparação das massas molares absolutas dos peptídeos obtidas experimentalmente com aquelas presentes em banco de dados. No caso, o banco de dados utilizado foi o do *The Institute for Genome Research* (TIGR) para a soja [33], que fornece a identidade da proteína com base na seqüência de nucleotídeos. A partir do resultado fornecido por este banco de dados, foi feita a tradução da seqüência nucleotídica para a seqüência

protéica, utilizando-se o programa BLAST [34] e, por fim, foram calculados os pontos isoelétricos e massas molares destas proteínas com uma ferramenta disponível no *ExpASY Proteomics Server* [35], que confirmou a identidade das mesmas.

A Figura 1.8 mostra os eletroferogramas 2-D PAGE com a localização das proteínas que foram caracterizadas e a Tabela 1.2 mostra as informações obtidas por esta análise, incluindo os valores de pI e M obtidos.

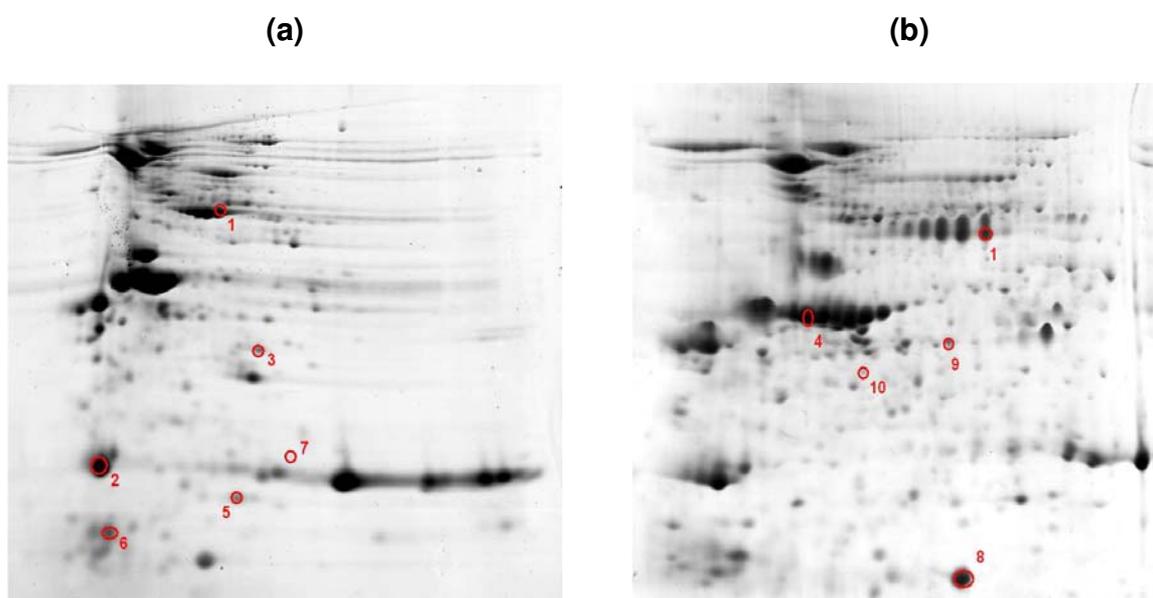


Figura 1.8. Eletroferogramas 2-D PAGE para 300 µg de proteínas de semente de soja: (a) não-transgênica, em faixa de pI entre 3 e 10 e (b) transgênica, em faixa de pI entre 4 e 7. Os spots marcados foram analisados por MALDI-TOF MS.

A proteína *β-conglycinin*, *β-chain (precursor)* é uma proteína de armazenamento, ou seja, ela é acumulada durante o desenvolvimento da semente e hidrolisada após a germinação, sendo uma fonte de carbono e nitrogênio, necessários para o crescimento da planta [35]. Esta proteína possui a estrutura tridimensional definida [36], mostrada na Figura 1.9 (a), sendo classificada como uma proteína ligante de açúcares.

A proteína *trypsin inhibitor subtype A* é um inibidor de tripsina, que atua como inibidor ou antagonista da biossíntese ou atividade de proteases [35]. Já a proteína *LEA protein*, é uma proteína de maturação, que atua nos processos de

resposta ao estresse e à água [35]. Na Figura 1.10, é mostrada uma comparação entre os *spots* desta mesma proteína, para a soja transgênica e a para a soja não-transgênica. É possível observar que, na soja transgênica, esta proteína está mais expressa (volume normalizado = $1,3 \pm 0,2$) que na soja não-transgênica (volume normalizado = $0,37 \pm 0,02$), o que pode evidenciar um efeito resultante do estresse gerado pela modificação genética na planta.

Tabela 1.2. Identificação das proteínas por MALDI-TOF MS

Spot	Proteína	Identificação no ExPASy [35]	M / kDa	pI
1	<i>β-conglycinin, β-chain (precursor)</i>	P25974	50,55	5,88
2	<i>Trypsin inhibitor subtype A</i>	Q39898	24,08	4,99
3	<i>LEA protein</i>	Q39846	67,88	6,10
4	<i>Glycinin G2 (precursor)</i>	P04405	54,39	5,46
5	<i>Stem 31 kDa glycoprotein (precursor)</i>	P10743	29,28	6,72
6	<i>β-1,3-glucanase (fragment)</i>	O49011	26,99	4,52
7	<i>P34 probable thiol protease (precursor)</i>	P22895	42,79	5,74
8	<i>Glycinin G4 (precursor)</i>	P02858	14,40	5,29
9	<i>Early nodulin 75 (precursor)</i>	P08297	35,97	5,88
10	<i>Clavamate synthase-like protein At3g21360</i>	Q9LIG0	37,21	5,70

A proteína *glycinin G2 (precursor)* é uma proteína de armazenamento, sendo uma das majoritárias da soja. A proteína *stem 31 kDa glycoprotein (precursor)* é outra proteína de armazenamento e também atua como ácido fosfatase [35].

A proteína *β -1,3-glucanase* possui as funções de hidrolase, catalisando a hidrólise de compostos O-glicosilados, e de ligante de cátions. Esta proteína atua no processo do metabolismo de carboidratos [35]. A proteína *P34 probable thiol protease (precursor)* (EC 3.4.22.-) possui as funções de hidrolase e peptidase, atuando em processos de proteólise [35].

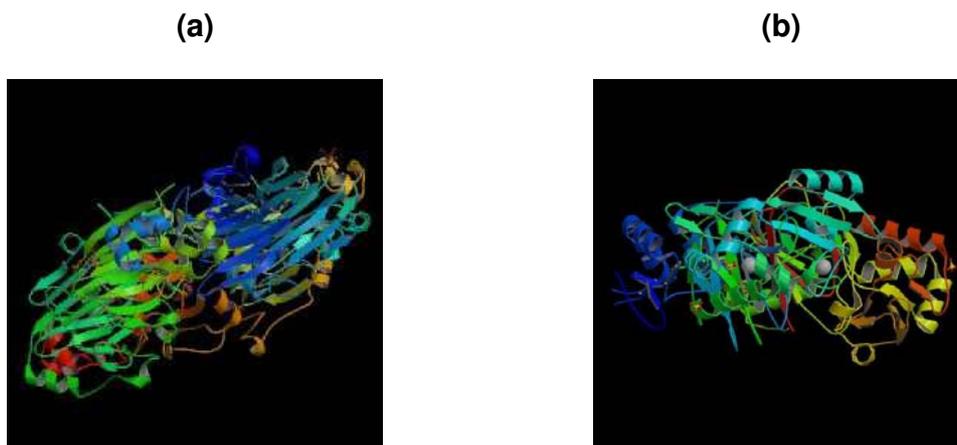


Figura 1.9. Estrutura tridimensional da proteína (a) β -conglycinin, β -chain (precursor) e (b) clavamate synthase-like protein At3g21360 [38].



Figura 1.10. Visão tridimensional dos spots da proteína *LEA protein*, para (a) soja transgênica e (b) soja não-transgênica.

A proteína *glycinin G4 (precursor)* é outra proteína de armazenamento da soja e possui uma seqüência sinalizadora, ou seja, uma seqüência de aminoácidos presente no N-terminal da proteína secretada, que é requerida para o transporte através da membrana celular [35].

A proteína *early nodulin 75 (precursor)* possui a função de participar nos estágios iniciais do desenvolvimento dos nódulos fixadores de nitrogênio da raiz de plantas leguminosas [35]. Esta proteína apresentou uma maior expressão na soja não-transgênica (volume normalizado = $0,39 \pm 0,01$) do que na soja transgênica (volume normalizado = $0,05 \pm 0,01$), conforme mostra a Figura 1.11.

Tal fato pode indicar que o desenvolvimento dos nódulos fixadores de nitrogênio na raiz da soja não-transgênica deve ser mais eficiente que na soja transgênica.



Figura 1.11. Visão tridimensional dos *spots* da proteína *early nodulin 75 (precursor)*, para (a) soja transgênica e (b) soja não-transgênica.

A proteína *clavamine synthase-like protein At3g21360* (EC 1.14.11.21) é uma proteína ligada a metal, ligando um íon de ferro por subunidade. Ela atua como oxidoreductase, ou seja, como uma enzima que catalisa a oxidação de um composto, promovendo a redução de outro [35]. Esta proteína possui a estrutura tridimensional definida [37], mostrada na Figura 1.9 (b).

As proteínas classificadas como precursoras consistem em proteínas inativas, que podem tornar-se ativas ao passarem por uma mudança pós-traducional. Estas proteínas geralmente são utilizadas por um organismo quando a proteína subsequente é potencialmente prejudicial, mas precisa estar disponível em um período curto e/ou em grandes quantidades [35].

5. CONCLUSÕES PARCIAIS

Neste Capítulo, foi otimizada a separação das proteínas de soja por meio da eletroforese bidimensional. No preparo da amostra prévio à separação por 2-D PAGE, o procedimento mais adequado foi aquele envolvendo a precipitação das proteínas com uma solução de acetato de amônio em metanol e a ressolubilização destas em um tampão contendo uréia e tiouréia, devido à extração de uma maior variedade de proteínas, conforme mostraram os géis 2-D PAGE obtidos. Para

melhorar a resolução do gel, uma massa de proteína de 300 µg foi aplicada, sendo esta a condição considerada otimizada.

