

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

DEYSE DE BRITO MARTHE BERTOLINO

**FRACIONAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE LINHAÇA DOURADA
(*Linum usitatissimum* L.) ASSOCIADAS AOS METAIS Cu, Fe e Zn**

Área de concentração: Química Analítica.

Orientação: Leticia Malta Costa

Co-orientação: Rodinei Augusti

BELO HORIZONTE

2015

UFMG – ICEx/DQ. 1.089^a

T. 496^a

DEYSE DE BRITO MARTHE BERTOLINO

**FRACIONAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE LINHAÇA DOURADA
(*Linum usitatissimum* L.) ASSOCIADAS AOS METAIS Cu, Fe e Zn**

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências – Química.

Belo Horizonte

2015

B546f
2015
T

Bertolino, Deyse de Brito Marthe
Fracionamento e identificação de proteínas de
linhaça dourada (*Linum usitatissimum* L.) associadas aos
metais Cu, Fe e Zn [manuscrito] / Deyse de Brito Marthe
Bertolino. 2015.

[xvii], 93 f. : il.

Orientadora: Letícia Malta Costa.

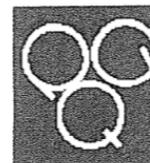
Coorientador: Rodinei Augusti.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas
Gerais - Departamento de Química.

Inclui bibliografia.

1. Química analítica - Teses 2. Proteínas - Teses 3.
Metais - Teses 4. Linho (Planta) - Teses I. Costa,
Letícia Malta, Orientadora II. Augusti, Rodinei,
Coorientador III. Título.

CDU 043



"Fracionamento e Identificação de Proteínas de Linhaça Dourada (*Linum usitatissimum* L.) Associadas aos Metais Cu, Fe e Zn"

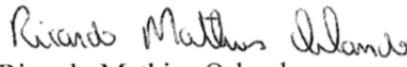
Deyse de Brito Marthe Bertolino

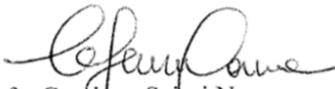
Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

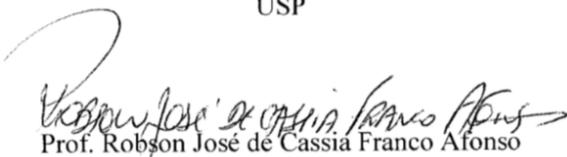

Prof. Leticia Malta Costa - Orientadora
UFMG


Prof. Rodinei Augusti - Coorientador
UFMG


Prof. Clésia Cristina Nascentes
UFMG


Prof. Ricardo Mathias Orlando
UFMG


Prof. Cassiana Seimi Nomura
USP


Prof. Robson José de Cassia Franco Afonso
UFOP

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

Isaac Newton

*A Deus,
Aos meus pais, Eloiza e Carlos,
ao meu irmão Jefferson,
e ao meu marido Adilson*

*Com amor,
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser um Pai leal e companheiro. Pelo Seu infinito amor fui abençoada com inteligência e fortaleza. Dons do Espírito Santo que me trouxeram coragem necessária para estudar, aprender, escutar e crescer. A Ele rendo graças eternamente.

Aos meus pais, pelo amor incondicional. Pelas palavras de carinho, apoio e incentivo, sendo pacientes e dedicados. Pelos exemplos de vida que me encorajou a fazer o meu melhor neste trabalho.

Ao meu marido, Adilson, que esteve sempre ao meu lado trazendo amor, palavras, gestos de apoio e compreensão. Pelo incentivo nas horas de desânimo e pela presença nas alegrias de nossas conquistas.

Ao meu irmão, Jefferson, que sempre me trazia conselhos e compartilhava experiências, estabelecendo uma relação de confiança e respeito.

Aos meus familiares, que com um sorriso, um abraço ou um carinho, fizeram-nos acreditar que valia a pena continuar.

À professora Dra. Letícia Malta Costa, pela orientação, disponibilidade e, sobretudo, pelos ensinamentos transmitidos.

Ao professor Dr. Rodinei Augusti, não somente pela colaboração, mas pelo incentivo.

Ao professor Dr. William Castro Borges do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto pela parceria, ensinamentos transmitidos, auxílio e por disponibilizar o seu laboratório e equipamentos para a realização da Eletroforese em Gel e Espectrometria de Massas.

À Ananda Lima Sanson pela receptividade, aprendizado e colaboração efetiva nos experimentos de Eletroforese e Espectrometria de Massas. Por todo o tempo dedicado.

Ao Laboratório de Contaminantes Inorgânicos pertencente ao Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO/MG), Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento pelo suporte dado para a execução dos experimentos de Espectrometria de Absorção Atômica por Forno de Grafite, em especial ao Amarildo Germano e à Hélia Luíza Clark.

À Universidade Federal de Minas Gerais, em especial ao Departamento de

Química, pela oportunidade oferecida para a realização deste trabalho. Aos funcionários do Departamento de Química e Pós-Graduação, em especial, ao Gustavo e Leandro pelos serviços prestados e, também, à Paulete Maria Pitangueira Gerken e Lilian Fátima Bréscia, por me atenderem prontamente na secretaria.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão de bolsa de estudo e auxílio financeiro.

A todos os amigos do laboratório: Arlesiene, Camila, Fred, Gama, Lívia, Louise, Luciene, Mariana, Roberta e Davyston pelo agradável convívio, meu muito obrigado. Aos colegas e ex-alunos do laboratório Frank, Leila, Leonel, Luciano e Rita.

Agradeço à Aline, Elizângela, Patrícia e Silvéria, pelas conversas, ensinamentos, amizade e principalmente pelos cuidadosos e fundamentais suporte e apoio no desenvolvimento desse trabalho.

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

Muito Obrigada!

RESUMO

A linhaça (*Linum usitatissimum L.*) é conhecida pelo seu elevado valor nutricional, devido, principalmente, ao seu alto conteúdo de fibras, ligninas e proteínas. Apesar de pouco conhecido, sua fração proteica também produz efeitos benéficos à saúde. Por isso, o objetivo deste trabalho foi o estudo das proteínas de linhaça dourada associadas aos metais Cu, Fe e Zn. Inicialmente, foi desenvolvido e validado um método para quantificação destes metais na amostra utilizando a digestão assistida por radiação micro-ondas em forno com cavidade e espectrometria de absorção atômica por chama. Visto que a digestão foi mais eficiente na amostra sem a fração oleosa, diferentes marcas de linhaça dourada sem fração lipídica foram analisadas e obteve-se maior concentração de Fe, seguido de Zn e Cu. Para garantir a extração proteica, essa fase oleosa deve ser retirada e, por isso, investigou-se como solventes de diferentes polaridades, hexano, clorofórmio e metanol, utilizados nesta etapa podem interagir com a fase oleosa e afetar a integridade da ligação metal-proteína. As concentrações de Cu, Fe e Zn foram maiores nos sobrenadantes obtidos após a extração proteica dos resíduos sem a fração lipídica, após a utilização de hexano como extrator. As proteínas nestes mesmos resíduos também foram extraídas pelo método sequencial e foi possível relacionar a presença de albuminas e globulinas com os metais estudados. A fase oleosa da linhaça dourada foi retirada com hexano e extraiu-se as proteínas do resíduo sem lipídios com a solução tampão em Tris-HCl para serem fracionadas em uma coluna cromatográfica por exclusão molecular. A fração que possuía os maiores teores proteicos e altas concentrações de metais foi selecionada e analisada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial. Vinte e uma proteínas foram identificadas e dentre elas, proteínas de armazenamento. Como foram adotados procedimentos não desnaturantes, possivelmente os metais estudados possuem grande afinidade pelas proteínas identificadas. Outras cinco marcas de linhaça dourada foram submetidas à extração proteica e observou-se, pelo perfil eletroforético, que existem diferenças na composição de subunidades entre as marcas investigadas. Os teores proteicos obtidos variaram de 2 a 6 mg mL⁻¹ e os metais Cu, Fe e Zn também foram quantificados nestes extratos, com concentrações médias de Fe em torno de 120 µg L⁻¹, de 50 µg L⁻¹ para Cu e de 20 µg L⁻¹ para Zn.

PALAVRAS CHAVES: linhaça, metal, proteína, GFAAS, LC-MS/MS.

ABSTRACT

Flaxseed (*Linum usitatissimum L.*) is known for its high nutritional value, mainly due to the high fiber, lignin and proteins content, which has beneficial health effects. Then, the goal of this work was to study the golden flaxseed proteins bound to the metals Cu, Fe and Zn. Initially, it was developed and validated a method to determinate metals in golden flaxseed samples using an acid digestion assisted by microwave radiation in a cavity system. The metals were quantified by flame atomic absorption spectrometry (FAAS). Digestion procedure was more efficient in a sample without oily fraction, so different brands of golden flaxseed without lipid fraction were analyzed. Iron obtained the highest concentration, followed by Zn and Cu, respectively. The polarity of the organic solvents can affected the metal-protein bound and disrupted it. In this sense, sample preparation was evaluated with different organic solvents, as hexane, chloroform and methanol. The content of Cu, Fe and Zn were higher in supernatants obtained after protein extraction in the sample without the lipid fraction using hexane as extractor. Proteins in these residues were also extracted by the sequential procedure and it was possible to relate the presence of albumin and globulins with the metals. After, the golden flaxseed oil phase was removed with hexane and the proteins were extracted in the lipid-free residue with Tris-HCl buffer solution to be fractionated in a molecular exclusion column chromatography. A protein fraction which higher absorbance and metals concentration was selected and analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Twenty-one proteins were identified including storage proteins. As procedures used were non-denaturing it is possible to say that the metals have a great affinity for the identified proteins. Another five golden flaxseed brands were submitted to protein extraction and it was observed by electrophoretic profile that they have different subunit composition. The protein levels obtained ranged from 2 to 6 mg ml⁻¹ and the metals Cu, Fe and Zn were also quantified in these extracts, obtaining medium values of 50, 120 and 20 µg L⁻¹, respectively.

KEYWORDS: flaxseed, metal, protein, GFAAS, LC-MS/MS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TABELAS

Tabela 1.1. Parâmetros instrumentais utilizados para determinação de cobre, ferro e zinco por espectrometria de absorção atômica com chama sequencial (FS FAAS) .	20
Tabela 1.2. Programa de aquecimento para a digestão da amostra de linhaça dourada em forno de micro-ondas com cavidade	22
Tabela 1.3. Concentrações médias (mg kg^{-1}) e desvios padrão das digestões de amostras de linhaça <i>in natura</i> realizadas em ácido nítrico concentrado e diluído para cobre, ferro e zinco (n=3)	28
Tabela 1.4. Limites de detecção e quantificação ($\mu\text{g g}^{-1}$) de cobre, ferro e zinco por FS FAAS obtidos para a amostra de linhaça dourada digerida	31
Tabela 1.5. Teor proteico (mg g^{-1}) e desvio padrão em cada fração coletada na extração sequencial após a extração lipídica com hexano, clorofórmio:metanol (2:1 v v ⁻¹) e hexano seguido de clorofórmio:metanol (2:1 v v ⁻¹) (n = 3)	36
Tabela 1.6. Limites de detecção e quantificação ($\mu\text{g g}^{-1}$) de cobre, ferro e zinco por GFAAS obtidos nos meios extratores avaliados: Tris-HCl, água, NaCl, etanol e NaOH, em brancos analíticos do procedimento de digestão	38
Tabela 1.7. Concentração (mg kg^{-1}) e desvio padrão de cobre, ferro e zinco na fase oleosa, no sólido residual e nos sobrenadantes em Tris-HCl, após o procedimento de extração lipídica (n = 3)	39
Tabela 1.8. Concentração (mg kg^{-1}) e desvio padrão de cobre, ferro e zinco na amostra de linhaça dourada e na soma do sólido residual, fase oleosa e sobrenadante em Tris-HCl após extração proteica. Todos os resultados foram obtidos após extração lipídica com hexano, clorofórmio:metanol (2:1 v v ⁻¹) e hexano seguido de clorofórmio:metanol (2:1 v v ⁻¹) (n = 3)	40
Tabela 2.1. Limites de detecção e quantificação ($\mu\text{g L}^{-1}$) de cobre, ferro e zinco por GFAAS obtidos para as frações coletadas através da cromatografia de exclusão molecular	73

Tabela 2.2. Proteínas identificadas na fração 34 coletada através da cromatografia de exclusão molecular.....	79
Tabela 2.3. Teor de proteínas totais (mg mL ⁻¹) e desvio padrão nos extratos (com e sem precipitação com sulfato de amônio) obtidos para as seis marcas de linhaça dourada (n = 3).....	83
Tabela 2.4. Concentração (µg L ⁻¹) e desvio padrão de cobre, ferro e zinco nos extratos (com e sem precipitação com sulfato de amônio) obtida para as seis marcas de linhaça dourada (n = 3).....	85

FIGURAS

Figura 1.1. O linho e suas partes: 1 e 2) planta inteira, 3 e 4) fruta jovem vista por diferentes ângulos, 5) fruta jovem vista por uma secção transversal, 6) fruta madura, 7 e 8) semente marrom e dourada madura vistas por diferentes ângulos (adaptado de Hermann Adolph Köhler, 1887; Köhler, 1887).....	5
Figura 1.2. Estrutura do corante Azul de Coomassie R250 e G250.....	14
Figura 1.3. Resumo das etapas descritas no item 1.4.7	26
Figura 1.4. Concentração (mg kg^{-1}) e desvio padrão de cobre, ferro e zinco obtida após digestão ácida assistida por radiação micro-ondas da amostra de linhaça dourada <i>in natura</i> e sem fração lipídica após extração com hexano, clorofórmio:metanol (2:1 v v ⁻¹) e hexano seguido de clorofórmio:metanol (2:1 v v ⁻¹) (n = 3).....	29
Figura 1.5. Teor de carbono orgânico residual (COT) (%) e desvio padrão obtido nos digeridos da amostra de linhaça dourada <i>in natura</i> e sem fração lipídica após extração com hexano, clorofórmio:metanol (2:1 v v ⁻¹) e hexano seguido de clorofórmio:metanol (2:1 v v ⁻¹) (n = 3).....	30
Figura 1.6. Concentração (mg kg^{-1}) e desvio padrão de cobre, ferro e zinco obtidas pela digestão ácida assistida com radiação por micro-ondas de seis marcas de linhaça dourada sem a fração lipídica (n = 3).....	33
Figura 1.7. Teor proteico (mg g^{-1}) e desvio padrão em solução tampão Tris-HCl a partir do resíduo sem lipídios e no extrato da fase lipídica obtidos após remoção da fração oleosa com hexano, clorofórmio:metanol (2:1 v v ⁻¹) e hexano seguido de clorofórmio:metanol (2:1 v v ⁻¹) (n = 3)	35
Figura 1.8. Concentração (mg kg^{-1}) e desvio padrão de cobre, ferro e zinco em cada fração coletada na extração sequencial após extração lipídica com hexano (n = 3).41	41
Figura 2.1. Resume das etapas descritas nos itens 2.4.3 a 2.4.7	68
Figura 2.2. Gráfico fração <i>versus</i> absorbância do extrato proteico de linhaça dourada obtido das leituras de absorbância em 280 nm de cada fração coletada da cromatografia de exclusão molecular. Os sinais de absorbância de intensidade máxima foram destacados em pontos em vermelho	71

Figura 2.2. Perfil eletroforético 1D SDS-PAGE corado com prata de frações coletadas da cromatografia de exclusão molecular	72
Figura 2.4. Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) e desvios padrão de cobre (A), ferro (B) e zinco (C) em algumas das frações coletadas por cromatografia de exclusão molecular utilizando GFAAS	74
Figura 2.5. Fragmentos (a, b, c, x, y, z) oriundos da dissociação de um peptídeo de acordo com a nomenclatura proposta por Roepstorff-Fohlmann-Biemann (1984)....	75
Figura 2.6. Espectro de MS/MS obtido no sequenciamento do peptídeo MESEALELGFGAPAR duplamente carregado em que são indicadas as séries –b e –y utilizados para a identificação proteica pelo software Proteome Discover	77
Figura 2.7. Perfil eletroforético 1D SDS-PAGE corado com azul de coomassie dos seis extratos de linhaça dourada com precipitação (p) e sem precipitação (s) com sulfato de amônio.....	84

LISTA DE SIGLAS

1D	1 Dimensão
2D	2 Dimensões
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Arg	<i>Arginine</i> (Arginina)
ATP	Adenosina Trifosfato
BCA	<i>Bicinchoninic Acid</i> (Ácido Bicinconínico (4,4'-dicarboxi-2,2'-biquinolina))
Bis	N,N'-metileno-bis-acrilamida
BLAST	<i>Basic Local Alignment Sequence Tool</i>
CBB	<i>Coomassie Brilliant Blue</i> (Azul de Coomassie)
CHAPS	3-[(3-cholamidopropil)dimetilamônio]-1-propanosulfonato
COT	Carbono Orgânico Total
DTT	<i>Dithiothreitol</i> (Ditiotreitol)
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionização por <i>Electrospray</i>)
FS FAAS	<i>Fast Sequential Flame Atomic Absorption Spectrometry</i> (Espectrometria de Absorção Atômica com Chama no Modo Sequencial)
HCL	<i>Hollow-Cathode Lamp</i> (Lâmpadas de Catodo Oco)
ICP-OES	<i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i> (Espectrometria de Emissão óptica com Plasma Indutivamente Acoplado)
ICP-MS	<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado)

IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia Normatização e Qualidade Industrial
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> (União Internacional de Química Pura e Aplicada)
GFAAS	<i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i> (Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite)
HDL	<i>High Density Lipoproteins</i> (Lipoproteínas de Alta Densidade)
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfônico
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry</i> (Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial)
LDL	<i>Low Density Lipoproteins</i> (Lipoproteínas de Baixa Densidade)
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
Lys	<i>Lysine</i> (Lisina)
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i> (Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz)
MM	Massa Molar Teórica
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas)
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas Sequencial)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional para Informação Biotecnológica)
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i> (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia)
OMS	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)

PAGE	<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida)
PFA	Perfluoroalcoxi
pI	Ponto Isoelétrico
PSA	Persulfato de Amônio
SDG	<i>Secoisolariciresinol Diglucoside</i> (Secoisolariciresinol Diglucosídeo)
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Dodecil Sulfato de Sódio)
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Extração em Fase Sólida)
SR-XRF	<i>Synchrotron Radiation X-Ray Fluorescence</i> (Fluorescência de Raios-X com Radiação Síncrotron)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilenediamina
TFA	Ácido Trifluoacético
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano (2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol)
UV	Ultravioleta
Vis	Visível
%CP	Porcentagem de Cobertura da Proteína

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. REMOÇÃO FASE LIPÍDICA E QUANTIFICAÇÃO DOS METAIS Cu, Fe E Zn LIGADO ÀS PROTEÍNAS DE LINHAÇA DOURADA	1
1.1. Introdução	2
1.2. Revisão Bibliográfica	4
1.2.1. Linhaça: um alimento funcional	4
1.2.2. Proteínas associadas a metais	8
1.2.3. Métodos analíticos para a extração de proteínas	10
1.2.4. Extração proteica pelo método sequencial e em fase única ..	12
1.2.5. Métodos analíticos para a determinação da concentração de proteínas	14
1.2.6. Determinação de teor de metais em alimentos.....	15
1.3. Objetivos	18
1.3.1. Objetivo geral.....	18
1.3.2. Objetivos específicos.....	18
1.4. Parte experimental.....	19
1.4.1. Reagentes	19
1.4.2. Instrumentação	19
1.4.3. Amostragem	21
1.4.4. Determinação do teor de lipídios em linhaça dourada.....	21
1.4.5. Desenvolvimento de um método para a digestão das amostras de linhaça em forno de micro-ondas com cavidade.....	22
1.4.6. Aplicação do método desenvolvido para a digestão em amostras de linhaça dourada em forno de micro-ondas com cavidade.....	23
1.4.7. Preparo dos extratos proteicos.....	23
i. Extração lipídica	23
ii. Extração proteica com solução tampão Tris-HCl.....	24

iii. Extração proteica sequencial	24
1.4.8. Determinação do teor proteico pelo método de Bradford	25
1.5. Resultados e discussão	27
1.5.1. Teor de lipídios e dos metais cobre, ferro e zinco em linhaça dourada ligada à fração não-oleosa	27
1.5.2. Aplicação do método desenvolvido para a digestão em amostras de linhaça dourada em forno de micro-ondas com cavidade	32
1.5.3. Teor proteico nos extratos de linhaça dourada	34
1.5.4. Determinação de cobre, ferro e zinco nas frações e resíduos gerados da extração proteica de linhaça dourada	37
1.6. Conclusões parciais	42
1.7. Referências bibliográficas	44
CAPÍTULO 2. SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO PROTEICA POR LC-MS/MS E DETERMINAÇÃO ELEMENTAR POR GFAAS	54
2.1. Introdução	55
2.2. Revisão Bibliográfica	56
2.2.1. Métodos de Separação	56
i. A cromatografia de exclusão molecular	56
ii. Eletroforese em gel	57
2.2.2. Metaloproteínas e a espectrometria por absorção atômica e massas	59
2.3. Objetivos	62
2.3.1. Objetivo geral	62
2.3.2. Objetivos específicos	62
2.4. Parte experimental	63
2.4.1. Amostra, reagentes e soluções	63
2.4.2. Instrumentação	64
2.4.3. Extração proteica	65

2.4.4. Isolamento de frações proteicas por filtração em gel.....	66
2.4.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e coloração de prata	66
2.4.6. Determinação de cobre, ferro e zinco nas frações coletadas	67
2.4.7. Identificação proteica por LC-MS/MS	67
2.4.8. Extração proteica de amostras de linhaça dourada e determinação do teor proteico, perfil eletroforético e concentração de cobre, ferro e zinco	68
2.5. Resultados e discussão	71
2.5.1. Isolamento de frações proteicas por filtração em gel.....	71
2.5.2. Extração proteica de amostras de linhaça dourada e comparação do perfil eletroforético.....	82
2.6. Conclusões parciais.....	86
2.7. Referências bibliográficas	87
CAPÍTULO 3. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91

**CAPÍTULO 1. REMOÇÃO DA FASE LIPÍDICA E QUANTIFICAÇÃO
DOS METAIS Cu, Fe E Zn LIGADOS ÀS PROTEÍNAS DE LINHAÇA
DOURADA (*Linum usitatissimum* L.)**

1.1. Introdução

A linhaça (*Linum usitatissimum L.*) é relatada como um alimento de elevado valor nutricional não apenas pela sua fração de fibras (Warrand *et al.*, 2005), mas também pelo seu teor de lignina e ácido alfa-linoleico (Hyvärinen *et al.*, 2005) e proteínas (Oomah e Mazza, 1993).