A seguir, foi feita uma comparação entre os dois tipos de soja, transgênica e não-transgênica, em termos da expressão protéica. A partir da análise das imagens dos géis 2-D PAGE, foi possível verificar a presença de uma maior quantidade de *spots* de proteínas na soja transgênica, o que pode ser um resultado do processo de modificação genética. Observou-se, também, que alguns *spots* de proteínas apresentaram maiores volumes normalizados em um dos tipos de soja, mostrando que a expressão de algumas proteínas foi afetada pelo processo de modificação genética de maneira aleatória, sendo que em alguns casos as proteínas apresentam um aumento em sua expressão e, em outros casos, uma redução em sua expressão.

A reprodutibilidade dos géis de eletroforese para os dois tipos de amostra foi muito boa, com altas porcentagens de probabilidade de identidade. Comparando-se as imagens dos géis para a soja transgênica e não-transgênica, observou-se que, na faixa de pI entre 4 e 7, a porcentagem de probabilidade de identidade foi baixa, indicando diferenças mais significativas entre os dois tipos de soja neste conjunto de proteínas.

Após a comparação dos géis de eletroforese, foi feita a caracterização de 10 proteínas de soja por MALDI-TOF MS. Uma das proteínas identificadas, a *LEA protein*, atua em processos de resposta ao estresse. Esta proteína mostrou uma maior expressão na soja transgênica, o que pode ser uma evidência do estresse na planta, resultante do processo de modificação genética. Já a proteína *early nodulin 75 (precursor)*, que participa nos estágios iniciais do desenvolvimento dos nódulos fixadores de nitrogênio da raiz das plantas leguminosas, apresentou uma menor expressão na soja transgênica. Tal fato pode indicar que o desenvolvimento dos nódulos fixadores de nitrogênio na raiz da soja não-transgênica deve ser mais eficiente que na soja transgênica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] A. Achouri, J.I. Boye, D. Belanger, *Soybean isoflavones: Efficacy of extraction conditions and effect of food type on extractability*, **Food Res. Inter.** 38 (2005) 1199-1204.
- [2] R.W. Yaklich, *β -conglycinin and glycinin in high-protein soybean seeds*, **J. Agric. Food Chem.** 49 (2001) 729-735.
- [3] Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, <http://www.embrapa.br/>, acessado em 28 de novembro de 2005.
- [4] S. Natarajan, C. Xu, T.J. Caperna, W.M. Garrett, *Comparison of protein solubilization methods suitable for proteomic analysis of soybean seeds proteins*, **Anal. Biochem.** 342 (2005) 214-220.
- [5] R. Mujoo, D.T. Trinh, P.K.W. Ng, *Characterization of storage proteins in different soybean varieties and their relationship to tofu yield and texture*, **Food Chem.** 82 (2003) 265-273.
- [6] E. Gianazza, I. Eberini, A. Arnoldi, R. Wait, C.R. Sirtori, *A proteomic investigation of isolated soy proteins with variable effects in experimental and clinical studies*, **J. Nutr.** 133 (2003) 9-14.
- [7] V.H. Thanh, K. Shibasaki, *Major proteins of soybean seeds: subunit structure of β -conglycinin*, **J. Agric. Food Chem.** 26 (1978) 695-698.
- [8] R.S. Guerrante, **Transgênicos: uma visão estratégica**, Editora Interciência, Rio de Janeiro (2003).
- [9] Y. Kim, S.J. Choi, H. Lee, T.W. Moon, *Quantitation of CP4 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in soybean by two-dimensional gel electrophoresis*, **J. Microbiol. Biotechnol.** 16 (2006) 25-31.
- [10] M.C. McCann, K. Liu, W.A. Trujillo, R.C. Dobert, *Glyphosate-tolerant soybeans remain compositionally equivalent to conventional soybeans (*Glycine max* L.) during three years of field testing*, **J. Agric. Food Chem.** 53 (2005) 5331-5335.
- [11] C.F.B. Coutinho, L.H. Mazo, *Complexos metálicos com o herbicida glifosato: revisão*, **Quím. Nova** 28 (2005) 1038-1045.
- [12] A.L. Cerdeira, S.O. Duke, *The current status and environmental impacts of glyphosate-resistant crops: a review*, **J. Environ. Qual.** 35 (2006) 1633-1658.
- [13] J.G. da Silva Jr., **Eletroforese de proteínas: guia teórico-prático**, Editora Interciência, Rio de Janeiro (2001).

- [14] M. Melvin, **Electrophoresis**, John Wiley & Sons, London (1987).
- [15] R.A. Copeland, **Methods for Protein Analysis**, Chapman & Hall, New York (1994).
- [16] D. Voet, J.G. Voet, C.W. Pratt, **Fundamentos de Bioquímica**, Artmed Editora, Porto Alegre (2000).
- [17] J.S. Garcia, C.S. Magalhães, M.A.Z. Arruda, *Trends in metal-binding and metalloprotein analysis*, **Talanta** 69 (2006) 1-15.
- [18] T. Berkelman, T. Stenstedt, **2-D Electrophoresis: Principles and Methods**, Amershan Biosciences, Uppsala (1998).
- [19] A. Görg, W. Weiss, M.J. Dunn, *Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics*, **Proteomics** 4 (2004) 3665-3685.
- [20] M.A.Z. Arruda (editor), **Trends in sample preparation**, cap. IX, Nova Science Publishers, New York, no prelo.
- [21] M.M. Shaw, B.M. Riederer, *Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis*, **Proteomics** 3 (2003) 1408-1417.
- [22] R.P. Newton, A.G. Brenton, C.J. Smith, E. Dudley, *Plant proteome analysis by mass spectrometry: principles, problems, pitfalls and recent developments*, **Phytochemistry** 65 (2004) 1449-1485.
- [23] T.A. Nyman, *The role of mass spectrometry in proteome studies*, **Biomol. Eng.** 18 (2001) 221-227.
- [24] M. Kinter, N.E. Sherman, **Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry**, John Wiley & Sons, New York (2000).
- [25] S. Ryu, J. Park, I. Lee, *Purification and characterization of a copper-binding protein from Asian Periwinkle Littorina brevicula*, **Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.** 134 (2003) 101-107.
- [26] S.S. Natarajan, C. Xu, H. Bae, T.J. Caperna, W.M. Garrett, *Characterization of storage proteins in wild (Glycine soja) and cultivated (Glycine max) soybean seeds using proteomic analysis*, **J. Agric. Food Chem.** 54 (2006) 3114-3120.
- [27] A. Sussulini, J.S. Garcia, M.F. Mesko, D.P. Moraes, E.M.M. Flores, C.A. Perez, M.A.Z. Arruda, *Evaluation of soybean seed protein extraction focusing metalloprotein analysis*, **Microchim. Acta**, no prelo.

- [28] M.M. Bradford, *Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of proteins utilizing principle of protein-dye binding*, **Anal. Biochem.** 72 (1976) 248-254.
- [29] G. Candiano, M. Bruschi, L. Musante, L. Santucci, G.M. Ghiggeri, B. Carnemolla, P. Orecchia, L. Zardi, P.G. Righetti, *Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis*, **Electrophoresis** 25 (2004) 1327-1333.
- [30] S. Compton, C.G. Jones, *Mechanism of dye response and interference in the Bradford Protein Assay*, **Anal. Biochem.** 151 (1985) 369-374.
- [31] A.C. Lucarini, B.V. Kilikian, *Comparative study of Lowry and Bradford methods: interfering substances*, **Biotechnol. Tech.** 13 (1999) 149-154.
- [32] M. Marques, GE Healthcare, comunicação pessoal (2006).
- [33] *The Institute for Genome Research*, disponível em <http://www.tigr.org>, acessado em 12 de janeiro (2007).
- [34] *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>, acessado em 12 de janeiro (2007).
- [35] *ExpASY Proteomics Server*, disponível em <http://www.expasy.org>, acessado em 12 de janeiro (2007).
- [36] N. Maruyama, M. Adachi, K. Takahashi, K. Yagasaki, M. Kohno, Y. Takenaka, E. Okuda, S. Nakagawa, B. Mikami, S. Utsumi, *Crystal structures of recombinant and native soybean β -conglycinin β homotrimers*, **Eur. J. Biochem.** 268 (2001) 3595-3604.
- [37] E. Bitto, C.A. Bingman, S.T.M. Allard, G.E. Wesenberg, D.J. Aceti, R.L. Wrobel, R.O. Frederick, H. Sreenath, F.C. Vojtik, W.B. Jeon, C.S. Newman, J. Primm, M.R. Sussman, B.G. Fox, J.L. Markley, G.N. Phillips Jr, *The structure at 2.4 Å resolution of the protein from gene locus At3g21360, a putative Fc1/2-oxoglutarate-dependent enzyme from *Arabidopsis thaliana**, **Acta Cryst.** 61 (2005) 469-472.
- [38] *RCSB Protein Data Bank*, disponível em <http://www.pdb.org>, acessado em 16 de janeiro (2007).

CAPÍTULO 2

ESTUDOS COMPARATIVOS DE METALOPROTEÍNAS DE SOJA TRANSGÊNICA E NÃO-TRANSGÊNICA

1. OBJETIVOS

O objetivo deste Capítulo consiste na realização de estudos metaloproteômicos comparativos para os dois tipos de soja avaliados. Para isso, alguns *spots* protéicos foram mapeados por SR-XRF e os íons metálicos presentes foram identificados. A seguir, foi feita a otimização do procedimento de decomposição dos *spots* de proteínas e este foi aplicado previamente à quantificação dos íons metálicos nas proteínas por espectrometria de absorção atômica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica referente a este Capítulo aborda uma descrição sobre as metaloproteínas e proteínas ligadas a metais, bem como sobre o estudo das mesmas na área da metalômica. A seguir, são descritas as técnicas analíticas utilizadas na identificação e quantificação das espécies metálicas ligadas às proteínas, além dos métodos de decomposição de amostras.