A maioria das proteínas ou enzimas presentes em alimentos contém algum metal em sua estrutura, sendo responsáveis por funções específicas do metabolismo (Reilly, 2002). Estas são as chamadas metaloproteínas. Caso o metal esteja associado a uma proteína, a função desta molécula é fortemente dependente desta interação (Tainer, Roberts e Getzoff, 1991).

Para o sucesso da identificação proteica e subsequente quantificação de elementos inorgânicos, faz-se necessário utilizar uma técnica de separação eficiente, um detector de sensibilidade elevada para o metal a ser quantificado e outro detector específico para compostos orgânicos, com base na espectrometria de massas (Gómez-Ariza *et al.*, 2004). No entanto, deve-se ressaltar que, nenhum procedimento de preparo de amostras que desnatura a proteína deve ser empregado, uma vez que os metais estão associados às proteínas por ligações covalentes e a preservação desta interação é essencial para estabelecer informações confiáveis (Mounicou, Szpunar e Lobinski, 2009). Para a amostra de linhaça dourada, foco deste trabalho, é desejável extrair previamente a fase lipídica antes da extração proteica, pois se trata de uma matriz rica em gordura.

Neste sentido, um estudo sistemático foi desenvolvido para investigar como solventes orgânicos polares e não-polares podem interagir com a fase oleosa e influenciar a quantificação de metais ligados às proteínas. Os elementos estudados neste trabalho, cobre, ferro e zinco, são essenciais para todos os organismos vivos, com exceção de certas bactérias. Grande parte destes metais estão fortemente ligados a proteínas, na grande maioria enzimas, tendo a função de um co-fator catalítico em uma gama de atividades celular e extracelular (Davidson, Ke e Costa, 2007).

Neste capítulo, inicialmente determinou-se o teor total de gordura na linhaça dourada, empregando-se a extração pelo método Soxhlet utilizando solventes orgânicos de diferentes polaridades, como hexano e a mistura de metanol e

clorofórmio, uma vez que a facilidade de manuseio da amostra e a eficiência da extração proteica dependem da extração da fase oleosa.

Posteriormente, a presença de cobre, ferro e zinco ligados à matriz não oleosa da linhaça foi avaliada por comparação aos valores obtidos após a digestão assistida por radiação micro-ondas em forno com cavidade da amostra *in natura* e das amostras sem a fração lipídica. Para realizar tal procedimento de digestão, o método foi desenvolvido e validado conforme as recomendações do INMETRO (2011).

Finalmente, foi investigada a influência dos solventes hexano, metanol e clorofórmio na remoção da fase lipídica antes da etapa de extração proteica em amostras de linhaça para quantificar o teor proteico pelo método proposto por Bradford (1976). Nesta etapa também foi realizada a quantificação dos metais estudados por espectrometria de absorção atômica.

1.2. Revisão Bibliográfica

1.2.1. Linhaça: um alimento funcional

A alimentação equilibrada com quantidades suficientes de calorias e nutrientes é essencial para o bem-estar e a qualidade de vida (Szakály *et al.*, 2012). Os alimentos deixam de ser abordados simplesmente do ponto de vista nutricional e passam a ser vistos também pela sua composição química. A partir da relação entre nutrição e saúde, surge o conceito de “alimento funcional” (Betoret *et al.*, 2011), que podem ser classificados como substâncias capazes de induzir respostas metabólicas ao indivíduo, resultando em maior proteção e estímulo à saúde. São alimentos que aumentam a longevidade com qualidade de vida, uma vez que atuam promovendo o bem-estar dos indivíduos e previnem doenças (Roberfroid, 2002).

A legislação brasileira não define os alimentos como funcionais, mas emprega as terminologias de alegação de propriedade funcional e alegação de propriedade de saúde para caracterizar estes alimentos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (1999) dita que propriedade funcional é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico do componente presente no alimento que atua no crescimento, desenvolvimento, na manutenção e outras funções normais do organismo humano. Alega-se que propriedade de saúde é vinculada pela existência de uma relação entre o alimento ou o ingrediente nele presente com uma doença ou condição relacionada à saúde. Os alimentos que apresentarem alegações de propriedade funcional e/ou de saúde, devem ser, obrigatoriamente, registrados junto ao órgão competente.

Um dos alimentos considerados como funcional devido ao seu perfil único de nutrientes é a linhaça (*Linum usitatissimum* L.). Os principais produtores da semente são: Canadá, Argentina, Uruguai e Brasil. No Brasil, este cultivo é feito somente em uma parte do país, no município de Guarani de Missões, Rio Grande do Sul, por apresentar condições climáticas favoráveis. A região apresenta um clima frio, onde as temperaturas no inverno oscilam entre 0 e 2 °C, necessárias para a floração do linho. O plantio comercial em outros estados brasileiros é desconhecido, no entanto, pode existir também o cultivo doméstico deste produto (Perassoli, 2007;

IBGE, 2015).

O linho é uma planta pertence à família das Lináceas, ilustrado na Figura 1.1, cuja planta pode atingir até 120 cm de altura. Os caules são finos e eretos. As folhas de cor verde claro, possuem 2 a 4 cm de comprimento e 3 mm de largura. As flores são azuis claras ou brancas, de 1,5 a 2,0 cm de diâmetro, com cinco pétalas. O fruto é uma cápsula seca, de 5 a 9 cm de diâmetro, contendo 7 a 11 sementes planas e ovaladas com bordas pontiagudas. As sementes medem, tipicamente, cerca 2,5 x 5,0 x 1,5 mm, são planas, lisas, brilhantes e ovaladas com bordas pontiagudas. A cor das sementes depende da variedade da planta podendo ser marrom avermelhada ou amarela dourada (Flax Council of Canada, 2015).

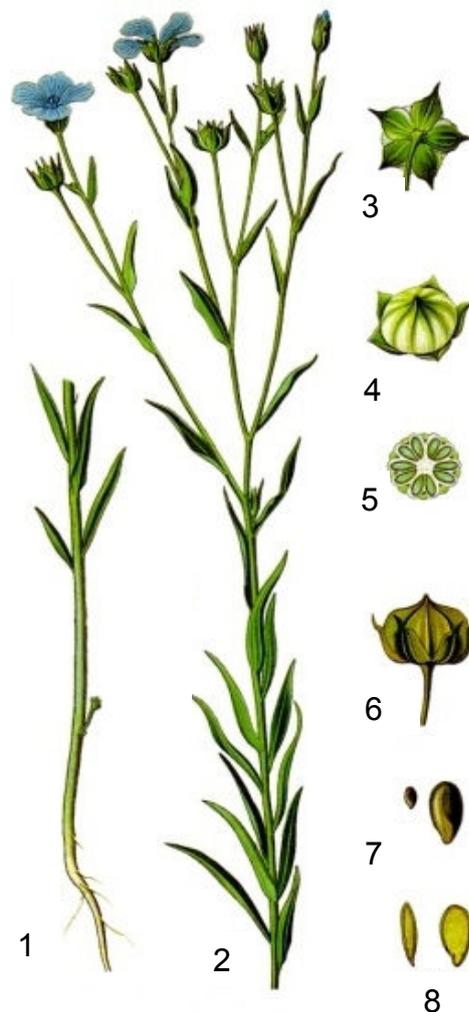


Figura 1.1. O linho e suas partes: 1 e 2) planta inteira, 3 e 4) fruta jovem vista por diferentes ângulos, 5) fruta jovem vista por uma secção transversal, 6) fruta madura, 7 e 8) semente marrom e dourada madura vistas por diferentes ângulos (adaptado de Hermann Adolph Köhler, 1887; Köhler, 1887).

A cultura do linho é antiga, sendo desenvolvido principalmente para fins

industriais e não alimentares. A fibra é usada tradicionalmente na indústria têxtil, podendo ser adicionadas fibras sintéticas para obter um material diferenciado (Harwood *et al.*, 2008). A indústria automobilística, por exemplo, está utilizando o linho e a linhaça combinados com biopolímeros para gerar materiais biodegradáveis (Barkoula, Garkhail e Peijs, 2010).

Somente nos últimos anos é que se observou um crescente interesse do uso de linhaça como alimento funcional (Ivanov, Rashevskaya e Makhonina, 2011). Além da semente inteira, outros subprodutos também são consumidos: farelo, óleo, extrato e cascas. O uso de cada um destes alimentos está associado a diferentes benefícios para a saúde (Shim *et al.*, 2014).

Quanto ao óleo da linhaça, seu teor varia entre 38 a 44% m m⁻¹ na semente (Oomah e Mazza, 1998). É composto de ácidos graxos contendo tipicamente ácido linolênico (52%), linoleico (17%), oleico (20%), palmítico (6%), e esteárico (4%). Também estão presentes lipídios menores e compostos lipossolúveis, como monoacilglicerídeos, diacilglicerídeos, tocoferóis, esteróis, fosfolipídios, ceras, ácidos graxos livres, carotenóides, clorofila, dentre outros (Green, 1986a).

No passado, este óleo foi usado principalmente para fins industriais, tais como a produção de tintas, linóleo, vernizes e cosméticos (Acikgoz, Onay e Kockar, 2004). Não é utilizado como óleo de cozinha pela sua baixa estabilidade oxidativa, ou seja, suas propriedades físico-químicas como acidez, densidade, viscosidade, teor de ésteres e índice de peróxido não são mantidas em longos períodos de estocagens (Choo, Birch e Dufour, 2007).

Como alimento funcional, o óleo de linhaça é consumido pela presença dos ácidos linoleico e α -linolênico. Cientistas australianos selecionaram uma nova variante genética, Linola™, com o teor de ácido linoleico acima de 65% e de ácido α -linolênico inferior a 2%, índices que melhoram a estabilidade oxidativa do produto em relação ao óleo convencional (Green, 1986b).

Os ácidos linoleico e α -linolênico são precursores do ômega-3 e ômega-6, respectivamente, importantes para o desenvolvimento do sistema nervoso central e auxiliam na prevenção de doenças cardiovasculares (Rodriguez-Leyva *et al.*, 2010) e determinados tipos de câncer (Caughey *et al.*, 1996). Atuam ainda na redução de processos inflamatórios e também doenças auto-imunes (Thies *et al.*, 2001).

Uma das partes da linhaça bastante utilizada é a semente. Ela contém,

aproximadamente, 1% m m⁻¹ de lignina secoisolariciresinol diglucosídeo (SDG), proporcionando efeitos antioxidantes (Hu, Yuan e Kitts, 2007) e sendo eficiente na inibição do desenvolvimento de diabetes (Hano *et al.*, 2013).

A semente também contém de 20 a 25% de fibras solúveis e insolúveis (Rabetafika *et al.*, 2011). A fibra solúvel, também conhecida como mucilagem, está presente no endosperma e é facilmente extraída com água quente (Cui *et al.*, 1994). Esta fibra solúvel inclui polissacarrídeos ácidos [L-ramnose (25%), L-galactose (12%), L-frutose (8,4%), e D-xilose (29%)] e neutros [L-arabinose (20%) e D-xilose/D-galactose (76%)] (Anderson e Lowe, 1947). A fibra insolúvel é composta por celulose (7-11%), lignina (2-7%) e a fibra em detergente ácido (10-14%), que é a porção de menor digestibilidade da parede celular (Cui *et al.*, 1994).

Idealmente, a proteína e/ou fibra resultante do fracionamento da semente de linhaça pode ser aplicada como um aditivo alimentar ou um ingrediente em alimentos processados (Mueller *et al.*, 2010). Kristensen e colaboradores (2013) compararam a ingestão da mucilagem com água com a ingestão da mesma quantidade de mucilagem misturada em massa de pães ao administrar em ratos. Os pesquisadores verificaram que, quando em jejum, ambas as formas de uso abaixaram os níveis do colesterol pelas lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e, após sete dias, o teor do colesterol total no sangue foi reduzido. Além disso, verificaram a redução de peso depois de alguns dias. Ao servir maiores quantidades de fibras nas refeições, a saciedade aumentou e os níveis de triglicerídeos no sangue reduziram. Já em seres humanos, segundo Bierenbaum, Reichstein e Watkins (1993) o consumo de 15 g de semente de linhaça por dia durante três meses resultou na redução de triglicerídeos e colesterol LDL, sem qualquer alteração no colesterol pelas lipoproteínas de alta densidade (HDL).

Ainda nas sementes, o teor proteico é influenciado por fatores genéticos e ambientais, podendo variar entre 21 a 48% m m⁻¹ (Oomah, 2001). Os aminoácidos essenciais encontrados são semelhantes em concentração e composição àqueles da soja (Oomah e Mazza, 1993), com maiores quantidades de arginina, ácido aspártico e ácido glutâmico (Oomah e Mazza, 1993).

A arginina, em especial, quando presente no endotélio vascular pode diminuir a pressão sanguínea. Marambe, Shand e Wanasundara (2008) avaliaram a administração de 200 mg de proteínas isoladas da linhaça em ratos hipertensos. Após

quatro horas de administração, os autores puderam observar que a pressão arterial foi efetivamente reduzida.

Recentemente, os peptídeos gerados da hidrólise das proteínas da linhaça estão sendo utilizados como ingredientes potenciais de formulações terapêuticas pelas suas propriedades funcionais e físico-químicas (Singh *et al.*, 2011).

Omoni e Aluko (2006) recuperaram os peptídeos das proteínas contidas na linhaça e demonstraram em um experimento *in vitro* alguns efeitos destas frações sobre a estrutura da calmodulina, proteína encontrada principalmente no encéfalo e coração. A calmodulina atua intermediando vários processos importantes, como metabolismo, contração do músculo liso, resposta a imunidade e movimento intracelular de curta e longa duração. Os autores verificaram a redução de atividade da enzima óxido nítrico sintetase, que é dependente da calmodulina.

Marambe, Shand e Wanasundara (2008) hidrolisaram as proteínas de semente de linhaça com a enzima Flavourzyme® e demonstraram a eliminação de radicais hidroxila e inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), sugerindo que os peptídeos fracionados podem atuar como agentes anti-oxidantes e anti-hipertensivos. A diminuição da atividade da ECA reduz o metabolismo da bradicinina, um polipeptídeo que dilata artérias e veias, diminuindo a pressão arterial. Udenigwe e colaboradores (2009) também confirmaram as atividades dos peptídeos produzidos como agentes antioxidantes, mas também demonstraram a potencialidade destas frações em processos anti-inflamatórios.

Visto a importância do assunto, é essencial obter a composição da linhaça em relação às proteínas e composição elementar. A relação dos constituintes inorgânicos com as proteínas permite analisar mais profundamente o comportamento dessas substâncias e a suas respectivas interações e funções no organismo (Reilly, 2002).

1.2.2. Proteínas associadas a metais

As proteínas são macromoléculas formadas por aminoácidos. Atualmente, são conhecidos vinte tipos diferentes de aminoácidos, todos possuindo um grupo carboxila e um grupo amino, ligados ao mesmo átomo de carbono α . Muitas proteínas

não contêm apenas aminoácidos, consideradas mais simples, mas algumas possuem outros componentes químicos permanentemente associados, sendo chamadas de proteínas conjugadas.

Esses outros constituintes, que se diferem dos aminoácidos, são nomeados grupo prostético e classificam as proteínas com base na sua natureza química. Por exemplo, as lipoproteínas contêm lipídeos; glicoproteínas, açúcares e metaloproteínas, um metal específico (Nelson e Cox, 2006). As metaloproteínas caracterizam-se pela alta afinidade da interação metal-proteína. As proteínas ligadas a metais constituem um grupo de proteínas em que há uma baixa afinidade da ligação metal-proteína e, por isso, essa ligação pode ser facilmente quebrada (Vallee, 1955).

Um indivíduo adulto contém cerca de 4 g de ferro, sendo que cerca de 3 g estão presentes nas metaloproteínas hemoglobina e mioglobina. Este elemento é essencial para todos os organismos vivos, com exceção de certas bactérias. Também é um componente essencial de várias enzimas, como por exemplo, o citocromo c e a catalase. Nestas enzimas, o ferro pode apresentar valência 2+ ou 3+, devido a reações redox necessárias para fornecer a energia necessária para catálise e síntese celular de moléculas grandes.

Quanto ao cobre, um adulto contém cerca de 100 mg deste metal. Desta quantidade, grande parte está fortemente ligada em aproximadamente vinte proteínas, na grande maioria enzimas, em que ele tem a função de um co-fator catalítico presente em uma gama de atividades celular e extracelular. Dentre estas substâncias, pode-se citar o citocromo c oxidase, envolvido na produção de adenosina trifosfato (ATP); a dismutase superoxidase, que funciona no metabolismo do oxigênio e a tirosinase, envolvida na produção do pigmento melanina. As enzimas contendo cobre também são envolvidas nas sínteses de muitos peptídeos e aminas neuroativas, como as catecolaminas. A manutenção de todas estas enzimas e suas atividades requer uma quantidade de cobre suficiente para que ele seja incorporado à sua estrutura.

Semelhante ao ferro em concentrações, e cerca de 200 vezes maiores do que o cobre, um adulto contém em seu corpo entre 1,5 e 2,5 gramas de zinco, sendo assim o terceiro metal mais abundante no organismo, essencial para mais de 200 enzimas em que 50 delas são importantes no metabolismo animal, promovendo a integridade estrutural em diversas proteínas. Proteínas contendo zinco estão envolvidas em processos de transcrição, se ligando com a dupla hélice de ácido

desoxirribonucleico (ADN) para iniciar a expressão do gene. A expressão de certos genes é conhecida por ser regulada pela quantidade de zinco absorvido a partir da dieta alimentar. Além disso, acredita-se que o zinco desempenha um papel na regulação do crescimento e diferenciação celular (Reilly, 2002).

Os metais realizam funções vitais para o funcionamento de uma série de proteínas e a investigação da relação de qualquer espécie metálica com as proteínas e, em destaque, as da linhaça dourada torna-se indispensável para compreender o comportamento dessas substâncias e a suas interações e funções nos organismos vivos.

1.2.3. Métodos analíticos para a extração de proteínas

A compreensão das atividades proteicas e enzimáticas permite que se esclareça um pouco mais o funcionamento de um sistema (Wilkins et al., 1996), incentivando pesquisas com o intuito de descrever o comportamento celular em nível proteômico (Wright et al., 2012).

A proteômica inclui conhecimentos e técnicas capazes de identificar um conjunto de proteínas produzidas por uma célula e também de revelar interações e interdependência dos processos biológicos. Seu estudo é um grande desafio, uma vez que a proteômica possui um caráter dinâmico e sujeito às condições específicas e temporais do ambiente (Mir, 2005).

Como procedimento proteômico, inicialmente as proteínas são separadas a partir do fracionamento de um extrato das células. Muitas técnicas estão disponíveis para a liberação do conteúdo celular, podendo-se citar a homogeneização mecânica, moagem e sonicação com ou sem tratamento de nitrogênio líquido. Dentre os métodos químicos destaca-se o uso de lise osmótica, detergentes e enzimas. A lise osmótica envolve a passagem de moléculas do solvente por uma membrana semipermeável e promove um aumento de pressão gerada pela entrada de solvente no interior da célula. Os detergentes solubilizam os lipídeos de membrana e as enzimas degradam a membrana celular.

Após a lise celular, o próximo passo é a extração proteica. Para isso, avalia-se a solubilidade das proteínas que é diretamente relacionada à sequência primária

dos aminoácidos, estrutura tridimensional e presença de grupamentos prostéticos. A solubilidade pode ser modificada por fatores como: pH, temperatura e força iônica. O pH afeta a distribuição das cargas, a temperatura favorece a solubilidade e a presença de íons em solução afeta as interações eletrostáticas intermoleculares proteína-proteína. O importante é que o método seja compatível com a quantidade de material a ser trabalhado e a técnica de análise que será utilizada (Cañas *et al.*, 2007).

Posteriormente à extração proteica, as proteínas podem ser purificadas e separadas em frações por centrifugação, diálise, cromatografia e eletroforese, para ao final serem analisados por espectrometria de massas (Liebler, 2002).

Dentre todas as etapas descritas para o estudo proteômico, uma atenção especial deve ser dada quando se deseja identificar íons metálicos ligados às proteínas. A integridade da ligação proteína-metal deve ser mantida com um protocolo de preparação da amostra eficaz, seguido de um procedimento de caracterização conveniente (de Magalhães e Arruda, 2007), pois a elucidação das respectivas funções biológicas e fisiológicas destas substâncias nos organismos vivos é fortemente dependente da interação metal-proteína (Tainer, Roberts e Getzoff, 1991; Haraguchi, 2004).

Essa a integridade de ligação metal-proteína deve ser mantida durante todo o preparo de amostra evitando procedimentos desnaturantes. A desnaturação proteica é resultante do desdobramento e da desorganização de sua estrutura tridimensional sem que ocorra hidrólise das ligações peptídicas. O resultado é uma mudança de conformação ao perturbar as interações que estabilizam boa parte desta estrutura.

Quando as proteínas estão desnaturadas, em geral, elas se tornam menos solúveis e, no caso das metaloproteínas, a ligação metal-proteína é rompida (Nelson e Cox, 2006).

A desnaturação proteica pode ocorrer nos métodos químicos usados tanto no rompimento celular como na solubilização (Helenius e Simons, 1975). O dodecil sulfato de sódio (SDS) ou 3-[(3-cholamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS), por vezes utilizados, rompem as membranas celulares e interações lipídio-proteína. Conseqüentemente, estes detergentes solubilizam proteínas contendo metais ligados e previnem interações hidrofóbicas. Outros reagentes contendo enxofre, como ditioneitol (DTT) e β -mercaptoetanol, reduzem as ligações de bissulfeto

e auxiliam o processo de desnaturação das proteínas (Liebler, 2002).

Quarles Jr. e colaboradores (2011) comprovaram experimentalmente o efeito de alguns reagentes no estudo das metaloproteínas. Estes pesquisadores determinaram o teor de ferro para relacionar a desnaturação da holo-transferrina humana sob diferentes condições: polaridade, pH, força iônica e hidrofobicidade. A máxima retenção de Fe^{3+} na proteína foi obtida em solução tampão Tris-HCl em pH 7,4. Com o uso de acetonitrila e metanol em meio aquoso em pH 7,4, essa retenção diminuiu para aproximadamente 70%. Quando o pH foi reduzido para 1,8 com ácido trifluoacético (TFA) nestes mesmos meios, a porcentagem de ferro presente na proteína foi nula. Para alterar a força iônica e a hidrofobicidade, guanidina-HCl e uréia foram adicionados, resultando na desnaturação e perda de Fe^{3+} .

Portanto, os métodos químicos devem ser utilizados com cautela, uma vez que alguns reagentes não são adequados para o estudo de metaloproteínas (Garcia, Magalhães e Arruda, 2006; Cañas *et al.*, 2007).

1.2.4. Extração proteica pelo método sequencial e em fase única

A extração química é um processo de separação e purificação de um soluto em que se adiciona um solvente ou uma solução imiscível à matriz e o soluto se distribui entre as duas fases de acordo com sua solubilidade (Rydberg, 2004).

Para as extrações proteicas, uma solução deve conter substâncias que auxiliem a solubilização do soluto e mantenham o pH constante durante o procedimento (Ahmed, 2004). Neste procedimento, diversas soluções tampão estão disponíveis em diferentes faixas de pH. Dentre os mais utilizados, pode-se citar o $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ em pH 5,8 a 8,0; Tris-HCl em pH 7,0 a 9,0 e HEPES-NaOH em pH 7,2 a 8,2.

O tampão Tris-HCl é bastante utilizado por simular as condições fisiológicas e pelo valor de pH ligeiramente alcalino. Além disso, o tampão Tris-HCl tem várias outras vantagens que o tornam útil na extração proteica, como apresentar elevada solubilidade em sistemas aquosos, não se ligar aos íons cálcio, magnésio, manganês ou chumbo, evitando interferência ou precipitação, ser quimicamente estável, ser facilmente disponível e possuir baixa higroscopicidade. No entanto, este tampão tem

um pKa dependente da temperatura, diminuindo a força da base com o aumento da temperatura (Ahmed, 2004).

Diferente da extração em fase única, no procedimento de extração sequencial a amostra sólida é submetida a diferentes solventes extratores, o que favorece a extração seletiva de frações específicas. Neste procedimento, utilizam-se diferentes agentes extratores, aumentando a extensão e a capacidade de interação com a matriz (Harvey, 2000). O fracionamento é influenciado por diversos fatores como o tipo de reagente usado, tempo de extração, a incompleta seletividade e readsorção, podendo ainda ser afetado por propriedades das espécies químicas, como tamanho, solubilidade, afinidade, hidrofobicidade e carga (Cornelis et al., 2004).

Osborne e Mendel (1914) isolaram as proteínas de milho de acordo a solubilidade em alguns solventes e as classificaram como albuminas aquelas extraídas pela água, globulinas por soluções salinas, prolaminas por soluções alcólicas e gluteínas por soluções básicas ou ácidas.

Utilizando este procedimento de extração sequencial, Chunhieng e colaboradores (2004) estudaram a distribuição de selênio nas frações de proteína da Castanha-do-Pará (*Bertholletia excelsa*) coletadas pela extração com água deionizada, cloreto de sódio, etanol e hidróxido de sódio. A fração extraída com água representou aproximadamente 18% m m⁻¹ da proteína total e foi a fração mais rica em selênio, com um valor de 153 mg L⁻¹.

Naozuka e Oliveira (2012) avaliaram os efeitos do cozimento doméstico de feijão (*Phaseolus vulgaris L.*) na distribuição de proteínas ligadas ao ferro. Os autores utilizaram a extração sequencial com diferentes agentes extratores: mistura de metanol e clorofórmio 1:2 v v⁻¹, água, cloreto de sódio, etanol e hidróxido de sódio, para extrair lipídeos, albuminas, globulinas, prolaminas e gluteínas, respectivamente. Os pesquisadores observaram que o ferro estava associado às altas concentrações de albuminas, globulinas e gluteínas encontradas em feijão cru, enquanto que em grãos cozidos, este elemento estava presente nos altos teores de albuminas e glutelinas. O cozimento afetou a distribuição de ferro nas diferentes classes de proteínas, principalmente na fração gluteína. O aquecimento foi capaz de promover a desnaturação da proteína, associação, dissociação de proteínas, inativação ou destruição de componentes anti-nutricionais e causar alteração da biodisponibilidade elementar.

1.2.5. Métodos analíticos para a determinação da concentração de proteínas

Após os procedimentos para a extração proteica, muitos métodos podem ser empregados para a determinação da concentração de proteínas totais, porém não existe um método considerado universal (Zaia, Zaia e Lichtig, 1998).

Os métodos mais utilizados para a determinação do teor proteico são: Biureto (Gornall, Bardawill e David, 1949), Lowry (Lowry *et al.*, 1951), Bradford (Bradford, 1976), BCA ou reagente de Smith (Smith *et al.*, 1985) e de absorção no ultravioleta (Deutscher, 1990).

O método de Bradford utiliza o corante de Azul de Coomassie (CBB) para a determinação de proteínas. Este corante pode ser encontrado em diferentes formas, R250 e G250, conforme ilustrado na Figura 1.2.

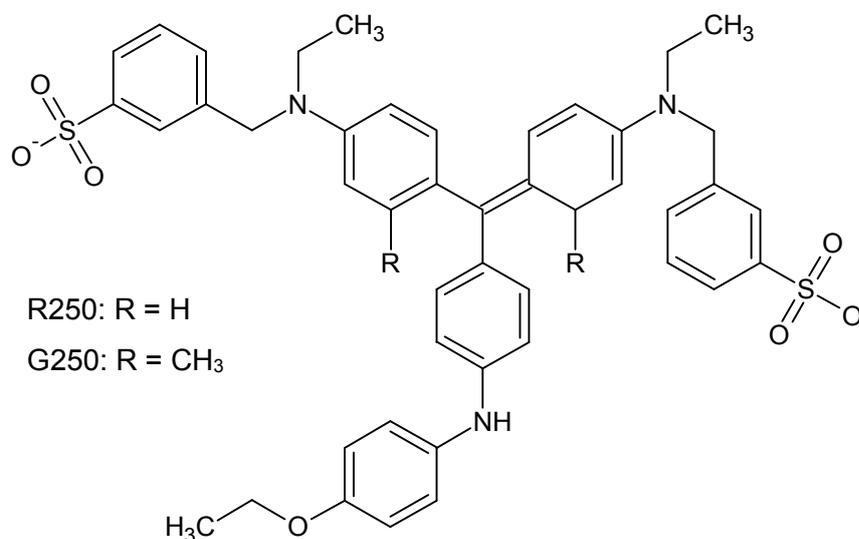


Figura 1.2. Estrutura do corante Azul de Coomassie R250 e G250

Tanto o CBB R250 como o G250 interagem com as macromoléculas de proteínas que contenham aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. Nesta reação, as moléculas dos corantes se alteram para a forma neutra e, posteriormente, para a forma aniônica. Este equilíbrio suprime a absorção nos comprimentos de ondas de 465 e 645 nm e forma-se um complexo azul bastante intenso que absorve fortemente em 595 nm, comprimento de onda no qual é realizada a leitura espectrofotométrica (Compton e Jones, 1985).

No método de Bradford, poucas substâncias são consideradas interferentes, dentre elas a uréia, o SDS e o β -mercaptoetanol. Estes interferentes reagem com as proteínas impedindo a reação com o corante CBB ou reagem com o corante causando aumento na absorbância (Bradford, 1976).

O método proposto por Smith e colaboradores (Smith *et al.*, 1985), também conhecido por método do ácido bicinconínico (BCA 4,4'-dicarboxi-2,2'-biquinolina), se baseia na reação de cobre(II) com proteínas, em meio alcalino, produzindo cobre(I) e um complexo com o BCA, que absorve fortemente na região de 560 nm. Neste método, tem-se a vantagem do preparo da amostra ser simples, rápido e tão sensível quanto o método de Lowry e colaboradores (Zaia, Zaia e Lichtig, 1998). Porém, algumas desvantagens podem ser citadas, como a dependência da temperatura de incubação das amostras (Jenzano *et al.*, 1986), variação da absorvidade específica para diferentes proteínas e variação da absorbância com o tempo. Os interferentes do método de BCA são as substâncias que reagem com os íons cobre (reações de óxido-redução, formação de complexos, precipitação) ou com o reativo do ácido bicinconínico (Zaia, Zaia e Lichtig, 1998).

Nesta parte do trabalho, os métodos espectrofotométricos empregando Bradford (Capítulo 1) e BCA (Capítulo 2) foram utilizados para determinar a concentração de proteínas em extratos de linhaça dourada. Estes métodos foram selecionados por apresentarem rapidez e facilidade de aplicação.

1.2.6. Determinação de teor de metais em alimentos

A fim de se conhecer o teor dos metais em alimentos, além da determinação proteica, vários métodos analíticos de preparo de amostras vêm sendo desenvolvidos na tentativa de reduzir o tempo total dos procedimentos e torná-los mais simples e seguros ao operador, acompanhando a evolução na área científica.

A substância de interesse deve ser transformada em uma forma apropriada para determiná-la sob a aplicação de uma técnica escolhida, exigindo, assim, um tratamento da amostra (Arruda e Santelli, 1997).

Os procedimentos de preparo necessitam de otimização tanto para redução de tempo, como também para diminuir os erros vindos de cada etapa da sequência

analítica (Ridgway, Lalljie e Smith, 2007).

Dentre os vários procedimentos de preparo de amostras sugeridos para determinar o teor total de metais em alimentos, o mais recomendado refere-se à digestão. Porém, a maneira de se decompor uma amostra depende da sua natureza, do analito que se quer determinar, assim como da sua concentração, do método de análise e, por fim, da precisão e veracidade desejada (Arruda e Santelli, 1997).

Para a digestão ácida, os fornos com radiação micro-ondas vêm sendo amplamente utilizados como uma alternativa eficaz aos procedimentos de digestão clássica (chapa de aquecimento e bloco digestor) (Bakkali *et al.*, 2009).

O aquecimento com a energia micro-ondas ocorre pela interação entre as micro-ondas e as moléculas e íons presentes na amostra. A radiação provoca um movimento das espécies em solução pela migração de íons e/ou rotações de dipolo, causadas pela alternância do campo eletromagnético. Dessa maneira, para que haja aquecimento é necessário que moléculas polares e íons estejam presentes em solução (Kingston e Jassie, 1988).

Os procedimentos assistidos por radiação micro-ondas geram resultados com melhor precisão quando comparados aos procedimentos convencionais em chapas de aquecimento ou blocos digestores, pois é uma técnica menos propensa à contaminação, minimizando perdas de analitos voláteis, empregando pequenos volumes de reagentes ácidos e reduzindo o tempo total de digestão, em relação aos outros métodos (Mello *et al.*, 2012).

Rodushkin, Engström e Sörlin (2008) determinaram o teor de 75 elementos em diferentes frutos e sementes usados como alimentos e disponíveis no mercado sueco (avelãs, nozes, amêndoas, amêndoas amargas, noqueira-pecã, castanha de caju, castanha do Brasil, pistache, pinhão, amendoim, coco, abóbora e girassol). O procedimento otimizado consistiu na digestão das amostras assistida por radiação micro-ondas usando ácido nítrico, seguido de quantificação por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). As concentrações obtidas foram comparadas com dados de rótulos dos produtos (quando disponível) e tabelas de composição de alimentos.

Ansari e colaboradores (2009) determinaram cádmio, chumbo e zinco por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite em 16 variedades de óleo de semente de girassol a partir da digestão ácida convencional (chapa de

aquecimento) e com radiação micro-ondas. O método proposto para a digestão ácida assistida por micro-ondas ofereceu maior facilidade para a análise de um grande número de amostras, uma vez que o tempo de preparo foi reduzido. Além disso, os resultados obtidos mostraram que todas as amostras apresentavam grandes quantidades de zinco.

Em outro trabalho, Smykalova e colaboradores (2010) empregaram a digestão assistida por radiação micro-ondas com o objetivo de investigar a tolerância e acúmulo de metais (cádmio e zinco) em amostras de linho por espectrometria de absorção atômica por chama. Para isso, aproximadamente 250 mg do material vegetal seco foram digeridos com 5 mL de ácido nítrico concentrado e 1 mL de peróxido de hidrogênio 30% v v⁻¹. Os resultados demonstraram que o aumento da concentração de cádmio e zinco estavam diretamente relacionados à concentração do metal no meio de cultura e, portanto, a planta possui uma evidente capacidade de acumulação destes analitos. Do ponto de vista de utilização da linhaça para a nutrição humana, este fato destaca alguns riscos de contaminação alimentar pela presença de cádmio, mas também relata a possibilidade de enriquecimento da linhaça com zinco por acumulação, podendo ser utilizada nos casos de deficiência nutricional.

Na semente e mesocarpo de babaçu, semente de sapucaia, polpa de coco, semente e polpa de cupuaçu e castanha de caju, vários metais (Al, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Sr e Zn), metalóides (B e Si), e não-metais (Cl, P e S) foram determinados por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). Para isso, a mistura oxidante de 2 mL de ácido nítrico, 1 mL de peróxido de hidrogênio e 3 mL de água foi utilizada em um forno de micro-ondas com cavidade, sendo esta eficiência de digestão confirmada pela baixa concentração de carbono residual. A precisão do método proposto foi confirmada pela análise do material de referência certificado de folhas de pêsego (NIST 1547), mostrando concordância com o resultado certificado, ao nível de confiança de 95%. Foi possível verificar que, as faixas de macro e micronutrientes presentes nas diferentes amostras não excederam o limite máximo de ingestão diária ideal, exceto para o manganês na polpa de coco (Naozuka *et al.*, 2011).

Pelos trabalhos citados, vê-se que a análise quantitativa da composição mineral dos alimentos se torna importante tanto nos estudos básicos e aplicados sobre a linhaça dourada.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo geral

Determinar o teor lipídico e a concentração dos metais cobre, ferro e zinco em amostras de linhaça dourada (*Linum usitatissimum L.*) e empregar procedimentos não desnaturantes para a extração de proteínas pelo método em etapa única utilizando solução tampão Tris-HCl e em modo sequencial em amostras de linhaça dourada para posterior determinação do teor proteico e concentração dos metais.

1.3.2. Objetivos específicos

- Desenvolver um método de digestão ácida assistida por radiação micro-ondas em amostras de linhaça dourada para a determinação de cobre, ferro e zinco por espectrometria de absorção atômica com chama;
- Determinar o teor de fase lipídica na amostra de linhaça dourada pela extração com Soxhlet;
- Aplicar o procedimento de digestão desenvolvido em amostras de linhaça *in natura* e sem fração lipídica, comparando os resultados obtidos;
- Aplicar o procedimento de digestão em diferentes amostras de linhaça dourada.
- Aplicar o procedimento de extração proteica pelo método sequencial utilizando como extratores água, cloreto de sódio, etanol e hidróxido de sódio;
- Avaliar a influência dos solventes orgânicos na etapa de remoção da fase lipídica para posterior extração de proteínas associadas a cobre, ferro e zinco;
- Aplicar o método de digestão de amostras de linhaça dourada nos resíduos gerados após extração proteica para a determinação de cobre, ferro e zinco por espectrometria de absorção atômica por chama;
- Correlacionar as concentrações de cobre, ferro e zinco associados às proteínas com o teor destes elementos obtidos nos resíduos gerados após extração proteica.