2.1. Metaloproteínas e proteínas ligadas a metais

As metaloproteínas constituem o grupo de proteínas que contêm um cofator metálico, incorporado por meio de ligações específicas. Este cofator pode ser um íon metálico isolado ou pode estar coordenado a um composto orgânico não-protéico. Já as proteínas ligadas a metais constituem o grupo de proteínas onde os íons metálicos são incorporados por ligações não-específicas, que são facilmente perdidas durante o manuseio da amostra (isolamento e diluição) ou, então, durante a separação eletroforética, sob a influência de um campo elétrico [1-3].

As metaloproteínas e as proteínas ligadas a metais apresentam um papel importante na fisiologia, exercendo diferentes funções, tais como a regulação da homeostase de íons metálicos, a desintoxicação, a participação em imuno-

reações não-específicas, o transporte e o armazenamento de oxigênio e a regulação da expressão genética. Além disso, muitas dessas proteínas atuam como marcadores de patologias no sangue humano, tais como a mioglobina, que é relacionada ao infarto do miocárdio, ou a hemoglobina e a transferrina, que são relacionadas à anemia [4].

Devido à importância destas biomoléculas, recentemente, uma nova área científica, denominada metalômica, foi proposta por Haraguchi [5]. Esta área envolve a integração de estudos tradicionalmente analíticos com estudos inorgânicos e bioquímicos [6]. Uma discussão mais aprofundada sobre este tema será apresentada a seguir.

2.2. Metalômica

A metalômica é um campo de pesquisa que deve estar em simbiose com a genômica e a proteômica, pois a síntese e as funções metabólicas dos genes e das proteínas não ocorrem sem a presença de íons metálicos ou metaloenzimas, que são metaloproteínas que atuam como catalisadores biológicos na regulação das reações biológicas e das funções fisiológicas em células e órgãos [5].

A proteômica envolve o estudo das propriedades das proteínas, tais como o nível de expressão, as modificações pós-translacionais e as interações, em uma ampla escala, de modo a obter uma visão global dos processos celulares [7]. Já a metalômica, tem como principais objetivos a verificação da distribuição das espécies metálicas e metalóides, bem como a elucidação dos aspectos fisiológicos e funcionais das biomoléculas que contenham íons metálicos em suas estruturas, tais como as metaloproteínas e as proteínas ligadas a metais [5]. Na metalômica, o íon metálico ou as espécies metalóides presentes em um sistema biológico (células, tecidos, fluidos ou organismos), na forma livre ou complexada, são definidos como metalomas [8].

Uma vez que a identificação dos metalomas e a elucidação de suas funções bioquímicas ou fisiológicas nos sistemas biológicos são os principais alvos das pesquisas em metalômica, a especificação química para a identificação

específica de metalomas bioativos é uma das mais importantes tecnologias analíticas para estabelecer a metalômica como uma ciência integrada dos biometais [5].

O estudo de um metaloma pode fornecer informações sobre: (i) como um elemento (espécie metálica ou metalóide) está distribuído entre os compartimentos celulares de um determinado tipo de célula; (ii) seu meio de coordenação (em qual biomolécula está incorporado ou a qual bioligante está complexado); (iii) as concentrações das espécies metálicas individuais presentes e (iv) a estrutura da biomolécula [5,8,9].

A informação metalômica pode ser classificada, de acordo com seu objetivo específico, de três maneiras: (i) *metalômica qualitativa*, que consiste na identificação das espécies metálicas individuais; (ii) *metalômica quantitativa*, que consiste na determinação das concentrações destas espécies; e (iii) *metalômica comparativa*, que consiste no monitoramento das alterações do metaloma de um determinado organismo, sob a influência de um estímulo externo [8].

Mais especificamente, quando as espécies metálicas ou metalóides estão complexadas a ligantes protéicos, o estudo destas biomoléculas é denominado metaloproteômica [8].

A abordagem analítica para os estudos metalômicos inclui três componentes principais: (i) uma técnica de separação, que contribui para o isolamento das espécies-alvo da matriz, chamada componente de seletividade; (ii) um detector específico para moléculas, visando sua caracterização, chamado componente estrutural, e (iii) um detector sensível para a quantificação dos elementos, chamado componente de sensibilidade [9].

Uma das componentes de sensibilidade utilizada neste trabalho, a SR-XRF, será descrita no tópico seguinte. A seguir, as técnicas de espectrometria de absorção atômica, também utilizadas como componente de sensibilidade, serão também descritas.

2.3. Fluorescência de raios-X com radiação síncrotron

A espectrometria de fluorescência de raios-X é uma técnica não destrutiva, na qual o preparo da amostra prévio à análise é simples e rápido. Esta técnica é multielementar, sendo capaz de identificar os elementos com números atômicos maiores que o do oxigênio. Os elementos da amostra são excitados pela absorção de um feixe primário de raios-X e, então, emitem linhas características de fluorescência [10].

Quando são necessárias maiores sensibilidade e resolução para a identificação dos elementos, emprega-se a SR-XRF. A radiação síncrotron, como fonte de raios-X, apresenta uma alta intensidade (10^3 a 10^6 vezes mais intensa que as fontes convencionais), é altamente colimada e linearmente polarizada no plano orbital do elétron. Esta técnica permite atingir limites de detecção absolutos da ordem de 10^{-15} g e limites de detecção relativos com valores menores do que 10 ng g^{-1} , em amostras contendo apenas alguns microgramas dos elementos a serem identificados [3,11].

Existem poucos trabalhos na literatura que fazem o uso da SR-XRF como técnica de detecção após a separação eletroforética de proteínas [3]. Uma aplicação desta técnica na análise de íons metálicos em proteínas é o trabalho desenvolvido por Gao *et al.* [12]. Neste estudo, foi feita a separação e a detecção de metaloproteínas de citosol de fígado humano para a determinação de ferro, cobre e zinco. O procedimento adotado incluía a separação das proteínas por cromatografia de filtração em gel e também por IEF.

Em um trabalho mais recente dos mesmos autores [1], a SR-XRF também foi empregada na análise de proteínas de citosol de fígado humano, porém, neste estudo, as proteínas foram separadas por SDS-PAGE, sendo que o gel obtido foi imediatamente seco após a corrida eletroforética. Com o uso desta metodologia, foi possível distinguir 35 bandas de proteínas, além da identificação e comparação da distribuição dos íons Cu^{2+} , Fe^{2+} e Zn^{2+} em várias metaloproteínas.

Kühbacher *et al.* [13] utilizaram a SR-XRF na determinação da distribuição de selênio em proteínas de testículos de ratos, previamente separadas por SDS-

PAGE e transferidas para uma membrana pelo processo de *blotting*. Neste trabalho, os autores utilizaram a mesma técnica para determinar a distribuição espacial de alguns íons metálicos em seções cerebrais de ratos infectados com *scrapie*, que é uma doença neurodegenerativa. Este método mostrou-se bastante adequado para a determinação dos padrões de distribuição de elementos em baixas concentrações em proteínas separadas por eletroforese e em preparações histológicas de tecidos.

Verbi *et al.* [14] fizeram o mapeamento de proteínas provenientes de calos embriogênicos de *Citrus*, previamente separadas por SDS-PAGE, utilizando a microfluorescência de raios-X com fonte de radiação síncrotron. A quantificação dos íons metálicos Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , K^+ e Zn^{2+} foi realizada empregando-se a SR-TXRF, dos íons metálicos Mg^{2+} e Ca^{2+} empregando-se a FAAS e de Na^+ empregando-se a FAES. As análises qualitativa e quantitativa mostraram concordância entre os resultados, sendo que o Fe^{2+} e o Mg^{2+} foram detectados em apenas duas bandas de proteínas, indicando que estes íons metálicos devem ter um papel importante em processos bioquímicos, nos quais estas proteínas participam.

2.4. Técnicas de espectrometria de absorção atômica para a quantificação de íons metálicos

A espectrometria de absorção atômica é utilizada na determinação qualitativa e quantitativa de cerca de 70 elementos químicos. Os métodos atômicos são amplamente empregados na determinação de íons metálicos presentes em amostras biológicas, pelo fato de apresentarem boas detectabilidades (na faixa de mg L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$), serem rápidos, possuírem alta seletividade e custos de instrumentação relativamente baixos [10].

A determinação espectrométrica de espécies atômicas somente pode ser efetuada em meio gasoso, no qual os átomos individuais encontram-se bem separados uns dos outros. Assim sendo, a etapa principal e mais crítica dos procedimentos de espectrometria atômica é a atomização, que é o processo no

qual a amostra é volatilizada e decomposta, de modo a produzir um gás atômico. A eficiência e reprodutibilidade da etapa de atomização determinam a sensibilidade, a precisão e a exatidão do método analítico [3,10].

A espectrometria de absorção atômica com chama é a técnica de espectrometria atômica mais utilizada em análises de rotina, devido à sua simplicidade, boa frequência analítica e baixo custo relativo [10].

Na FAAS, o analito em meio aquoso é convertido em uma névoa que é carregada até a chama por um oxidante gasoso ou um fluxo redutor. Na chama, o solvente presente na amostra é evaporado e as partículas sólidas resultantes são transformadas em átomos gasosos e íons elementares [3]. A limitação desta técnica se refere aos limites de detecção, que são da ordem de mg L^{-1} [10].

A espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica é uma técnica mais sensível que a FAAS (com limites de detecção da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$), pelo fato de que a amostra é completamente atomizada, de modo que a população de átomos no caminho óptico é maior do que na FAAS, onde somente uma pequena quantidade da amostra inserida no equipamento é atomizada [10].

Nos atomizadores eletrotérmicos, poucos microlitros da amostra são primeiramente evaporados a uma baixa temperatura (etapa de secagem) e, então, pirolisados a uma temperatura mais alta, em um forno de grafite eletricamente aquecido (etapa de pirólise). A etapa de pirólise tem o objetivo de destruir a matriz da amostra, o que torna a técnica de ETAAS mais seletiva. Após esta etapa, a corrente é rapidamente aumentada a várias centenas de ampères, o que faz com que a temperatura atinja entre 2000 e 3000 °C, ocorrendo a etapa de atomização da amostra. A absorção do analito atomizado é monitorada na região imediatamente acima da superfície aquecida [10].