1.4. Parte experimental

1.4.1. Reagentes

Ácido nítrico e peróxido de hidrogênio utilizados foram reagentes de grau analítico (Merck, Darmstadt, Alemanha). Água deionizada pelo sistema Milli-Q® (18.2 MΩ cm, Millipore, Bellirica, Estados Unidos) foi usada para todas as diluições.

Para a construção de curvas analíticas, soluções de referência dos analitos preparadas a partir de diluições de soluções de referência de 1000,0 mg L⁻¹ (Titrisol® Merck, Darmstadt, Alemanha) foram usadas, obedecendo a faixa linear de cada elemento: cobre (0,1 – 0,25 mg L⁻¹), ferro (0,1 – 1,5 mg L⁻¹), e zinco (0,1 – 0,75 mg L⁻¹) para FS FAAS e 0,05 – 100 µg L⁻¹ para cobre, ferro e zinco para GFAAS, construídas no meio extrator avaliado.

Hexano, clorofórmio e metanol (Synth, São Paulo, Brasil) foram utilizados para a extração por Soxhlet e extração da fase lípica. O extrato proteico em solução tampão Tris-HCl foi preparado com ácido clorídrico (Merck, Darmstadt, Alemanha) e tris-hidroximetilaminometano (Synth, São Paulo, Brasil). Para a extração sequencial, utilizaram-se cloreto de sódio, hidróxido de sódio e etanol (Synth, São Paulo, Brasil).

O teor proteico nos extratos foi determinado pelo método de Bradford com o corante Azul de Coomassie (Bio Agency, São Paulo, Brasil) e com o padrão albumina de soro bovino (67 kDa) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA).

A digestão das amostras em forno de micro-ondas com cavidade foi realizada com ácido nítrico de grau analítico e peróxido de hidrogênio (Merck, Darmstadt, Alemanha).

1.4.2. Instrumentação

As amostras foram moídas em um liquidificador e secas a 40 °C na estufa Tecnal, modelo TE-394/I (São Paulo, Brasil) com renovação e circulação de ar.

A digestão ácida foi realizada em forno de micro-ondas com cavidade Milestone Ethos 1 (Soriso, Itália).

O teor de carbono residual foi determinado pelo Analisador de Carbono Orgânico Total SSM 5000A da Shimadzu (Kyoto, Japão). Cobre, ferro e zinco foram quantificados no espectrômetro de absorção atômica com chama em modo sequencial Varian AA240FS (Mulgrave, Austrália), equipado com sistema de correção de fundo por lâmpada de deutério. Para todos os elementos analisados as medidas de absorbância foram obtidas por lâmpadas de catodo-oco (HCL). A energia da lâmpada foi verificada e o comprimento de onda adequado para a análise de cada elemento foi selecionado. Os parâmetros instrumentais utilizados para os elementos estudados estão apresentados na Tabela 1.1.

Tabela 1.1. Parâmetros instrumentais utilizados para determinação de cobre, ferro e zinco por espectrometria de absorção atômica com chama sequencial (FS FAAS)

Parâmetros	Cu	Fe	Zn
Comprimento de onda (nm)	324,8	248,3	213,9
ar (L min ⁻¹)	13,5	13,5	13,5
Acetileno (L min ⁻¹)	2,0	2,0	2,0

A agitação foi realizada no agitador multifuncional TS-2000A VDRL Kline da Biomixer (Norwalk, Estados Unidos).

As determinações de cobre, ferro e zinco nos extratos proteicos e na fase lipídica foram realizadas no espectrômetro de absorção atômica por forno de grafite (AAAnalyst 600, Perkin-Elmer, Waltham, Estados Unidos) equipado com correção Zeeman. Foram injetados 20 µL de amostra no tudo de grafite com plataforma de L'vov utilizando o autoamostrador AS800 (Perkin-Elmer, Waltham, Estados Unidos). Argônio foi utilizado como gás de purga a 250 mL min⁻¹. As medidas foram baseadas na área de picos, obtidas utilizando lâmpadas de catodo oco. As energias das lâmpadas foram verificadas e foram selecionados os mesmos comprimentos de onda descritos para o FS FAAS na Tabela 1.1..

As medidas de absorbância no ultravioleta (UV) para a aplicação do método de Bradford foram conduzidas no espectrofotômetro UV-Vis Carry-100 da Varian (Santa Clara, Estados Unidos).

1.4.3. Amostragem

As seis diferentes marcas de linhaça dourada foram adquiridas no comércio local de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. As amostras foram moídas e secas em estufa a 40 °C até atingir peso constante, observando-se perda de apenas 2% m m⁻¹.

1.4.4. Determinação do teor de lipídios em linhaça dourada

O teor de fase lipídica na amostra de linhaça dourada foi avaliado pelo princípio de extração fracionada desenvolvido por Franz von Soxhlet (1879) com hexano. Porém, como o uso de um único solvente não é recomendável para a extração dos lipídios, foram utilizados clorofórmio e metanol como proposto por Bligh e Dyer (1959).

Portanto, para a extração da fase lipídica foram avaliados solventes com diferentes polaridades: hexano, mistura clorofórmio:metanol (2:1 v v⁻¹) e uso sequencial de hexano e da mistura clorofórmio:metanol (2:1 v v⁻¹).

Ao empregar o método adaptado da IUPAC (Paquot e Hautfenne, 1987), 60 g de linhaça dourada moída foi adicionada ao extrator Soxhlet e acoplou-se a ele um balão contendo um solvente ou uma combinação de solventes. Primeiramente, a extração foi realizada com a adição de apenas um extrator orgânico, hexano ou clorofórmio:metanol (2:1 v v⁻¹). Depois, outra estratégia avaliada foi o uso de hexano e clorofórmio:metanol (2:1 v v⁻¹) sequencialmente à amostra. Em todos os casos, o volume do extrator foi de 300 mL.

Ao extrator Soxhlet também se conectou um condensador de refluxo e manteve-se o sistema sob aquecimento para extração contínua por 12 horas (três a quatro gotas por segundo). Ao final, o produto sólido foi seco em estufa a 40 °C até massa constante. A massa perdida foi considerada a quantidade de lipídios presente na amostra.

1.4.5. Desenvolvimento de um método para a digestão das amostras de linhaça em forno de micro-ondas com cavidade

De maneira semelhante a Smykalova e colaboradores (2010), inicialmente 7,0 mL de ácido nítrico concentrado (65% m m⁻¹) juntamente com 1,0 mL de peróxido de hidrogênio 30% v v⁻¹ foram empregados para a digestão de 200 mg de material vegetal seco. Como estudo comparativo, o uso de 7,0 mL de ácido nítrico 50% v v⁻¹ foi avaliado como condição branda de oxidação. Em ambos os casos, as amostras de semente de linhaça dourada foram digeridas com 7,0 mL de solução ácida e 1,0 mL de peróxido de hidrogênio, volume mínimo exigido para utilização do sensor de temperatura do equipamento. O programa de aquecimento empregado para o procedimento está descrito na Tabela 1.2.

Tabela 1.2. Programa de aquecimento para a digestão da amostra de linhaça dourada em forno de micro-ondas com cavidade

Etapa	Rampa (min)	Patamar (min)	Temperatura (°C)
1	10	-	180
2	-	20	180
3	Ventilação até temperatura ambiente		

Após a execução do programa de aquecimento, os digeridos foram diluídos para um volume final de 25,0 mL com água deionizada, para posterior determinação de cobre, ferro e zinco por FS FAAS.

De posse dos teores obtidos para cada elemento nas digestões com ácido concentrado e diluído, foram aplicados testes t de *Student*, ao nível de 95% de confiança, a fim de verificar se o uso de ácido nítrico 50% v v⁻¹ foi suficiente para digerir toda a amostra, em comparação ao procedimento com o ácido concentrado.

Terminado este procedimento, as diferentes amostras sem fração lipídica geradas pela extração com hexano, mistura clorofórmio:metanol (2:1 v v⁻¹) e hexano seguida da mistura clorofórmio:metanol (2:1 v v⁻¹), descritas no item 1.4.4, foram submetidas à digestão ácida assistida por radiação micro-ondas em forno com cavidade para a determinação do teor de carbono orgânico total (COT) e dos metais cobre, ferro e zinco por FS FAAS, a fim de aferir sobre a ligação dos elementos

pesquisados com a parte não-lipídica da amostra. Após essa avaliação, fez-se a validação do método desenvolvido para a digestão de amostras de linhaça dourada avaliando as seguintes figuras de mérito: limites de detecção e quantificação, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e veracidade, de acordo com as normas estabelecidas pelo INMETRO (2011).

1.4.6. Aplicação do método desenvolvido para a digestão em amostras de linhaça dourada em forno de micro-ondas com cavidade

Seis diferentes marcas de linhaça dourada foram submetidas ao procedimento de extração da fase lipídica pelo método Soxhlet com hexano. O sólido sem a fração lipídica foi digerido por radiação micro-ondas utilizando o método desenvolvido e validado no item 1.4.5. A concentração de cobre, ferro e zinco foi determinada por FS FAAS.

1.4.7. Preparo dos extratos proteicos

i. Extração lipídica

Em 2,0 g de linhaça dourada moída foram adicionados 10,0 mL do solvente orgânico e manteve-se agitados durante 1 minuto por vortex, procedimento de extração mais versátil e eficiente quanto o método Soxhlet, adaptado pelo método proposto por Bligh e Dyer (1959), que não utiliza altas temperaturas. Com este procedimento, o teor da fase lipídica obtida foi semelhante aos resultados obtidos pela extração por Soxhlet. O sobrenadante foi então o extrato lipídico e o resíduo sem lipídios armazenados sob resfriamento.

O efeito de cada solvente orgânico utilizado e a sua combinação foi avaliada. Para isso, este procedimento de preparação da amostra foi primeiramente realizado com a adição de apenas um solvente orgânico, hexano ou clorofórmio:metanol (2:1 v v⁻¹). Em outro ensaio, hexano e clorofórmio:metanol (2:1 v v⁻¹) foram adicionados sequencialmente à amostra. Os solventes orgânicos, sozinhos

ou em sequência, foram adicionados em triplicata em cada amostra e, em seguida, os três extratos foram combinados. Nesta etapa, foram obtidos um material sólido, chamado resíduo sem lipídios e um extrato da fase lipídica.

ii. Extração proteica com solução tampão Tris-HCl

O resíduo sem lipídios e o extrato da fase lipídica obtidos no item 1.4.7 i foram submetidos à extração proteica utilizando como extrator a solução tampão Tris-HCl. Em ambas as partes, adicionaram-se 15,0 mL de solução tampão Tris-HCl 0,50 mol L⁻¹ em pH 7,2. A mistura foi mantida em contato por 1 h sob agitação de 200 rpm a 25 °C. Em seguida as misturas foram centrifugadas por 10 min a 3500 rpm.

Na extração proteica do resíduo sem lipídios, o sobrenadante foi recuperado a fim de se determinar o teor proteico pelo método de Bradford e a concentração de cobre, ferro e zinco por GFAAS. O sólido residual, após extração com tampão Tris-HCl, foi submetido à digestão ácida assistido por radiação micro-ondas, seguindo o método desenvolvido e validado no item 1.4.5, para a determinação de cobre, ferro e zinco por FS FAAS.

Para a extração proteica na fase lipídica, o sobrenadante aquoso foi coletado e foram quantificados o teor proteico pelo método de Bradford, além de cobre, ferro e zinco por GFAAS. O resíduo orgânico gerado foi evaporado para restar somente a fase oleosa. Esta fase foi digerida por forno de micro-ondas com cavidade, utilizando o método desenvolvido e validado no item 1.4.5, para a determinação de cobre, ferro e zinco por GFAAS.

Cobre, ferro e zinco foram quantificados por espectrometria de absorção atômica com chama ou forno de grafite, pois a determinação dependia da sensibilidade requerida para as medições dos analitos nas amostras.

iii. Extração proteica sequencial

Após a extração lipídica descrita no item 1.4.7 i, uma extração sólido-líquido sequencial adaptada da literatura (Naozuka e Oliveira, 2007) foi avaliada. Os resíduos sem lipídios gerados com hexano, clorofórmio:metanol (2:1 v v⁻¹) e hexano seguido de

clorofórmio:metanol (2:1 v v⁻¹) foram tratados sequencialmente com 10,0 mL de quatro soluções extratoras: água deionizada, solução de cloreto de sódio 0,50 mol L⁻¹, mistura água:etanol (30:70 v v⁻¹) e solução de hidróxido de sódio 0,50 mol L⁻¹. A mistura entre o sólido e cada extrator foi mantida em contato por 1 h sob agitação a 200 rpm a 25 °C. Após este período, realizou-se uma centrifugação por 10 min a 3500 rpm e os sobrenadantes foram recuperados para a determinação do teor proteico pelo método de Bradford e quantificação de cobre, ferro e zinco por GFAAS.

O esquema a seguir, apresentado na Figura 1.3, resume as etapas descritas no item 1.4.7.

1.4.8. Determinação do teor proteico pelo método de Bradford

Inicialmente, seis soluções padrão de albumina de soro bovino de concentrações entre 0,004 a 1,0 mg mL⁻¹ foram preparadas para obter a curva analítica que relacionasse absorvância e concentração proteica. Em seguida, retirou-se 100 µL de cada solução padrão e dos extratos proteicos, adicionando-se 5,0 mL da solução contendo o corante de Bradford. As misturas foram agitadas em um vortex e analisados em UV-Vis a 595 nm.

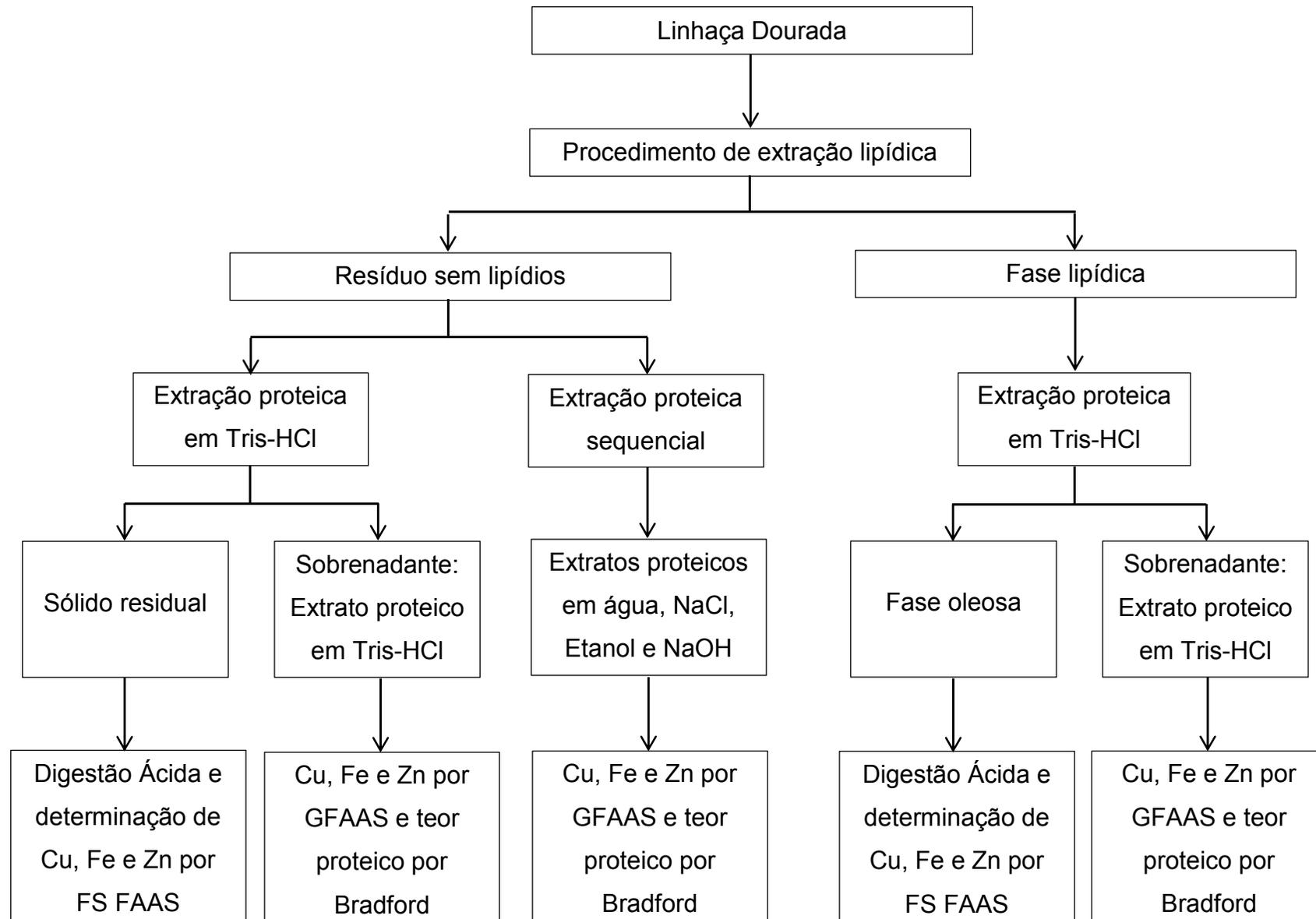


Figura 1.3. Resumo das etapas descritas no item 1.4.7

1.5. Resultados e discussão

1.5.1. Teor de lipídios e dos metais cobre, ferro e zinco em linhaça dourada ligada à fração não-oleosa

Com o objetivo de determinar o teor de lipídios, a linhaça dourada moída foi submetida a extração por Soxhlet usando três combinações de solvente: hexano, clorofórmio:metanol (2:1 v v⁻¹) e hexano seguido de clorofórmio:metanol (2:1 v v⁻¹). Os resíduos sólidos gerados foram secos em uma estufa a 40 °C até peso constante e, por subtração das massas iniciais, foi possível calcular o teor de lipídios na amostra.

Ao utilizar somente hexano pode-se extrair lipídios, polifenóis, alcalóides, alguns peptídeos lipossolúveis, e obteve-se um teor de 33,2% m m⁻¹ destes compostos na amostra, valor semelhante ao teor de gordura total descrito no rótulo do alimento (32% m m⁻¹). Na extração usando somente clorofórmio:metanol (2:1 v v⁻¹) o teor obtido foi de 42,2% m m⁻¹, enquanto que, utilizando os solventes hexano e clorofórmio:metanol (2:1 v v⁻¹) sequencialmente, o resultado foi de 45,4% m m⁻¹. A maior eficiência da extração sequencial é devido ao uso de solventes com polaridades diferentes. Com hexano, clorofórmio e metanol tornou-se possível extrair ainda aquelas substâncias associados às membranas celulares ou lipoproteínas de certa polaridade.

Os resultados obtidos com o uso de metanol e clorofórmio foram semelhantes aos descritos por Molena-Fernandez e colaboradores (2010), que avaliaram os efeitos do uso da farinha de linhaça dourada como suplemento alimentar sobre o perfil lipídico e a evolução ponderal em ratos. Ao utilizar estes mesmos solventes para a extração lipídica os autores encontram um teor total de 42% m m⁻¹.

Após avaliar o teor de lipídios, foi desenvolvido um método para a digestão das amostras de linhaça em forno de micro-ondas com cavidade e posterior determinação de Cu, Fe e Zn por FAAS. Para isto, cerca de 200 mg de linhaça dourada *in natura* moída foram digeridas com 7,0 mL de solução ácida e 1,0 mL de peróxido de hidrogênio em forno de micro-ondas com cavidade, sendo avaliado o uso

de ácido nítrico concentrado (65% m v⁻¹) e diluído (50% v v⁻¹). Sob as duas condições, as amostras foram totalmente digeridas, mas, o estudo foi direcionado para que, além de permitir melhor digestão, também fossem obtidas maiores concentrações dos metais analisados. As concentrações médias dos experimentos estão apresentadas na Tabela 1.3.