São encontrados na literatura recente, alguns trabalhos relacionados com a determinação de íons metálicos por espectrometria de absorção atômica em proteínas.

Magalhães e Arruda [15] utilizaram a ETAAS para quantificar cromo, ferro e manganês em bandas de proteínas de castanha da Índia (*Aescullus hippocastanum* L.) *in natura*, obtidas por meio da separação por SDS-PAGE.

Neste trabalho, 11 diferentes procedimentos para a extração de metaloproteínas foram testados e os íons metálicos presentes nas bandas de proteínas foram mapeados por SR-XRF, previamente à quantificação por ETAAS. Os resultados obtidos mostraram que houve concordância entre a identificação e a quantificação dos íons metálicos, bem como uma grande influência do procedimento de extração das proteínas na preservação da ligação metal-proteína.

Schilling *et al.* [16] utilizaram a FAAS e a TXRF para determinar o conteúdo de íons metálicos na enzima *murine glutaminyl cyclase* (mQC, EC 2.3.2.5). Esta análise indicou que quantidades estequiométricas de Zn^{2+} ligam-se a esta proteína e a depleção do íon metálico não mostrou alterações na estrutura da proteína, sugerindo que o zinco possui um papel catalítico. Os resultados deste estudo demonstraram que a mQC e provavelmente todas as *glutaminyl cyclases* animais, são enzimas dependentes de zinco.

2.5. Decomposição de amostras em sistema fechado com aquecimento por radiação microonda

Nas técnicas de espectrometria de absorção atômica, descritas no item anterior, a amostra, em geral, deve estar na forma líquida, de modo que ela seja introduzida no espectrômetro por meio da nebulização (FAAS) ou da vaporização eletrotérmica (ETAAS). Para que a determinação de íons metálicos em proteínas contidas em géis de poliacrilamida seja realizada por tais técnicas, é necessário efetuar a decomposição das amostras.

A decomposição em sistema fechado com aquecimento por radiação microonda destaca-se dentre os métodos de decomposição de amostras sólidas devido ao fato de requerer quantidades reduzidas de reagentes, ser executado em um tempo menor, evitar a perda de espécies voláteis e minimizar problemas de contaminação, quando comparada a procedimentos que utilizam o aquecimento convencional [17,18].

O aquecimento por radiação microonda ocorre quando um material não transparente a este tipo de radiação a absorve, por meio da interação da radiação

eletromagnética com os íons dissolvidos e com o solvente, provocando a migração iônica e a rotação de dipolos. Estes dois processos, que ocorrem quando as microondas interagem com a solução de um ácido utilizado na decomposição da amostra, resulta em um movimento molecular no material, o que também contribui para o aquecimento do mesmo [17,18].

O uso de frascos fechados para decomposições empregando radiação microonda é indicado para amostras de difícil decomposição, pois o aquecimento causa um aumento na pressão devido à evaporação dos ácidos empregados e à produção de gases durante o processo. Este aumento de pressão é benéfico pelo fato de aumentar o ponto de ebulição destes ácidos e, conseqüentemente, a capacidade de destruição da matriz da amostra [17].

Atualmente, os métodos analíticos para a análise de elementos em baixas concentrações requerem: (i) o emprego de pequenas quantidades de reagentes; (ii) que a relação entre a superfície do frasco de decomposição e a da amostra seja a menor possível; (iii) que materiais inertes sejam empregados como recipientes; (iv) a facilidade de processamento de grande número de amostras e (v) a miniaturização [17].

Se todas as etapas do processo analítico, desde a coleta da amostra, pudessem ser feitas no mesmo recipiente, os riscos de perdas e contaminação seriam minimizados. Baseado neste princípio do “frasco único” [19], o uso de mini-frascos na decomposição de amostras foi proposto.

2.5.1. Uso de mini-frascos

O emprego de mini-frascos de PP é altamente adequado para a decomposição por via úmida de amostras biológicas devido à capacidade de decompor um grande número de amostras, de maneira simples e com pequeno consumo de reagentes (da ordem de microlitros), e à mínima diluição da amostra, de modo que elementos presentes em baixas concentrações neste tipo de amostra possam ser detectados [17].

Os mini-frascos de PP são pequenos e descartáveis, tornando seu uso apropriado para análises de rotina, e são usados em algumas operações básicas do preparo de amostra, tais como a pesagem, a decomposição e a diluição para um volume adequado [17,20]. Estes frascos são mantidos fechados durante o procedimento de decomposição da amostra, sendo que isto minimiza eventuais erros, tais como as perdas por volatilização e a contaminação da amostra, que ocorrem quando frascos abertos são usados nas etapas mencionadas anteriormente, atingindo um melhor rendimento no tratamento da amostra [20].

Na literatura, são encontrados alguns trabalhos envolvendo o uso de mini-frascos na decomposição de amostras de origem biológica. Flores *et al.* fizeram a decomposição de amostras de cabelo humano para a posterior determinação de arsênio [20] e selênio [21] por HG-AAS. No caso da determinação de arsênio [20], o procedimento envolveu a oxidação da amostra com os ácidos sulfúrico e nítrico em combinação com o ácido clorídrico, em uma etapa específica do programa de aquecimento por radiação microonda. As amostras decompostas foram tratadas com ácido sulfâmico antes da diluição e as determinações por HG-AAS foram feitas usando-se a L-cisteína como pré-redutor para arsênio. As recuperações foram quantitativas (melhores que 98,6%) para alguns compostos de arsênio e uma exatidão de mais de 98% foi observada quando se comparou com os resultados da análise de cabelos certificados de referência. Na determinação de selênio [21], o procedimento envolveu o tratamento da amostra com misturas de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio e de ácidos sulfúrico e nítrico. Antes da realização das medidas por HG-AAS, as amostras decompostas foram tratadas com ácido sulfâmico. A exatidão foi estimada com a análise de amostras de cabelo certificadas, que forneceu uma concordância maior de 97%, por meio de testes de recuperação. O limite de detecção absoluto foi de 1,2 ng, o que correspondia a $0,12 \mu\text{g g}^{-1}$ na amostra seca.

Brancalion e Arruda [22] desenvolveram um sistema para a decomposição de plantas medicinais usando mini-frascos. A amostra foi tratada com uma mistura de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio e o carbono residual medido após a decomposição da mesma encontrou-se na faixa de 0,30 a 0,45%. Após a

decomposição, foi feita a determinação de cádmio em três amostras de plantas medicinais (*Equisetum arvense*, *Maytenus ilicifolia* e *Phyllanthus niruri*), empregando a TSFFAAS. A exatidão do método foi verificada utilizando-se materiais certificados de referência e também a decomposição das amostras assistida por radiação microonda empregando frascos convencionais.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Equipamentos e acessórios

- Autobalança, modelo AD6 (Perkin-Elmer, Norwalk, EUA)
- Analisador elementar CHN, modelo PE2400 (Perkin-Elmer, Norwalk, EUA)
- Chapa aquecedora, modelo M249 (Marconi, Piracicaba, Brasil)
- Destilador sub-ebulição de quartzo (Marconi, Piracicaba, Brasil)
- Espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica, modelo AAnalyst 600, equipado com corretor Zeeman longitudinal e auto-amostrador modelo AS-800 (Perkin-Elmer, Norwalk, EUA)
- Espectrômetro de absorção atômica com chama, modelo AAnalyst 300 (Perkin-Elmer, Norwalk, EUA)
- Estufa (Quimis, Diadema, Brasil)
- Forno de microondas tipo cavidade, modelo DGT100 Plus (Provecto Analítica, Jundiaí, Brasil)
- Lâmpadas de cátodo oco de cálcio, cobre e ferro (Perkin-Elmer, Norwalk, EUA)
- Sistema de purificação Milli-Q, modelo QuantumTM cartridge (Millipore, Molsheim, França)
- Vidrarias de uso rotineiro em laboratório de química analítica e gases para espectrometria atômica

3.2. Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água desionizada (18,2 MΩ cm), obtida por um sistema de purificação Milli-Q, e reagentes de grau analítico. Os frascos plásticos, vidrarias e demais utensílios de laboratório foram descontaminados por meio de imersão em ácido clorídrico 10% (v/v), por 12 horas. Depois, o material foi lavado três vezes com água Milli-Q e seco a temperatura ambiente. A seguir, é apresentada a lista completa dos reagentes utilizados nesta etapa:

- Ácido nítrico, HNO_3 , $M = 63,01 \text{ g mol}^{-1}$ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA)
- Nitrato de magnésio, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, $M = 256,41 \text{ g mol}^{-1}$ (Mallinckrodt, Xalostoc, México)
- Óxido de lantânio, La_2O_3 , $M = 325,80 \text{ g mol}^{-1}$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA)
- Peróxido de hidrogênio 30% (v/v), H_2O_2 , $M = 34,01 \text{ g mol}^{-1}$ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA)
- Soluções padrão de cálcio, cobre e ferro a 1000 mg L^{-1} (Tec-Lab, Indaiatuba, Brasil)

3.3. Mapeamento dos *spots* por SR-XRF

O mapeamento dos *spots* de proteínas foi efetuado na linha de fluorescência de raios-X com radiação síncrotron, disponível no LNLS, localizado na cidade de Campinas/SP.

Os *spots* de proteínas foram previamente retirados do gel com o auxílio de um bisturi, secos em estufa a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ por cerca de 5 h (até massa constante) e, para a realização das medidas, foram fixados em uma plataforma de alumínio, usando fita adesiva. Na linha de fluorescência de raios-X, um sistema de fendas, controlado por computador, foi utilizado para colimar o feixe branco, de forma a se obter um feixe de $200 \times 200 \text{ }\mu\text{m}$. Durante os experimentos, foram utilizadas folhas

de alumínio para reduzir a energia de alguns componentes dos raios-X incidentes na amostra. O detector utilizado para coletar o sinal de radiação proveniente da amostra foi de germânio ultrapuro. Após serem estabelecidas as condições de análise, o mapeamento foi realizado irradiando-se a banda por 200 s em um único ponto. Os espectros coletados foram processados por meio do programa AXIL [23], que permite corrigir a variação da intensidade do feixe da radiação síncrotron fazendo-se a normalização da área dos picos das espécies químicas detectadas pela contagem do pico de argônio.

3.4. Decomposição dos *spots* protéicos em mini-frascos assistida por radiação microonda

O procedimento de decomposição em mini-frascos assistida por radiação microonda dos *spots* protéicos foi otimizado [24]. Primeiramente, os *spots* foram retirados do gel de eletroforese bidimensional com o auxílio de um bisturi e secos em estufa a 40 °C, até massa constante. Cada *spot* seco foi pesado em uma autobalança, colocado em um mini-frasco de PP e, por fim, foram adicionados 200 µL de ácido nítrico concentrado subdestilado e 150 µL de peróxido de hidrogênio 30% (v/v). Os mini-frascos foram mantidos abertos e deixou-se um tempo de pré-reação de 20 min. Após este tempo, os mini-frascos foram fechados e dispostos em um suporte de PTFE, sendo que cada suporte tem a capacidade para alocar quatro mini-frascos. Cada suporte de PTFE foi, então, colocado dentro de um frasco do forno de microonda contendo 15 mL de água desionizada, de modo a manter uma pressão equilibrada no sistema. A seguir, todo o conjunto foi aquecido no forno com radiação microonda. Após a decomposição, os volumes dos mini-frascos foram ajustados a 1,0 mL com água desionizada. O carbono residual foi determinado em um analisador elementar após a decomposição das amostras, de modo a avaliar a eficiência da decomposição.

3.5. Quantificação de cobre e ferro por ETAAS

Um espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica foi utilizado nas determinações de cobre e ferro. Uma lâmpada de cátodo oco de cobre ($\lambda = 324,8$ nm, abertura de fenda de 0,7 nm) e modificador químico de matriz contendo 0,015 mg de nitrato de magnésio foram utilizados na determinação de cobre. A curva analítica de calibração foi estabelecida na faixa de 5,0 a 25,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e as temperaturas de pirólise e atomização foram de 1200 e 2000 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Uma lâmpada de cátodo oco de ferro ($\lambda = 248,3$ nm, abertura de fenda de 0,2 nm) foi utilizada na determinação de ferro. A curva analítica de calibração foi estabelecida na faixa de 5,0 a 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e as temperaturas de pirólise e atomização foram de 1400 e 2100 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Na Tabela 2.1, são mostrados os programas de aquecimento do forno de grafite para cobre e ferro.

Tabela 2.1. Programas de aquecimento do forno de grafite para cobre e ferro

Etapa	Temperatura / $^{\circ}\text{C}$		Rampa / s		Tempo de permanência / s		Fluxo de Ar / mL min^{-1}	
	Cu	Fe	Cu	Fe	Cu	Fe	Cu	Fe
1	110	110	1	1	30	30	250	250
2	130	130	15	15	30	30	250	250
3	1200	1400	10	10	20	20	250	250
4	2000	2100	0	0	5	5	0	0
5	2400	2450	1	1	3	3	250	250

3.6. Quantificação de cálcio por FAAS

Um espectrômetro de absorção atômica com chama foi utilizado na determinação de cálcio. Nos experimentos, foi usada chama de acetileno/ar em proporção 3: 10. Uma lâmpada de cátodo oco de cálcio ($\lambda = 422$ nm, abertura de fenda de 0,7 nm) foi empregada como fonte de radiação primária. Foi adicionado

lantânio (na forma de La_2O_3) 1% (m/v) às soluções de referência e às amostras, antes das determinações. A curva analítica de calibração foi estabelecida na faixa de 0,5 a 5,0 mg L^{-1} .

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Mapeamento dos *spots* por SR-XRF

De modo a avaliar qualitativamente a presença de íons metálicos em proteínas de soja transgênica e não-transgênica, alguns *spots* de proteínas foram submetidos à análise por SR-XRF. Na Figura 2.1, é mostrada a localização dos *spots* protéicos, que foram analisados com esta finalidade.

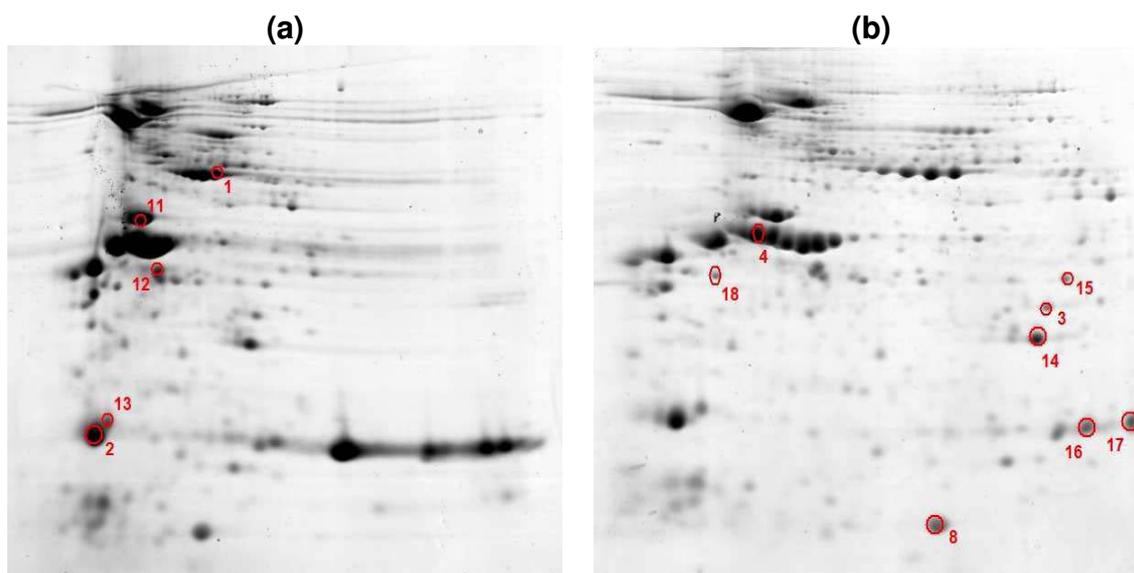


Figura 2.1. Eletroferogramas 2-D PAGE para 300 μg de proteínas de semente de soja não-transgênica: (a) em faixa de pI entre 3 e 10 e (b) em faixa de pI entre 4 e 7. Os *spots* marcados foram analisados por SR-XRF.

A Figura 2.2 mostra os espectros obtidos para um *spot* de proteína (*spot* 15, Figura 2.1), antes e após o processo de secagem e para o branco analítico. Vale ressaltar que o branco analítico foi escolhido como sendo uma região do gel onde não havia *spots* protéicos e que os espectros mostrados para a amostra são

resultados de uma subtração do espectro do branco analítico. De acordo com esta Figura, é possível notar que, em todos os espectros, ocorre o aparecimento de fundos contínuos intensos. Tais fundos devem-se, principalmente, ao espalhamento Compton dos raios-X incidentes sobre a matriz do gel, o qual pode mascarar os sinais de alguns elementos de interesse [1].

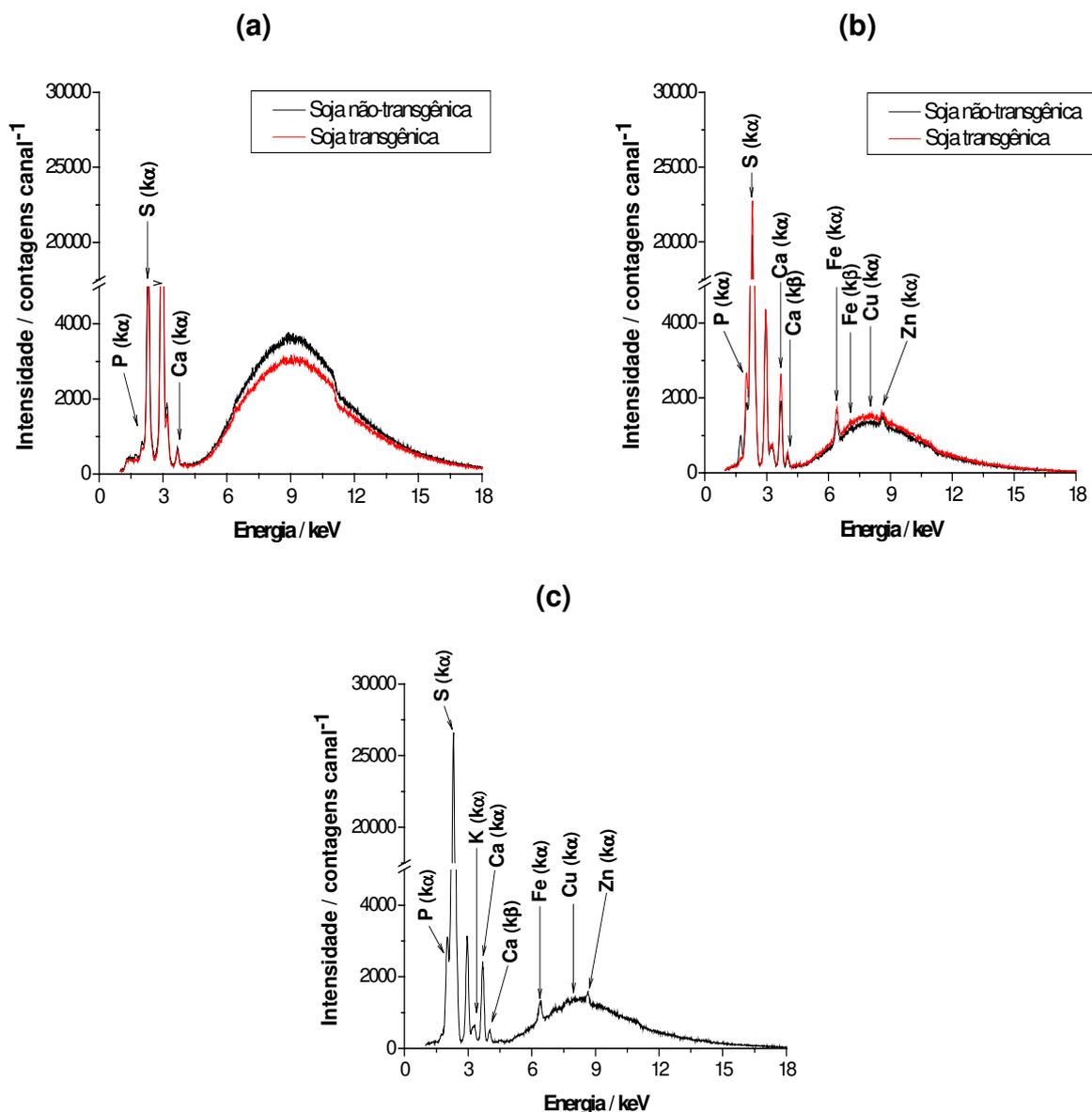


Figura 2.2. Espectros de SR-XRF para: (a) *spot* 15, antes do processo de secagem, (b) *spot* 15, após o processo de secagem e (c) branco analítico (seco). Os picos em 2,9 e 3,2 keV referem-se ao Ar (k α) e ao Ar (k β), respectivamente.