Tabela 1.3. Concentrações médias (mg kg⁻¹) e desvios padrão das digestões de amostras de linhaça *in natura* realizadas em ácido nítrico concentrado e diluído para cobre, ferro e zinco (n=3)

Metal	HNO ₃ concentrado	HNO ₃ diluído
Cobre	16,7 ± 0,5	17,7 ± 0,5
Ferro	75,5 ± 2,0	81,5 ± 2,6
Zinco	41,2 ± 1,2	50,0 ± 0,8

Ao aplicar o teste t de *Student* nos valores médios obtidos para cobre, ferro e zinco, a 95% de confiança, observou-se que os resultados obtidos para o ácido concentrado ou diluído não foram estatisticamente diferentes para ferro e zinco, mas foram para cobre. Para ferro e zinco, os teores obtidos foram maiores quando se utilizou o ácido diluído. Portanto, optou-se pelo uso de ácido nítrico diluído por ser uma condição mais branda, de menor consumo de reagente e, conseqüentemente, de melhores brancos analíticos.

A utilização de uma solução diluída do ácido nítrico leva a digestões eficientes, pois maiores quantidades de água estão presentes, uma molécula de momento de dipolo diferente de zero, que proporciona uma conversão eficiente de energia micro-ondas para um melhor aquecimento. O uso de soluções diluídas implicaria em uma melhor eficiência do aquecimento por micro-ondas, o que justifica os bons resultados obtidos (Kingston e Jassie, 1988). O uso de ácido nítrico diluído também promove digestões eficientes, devido ao processo de regeneração do HNO₃ a partir de NO e a sua conversão em NO₂ por ação do O₂, exercendo um efeito importante na oxidação da matéria orgânica (Flores, 2014).

Desta forma, foi estabelecida uma condição única de digestão para todos os elementos de interesse, que consistiu da utilização de 7,0 mL de ácido nítrico 50% v v⁻¹ acrescido de 1,0 mL de peróxido de hidrogênio 30% v v⁻¹, tempo de irradiação de 30 min e temperatura de 180 °C.

Uma vez que a concentração da mistura oxidante a ser utilizada no procedimento de digestão foi definida, pôde-se avaliar a presença dos metais ligados à matriz não oleosa da linhaça por comparação aos valores obtidos após a digestão da amostra *in natura* e amostras sem a fração lipídica geradas pela extração com hexano, clorofórmio:metanol (2:1 v v⁻¹) e hexano seguido de clorofórmio:metanol (2:1 v v⁻¹). Todas as amostras foram submetidas à digestão ácida sob as mesmas condições experimentais e os resultados estão ilustrados graficamente na Figura 1.4.

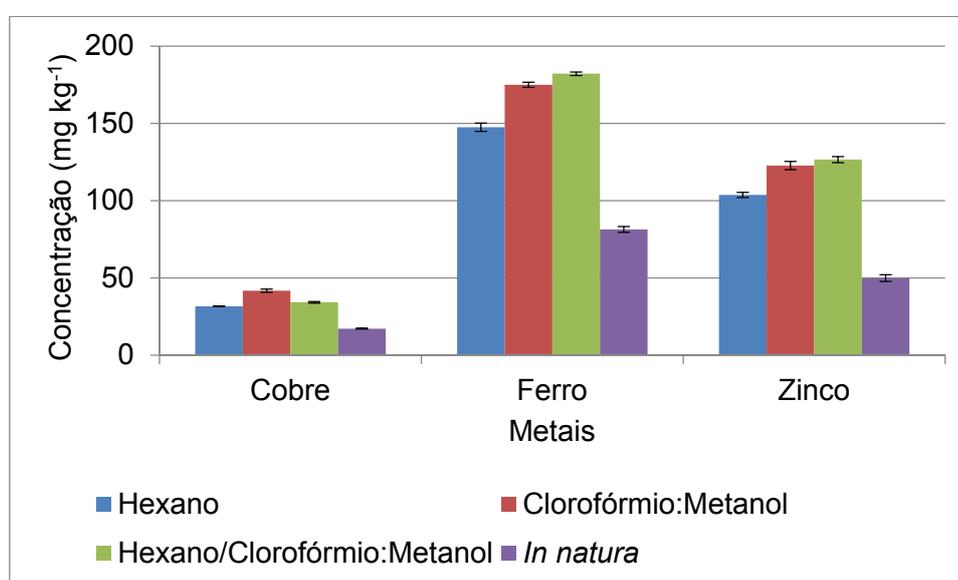


Figura 1.4. Concentração (mg kg⁻¹) e desvio padrão de cobre, ferro e zinco obtida após digestão ácida assistida por radiação micro-ondas da amostra de linhaça dourada *in natura* e sem fração lipídica após extração com hexano, clorofórmio:metanol (2:1 v v⁻¹) e hexano seguido de clorofórmio:metanol (2:1 v v⁻¹) (n = 3)

Pela Figura 1.4, pode-se observar que as maiores concentrações foram obtidas pela digestão ácida assistida por radiação micro-ondas em amostras de linhaça dourada sem a fração lipídica. Dentre as amostras que a fração oleosa foi retirada com clorofórmio:metanol (2:1 v v⁻¹) ou hexano seguido de clorofórmio:metanol (2:1 v v⁻¹) os resultados foram próximos.

A retirada da fase lipídica pode concentrar os metais na fase residual e diminuir o efeito de matriz na quantificação predominante na amostra *in natura*. Como houve uma diferença de concentração dos metais em relação aos tipos de matrizes digeridas, *in natura* e sem fração oleosa, determinou-se o teor de carbono residual nestas mesmas amostras. Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 1.5.

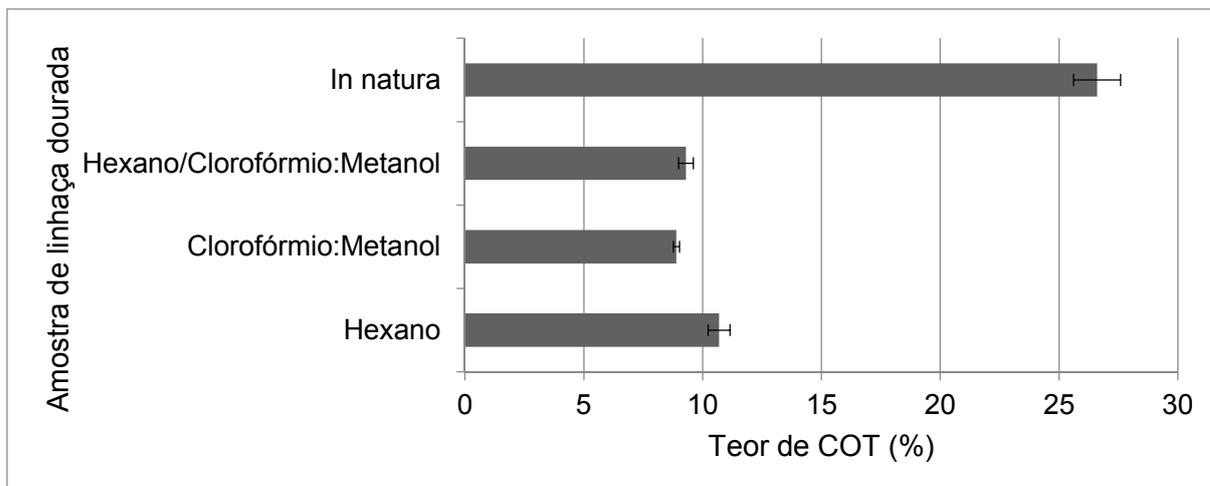


Figura 1.5. Teor de carbono orgânico residual (COT) (%) e desvio padrão obtido nos digeridos da amostra de linhaça dourada *in natura* e sem fração lipídica após extração com hexano, clorofórmio:metanol (2:1 v v⁻¹) e hexano seguido de clorofórmio:metanol (2:1 v v⁻¹) (n = 3)

O maior valor de carbono residual encontrado foi no digerido de linhaça dourada *in natura*, enquanto que para as amostras sem fração lipídica, o teor foi menor, como ilustrado na Figura 1.5. Desta forma, pôde-se inferir que a retirada prévia da fase lipídica, independente do extrator utilizado, resultou em digeridos com baixos teores de carbono orgânico residual.

Segundo Würfels, Jackwerth e Stoepler (1989), amostras que contenham altos teores de proteínas e gorduras produzem resíduos orgânicos que não são atacados pelo ácido nítrico caso a temperatura seja de até 180 °C, sendo necessário ao menos 300 °C. Porém, essa temperatura é inviável no sistema de radiação por micro-ondas, pois o frasco de perfluoroalcoxi (PFA) utilizado para a digestão se funde a 260 °C.

No caso da linhaça, ela possui gorduras contendo ácido linoleico (Begum *et al.*, 2004) que reage com o ácido nítrico e produzem o ácido 1,2-ciclopropanodicarboxílico, estável neste meio e permanecendo como resíduo ou carbono residual. A presença destes resíduos ainda pode ser justificada pelos outros produtos da decomposição de aminoácidos, que também podem permanecer nos digeridos (Würfels, Jackwerth e Stoepler, 1989).

Por estas razões, o procedimento de digestão assistida por radiação micro-ondas torna-se mais eficiente quando realizado na amostra sem um alto teor de

lipídios. A retirada da fase oleosa, seja pelo uso de hexano ou clorofórmio:metanol, permite uma melhor decomposição da amostra para posterior quantificação elementar.

Após essa avaliação, estabeleceu-se que para a digestão ácida assistida por radiação micro-ondas seguida da determinação de cobre, ferro e zinco em amostras de linhaça dourada, inicialmente seria retirada a fase lipídica com hexano ou clorofórmio:metanol, para depois, o sólido sem lipídios ser submetido à digestão. Este método desenvolvido foi então validado.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados através da análise de 7 replicatas de brancos analíticos, analisados no mesmo dia. O LD e o LQ foram calculados de acordo com as Equações 1.1 e 1.2 (INMETRO, 2011).

$$LD = X + t.s \quad (\text{Equação 1.1})$$

$$LQ = X + 10.s \quad (\text{Equação 1.2})$$

Onde

X = média das concentrações dos brancos

S = desvio das concentrações dos brancos

t = valor de t de *Student* tabelado para 95% de confiança

Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 1.4.

Tabela 1.4. Limites de detecção e quantificação ($\mu\text{g g}^{-1}$) de cobre, ferro e zinco por FS FAAS obtidos para a amostra de linhaça dourada digerida

Elemento	LD	LQ
Cobre	0,072	0,17
Ferro	0,051	0,15
Zinco	0,058	0,19

Os limites de detecção e quantificação variaram dependendo do metal analisado e estes resultados demonstram que a sensibilidade é satisfatória para este trabalho.

O grau de concordância mútua entre os resultados ao aplicar o método em uma série de medidas foi avaliado pela precisão por meio da repetitividade e precisão intermediária, sendo expressas pelo coeficiente de variação (INMETRO, 2011).

A repetibilidade e precisão intermediária foram avaliadas pela análise de 7 replicatas de digeridos de linhaça dourada sem a fase lipídica pelo mesmo analista, no mesmo equipamento, sob as mesmas condições de uso. A repetibilidade foi determinada em um único dia, enquanto que a precisão intermediária em três dias diferentes. Os valores dos coeficientes de variação obtidos na avaliação da precisão para as amostras digeridas de linhaça dourada foram entre 1,6 a 3,2% para cobre, ferro e zinco. De acordo com as normas estabelecidas pelo INMETRO (2010) são aceitáveis coeficientes de variação de até 10% para concentrações superiores a 100 ng g⁻¹ e, portanto, a precisão do método desenvolvido pode ser considerada satisfatória.

A veracidade do método desenvolvido foi confirmada por duas formas, uma pela utilização do material de referência certificado: farinha de trigo (NIST 1567a), uma semente, e a outra por ensaios de adição/recuperação em três níveis de concentração dentro da faixa linear adotada.

O material de referência certificado foi digerido pelo mesmo procedimento otimizado para as amostras de linhaça dourada. Ao determinar o teor de cobre, ferro e zinco por este método, os valores obtidos foram comparados aos certificados através dos testes F e t de *Student*, ao nível de 95% de confiança e pode-se verificar que não houve diferenças significativas.

O ensaio de adição/recuperação foi conduzido pela determinação dos teores de cobre, ferro e zinco em amostras de linhaça dourada sem a fase lipídica em que se adicionaram padrões antes do procedimento de digestão ácida otimizado. Os resultados obtidos nestas amostras foram comparados àquelas não fortificadas. Para todos os metais analisados, a porcentagem de recuperação alcançada foi maior que 90%, resultado que traduz a concordância com o valor verdadeiro da amostra e que comprovou a eficiência de digestão proposto para amostras de linhaça dourada.

1.5.2. Aplicação do método desenvolvido para a digestão em amostras de linhaça dourada em forno de micro-ondas com cavidade

Cerca de 200 mg de cada uma das seis marcas diferentes de linhaça

dourada sem fração lipídica gerada após extração com hexano foram digeridas para a determinação de cobre, ferro e zinco por FS FAAS. Este procedimento foi realizado em triplicata e os resultados estão ilustrados graficamente na Figura 1.6.

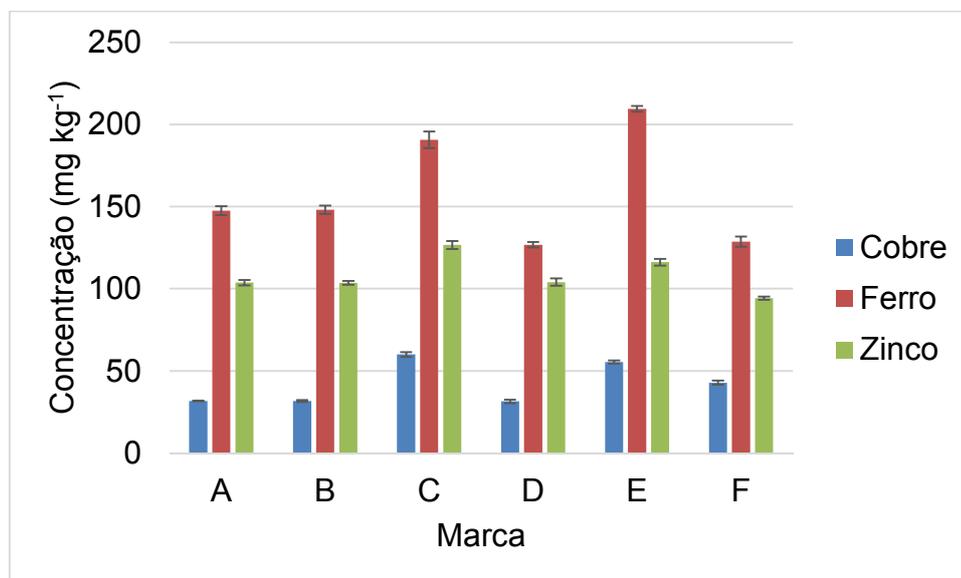


Figura 1.6. Concentração (mg kg^{-1}) e desvio padrão de cobre, ferro e zinco obtidas pela digestão ácida assistida com radiação por micro-ondas de seis marcas de linhaça dourada sem a fração lipídica ($n = 3$)

Para os digeridos das amostras de linhaça dourada sem a fração lipídica, pode-se perceber pelos dados ilustrados na Figura 1.6 que, a maior concentração foi de ferro, seguido de zinco e a menor de cobre.

Ferro é o segundo elemento mais abundante e está presente em quase todos alimentos e vegetais (Reilly, 2002). Sabe-se que a deficiência deste metal da dieta pode causar anemia principalmente na infância, adolescência e gravidez, períodos cujas necessidades nutricionais de ferro são altas (WHO, 2001). Segundo a OMS (1996a; WHO, 1996b; WHO, 2004), as necessidades diárias de ingestão desses nutrientes variam entre 2 a 10 mg por dia e com a ingestão de uma colher de sopa destas marcas de linhaça (aproximadamente 15 g) podem fornecer esta quantidade. No entanto, o grau de absorção destes elementos é altamente variável e depende das reservas do indivíduo e de outros componentes da dieta que facilitam a assimilação (Bothwell *et al.*, 1989).

Também pela Figura 1.6, nota-se que há uma variação entre as concentrações dos metais obtidas nas diferentes marcas. Possivelmente, estes

valores podem ser diferentes devido às condições de plantio, relacionadas ao solo e condições climáticas (Reilly, 2002).

1.5.3. Teor proteico nos extratos de linhaça dourada

Após a avaliação do teor total de cobre, ferro e zinco na linhaça dourada, foram aplicados os procedimentos de extração proteica sequencial e em fase única com solução tampão Tris-HCl. Porém, antes da extração proteica, a retirada da fase lipídica se faz necessária, uma vez que Bittencourt e colaboradores (2012) observaram experimentalmente, que o elevado teor de lipídios pode reduzir a extração das proteínas.

Os efeitos de diferentes solventes orgânicos no procedimento de retirada da fase lipídica sobre a extração proteica e determinação de cobre, ferro e zinco foram investigados ao realizar três procedimentos para a retirada da fração oleosa: o primeiro utilizando hexano, o segundo utilizando clorofórmio:metanol (2:1 v v⁻¹), e o terceiro, usando hexano seguido por clorofórmio:metanol (2:1 v v⁻¹).

Logo após a remoção da fase lipídica, o resíduo sem lipídios e o extrato da fase lipídica foram submetidos à extração proteica com o uso de uma solução tampão de Tris-HCl. Em outra etapa, um procedimento sequencial nos resíduos sem lipídios foi aplicado em quatro etapas sucessivas para identificar grupos de proteínas, tal como descrito por Osborne e Mendel (1914) e adaptado por Naozuka e Oliveira (2007).

O teor de proteínas foi determinado pelo método de Bradford (1976) a partir de uma alíquota dos sobrenadantes dos extratos proteicos em Tris-HCl e das soluções utilizadas no procedimento sequencial. Os resultados obtidos estão descritos na Figura 1.7 e Tabela 1.6.

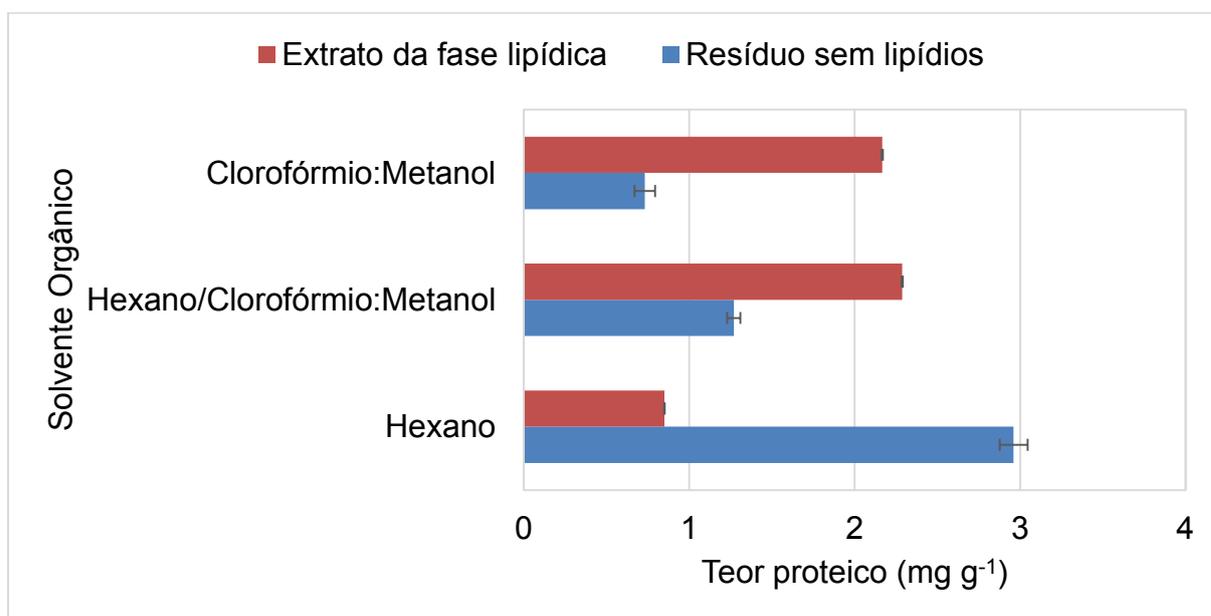


Figura 1.7. Teor proteico (mg g^{-1}) e desvio padrão em solução tampão Tris-HCl a partir do resíduo sem lipídios e no extrato da fase lipídica obtidos após remoção da fração oleosa com hexano, clorofórmio:metanol ($2:1 \text{ v v}^{-1}$) e hexano seguido de clorofórmio:metanol ($2:1 \text{ v v}^{-1}$) ($n = 3$)

A Figura 1.7 ilustra que o teor proteico no extrato em solução tampão Tris-HCl do resíduo sem lipídios variou entre 0,7 a 3 mg g^{-1} . Nestas frações, o maior teor proteico foi obtido quando se utilizou somente hexano, enquanto que, com o uso de metanol e clorofórmio, os valores foram menores.

Nos extratos em solução tampão Tris-HCl da fase lipídica, ocorreu o inverso: o teor foi menor com o uso de somente hexano, ao passo que, os valores foram maiores quando foram utilizados metanol e clorofórmio.

Sabe-se que os solventes orgânicos podem ser utilizados para proteger ou desnaturar proteínas. Por isso, é aconselhável escolher uma solução capaz de preservar a interação entre metais e proteínas durante a extração dos lipídios. De acordo com Asakura e colaboradores (1978), a extensão da desnaturação de proteínas é fortemente afetada pelo tipo de solvente utilizado. Para um grupo de solventes, incluindo álcoois e cetonas, a extensão de desnaturação é diretamente proporcional à concentração de proteína. Para outros solventes, tais como tolueno e clorofórmio foi observado apenas um efeito desnaturante, enquanto que, para solventes como formamida e pentano, não houve nenhum efeito de desnaturação em qualquer concentração proteica. O hexano, para estes pesquisadores, é classificado como um solvente orgânico adequado para preservar a ligação metal-proteína, não

trazendo efeitos de desnaturação.

Como a desnaturação proteica expõe regiões hidrofóbicas e aumentam a concentração de proteína nas frações orgânicas, os teores obtidos na extração de proteínas do resíduo sem lipídios com metanol e clorofórmio foram menores quando comparado com o hexano, porque tanto metanol e clorofórmio são solventes desnaturantes. Por outro lado, o hexano é um solvente não-desnaturante que promoveu maior eficiência de extração proteica na solução aquosa de Tris-HCl.

Vale a pena destacar que o procedimento de extração de proteínas utilizando a solução tampão de Tris-HCl é brando e diferente do método de Kjeldahl, por exemplo, em que é possível determinar o teor proteico total. Apesar disso, pela Figura 1.7 observou-se que após a remoção da fração oleosa com qualquer solvente extrator utilizado, a soma do teor proteico do resíduo sem lipídios com o do extrato da fase lipídica é de, aproximadamente, 4 mg g⁻¹ de proteína na linhaça dourada.

As proteínas da linhaça dourada sem lipídios também foram extraídas de forma sequencial para inferir sobre as frações albuminas, globulinas, prolaminas e gluteínas presentes na amostra. Os resultados são apresentados na Tabela 1.5.

Tabela 1.5. Teor proteico (mg g⁻¹) e desvio padrão em cada fração coletada na extração sequencial após a extração lipídica com hexano, clorofórmio:metanol (2:1 v v⁻¹) e hexano seguido de clorofórmio:metanol (2:1 v v⁻¹) (n = 3)

Extração lipídica	Fração			
	Água	NaCl	Etanol	NaOH
Hexano	2,9 ± 0,1	2,9 ± 0,1	0,18 ± 0,01	2,4 ± 0,1
Clorofórmio:Metanol	0,55 ± 0,02	1,7 ± 0,1	0,25 ± 0,01	2,5 ± 0,1
Hexano seguido de Clorofórmio:Metanol	0,91 ± 0,02	1,3 ± 0,1	0,28 ± 0,01	2,5 ± 0,1

Pela Tabela 1.5 pode ser visto que o teor de proteína foi de aproximadamente 3 mg g⁻¹ nas frações extraídas com água e NaCl quando apenas o hexano foi usado para a extração de fase lipídica, enquanto que quando metanol e clorofórmio foram utilizados o valor variou entre 0,5 a 1,7 mg g⁻¹. Os valores obtidos com o uso de hexano seguido de clorofórmio:metanol foram semelhantes aos obtidos com somente clorofórmio:metanol, demonstrando a influência destes solventes no processo de desnaturação da proteína e, tal como descrito antes, liberando baixo teor

de proteínas na solução aquosa.

Nas frações extraídas com etanol e NaOH os resultados foram semelhantes entre os três procedimentos de retirada da fase lipídica. Etanol e NaOH também são reagentes desnaturantes e, portanto, não importa se foram utilizados hexano, metanol ou clorofórmio anteriormente para remoção de fase oleosa, todas as proteínas se tornam inativas e serão igualmente solubilizadas nestes extratos proteicos.

Ao utilizar hexano para extração lipídica, albumina, globulina e glutelina foram as proteínas predominantes nas frações água, NaCl e NaOH, respectivamente, representando 34, 34 e 29% do conteúdo total de proteína extraída pelo procedimento sequencial, enquanto a prolamina, presentes na fração etanol, representou 2%.

Esta prevalência também foi relatada por Oomah e Mazza (1993) para amostras de linhaça. Os autores determinaram 25% de albuminas, 30% de glutelinas e 42% de globulinas. Para prolaminas, somente 4% foram solúveis na fração em etanol, devido à maior interação lipofílica com a matriz (Oomah, 2001).

E quando se comparou os resultados obtidos nas frações em água e NaCl com os obtidos após extração de Tris-HCl (Figura 1.7), foi possível verificar que, os valores foram semelhantes com o uso de hexano para a extração de fase lipídica, demonstrando a característica não desnaturante do solvente.

1.5.4. Determinação de cobre, ferro e zinco nas frações e resíduos gerados da extração proteica de linhaça dourada

A distribuição dos metais foi avaliada nas amostras de digeridos do sólido residual por FS FAAS, nos digeridos da fase oleosa (após evaporação do solvente) e sobrenadantes em água, NaCl, etanol e NaOH e Tris-HCl (gerados do resíduo sem lipídios e do extrato da fração lipídica) empregando GFAAS.

Inicialmente, os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados através da análise de 7 replicatas de brancos analíticos, analisados no mesmo dia e calculados de acordo com as Equações 1.1 e 1.2 (INMETRO, 2011). Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 1.6.

Tabela 1.6. Limites de detecção e quantificação ($\mu\text{g g}^{-1}$) de cobre, ferro e zinco por GFAAS obtidos nos meios extratores avaliados: Tris-HCl, água, NaCl, etanol e NaOH, em brancos analíticos do procedimento de digestão

Meio	Elemento	LD	LQ
Tris-HCl	Cobre	0,010	0,044
	Ferro	0,056	0,18
	Zinco	0,026	0,073
Água	Cobre	0,0086	0,034
	Ferro	0,015	0,052
	Zinco	0,019	0,036
NaCl	Cobre	0,010	0,042
	Ferro	0,012	0,025
	Zinco	0,024	0,048
Etanol	Cobre	0,011	0,045
	Ferro	0,034	0,082
	Zinco	0,021	0,062
NaOH	Cobre	0,011	0,048
	Ferro	0,057	0,16
	Zinco	0,022	0,042
Digeridos	Cobre	0,0081	0,032
	Ferro	0,041	0,11
	Zinco	0,030	0,10

Estes resultados demonstram que a sensibilidade é satisfatória para este trabalho.

Posteriormente, a digestão ácida assistida por radiação micro-ondas foi realizada no resíduo sólido sem lipídios e fase oleosa. Os resultados estão descritos nas Tabelas 1.7 e 1.8.

Tabela 1.7. Concentração (mg kg^{-1}) e desvio padrão de cobre, ferro e zinco na fase oleosa, no sólido residual e nos sobrenadantes em Tris-HCl, após o procedimento de extração lipídica ($n = 3$)

Extração da fase lipídica	Metal	Fase oleosa	Sólido residual	Sobrenadante Tris-HCl	
				Resíduo sem lipídios	Extrato fase lipídica
Hexano	Cobre	<LQ	$25,3 \pm 0,3$	$2,3 \pm 0,1$	<LQ
	Ferro	$0,44 \pm 0,02$	176 ± 4	$2,7 \pm 0,1$	$0,44 \pm 0,02$
	Zinco	$3,7 \pm 0,1$	$88,0 \pm 4,4$	$1,2 \pm 0,1$	$3,9 \pm 0,1$
Clorofórmio:Metanol	Cobre	$1,2 \pm 0,1$	$36,3 \pm 0,9$	$1,3 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$
	Ferro	$5,8 \pm 0,1$	162 ± 3	$0,85 \pm 0,01$	$5,8 \pm 0,1$
	Zinco	$4,0 \pm 0,2$	112 ± 4	$0,79 \pm 0,01$	$4,0 \pm 0,2$
Hexano seguido de Clorofórmio:Metanol	Cobre	$1,2 \pm 0,1$	$28,7 \pm 0,6$	$1,3 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$
	Ferro	$4,6 \pm 0,1$	165 ± 1	$0,91 \pm 0,1$	$4,6 \pm 0,1$
	Zinco	$3,9 \pm 0,1$	110 ± 3	$0,77 \pm 0,1$	$3,9 \pm 0,1$

Os resultados da Tabela 1.7 demonstram que, no sobrenadante obtido após a extração proteica com solução tampão Tris-HCl, as concentrações dos metais foram maiores nas soluções geradas depois da extração lipídica com hexano, reafirmando os benefícios do uso de um solvente orgânico não-desnaturante. Por outro lado, para a fração oleosa, as maiores concentrações foram obtidas ao utilizar solventes orgânicos desnaturantes como extratores da fase lipídica. Neste caso, a interação metal-proteína é rompida e o metal, por também ter afinidade pelo solvente polar, permanece nesta fração, o que justifica os teores obtidos nesta fase.

Também pela Tabela 1.7 é possível observar que a solução tampão Tris-HCl tem uma eficiência limitada sobre a extração dos metais, uma vez que a concentração obtida não foi elevada.

Como todo o procedimento de extração foi realizado a temperatura ambiente na tentativa de preservar a ligação entre a proteína e o metal, pode-se estimar a associação do metal com as proteínas em amostras de linhaça. Para isso, os resíduos sem lipídios foram submetidos à digestão ácida assistida por radiação micro-ondas. Este resíduo sem lipídios, a fase oleosa foi retirada e ele não foi submetido à extração proteica. A concentração de cobre, ferro e zinco descrita na

Figura 1.4 obtida após digestão ácida assistida por radiação micro-ondas da amostra de linhaça dourada sem fração lipídica após extração com hexano pode ser comparada à soma dos valores obtidos no sólido residual, fase oleosa e sobrenadante em Tris-HCl após a extração proteica, descritos na Tabela 1.7, a fim de estudar o grau de proximidade entre os resultados obtidos. Esta comparação é apresentada na Tabela 1.8.

Tabela 1.8. Concentração (mg kg^{-1}) e desvio padrão de cobre, ferro e zinco na amostra de linhaça dourada e na soma do sólido residual, fase oleosa e sobrenadante em Tris-HCl após extração proteica. Todos os resultados foram obtidos após extração lipídica com hexano, clorofórmio:metanol (2:1 v v⁻¹) e hexano seguido de clorofórmio:metanol (2:1 v v⁻¹) (n = 3)

Extração da fase lipídica	Metal	Amostra	Soma
Hexano	Cobre	31,7 ± 0,3	27,6 ± 0,4
	Ferro	182 ± 1	179 ± 4
	Zinco	103 ± 1,6	96,7 ± 4,4
Clorofórmio:Metanol	Cobre	41,7 ± 1,0	39,9 ± 1,0
	Ferro	175 ± 2	174 ± 3
	Zinco	123 ± 2,7	121 ± 4
Hexano seguido de Clorofórmio:Metanol	Cobre	34,2 ± 0,6	32,5 ± 0,3
	Ferro	182 ± 1	175 ± 1
	Zinco	127 ± 2,0	119 ± 3

Ao aplicar o teste t de *Student* entre os dois grupos de valores obtidos (amostra e soma), a 95% de confiança, foi possível inferir que os resultados não foram estatisticamente diferentes, demonstrando boa exatidão dos métodos propostos para a extração metálica.

Os teores de cobre, ferro e zinco nos extratos em Tris-HCl foram maiores quando se utilizou hexano para a retirada da fase lipídica. Com o uso deste solvente, têm-se a expectativa de manter a interação metal-proteína na extração lipídica, aumentando-se a concentração dos metais na fase aquosa. Este fato não foi observado quando se utilizou clorofórmio e metanol.

Os metais cobre, ferro e zinco também foram quantificados por GFAAS nas soluções obtidas após o processo de extração sucessiva, utilizando a água, solução de NaCl, etanol e NaOH e os resultados são mostrados na Figura 1.8.

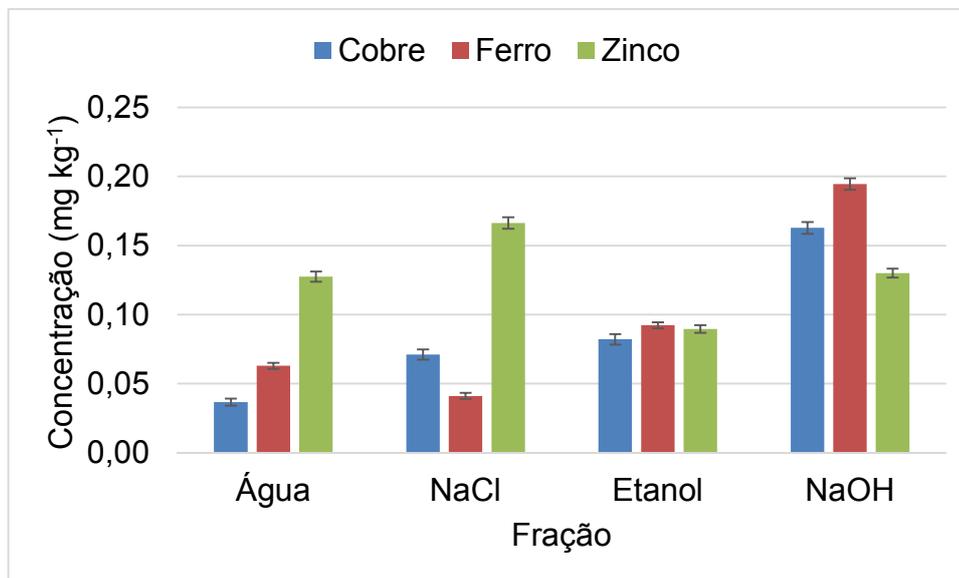


Figura 1.8. Concentração (mg kg⁻¹) e desvio padrão de cobre, ferro e zinco em cada fração coletada na extração sequencial após extração lipídica com hexano (n = 3)

Pela Figura 1.8 observou-se que os valores obtidos em água e NaCl foram semelhantes. A fração de globulina, extraída com NaOH, contém teores mais altos dos metais, enquanto as prolaminas, extraídas com etanol, contém concentrações mais baixas em comparação com as globulinas.

Uma vez que o hexano possivelmente mantém a interação proteína-metal, torna-se possível relacionar a presença de cobre, ferro e zinco com as proteínas da semente de linhaça dourada extraídas após o procedimento de extração sequencial.

1.6. Conclusões parciais

Neste capítulo o teor total de lipídios na linhaça dourada foi determinado na extração pelo método Soxhlet empregando solventes de diferentes polaridades. Os valores dos teores de gordura obtidos foram semelhantes aos descritos pelo rótulo do produto analisado e pela literatura.

Os teores dos metais cobre, ferro e zinco na linhaça foram determinados por FS FAAS após a digestão da amostra em forno de micro-ondas com cavidade empregando-se ácido nítrico diluído. Além de produzir digeridos límpidos e com baixos percentuais de carbono residual, os digeridos apresentam uma menor acidez residual e podem ser introduzidos diretamente no equipamento sem diluições adicionais.

A influência da fase lipídica no procedimento de digestão foi avaliada a partir da decomposição de amostras após retirada da fração oleosa. O teor de carbono residual e as concentrações de cobre, ferro e zinco nestes digeridos foram comparados aos resultados da digestão de amostras *in natura* e verificou-se que o processo foi mais eficiente nas amostras sem a fração oleosa. As proteínas e gorduras presentes na linhaça não foram eficientemente destruídas nas condições operacionais empregadas no forno micro-ondas, ou seja, temperatura de 180 °C na presença de ácido nítrico diluído.

Foram analisadas seis diferentes marcas de linhaça dourada sem fração lipídica. Apesar da concentração variar entre as diferentes marcas, pode-se perceber que a maior concentração foi de ferro, seguido de zinco, com o cobre alcançando sempre a menor concentração.

O teor total de proteínas nos extratos gerados a partir dos resíduos sem lipídios foi maior quando se retirou a fração oleosa com hexano, enquanto que, quando se utilizou clorofórmio e metanol, o valor foi menor. Como clorofórmio e metanol são solventes desnaturantes, regiões hidrofóbicas são expostas e aumentam assim a concentração de proteína nas frações orgânicas. Já com o hexano, um solvente não-desnaturante, a fase lipídica foi primeiramente retirada e promoveu maior eficiência de extração proteica na solução tampão Tris-HCl.

Os teores de cobre, ferro e zinco nos sólidos residuais obtidos após

extração lipídica e proteica foram semelhantes, independente do solvente utilizado para o procedimento de retirada da fase oleosa. As concentrações dos metais foram maiores nos sobrenadantes obtidos após a extração de proteínas com solução tampão Tris-HCl dos resíduos sem lipídios gerados após o uso de hexano como extratores da fase lipídica, reafirmando os benefícios do uso de um solvente orgânico não-desnaturante. Para a fração oleosa, as maiores concentrações foram obtidas ao utilizar solventes orgânicos desnaturantes, pois a interação metal-proteína é rompida e o metal, por ter grande afinidade pelo solvente polar, permanece nesta fração.

Também com o uso de hexano tornou-se possível relacionar a presença de albuminas e globulinas no tampão Tris-HCl com cobre, ferro e zinco. No processo sequencial, todos os metais estudados estavam presentes nas frações recolhidas.

1.7. Referências bibliográficas

ACIKGOZ, C.; ONAY, O.; KOCKAR, O. M. Fast pyrolysis of linseed: product yields and compositions. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, v. 71, n. 2, p. 417-429, 2004.

AHMED, H. Principles and Reactions of Protein Extraction, Purification, and Characterization. CRC Press, 2004. 408, p.

ANDERSON, E.; LOWE, H. J. The composition of flaxseed mucilage. *Journal of Biological Chemistry*, v. 168, n. 1, p. 289-297, 1947.

ANSARI, R. *et al.* Variation in accumulation of heavy metals in different varieties of sunflower seed oil with the aid of multivariate technique. *Food Chemistry*, v. 115, n. 1, p. 318-323, 2009.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Brasília: Diário da República Federativa do Brasil 1999b.

ARRUDA, M. A. Z.; SANTELLI, R. E. Mecanização no preparo de amostras por micro-ondas: o estado da arte. *Química Nova*, v. 20, p. 638-643, 1997.

ASAKURA, T.; ADACHI, K.; SCHWARTZ, E. Stabilizing effect of various organic solvents on protein. *Journal of Biological Chemistry*, v. 253, n. 18, p. 6423-6425, 1978.

BAKKALI, K. *et al.* Characterization of trace metals in vegetables by graphite furnace atomic absorption spectrometry after closed vessel microwave digestion. *Food Chemistry*, v. 116, n. 2, p. 590-594, 2009.

BARKOULA, N. M.; GARKHAIL, S. K.; PEIJS, T. Biodegradable composites based on flax/polyhydroxybutyrate and its copolymer with hydroxyvalerate. *Industrial Crops and*

Products, v. 31, n. 1, p. 34-42, 2010.

BEGUM, A. N. *et al.* Dietary lignins are precursors of mammalian lignans in rats. *Journal of Nutrition*, v. 134, n. 1, p. 120-127, 2004.