Na Tabela 2.2, são mostrados os resultados obtidos no mapeamento dos *spots* selecionados, sendo que o sinal (+) ao lado de alguns metais significa que a intensidade observada neste caso foi maior. Os íons metálicos identificados nos *spots* de proteínas foram Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} e Zn^{2+} , que são íons metálicos comumente encontrados ligados a proteínas ou mesmo como parte da estrutura das mesmas [1,27].

A partir destes resultados, notou-se que a maioria das proteínas de soja transgênica avaliada apresentou um número de íons metálicos identificados maior do que nas proteínas de soja não-transgênica (*spots* 11, 12, 15, 16 e 18). Com relação à presença dos íons metálicos identificados em comum entre as amostras, observou-se uma tendência do cálcio estar mais presente na soja não-transgênica (*spots* 13 e 17). Esta mesma tendência foi observada na soja transgênica para o cobre (*spots* 12 e 15) e para o zinco (*spot* 15). Entretanto, para o ferro, houve um comportamento aleatório com relação à sua presença nos diferentes tipos de soja.

Na Tabela 2.2, encontram-se também as identidades de algumas proteínas, obtidas pela análise por MALDI-TOF MS (vide item 4.3 do Capítulo 1) ou por inferência, por meio de uma busca no banco de dados de proteínas [28] baseada no ponto isoelétrico e massa molar das proteínas, de modo a relacioná-las com os íons metálicos identificados nas mesmas.

De acordo com as informações obtidas pelo banco de dados do *ExPASy Proteomics Server* [28], as proteínas caracterizadas por MALDI-TOF MS não contêm íons metálicos ligados, o que, no caso das proteínas correspondentes aos *spots* 2 e 3, concorda com os resultados obtidos por SR-XRF. Entretanto, na proteína *β -conglycinin, β -chain (precursor)* foi detectada a presença de ferro nos dois tipos de soja avaliados, na proteína *glycinin G4 (precursor)* foi detectada a presença de ferro na soja não-transgênica e na proteína *glycinin G2 (precursor)* foram identificados os íons metálicos cálcio e ferro na soja não-transgênica.

Pelas informações obtidas a respeito da estrutura tridimensional da proteína *β -conglycinin, β -chain (precursor)* [29], ela é classificada como uma proteína ligante de açúcares. Assim sendo, é possível estabelecer uma hipótese de que o

açúcar ligado a esta proteína pode ser um complexo do tipo carboidrato-ferro [30], justificando a provável presença de ferro detectada nesta proteína.

As estruturas tridimensionais das proteínas *glycinin G2 (precursor)* e *glycinin G4 (precursor)* ainda não foram estabelecidas, de acordo com as informações disponíveis na literatura. Assim sendo, a possibilidade destas proteínas ligarem-se ao cálcio e/ou ao ferro poderá vir a ser um objeto de estudo, caso seja confirmada a presença destes íons metálicos por meio da quantificação por espectrometria de absorção atômica.

Tabela 2.2. Identificação dos íons metálicos presentes nas proteínas de soja transgênica e não-transgênica

Spot [Identidade da proteína]	Soja transgênica	Soja não-transgênica
1 [<i>β-conglycinin, β-chain (precursor)</i>] ^a	Fe (+)	Fe
2 [<i>Trypsin inhibitor subtype A</i>] ^a	Nenhum	Nenhum
3 [<i>LEA protein</i>] ^a	Nenhum	Nenhum
4 [<i>Glycinin G2 (precursor)</i>] ^a	Nenhum	Ca, Fe
8 [<i>Glycinin G4 (precursor)</i>] ^a	Nenhum	Fe
11 [não identificada]	Ca, Cu, Fe	Cu (+), Fe (+)
12 [<i>Cytochrome c oxidase polypeptide II</i>] ^b	Ca, Cu (+)	Cu
13 [<i>Calmodulin-2</i>] ^b	Ca, Fe	Ca (+), Mn, Fe (+), Ni
14 [não identificada]	Nenhum	Nenhum
15 [<i>Chalcone synthase 2</i>] ^b	Ca (+), Cu (+), Fe (+), Zn (+)	Ca, Cu, Fe, Zn
16 [não identificada]	Fe	Nenhum
17 [não identificada]	Ca	Ca (+), Fe
18 [não identificada]	Ca	Nenhum

^a Identificada por MALDI-TOF MS; ^b Identificada pelo banco de dados de proteínas

As proteínas cujas identidades foram inferidas, a *cytochrome c oxidase polypeptide II* (identificação no ExPASy P05491, EC 1.9.3.1), a *calmodulin-2* (identificação no ExPASy P62163) e a *chalcone synthase 2* (identificação no ExPASy P17957, EC 2.3.1.74) não possuem as estruturas tridimensionais definidas. No banco de dados, são encontradas as informações que a *cytochrome c oxidase polypeptide II* é uma proteína ligada a cobre e a *calmodulin-2* é uma proteína ligada a cálcio [28], o que concorda com os resultados obtidos pela análise qualitativa. Para a proteína *chalcone synthase 2*, não estão disponíveis informações acerca da presença de metais ligados, entretanto, pelo fato desta proteína possuir uma atividade catalítica (transferase), é possível estabelecer uma hipótese de que alguns íons metálicos possam se ligar à mesma, auxiliando na execução de processos bioquímicos.

4.2. Otimização da decomposição em mini-frascos assistida por radiação microonda dos spots dos géis

No processo de otimização da decomposição em mini-frascos assistida por radiação microonda dos spots de proteínas, três parâmetros foram avaliados: a quantidade de massa da amostra, a mistura dos agentes oxidantes (ácido nítrico e peróxido de hidrogênio) e o programa de aquecimento no forno de microonda. Embora interdependentes cada parâmetro foi estudado de maneira univariada.

As decomposições de spots com massas maiores do que 3,0 mg não foram suficientemente eficientes devido à presença de partículas sólidas na solução resultante. Os spots com quantidades de massa entre 0,4 e 3,0 mg produziram melhores resultados na decomposição, pois não foi visivelmente detectada a presença de partículas sólidas na solução resultante. De modo a confirmar esta observação, uma análise de carbono residual foi realizada. A massa de amostra igual a 1,6 mg resultou na decomposição mais eficiente, ou seja, com o menor conteúdo de carbono residual, de 0,33% (m/m).

O efeito da mistura dos agentes oxidantes na decomposição da amostra foi também avaliado. A mistura de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio a 30% (v/v)

foi testada nas proporções 1: 0,75 (200: 150 μL), 3: 1 (300 μL : 100 μL) e 5: 1 (250 μL : 50 μL). As melhores condições de decomposição foram atingidas ao empregar-se a proporção de 1: 0,75 de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio a 30% (v/v), uma vez que apenas as amostras decompostas com esta mistura não apresentaram partículas sólidas visivelmente detectáveis na solução resultante.

Seis diferentes programas de aquecimento no forno com radiação microonda foram testados, e o que apresentou um melhor desempenho dentre eles foi composto por sete etapas (executas duas vezes) e está detalhado na Tabela 2.3. Entre cada etapa, deixou-se 2 min para resfriamento e, entre cada execução do programa, deixou-se um tempo de resfriamento de 10 min. Nesta condição, a porcentagem de carbono residual medida foi entre 0,13 e 0,68% (m/m).

Depois de otimizado o método de decomposição de amostra, os seguintes parâmetros foram fixados: 0,4 a 3,0 mg de amostra, 200 μL de ácido nítrico concentrado, 150 μL de peróxido de hidrogênio a 30% (v/v) e o programa de aquecimento mostrado na Tabela 2.3. Em cada execução, 24 mini-frascos (seis frascos do forno com radiação microonda) foram utilizados.

Tabela 2.3. Programa do forno de microonda empregado na decomposição das amostras de proteínas contidas em gel de poliacrilamida (executado duas vezes)

Etapa	Tempo / s	Potência / W
1	60	300
2	30	500
3	60	500
4	30	800
5	30	800
6	30	800
7	60	500

Os processos de decomposição de amostras são freqüentemente citados como um risco potencial à segurança no laboratório [21]. Entretanto, o procedimento proposto oferece um risco mínimo ao analista, devido ao baixo

volume de ácido empregado e à pequena quantidade de amostra requerida para que uma decomposição eficiente seja realizada, o que vem de encontro com as necessidades quando são envolvidos estudos na área da metalômica.

4.3. Aplicabilidade e validação do método de decomposição em mini-frascos

De modo a avaliar a aplicabilidade do método de decomposição proposto, foi feita a quantificação de alguns íons metálicos em proteínas de soja não-transgênica e compararam-se os resultados obtidos com aqueles onde os *spots* de proteínas foram decompostos pelo método de decomposição assistida por radiação microonda convencional, realizado de acordo com o trabalho de Verbi *et al.* [14]. A seleção dos *spots* protéicos para a quantificação dos íons metálicos foi baseada em uma busca no banco de dados de proteínas *ExPASy Proteomics Server* [28], de acordo com os pontos isoelétricos e as massas molares das proteínas presentes no gel, estimados pelo programa de análise de imagens. Tal banco de dados, além de fornecer a provável identidade da proteína, apresenta também a informação de qual íon metálico está presente em cada uma delas.