BETORET, E. *et al.* Functional foods development: Trends and technologies. *Trends in Food Science and Technology*, v. 22, n. 9, p. 498-508, 2011.

BIERENBAUM, M. L.; REICHSTEIN, R.; WATKINS, T. R. Reducing atherogenic risk in hyperlipemic humans with flax seed supplementation: a preliminary report. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 12, n. 5, p. 501-504, 1993.

BITTENCOURT, L. M. *et al.* Determinação de Cu, Fe, Mn, Zn e do teor de proteína total em amostras de trigo e soja após procedimento de extração sequencial. *Química Nova*, v. 35: p. 1922-1926, 2012.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BOTHWELL, T. H. *et al.* Nutritional iron requirements and food iron absorption. *Journal of Internal Medicine*, v. 226, n. 5, p. 357-365, 1989.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CAUGHEY, G. E. *et al.* The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 63, n. 1, p. 116-122, 1996.

CAÑAS, B. *et al.* Trends in sample preparation for classical and second generation proteomics. *Journal of Chromatography A*, v. 1153, n. 1-2, p. 235-258, 2007.

CHOO, W. S.; BIRCH, E. J.; DUFOUR, J. P. Physicochemical and stability characteristics of flaxseed oils during pan-heating. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 84, n. 8, p. 735-740, 2007.

CHUNHIENG, T. *et al.* Study of selenium distribution in the protein fractions of the Brazil nut, *Bertholletia excelsa*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, n. 13, p. 4318-4322, 2004.

COMPTON, S. J.; JONES, C. G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry*, v. 151, n. 2, p. 369-374, 1985.

CORNELIS, R. *et al.* Handbook of Elemental Speciation: Techniques and Methodology. Wiley, 2004.

CUI, W. *et al.* Optimization of an Aqueous Extraction Process for Flaxseed Gum by Response Surface Methodology. *Food Science and Technology*, v. 27, n. 4, p. 363-369, 1994.

DAVIDSON, T.; KE, Q.; COSTA, M. Chapter 5 - Selected Molecular Mechanisms of Metal Toxicity and Carcinogenicity. Em: *Handbook on the Toxicology of Metals*. Nordberg, G. F.; Fowler, B. A.; Nordberg, M.; Friberg, L. T. (Editores). 3 ed., p. 79-100. Burlington: Academic Press. 2007.

DE MAGALHÃES, C. S.; ARRUDA, M. A. Z. Sample preparation for metalloprotein analysis: A case study using horse chestnuts. *Talanta*, v. 71, n. 5, p. 1958-1963, 2007.

DEUTSCHER, M. P. Guide to protein purification. Gulf Professional Publishing, 1990.

Flax Council of Canada. 2015. Disponível em: <
<http://www.flaxcouncil.ca/english/index.jsp?p=growing2&mp=growing>>. Acesso: 29 de julho de 2015.

FLORES, E. M. M. (Editor) Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element

Determination. Oxford: Elsevier Science, 2014. 416, p.

GARCIA, J. S.; MAGALHÃES, C. S. D.; ARRUDA, M. A. Z. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. *Talanta*, v. 69, n. 1, p. 1-15, 2006.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 177, p. 751-766, 1949.

GREEN, A. G. A Mutant genotype of flax (*Linum usitatissimum* L.) containing very low levels of linolenic acid in its seed oil. *Canadian Journal of Plant Science*, v. 66, n. 3, p. 499-503, 1986a.

_____. Genetic control of polyunsaturated fatty acid biosynthesis in flax (*Linum usitatissimum*) seed oil. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 72, n. 5, p. 654-661, 1986b.

GÓMEZ-ARIZA, J. L. *et al.* Use of mass spectrometry techniques for the characterization of metal bound to proteins (metallomics) in biological systems. *Analytica Chimica Acta*, v. 524, n. 1-2, p. 15-22, 2004.

HANO, C. *et al.* Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) extract as well as (+)-secoisolariciresinol diglucoside and its mammalian derivatives are potent inhibitors of α -amylase activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 23, n. 10, p. 3007-3012, 2013.

HARAGUCHI, H. Metallomics as integrated biometal science. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 19, n. 1, p. 5-14, 2004.

HARVEY, D. *Modern Analytical Chemistry*. McGraw-Hill, 2000, 798, p.

HELENIUS, A.; SIMONS, K. Solubilization of membranes by detergents. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 415, n. 1, p. 29-79, 1975.

HARWOOD, J. *et al.* Evaluation of flax accessions for high value textile end uses. *Industrial Crops and Products*, v. 27, n. 1, p. 22-28, 2008.

HU, C.; YUAN, Y. V.; KITTS, D. D. Antioxidant activities of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglucoside, its aglycone secoisolariciresinol and the mammalian lignans enterodiol and enterolactone in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, v. 45, n. 11, p. 2219-2227, 2007.

HYVÄRINEN, H. K. *et al.* Effect of Processing and Storage on the Stability of Flaxseed Lignan Added to Bakery Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 1, p. 48-53, 2005.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA. 2015. Disponível em: < <http://www.sidra.ibge.gov.br/> >. Acesso dia 21 de abril de 2015.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia e Normatização e Qualidade Industrial. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos; DOQ-CGCRE-008, 2010.

_____. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos; DOQ-CGCRE-008, 2011.

IVANOV, S.; RASHEVSKAYA, T.; MAKHONINA, M. Flaxseed additive application in dairy products production. *Procedia Food Science*, v. 1, n. 0, p. 275-280, 2011.

JENZANO, J. W. *et al.* Comparison of five techniques for the determination of protein content in mixed human saliva. *Analytical Biochemistry*, v. 159, n. 2, p. 370-376, 1986.

KINGSTON, H. M.; JASSIE, L. B. Introduction to Microwave Sample Preparation: Theory and Practice. American Chemical Society, 2 ed. 1988, 263, p.

KRISTENSEN, M. *et al.* Linseed dietary fibers reduce apparent digestibility of energy and fat and weight gain in growing rats. *Nutrients*, v. 5, n. 8, p. 3287-3298, 2013.

KÖHLER, HERMANN ADOLPH. Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte. Atlas zur Pharmacopoea germanica, austriaca, belgica, danica, helvetica, hungarica, rossica, suecica, Neerlandica, British pharmacopoeia, zum Codex medicamentarius, sowie zur Pharmacopoeia of the United States of America, 1887.

LIEBLER, D. C. Introduction to Proteomics. Tools for the new biology. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2002. 198, p.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MARAMBE, P. W. M. L. H. K.; SHAND, P. J.; WANASUNDARA, J. P. D. An *in-vitro* investigation of selected biological activities of hydrolysed flaxseed (*Linum usitatissimum L.*) proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 85, n. 12, p. 1155-1164, 2008.

MELLO, P. A. *et al.* Sample preparation methods for subsequent determination of metals and non-metals in crude oil—A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 746, p. 15-36, 2012.

MIR, L. O. Genômica. São Paulo: Atheneu Rio, 2005. 1212 p.

MOLENA-FERNANDES, C. A. *et al.* Avaliação dos efeitos da suplementação com farinha de linhaça (*Linum usitatissimum L.*) marrom e dourada sobre o perfil lipídico e a evolução ponderal em ratos Wistar. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 12, p. 201-207, 2010.

MOUNICOU, S.; SZPUNAR, J.; LOBINSKI, R. Metallomics: the concept and methodology. *Chemical Society Reviews*, v. 38, n. 4, p. 1119-1138, 2009.

MUELLER, K. *et al.* Functional properties and chemical composition of fractionated brown and yellow linseed meal (*Linum usitatissimum L.*). *Journal of Food Engineering*, v. 98, n. 4, p. 453-460, 2010.

NAOZUKA, J.; OLIVEIRA, P. V. Cu, Fe, Mn and Zn distribution in protein fractions of Brazil-nut, cupuassu seed and coconut pulp by solid-liquid extraction and electrothermal atomic absorption spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 18, p. 1547-1553, 2007.

_____. Cooking effects on iron and proteins content of beans (*Phaseolus Vulgaris L.*) by GF AAS and MALDI-TOF MS. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 23, p. 156-162, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger: Princípios de Bioquímica. 4 ed. São Paulo: Editora Sarvier, 2006, 1636, p.

OMONI, A. O.; ALUKO, R. E. Effect of cationic flaxseed protein hydrolysate fractions on the in vitro structure and activity of calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase. *Molecular Nutrition and Food Research*, v. 50, n. 10, p. 958-966, 2006.

OOMAH, B. D. Flaxseed as a functional food source. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 81, n. 9, p. 889-894, 2001.

OOMAH, B. D.; MAZZA, G. Flaxseed proteins—a review. *Food Chemistry*, v. 48, n. 2, p. 109-114, 1993.

OSBORNE, T. B.; MENDEL, L. B. Nutritive properties of proteins of the maize kernel. *Journal of Biological Chemistry*, v. 18, n. 1, p. 1-16, 1914.

PAQUOT, C.; HAUTFENNE, A.; International Union Of Pure And Applied Chemistry. Applied Chemistry Division. Standard methods for the analysis of oils, fats, and derivatives. *Blackwell Scientific Publications*, 1987.

PERASSOLI, E. Cultivo da Linhaça está em expansão. *Gazeta Digital*, 2007.

QUARLES Jr., C. D. *et al.* Metal retention in human transferrin: Consequences of solvent composition in analytical sample preparation methods. *Metallomics*, v. 3, n. 10, p. 1027-1034, 2011.

RABETAFIKA, H. N. *et al.* Flaxseed proteins: food uses and health benefits. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 46, n. 2, p. 221-228, 2011.

REILLY, C. Metal contamination of food: its significance for food quality and human health. Boadmin, Cornwall: Blackwell Science LTD, 2002.

RIDGWAY, K.; LALLJIE, S. P. D.; SMITH, R. M. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. *Journal of Chromatography A*, v. 1153, n. 1–2, p. 36-53, 2007.

ROBERFROID, M. B. Global view on functional foods: European perspectives. *British Journal of Nutrition*, v. 88 Suppl 2, p. S133-138, 2002.

RODRIGUEZ-LEYVA, D. *et al.* The cardiovascular effects of flaxseed and its omega-3 fatty acid, alpha-linolenic acid. *Canadian Journal of Cardiology*, v. 26, n. 9, p. 489-496, 2010.

RODUSHKIN, I.; ENGSTRÖM, E.; SÖRLIN, D. Levels of inorganic constituents in raw nuts and seeds on the Swedish market. *Science of The Total Environment.*, v.392, p. 290–304, 2008.

RYDBERG, J. Solvent Extraction Principles and Practice, Revised and Expanded. Taylor & Francis, 2004.

SHIM, Y. Y. *et al.* Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) bioactive compounds and peptide nomenclature: A review. *Trends in Food Science and Technology*, v. 38, n. 1, p. 5-20, 2014.

SINGH, K. K. *et al.* Flaxseed: a potential source of food, feed and fiber. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.51, p. 210-222, 2011.

SMITH, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.

SMYKALOVA, I. *et al.* Large scale screening of heavy metal tolerance in flax/linseed (*Linum usitatissimum* L.) tested in vitro. *Industrial Crops and Products*, v. 32, n. 3, p. 527-533, 2010.

SOXHLET, F. V. Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes. *Polytechnisches J. (Dingler's)*. v. 232, p. 461-465, 1879.

SZAKÁLY, Z. *et al.* The influence of lifestyle on health behavior and preference for functional foods. *Appetite*, v. 58, n. 1, p. 406-413, 2012.

SZPUNAR, J. Metallomics: a new frontier in analytical chemistry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 378, n. 1, p. 54-56, 2004.

TAINER, J. A.; ROBERTS, V. A.; GETZOFF, E. D. Metal-binding sites in proteins. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 2, n. 4, p. 582-591, 1991.

THIES, F. *et al.* Influence of dietary supplementation with long-chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids on blood inflammatory cell populations and functions and on plasma soluble adhesion molecules in healthy adults. *Lipids*, v. 36, n. 11, p. 1183-1193, 2001.

UDENIGWE, C. C. *et al.* Flaxseed protein-derived peptide fractions: Antioxidant properties and inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in murine macrophages. *Food Chemistry*, v. 116, n. 1, p. 277-284, 2009.

WARRAND, J. *et al.* Flax (*Linum usitatissimum*) Seed Cake: A Potential Source of High Molecular Weight Arabinoxylans? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.

53, n. 5, p. 1449-1452, 2005.

WHO, World Health Organization. Iron in Drinking-water. Guidelines for drinking-water quality. Health criteria and other supporting information. Geneva. 2. ed. 1996a.

_____. Zinc in Drinking-water. Guidelines for drinking-water quality. Health criteria and other supporting information. Geneva. 2. ed. 1996b.

_____. Iron deficiency anaemia: assessment, prevention, and control. Geneva. 2001.

_____. Copper in Drinking-water. Guidelines for drinking-water quality. Health criteria and other supporting information. Geneva. 2004.

WILKINS, M. R. *et al.* Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, v. 13, p. 19-50, 1996.

WRIGHT, P. C. *et al.* A review of current proteomics technologies with a survey on their widespread use in reproductive biology investigations. *Theriogenology*, v. 77, n. 4, p. 738-765, 2012.

WÜRFELS, M.; JACKWERTH, E.; STOEPLER, M. Residues from biological materials after pressure decomposition with nitric acid: Part 1. Carbon conversion during sample decomposition. *Analytica Chimica Acta*, v. 226, n. 1, p. 1-16, 1989.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química nova*, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

CAPÍTULO 2. SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO PROTEICA POR LC-MS/MS E DETERMINAÇÃO ELEMENTAR POR GFAAS

2.1. Introdução

Acredita-se que um terço de todas as proteínas que compõem o organismo humano não contenham apenas aminoácidos, mas possuam algum metal associado (Shi e Chance, 2011). Estas são as chamadas metaloproteínas (Andreini *et al.*, 2008), estruturas ainda pouco conhecidas, mesmo com a disponibilidade de sequências genômicas completas de vários organismos (Cvetkovic *et al.*, 2010).

Para se estudar as metaloproteínas ou metais associados a proteínas, adiciona-se uma complexidade aos desafios experimentais, pois é preciso manter a interação das proteínas com os íons metálicos (Barnett *et al.*, 2012). Uma melhor definição e caracterização das metaloproteínas é possível somente quando se utiliza métodos analíticos que mantenham as proteínas nativas em todo o processo.

Uma técnica eficiente de separação das metaloproteínas é a cromatografia de exclusão molecular. Ela é baseada no efeito de peneira molecular, que separa as espécies de acordo com o seu tamanho (Hagel, 2011) e permite uma determinação aproximada da massa molecular. Dependendo do eluente utilizado, essas frações podem ser analisadas diretamente por espectrometria de massas, absorção e emissão atômica (Szpunar e Lobinski, 1999).

A espectrometria de absorção atômica pode ser utilizada para quantificar os íons metálicos presentes nas proteínas (Szpunar, 2000), enquanto a espectrometria de massas permite determinar a sequência de aminoácidos de uma proteína. Uma forma de se utilizar a espectrometria de massas é submeter às proteínas a clivagens química ou enzimáticas. Depois, os produtos de peptídeos são separados por cromatografia para serem posteriormente analisados no espectrômetro (Chait, 2006). Neste caso, pode-se estudar a sequência de alguns fragmentos de peptídeos e combinar essas informações com uma proteína derivada de um sequenciamento do genoma ou bibliotecas de espectros de massas disponíveis (Chen, 2008).

Neste capítulo obteve-se a composição proteica e elementar da linhaça dourada (*Linum usitatissimum L.*) utilizando-se a cromatografia de exclusão molecular não-desnaturante seguida da caracterização dos constituintes por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) e GFAAS.

2.2. Revisão Bibliográfica

2.2.1. Métodos de Separação

i. A cromatografia de exclusão molecular

Ao se estudar metaloproteínas é preciso manter a interação das proteínas com os íons metálicos (Barnett, Scanlan e Blindauer, 2012) para uma melhor definição e caracterização.

Para a separação das metaloproteínas, a cromatografia de exclusão molecular é uma técnica eficiente na qual se emprega a separação de macromoléculas através de uma coluna cromatográfica, onde a fase móvel flui pelo interior da coluna sob uma vazão constante (Skoog, Holler e Crouch, 2007).

Quando se insere uma amostra contendo moléculas de massas moleculares diferentes, verifica-se que as moléculas maiores emergem pela fase móvel em um curto período de análise. No entanto, moléculas menores migram por dentro dos poros da coluna, aumentando o tempo de eluição (Collins, Braga e Bonato, 2006).

Esta técnica se baseia no efeito de peneira molecular, onde o tempo médio de eluição nos poros pode ser diretamente relacionado com a massa. Como consequência disso, a massa molar de um composto pode ser caracterizada pela construção de uma curva analítica que relaciona a massa com o coeficiente de distribuição (K_D).

A cromatografia de exclusão molecular é um procedimento de separação comumente aplicado em fracionamentos por não resultar em perdas de espécies ou alterações químicas (Hagel, 2011). Na prática, para a separação de proteínas os poros da fase estacionária variam entre 100 a 1000 Å e os dois tipos de leitos mais utilizados são de sílica e polímeros orgânicos. O importante é que a eluição das proteínas na coluna deve impedir sua desnaturação, para evitar a destruição da interação metal-proteína (Szpunar e Lobinski, 1999).

Neste sentido, Osvald e colaboradores (2008) estudaram o teor proteico de arroz com o objetivo de obter uma relação entre o local de cultivo e a composição da farinha de arroz. A extração das proteínas foi realizada com o uso de um tampão

fosfato de sódio em pH 6,9. A suspensão foi agitada durante 30 min e as proteínas solubilizadas foram recuperadas por centrifugação durante 10 min. Depois disso, a cromatografia de exclusão molecular foi aplicada a fim de se estudar a distribuição do tamanho das proteínas da farinha de arroz. Foram detectadas frações constituídas por glutelina, globulina e uma última fração de albumina e prolamina. Os pesquisadores analisaram a composição proteica das amostras em função da localização de seu cultivo através de uma análise de agrupamento hierárquico e observaram diferenças significativas entre elas.

Também utilizando a cromatografia de exclusão de tamanho e detecção em linha dos metais em conjunto com a espectrometria de emissão óptica por plasma indutivamente acoplado (ICP OES), Manley e colaboradores (2009) desenvolveram um método para determinação de cobre, ferro e zinco em proteínas contidas em plasma de coelho, permitindo a identificação de, aproximadamente, doze metaloproteínas contendo cobre, ferro e zinco.

ii. Eletroforese em gel

Outra técnica eficiente de separação das proteínas é a eletroforese em gel que envolve a separação de espécies carregadas eletricamente, sob a influência de um campo elétrico aplicado.

A formação de espécies carregadas pode ser realizada a partir do envolvimento das proteínas com um surfactante aniônico, tal como SDS, ou por reações de dissociação de grupos carboxílicos ou aminos. As espécies carregadas migram em suportes inertes, como papel-filtro, sílica gel, membranas de acetato de celulose, géis de agarose, amido ou poliacrilamida. A escolha do suporte é feita em função da resolução de separação requerida. Por exemplo, o número de frações observadas com o gel de poliacrilamida é muito maior do que o gel de ágar. Os géis de poliacrilamida têm porosidade rigorosamente controlável e a resolução de separação é, em consequência, maior. De um modo geral, o gel de poliacrilamida é o mais utilizado para separação das proteínas (Brune e Alfenas, 2006).

Os géis de poliacrilamida são formados pela co-polimerização de acrilamida e N,N'-metileno-bis-acrilamida (Bis). O processo de polimerização consiste em uma reação em cadeia de radicais livres, iniciada pelo persulfato de amônio (PSA)

e N,N,N',N'-tetrametilinediamina (TEMED). O PSA deixa o TEMED com um elétron desemparelhado que reage então com uma molécula de acrilamida, transformando-a em um radical. Esta, por sua vez, reage com uma outra molécula de acrilamida (ou, ocasionalmente, com a bis-acrilamida), dando origem a novo radical, e assim sucessivamente, até se formar um polímero com ligações cruzadas. O número de ligações cruzadas determina o tamanho dos poros do gel e, conseqüentemente, o intervalo de massa molecular das proteínas que podem ser separadas. A porosidade do gel é então definida pela quantidade de bis-acrilamida. A escolha da concentração desta mistura é feita em função de qual faixa de massa molecular ocorrerá a separação, pois quanto maior a porcentagem, menor é o diâmetro do poro. Para separação de moléculas maiores, usam-se géis com menor teor de bis-acrilamida (Hames, 1998).