A Tabela 2.4 mostra os resultados obtidos na quantificação de cálcio, cobre e ferro nos *spots* selecionados, pelos métodos de decomposição em mini-frascos e decomposição convencional assistida por radiação microonda. Os resultados obtidos para estes dois métodos foram estatisticamente iguais, dentro de um limite de confiança de 90%, pelo teste *t* [31].

Ressalta-se que a quantificação de cobre não foi possível quando a decomposição convencional foi empregada, pois o valor obtido foi menor do que o limite de quantificação encontrado ($12 \mu\text{g g}^{-1}$). Já no caso da decomposição em mini-frascos, a quantificação do cobre foi possível (limite de quantificação igual a $3,3 \mu\text{g g}^{-1}$), o que evidencia a vantagem deste tipo de decomposição para a determinação de íons metálicos em proteínas contidas em gel de poliacrilamida.

Ainda, de acordo com os resultados apresentados na Tabela 2.4, verifica-se claramente porque o cálcio é considerado um macronutriente de plantas

(concentração em nível de mg g^{-1}), enquanto que o cobre e o ferro são considerados micronutrientes (concentrações em nível de $\mu\text{g g}^{-1}$). Os macronutrientes são elementos essenciais para as plantas, envolvendo-se diretamente no metabolismo destas. Já os micronutrientes não atuam diretamente em funções vitais da planta, mas são benéficos no sentido de auxiliar o crescimento das mesmas [32].

Tabela 2.4. Concentração dos íons metálicos para os quatro *spots* de proteínas selecionados, que foram preparados por meio da decomposição convencional (DC) e em mini-frascos (DMF); $n = 3$

<i>Spot</i>	$\text{Ca}^{\text{a}} / \text{mg g}^{-1}$		$\text{Cu}^{\text{b}} / \mu\text{g g}^{-1}$		$\text{Fe}^{\text{b}} / \mu\text{g g}^{-1}$	
	DC	DMF	DC	DMF	DC	DMF
A	NR	NR	NR	NR	219 ± 18	209 ± 8
B	NR	NR	NR	NR	16 ± 2	12 ± 4
C	NR	NR	$< \text{LQ}^{\text{c}}$	6 ± 1	NR	NR
D	58 ± 3	52 ± 7	NR	NR	NR	NR

^aDeterminada por FAAS; ^bDeterminadas por ETAAS; ^cLQ = $12 \mu\text{g g}^{-1}$;
^{NR}Determinação não realizada

4.4. Quantificação de íons metálicos nos *spots* protéicos por ETAAS e FAAS

Nos *spots* de proteínas de soja transgênica e não-transgênica onde os íons metálicos Ca^{2+} , Cu^{2+} e Fe^{2+} foram detectados pela análise qualitativa por SR-XRF (vide item 4.1), foi realizada a quantificação dos mesmos. Para tanto, estes *spots* passaram primeiramente pela decomposição em mini-frascos assistida por radiação microonda e, então, os íons metálicos foram quantificados por meio de técnicas de espectrometria de absorção atômica.

O Ca^{2+} possui a função de estabilizar estruturalmente as membranas e paredes celulares das plantas. Este íon metálico é também um importante sinalizador, regulando o transporte de nutrientes na planta, sendo encontrado em

proteínas como as calmodulinas [32]. O Cu^{2+} é um componente redox presente em proteínas, essencial para a realização de vários processos biológicos nas plantas, tais como as reações de transferência de elétrons da respiração (citocromo c oxidase) e da fotossíntese (plastocianina), a desintoxicação de radicais superóxido (Cu-Zn superóxido dismutase) e na lignificação de paredes celulares de plantas (laccase) [32]. Já o Fe^{2+} é um íon metálico necessário para a fotossíntese e atua como um cofator de enzimas em plantas, associadas com a transferência de elétrons e na redução e fixação de nitrogênio [32].

Na Tabela 2.5, são mostrados os resultados obtidos nas quantificações e na Tabela 2.6, são mostrados os limites de quantificação e detecção calculados. Os valores expressos nestas Tabelas foram calculados em termos de massa do íon metálico por massa do *spot* protéico, uma vez que não é possível estimar a massa de proteína por *spot*, devido a uma limitação do programa de análise de imagens dos géis. O branco analítico utilizado para estas análises foi o mesmo adotado nas análises por SR-XRF, ou seja, uma região do gel de eletroforese onde não havia qualquer *spot* protéico.

Para uma grande maioria, os resultados da análise qualitativa por SR-XRF e aqueles obtidos da análise quantitativa por ETAAS ou FAAS, foram concordantes. Como exemplos, pode-se mencionar o *spot* 13, onde o cálcio e o ferro foram detectados com uma maior intensidade e quantificados com uma maior concentração na soja não-transgênica e o *spot* 15, onde o cálcio, o cobre e o ferro foram detectados com uma maior intensidade e quantificados com uma maior concentração na soja transgênica.

Nas proteínas *β -conglycinin*, *β -chain (precursor)* (*spot* 1), e *glycinin G4 (precursor)* (*spot* 8), o ferro havia sido detectado por SR-XRF. Porém, de acordo com os resultados da Tabela 2.5, a presença deste íon metálico não foi confirmada e, portanto, apesar da discordância com o resultado da análise qualitativa, houve uma concordância com as informações disponíveis no banco de dados de proteínas [28].

Já no caso das proteínas *chalcone synthase 2* (*spot* 15) e *glycinin G2 (precursor)* (*spot* 4), houve uma concordância entre os resultados das análises

qualitativa e quantitativa, confirmando a presença de cálcio, cobre e ferro na primeira e de ferro na segunda. Estes resultados, porém, não estão disponíveis no banco de dados de proteínas [28], o que indica que mais estudos a respeito das estruturas e funções destas proteínas devem vir a ser realizados.

Tabela 2.5. Concentração dos íons metálicos cálcio, cobre e ferro, para os *spots* de proteínas de soja transgênica (T) e não-transgênica (NT)

Spot	Ca ^a / mg g ⁻¹		Cu ^b / µg g ⁻¹		Fe ^b / µg g ⁻¹	
	Soja T	Soja NT	Soja T	Soja NT	Soja T	Soja NT
1	NR	NR	NR	NR	< LQ	< LQ
4	< LQ	< LQ	NR	NR	212 ± 31	348 ± 99
8	NR	NR	NR	NR	< LQ	< LQ
11	2,3 ± 0,5	2,6 ± 0,1	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
12	2,6 ± 0,2	2,2 ± 0,9	1,5 ± 0,6	2,8 ± 0,2	NR	NR
13	3,5 ± 0,2	15 ± 6	NR	NR	663 ± 79	869 ± 93
15	17 ± 2	3,6 ± 0,8	1,6 ± 0,1	< LQ	691 ± 78	447 ± 54
17	< LQ	< LQ	NR	NR	< LQ	< LQ
18	< LQ	< LQ	NR	NR	NR	NR

^a Determinada por FAAS; ^b Determinadas por ETAAS; ^{NR} Determinação não realizada

Tabela 2.6. Limites de quantificação e detecção para o cálcio, cobre e ferro

Metal	LQ / µg g ⁻¹	LD / µg g ⁻¹
Ca	2750	750
Cu	1,7	0,5
Fe	198	54

5. CONCLUSÕES PARCIAIS

Neste Capítulo, foi realizado o mapeamento de alguns *spots* de proteínas de soja, empregando a SR-XRF, onde foi detectada a presença dos íons metálicos

Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} e Zn^{2+} . Ao comparar os dois tipos de soja estudados, verificou-se que a maioria das proteínas de soja transgênica apresentou um maior número de íons metálicos identificados do que nas proteínas de soja não-transgênica.

A partir da relação entre os resultados obtidos pela análise qualitativa dos íons metálicos com aqueles de caracterização das proteínas por MALDI-TOF MS, foi possível confirmar a ausência de íons metálicos nas proteínas *trypsin inhibitor subtype A* e *LEA protein*, conforme consta no banco de dados de proteínas.

A seguir, foi otimizada a decomposição dos géis de poliacrilamida, visando a quantificação de íons metálicos presentes em metaloproteínas e proteínas ligadas a metais. O sistema de decomposição em mini-frascos assistida por radiação microonda possibilitou uma decomposição eficiente e rápida das amostras, além de permitir uma baixa diluição das mesmas, o que é essencial para a realização de análise posterior por meio de técnicas de espectrometria atômica. A aplicabilidade do método proposto foi demonstrada pela quantificação dos íons metálicos Ca^{2+} , Cu^{2+} e Fe^{2+} em quatro proteínas de soja não-transgênica com o uso de técnicas de espectrometria de absorção atômica (ETAAS e FAAS) e a validação foi feita a partir da comparação destes resultados com aqueles obtidos após a decomposição assistida por radiação microonda convencional dos mesmos *spots* de proteínas. Os resultados foram condizentes com as características dos íons metálicos serem macro (cálcio) ou micronutrientes (cobre e ferro) de organismos vegetais.

Os íons metálicos Ca^{2+} , Cu^{2+} e Fe^{2+} também foram quantificados nos *spots* de proteínas cuja análise qualitativa indicou a presença dos mesmos. Os resultados obtidos pela quantificação foram, em grande parte, concordantes com aqueles obtidos por SR-XRF. No caso das proteínas *β -conglycinin*, *β -chain (precursor)* e *glycinin G4 (precursor)*, onde o ferro havia sido detectado por SR-XRF, não houve esta concordância, uma vez que a quantificação não foi possível, porém, este é um resultado que condiz com as informações disponíveis no banco de dados de proteínas. No caso das proteínas *chalcone synthase 2* e *glycinin G2 (precursor)*, houve uma concordância entre os resultados das análises qualitativa

e quantitativa, confirmando a presença de metais nestas proteínas. Estes resultados não estão disponíveis no banco de dados de proteínas, o que indica que mais estudos a respeito das estruturas e funções destas proteínas devem vir a ser realizados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Y. Gao, C. Chen, P. Zhang, Z. Chai, W. He, Y. Huang, *Detection of metalloproteins in human liver cytosol by synchrotron radiation X-ray fluorescence after sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, **Anal. Chim. Acta** 485 (2003) 131-137.
- [2] V.L. Herald, J.L. Heazlewood, D.A. Day, A. H. Millar, *Proteomic identification of divalent metal cation binding proteins in plant mitochondria*, **FEBS Lett.** 537 (2003) 96-100.
- [3] J.S. Garcia, C.S. Magalhães, M.A.Z. Arruda, *Trends in metal-binding and metalloprotein analysis*, **Talanta** 69 (2006) 1-15.
- [4] H. Stutz, G. Bordin, A.R. Rodriguez, *Separation of selected metal-binding proteins with capillary zone electrophoresis*, **Anal. Chim. Acta** 477 (2003) 1-19.
- [5] H. Haraguchi, *Metallomics as integrated biometal science*, **J. Anal. At. Spectrom.** 19 (2004) 5-14.
- [6] J. Bettmer, *Metalloproteomics: a challenge for analytical chemists*, **Anal. Bioanal. Chem.** 383 (2005) 370-371.
- [7] W.P. Blackstock, M.P. Weir, *Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins*, **Trends Biotechnol.** 17 (1999) 121-127.
- [8] J. Szpunar, *Metallomics: a new frontier in analytical chemistry*, **Anal. Bioanal. Chem.** 378 (2004) 54-56.
- [9] J.L. Gómez-Ariza, T. Garcia-Barrera, F. Lorenzo, V. Bernal, M.J. Villegas, V. Oliveira, *Use of mass spectrometry techniques for the characterization of metal bound to proteins (metallomics) in biological systems*, **Anal. Chim. Acta** 524 (2004) 15-22.
- [10] D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, **Fundamentals of Analytical Chemistry**, Harcourt College Publishers, Philadelphia (1996).

- [11] F. van Langevelde, R.D. Vis, *Trace-element determinations using a 15-keV synchrotron X-ray microprobe*, **Anal. Chem.** 63 (1991) 2253-2259.
- [12] Y. Gao, C. Chen, Z. Chai, J. Zhao, J. Liu, P. Zhang, Y. Huang, *Detection of metalloproteins in human liver cytosol by synchrotron radiation X-ray fluorescence combined with gel filtration chromatography and isoelectric focusing separation*, **Analyst** 127 (2002) 1700-1704.
- [13] M. Kühbacher, G. Weseloh, A. Thomzig, H. Bertelsmann, G. Falkenberg, M. Radtke, H. Riesemeier, A. Kyriakopoulos, M. Beekes, D. Behne, *Analysis and localization of metal- and metalloid-containing proteins by synchrotron radiation X-ray fluorescence spectrometry*, **X-Ray Spectrom.** 34 (2005) 112-117.
- [14] F.M. Verbi, S.C.C. Arruda, A.P.M. Rodríguez, C.A. Pérez, M.A.Z. Arruda, *Metal-binding proteins scanning and determination by combining gel electrophoresis, synchrotron radiation X-ray fluorescence and atomic spectrometry*, **J. Biochem. Biophys. Meth.** 62 (2005) 97-109.
- [15] C.S. Magalhães, M.A.Z. Arruda, *Sample preparation for metalloprotein analysis: a case study using horse chestnuts*, **Talanta** 71 (2007) 1958-1963.
- [16] S. Schilling, H. Cynis, A. von Bohlen, T. Hoffmann, M. Wermann, U. Heiser, M. Buchholz, K. Zunkel, H. Demuth, *Isolation, catalytic properties, and competitive inhibitors of the zinc-dependent murine glutaminy cyclase*, **Biochemistry** 44 (2005) 13415-13424.
- [17] F.J. Krug (editor), **Métodos de preparo de amostras**, cap. 8, 6ª edição, VI Workshop sobre Preparo de Amostras, Santa Maria (2006).
- [18] H.M. (Skip) Kingston, S.J. Haswell (editors), **Microwave-enhanced chemistry**, American Chemical Society, Washington (1997).
- [19] G. Tölg, P. Tschöpel, **Determination of trace elements**, VCH, Weinheim (1994).
- [20] E.M.M. Flores, A.P.F. Saidelles, J.S. Barin, S.R. Mortari, A.F. Martins, *Hair sample decomposition using polypropylene vials for determination of arsenic by hydride generation atomic absorption spectrometry*, **J. Anal. At. Spectrom.** 16 (2001) 1419-1423.
- [21] S.R. Mortari, A.P.F. Saidelles, J.S. Barin, E.M.M. Flores, A.F. Martins, *Hair sample decomposition using polypropylene vials for determination of arsenic by hydride generation atomic absorption spectrometry*, **Microchim. Acta** 148 (2004) 157-162.

- [22] M.L. Brancalion, M.A.Z. Arruda, *Evaluation of medicinal plant decomposition efficiency using microwave ovens and mini-vials for Cd determination by TS-FF-AAS*, **Microchim. Acta** 150 (2005) 283-290.
- [23] B. Vekemans, K. Janssens, L. Vincze, F. Adams, P. van Espen, *Analysis of X-ray spectra by iterative least squares (AXIL): new developments*, **X-Ray Spectrom.** 23 (1994) 278-285.
- [24] A. Sussulini, J.S. Garcia, M.A.Z. Arruda, *Microwave-assisted decomposition of polyacrylamide gels containing metalloproteins using mini-vials: an auxiliary strategy for metallomics studies*, **Anal. Biochem.** 361 (2007) 146-148.
- [25] M. van Gysel, P. Lemberge, P. van Espen, *Description of Compton peaks in energy-dispersive X-ray fluorescence spectra*, **X-Ray Spectrom.** 32 (2003) 139-147.
- [26] L. Vincze, B. Vekemans, K. Janssens, F. Adams, *Modeling of photon scattering at high X-ray energies: experiment versus simulation*, **J. Anal. At. Spectrom.** 14 (1999) 529-533.
- [27] D. Voet, J.G. Voet, C.W. Pratt, **Fundamentos de Bioquímica**, Artmed Editora, Porto Alegre (2000).
- [28] *ExpASY Proteomics Server*, disponível em <http://www.expasy.org>, acessado em 21 de setembro (2006).
- [29] N. Maruyama, M. Adachi, K. Takahashi, K. Yagasaki, M. Kohno, Y. Takenaka, E. Okuda, S. Nakagawa, B. Mikami, S. Utsumi, *Crystal structures of recombinant and native soybean β -conglycinin β homotrimers*, **Eur. J. Biochem.** 268 (2001) 3595-3604.
- [30] A. Zamojski, S. Jarosz, *Iron complexes in carbohydrate chemistry*, **Curr. Org. Chem.** 7 (2003) 1-12.
- [31] J.C. Miller, J.N. Miller, **Statistics for analytical chemistry**, 3rd edition, Ellis Horwood, London (1993).
- [32] T.C. Fox, M.L. Guerinot, *Molecular biology of cation transport in plants*, **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 49 (1998) 669-696.

CONCLUSÕES FINAIS

Os estudos apresentados nesta Dissertação de Mestrado permitiram corroborar a hipótese formulada, a qual o processo de modificação genética em sementes de soja ocasiona alterações em nível protéico e metaloprotéico. Para isso, foram estabelecidos protocolos de análises tanto para a identificação de proteínas de soja após a separação por 2-D PAGE, quanto das espécies metálicas ligadas a elas.

No Capítulo 1, foi feita uma comparação entre os dois tipos de soja estudados, transgênica e não-transgênica, em nível proteômico. Observou-se um maior número de proteínas em soja transgênica após a separação eletroforética, apesar de que a concentração encontrada de proteínas totais nos dois tipos de amostra diferiu pouco. Com a caracterização de proteínas por MALDI-TOF MS e a análise das imagens dos géis de eletroforese, foi possível observar que houve alterações na expressão de algumas destas proteínas. A *LEA protein* foi mais expressa na soja transgênica, o que pode ser uma evidência do estresse na planta, resultante do processo de modificação genética e a proteína *early nodulin 75 (precursor)* apresentou uma menor expressão na soja transgênica, sendo que tal fato pode indicar que o desenvolvimento dos nódulos fixadores de nitrogênio na raiz da soja não-transgênica deve ser mais eficiente que na soja transgênica.

No Capítulo 2, foi feita uma comparação entre os dois tipos de soja em nível metaloproteômico. O mapeamento de alguns *spots* protéicos indicou um maior número de íons metálicos presentes em proteínas de soja transgênica e os resultados desta análise foram coerentes com aqueles encontrados pela análise quantitativa dos íons metálicos Ca^{2+} , Cu^{2+} e Fe^{2+} . A quantificação destes íons metálicos nos *spots* protéicos foi possível de ser realizada por meio de técnicas de espectrometria de absorção atômica, após a decomposição em mini-frascos assistida por radiação microonda, proposta neste trabalho, que permitiu uma decomposição rápida e eficiente, e com uma diluição mínima da amostra. Um resultado interessante encontrado após estas análises, foi com relação à proteína *glycinin G2 (precursor)*, onde a presença de ferro foi confirmada, sendo que tal

resultado não está disponível no banco de dados de proteínas, o que indica que mais estudos a respeito da estrutura e função desta proteína devem vir a ser realizados.

Outro ponto importante a ser destacado se refere às proteínas dos *spots* 12, 13 e 15, que apresentaram uma maior diversidade de espécies metálicas em suas estruturas. Entretanto, estas proteínas ainda não foram identificadas. É interessante ressaltar que os resultados obtidos, quando comparados com o banco de dados de proteínas, são bastante coerentes, principalmente para a *cytochrome c oxidase polypeptide II* e a *calmodulin-2*, e para a *chalcone synthase 2* uma nova informação foi obtida em termos da presença de metal em sua estrutura. Este é um outro ponto a ser investigado.

Finalizando, este trabalho evidencia que uma abordagem multidisciplinar é necessária aos estudos metaloproteômicos, que requer o uso de diversas técnicas analíticas para a obtenção dos resultados, bem como uma conexão entre diferentes áreas científicas, como a química analítica, a bioquímica, a fisiologia e a biotecnologia, para que os resultados obtidos possam ser melhores interpretados e aplicados.