A eletroforese deve ser realizada em soluções tampão apropriadas pois, como a carga elétrica de uma molécula proteica depende do pH do meio, é conveniente manter o pH estável durante o processo, mediante o uso de soluções tampão no preparo do gel e nos tanques onde estão os eletrodos. As substâncias presentes nestas soluções, que estão em contato elétrico com os polos, permitem o fluxo da corrente elétrica e geralmente são inertes no processo eletroforético. O tampão deve ter acentuada condutividade elétrica mas, em geral, soluções mais concentradas fornecem melhor resolução porém em maior tempo de separação (Brune e Alfenas, 2006).

Do ponto de vista da eletroforese, as propriedades mais importantes das proteínas são tamanho (isto é, raio hidratado), formato e número de carga. São por essas características que se tem diferentes velocidades de migração e conseqüente separação. A eletroforese pode ser feita em uma dimensão (1D), cuja separação pode ser realizada pelo tamanho molecular, ou ainda em duas dimensões (2D), que pode ser não somente pelo tamanho, mas também pela carga proteica.

A eletroforese em 1D em gel de poliacrilamida é relativamente simples e pode ser classificada como dissociante ou não-dissociante dependendo das condições de separação. Nos sistemas não-dissociantes as proteínas são estudadas na sua forma nativa ou *in natura*, de forma que não existam alterações na atividade biológica e conformação. Em sistemas dissociantes, as proteínas são solubilizadas em um tampão contendo SDS na presença de β -mercaptoetanol ou DTT por

aquecimento a 100 °C. O β -mercaptoetanol e DTT reduzem as ligações dissulfídicas por ruptura. A organização da cadeia polipeptídica na estrutura terciária é então deteriorada e os polipetídios adquirem a carga negativa do SDS. Com esta carga, todas as proteínas migrarão em direção ao eletrodo positivo durante a eletroforese e a separação será baseada apenas no tamanho das proteínas. As proteínas de menor massa se movem mais rapidamente através do gel do que as maiores. Este tipo de eletroforese é geralmente conhecido como SDS-PAGE, devido à combinação do tratamento das proteínas com SDS e a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) (Alfenas e Brune, 2006).

Depois de realizada a separação eletroforética, é necessário fazer a coloração do gel para visualizar o resultado obtido. Em geral, os métodos mais empregados são a coloração com prata e corantes orgânicos, como Azul de Coomassie.

Como revisado no Capítulo 1, o Azul de Coomassie é empregado para identificação proteica graças a sua intensa capacidade de coloração. Mas, quando se requer uma coloração mais sensível que detecte concentrações mais baixas de proteínas, utiliza-se a coloração por prata. No processo de coloração com íon prata (Ag^+), ele é reduzido à prata metálica na proteína, onde a prata se deposita formando uma banda de cor marrom. E tal como ocorre com o Azul de Coomassie, a intensidade da coloração com prata está relacionada à quantidade de aminoácidos presentes na cadeia polipeptídica (Morrissey, 1981).

2.2.2. Metaloproteínas e a espectrometria por absorção atômica e massas

Os íons metálicos presentes nas proteínas podem ser quantificados utilizando-se a espectrometria de absorção atômica (Szpunar, 2000). Nesta técnica, a determinação das espécies metálicas é feita na fase gasosa. Quando comparada com FAAS, a GFAAS é mais sensível e apresenta limites de detecção na ordem de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$ e necessita de um volume muito menor de amostra (5 -100 μL). Tais vantagens são bastante interessantes, sobretudo quando se trata de amostras com metais presentes em baixa concentração, como em materiais escassos e/ou de difícil obtenção.

Na GFAAS, a amostra é inicialmente dessolvada a baixas temperaturas em um tubo de grafite. Em seguida, é pirolisada a uma temperatura mais elevada e, posteriormente, a temperatura se eleva um pouco mais para atomizar os analitos em um curto período de tempo. Apesar de apresentar uma boa sensibilidade de detecção, a técnica GFAAS mostra algumas limitações, como interferências químicas, ser monoelementar e requerer um tempo razoável de análise por elemento (Welz e Sperling, 2008).

Santos e colaboradores (2011) realizaram investigação proteica em amostras de plasma de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacríamida em duas dimensões (2D-PAGE) e os metais manganês e zinco foram determinados qualitativamente e quantitativamente nos *spots* por fluorescência de radiação síncrotron de raios-X (SR-XRF) e GFAAS. A identificação por SR-XRF mostrou que o manganês estava presente em quatro *spots*, enquanto zinco em seis. Estes íons estavam ligados a proteínas com massas moleculares de 19 a 70 kDa e com o ponto isoelétrico (pI) variando de 4,7 a 6,3. Após digestão ácida dos *spots*, as concentrações de manganês e zinco ligados a estas proteínas variaram entre 0,8 e 2,6 mg de manganês e de 1,0 a 6,3 mg de zinco por grama de proteína, valores determinados por GFAAS. A sequência de aminoácidos de uma proteína pode ser determinada pela espectrometria de massas (MS) com uso de técnicas brandas de ionização, seja por *electrospray* (ESI), ou por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI). É uma técnica ideal para proteômica pela alta especificidade, precisão, velocidade e sensibilidade.

A análise de proteínas por MS pode ser realizada de duas formas: *Bottom-up* e *Top Down* (Zhou *et al.*, 2011). No caso do *Bottom-up*, as proteínas de interesse são isoladas para serem submetidas a clivagens químicas ou enzimáticas em pontos específicos. A tripsina, por exemplo, cliva as ligações peptídicas após os grupos carbonila dos resíduos de lisina e arginina (Nelson e Cox, 2006). Depois, os produtos de peptídeos são separados por cromatografia para serem posteriormente analisados no espectrômetro de massas (Chait, 2006). Os espectros de massas de alguns fragmentos de peptídeos são obtidos e as informações ali presentes são combinadas as de uma proteína derivada de um sequenciamento do genoma, ou ainda, com dados de bibliotecas de espectros de massas disponíveis (Chen, 2008), permitindo assim a identificação proteica.

Na estratégia *Top-Down*, a proteína intacta é analisada diretamente por MS

e, inicialmente, deve-se determinar a massa molecular da proteína em questão com exatidão para, posteriormente, realizar fragmentações da proteína no próprio equipamento, proporcionando a identificação de peptídeos que permitem a subsequente identificação da sequência proteica completa. Essa estratégia requer o uso de equipamentos de altíssima resolução e exatidão de massas (Zhou *et al.*, 2011).

A conjugação de analisadores de massa sequenciais (MS/MS) contribuiu ainda mais para o desenvolvimento da MS. Tal arranjo aumentou o poder de resolução e a sensibilidade, tornando-o praticamente obrigatório em análises de moléculas biológicas. Com essa conjugação é possível fragmentar uma molécula ionizada pela colisão com um gás inerte e a análise das massas dos fragmentos obtidos permite determinar, por exemplo, a sequência de aminoácidos de um peptídeo ou uma alteração de algum resíduo de aminoácido (Steen e Mann, 2004).

Portanto, a espectrometria de absorção atômica em conjunto com a de massas sequencial são coerentes para o estudo de metais associados as proteínas em amostras de linhaça dourada.

2.3. Objetivos

2.3.1. Objetivo geral

Fracionar proteínas de linhaça dourada por cromatografia de exclusão molecular após procedimento de extração não-desnaturante com tampão Tris-HCl e caracterizar por LC/MS-MS e GFAAS, avaliando-se o teor proteico, o perfil eletroforético e a concentração de cobre, ferro e zinco.

2.3.2. Objetivos específicos

- Extrair as proteínas da linhaça dourada usando uma solução tampão Tris-HCl;
- Isolar frações proteicas por filtração em gel;
- Avaliar o perfil eletroforético de frações proteicas coletadas pela cromatografia de exclusão molecular através do gel de poliacrilamida 12% m v⁻¹ com SDS em uma dimensão (1D SDS-PAGE) e coloração de prata;
- Determinar cobre, ferro e zinco nas frações proteicas coletadas pela cromatografia de exclusão molecular utilizando GFAAS;
- Identificar as proteínas de uma das frações proteicas coletadas pela cromatografia de exclusão molecular utilizando LC-MS/MS;
- Extrair as proteínas de seis diferentes amostras de linhaça dourada para avaliar o teor proteico, perfil eletroforético por 1D SDS-PAGE e a concentração de cobre, ferro e zinco por GFAAS.

2.4. Parte experimental

2.4.1. Amostra, reagentes e soluções

As amostras foram adquiridas e tratadas conforme descrito no item 1.4.3.

Hexano (Synth, São Paulo, Brasil) foi utilizado para a extração da fase lipídica. A solução tampão Tris-HCl foi preparada com tris-hidroximetilaminometano (Synth, Brasil) e o pH foi ajustado com ácido clorídrico diluído (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Para extração e isolamento das proteínas foram utilizados Coquetel Inibidor de Protease (Sigma Aldrich, Saint Louis, Estados Unidos), sulfato de amônio (Synth, São Paulo, Brasil), glicerol (Synth, São Paulo, Brasil) e membrana de celulose com corte de 12000 Da (Sigma Aldrich, Saint Louis, Estados Unidos). A dosagem das proteínas totais das amostras foi realizada pelo método de BCA, conforme kit comercial *Pierce® BCA Protein Assay* (Thermo Scientific, Waltham, Estados Unidos).

A eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS foi realizada utilizando azul de bromofenol, SDS, glicina e um padrão contendo as seguintes proteínas com pesos moleculares conhecidos: fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa) (Sigma Aldrich, Saint Louis, Estados Unidos). A coloração com prata foi realizada com etanol, ácido acético glacial e formaldeído (Merck, Darmstadt, Alemanha), acetato de sódio, nitrato de prata, carbonato de sódio (Sigma Aldrich, Saint Louis, Estados Unidos). A coloração com Azul de Coomassie foi realizada com ácido ortofosfórico e etanol (Synth, São Paulo, Brasil), sulfato de amônio e Azul de Coomassie (Sigma Aldrich, Saint Louis, Estados Unidos).

Para a construção de curvas analíticas de cobre, ferro e zinco, soluções de referência dos analitos, em separado, foram preparadas a partir de diluições de soluções estoque de 1000,0 mg L⁻¹ (Titrisol®, Merck, Darmstadt, Alemanha) obedecendo a faixa linear de cada elemento (0,05 – 100 µg L⁻¹), em separado para a GFAAS.

A digestão das proteínas com tripsina (Promega, Fitchburg, Estados Unidos) e a análise dos peptídeos por LC-MS/MS foram realizadas com bicarbonato de amônio, DTT, iodoacetamida, ácido fórmico (Sigma Aldrich, Saint Louis, Estados

Unidos). Para a dessalinização e eluição da amostra no equipamento LC-MS/MS, a acetonitrila e o ácido fórmico utilizados foram de grau cromatográfico (J.T. Baker, Deventer, Holanda). Os peptídeos foram purificados e dessalinizados em um cartucho para extração em fase sólida (SPE) de C18, 100 mg/1 mL (Phenomenex, Torrance, Estados Unidos).

Todas as soluções foram preparadas utilizando água destilada e deionizada (Milli-Q, 18,2 MΩ cm, Millipore, Bellirica, Estados Unidos), com exceção das que foram utilizadas na análise por LC-MS/MS que foi ultrapura (J.T. Baker, Deventer, Holanda).

2.4.2. Instrumentação

A centrífuga Sorvall RC-5C Plus da Kendro Laboratories Products (Waltham, Estados Unidos) foi utilizada para a separação das fases na extração proteica.

As medidas de absorbância no ultravioleta (UV) foram conduzidas no espectrofotômetro UV-Vis, modelo 1601 da Shimadzu (Kyoto, Japão).

A eletroforese foi realizada em uma mini-cuba (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suécia) e a agitação no agitador multifuncional TS-2000A VDRL (Kline) da Biomixer. As imagens dos géis foram obtidas pelo ImageScanner III (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suécia).

O teor de cobre, ferro e zinco nos materiais sólidos foram quantificados no espectrômetro de absorção atômica por forno de grafite também descrito no item 1.4.2.

A incubação da amostra para a digestão com tripsina foi realizada no Banho Dubnoff Microprocessado, modelo Q226M da Quimis (São Paulo, Brasil).

Os peptídeos foram separados no cromatógrafo líquido UltiMate 3000 (Thermo Scientific, Waltham, Estados Unidos) com sistema binário de bombas modelo RSLC nano System, detector modelo RS com comprimento de onda variável entre 214 e 280 nm.

Foram injetados 10 µL de amostra pelo auto-injetor climatizado (modelo RS) em uma coluna cromatográfica de fase reversa modelo Acclaim® PepMap RSLC

(75 μm \times 15 cm, nano Viper, C18, 2 μm , 100 \AA) mantida a 40 $^{\circ}\text{C}$. A fase móvel foi eluída a 0,300 $\mu\text{L min}^{-1}$, utilizando gradiente não linear (iniciando em 4% v v⁻¹ de B à 90% v v⁻¹ de B) até 280 min. A fase móvel A utilizada foi uma solução de ácido fórmico a 0,1% v v⁻¹ e a fase móvel B, uma solução de acetonitrila 80% v v⁻¹ e ácido fórmico 0,08% v v⁻¹, ambas diluídas em água pura.

O espectrômetro de massas utilizado foi o modelo Q-Exactive da Thermo Scientific (Waltham, Estados Unidos) com fonte de ionização modelo nano ESI. Utilizou-se o modo de aquisição *Fu/IMS* na faixa de 50 a 2200 m/z, seguido de MS/MS entre 350 a 1400 m/z. Os parâmetros de espectrometria de massas incluíram: voltagem do capilar de 1500 V, nitrogênio como gás de secagem a 6 L min⁻¹ a 160 $^{\circ}\text{C}$, faixa de aquisição de 50 2200 m/z.

Os dados das análises foram obtidos pelo software Xcalibur 2.2 da Thermo Scientific (Waltham, Estados Unidos). Para a análise dos dados foi utilizado o software Proteome Discoverer 1.4 da Thermo Scientific (Waltham, Estados Unidos), o MaxQuant 1.5 e a ferramenta *six-frame translation* do Instituto de Bioquímica de Martinsried, Alemanha.

2.4.3. Extração proteica

Após moagem em liquidificador, 5,0 g da linhaça dourada moída foram macerados com gral e pistilo. Para a remoção da fase lipídica, adicionaram-se 20,0 mL de hexano e agitou-se em vortex. O material sólido foi recuperado por filtração a vácuo. Esse procedimento foi realizado por mais uma vez.

Em seguida, adicionaram-se cerca de 25,0 mL de tampão Tris-HCl 0,025 mol L⁻¹ em pH 7,2 (volume suficiente para alcançar 5 vezes o volume do sólido obtido) e 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de Coquetel Inibidor de Protease.

Essa mistura foi mantida em agitação por 3 h sob resfriamento (aproximadamente 5 $^{\circ}\text{C}$) e, após este período, realizou-se centrifugação a 12500 rpm a 4 $^{\circ}\text{C}$ por 40 min. O sobrenadante foi retirado e adicionou-se sulfato de amônio até atingir 80% m v⁻¹ de saturação. Após nova centrifugação (12500 rpm 4 $^{\circ}\text{C}$ por 20 min), o precipitado foi retirado e ressolubilizado em Tris-HCl 0,025 mol L⁻¹ em pH 7,2 e glicerol 1% v v⁻¹ para ser dialisado por 24 h em um envoltório de membrana de

celulose. Posteriormente, o extrato proteico, foi retirado do interior da membrana e armazenado para análises futuras. O volume final foi de aproximadamente 2 mL.

2.4.4. Isolamento de frações proteicas por filtração em gel

O extrato proteico obtido no item 2.4.3 foi inserido em uma coluna cromatográfica por exclusão molecular Sephacryl S-400 HR (GE Healthcare Bio-Sciences, Suécia) de 1,2 cm x 71 cm, condicionada com Tris-HCl 0,025 mol L⁻¹ e Glicerol 10% v v⁻¹ em pH 7,5, com a vazão de 0,2 mL min⁻¹. Foram coletadas frações de 2 mL e, em cada uma delas, as absorvâncias em 280 nm foram medidas, para monitoramento da eluição e obtenção do gráfico volume *versus* absorvância.

2.4.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e coloração de prata

Após o isolamento das frações proteicas, a eletroforese das proteínas em gel de poliacrilamida 12% m v⁻¹ com SDS em 1 dimensão (1D SDS-PAGE) e coloração com prata foi realizada de acordo com o método descrito por Laemmli (1970). As dimensões do gel foram 10,0 cm (altura) por 10,5 cm (largura).

Frações representativas coletadas pela cromatografia de exclusão molecular foram inseridas nas canaletas após a diluição com uma solução, chamada tampão de amostra, contendo Tris-HCl 0,125 mol L⁻¹ em pH 6,8, azul de bromofenol 0,002% m v⁻¹, SDS 4% m v⁻¹ e glicerol 20% v v⁻¹. A mistura foi aquecida a 100 °C por 5 min. Também foi inserido em uma canaleta um padrão contendo proteínas com massas moleculares conhecidos, conforme descrito no item 2.4.1.

A eletroforese foi realizada utilizando-se uma solução tampão de corrida composta por Tris-HCl 0,025 mol L⁻¹, glicina 0,192 mol L⁻¹ e SDS 0,1% m v⁻¹ em pH 8,3, adicionada nos reservatórios da cuba. A corrente e voltagem foram 20 mA e 110 V, respectivamente. Após uma corrida de aproximadamente 3 h, as bandas proteicas foram reveladas pelo método descrito por Wray e colaboradores (1981). O gel foi fixado em uma solução aquosa de etanol 40% v v⁻¹ e de ácido acético glacial 7% v v⁻¹ por 30 min. Logo em seguida, foi sensibilizado com uma solução aquosa de etanol

30% v v⁻¹ e acetato de sódio 68 g L⁻¹ sob agitação por 30 min. O gel foi lavado e reidratado com água deionizada, e adicionou-se uma solução aquosa de nitrato de prata 2,5 g L⁻¹ em um frasco protegido da luz, mantendo a agitação por 20 min. Após este período, o gel foi lavado novamente. As bandas foram reveladas com uma solução aquosa de carbonato de sódio 68 g L⁻¹ e formaldeído 0,02% v v⁻¹. Posteriormente, os géis foram reproduzidos em *scanner*.

2.4.6. Determinação de cobre, ferro e zinco nas frações coletadas

Os metais cobre, ferro e zinco foram determinados por GFAAS nas mesmas frações inseridas nas canaletas da eletroforese em gel.

Os parâmetros para quantificação de cobre, ferro e zinco foram avaliados frente aos limites de detecção e quantificação, seguindo as recomendações do INMETRO (2011).

2.4.7. Identificação proteica por LC-MS/MS

As frações de 2 mL eluídas da coluna foram enumeradas de 1 a 50. Como a fração número 34, separada pela cromatografia de exclusão molecular, apresentou o maior teor proteico e de metais, 45 µL desta fração foram submetidos a um procedimento de digestão trípica em solução. Neste volume adicionaram-se 5 µL de bicarbonato de amônio 1 mol L⁻¹. As proteínas foram reduzidas com a adição de 5 µL de solução de ditioneitol (DTT) 0,045 mol L⁻¹, seguido de incubação à 56 °C por 15 min. Em seguida, as proteínas foram alquiladas com 125 µL de solução de iodoacetamida 0,100 mol L⁻¹ à temperatura ambiente por 15 min sem contato com luz. Após este tempo, adicionaram-se 125 µL de água e 15 µL de bicarbonato de amônio 1 mol L⁻¹. Finalmente, 6 µL de solução diluída de tripsina foi adicionada e a amostra foi incubada em banho-maria a 37 °C por 2 h. A clivagem foi interrompida com adição de 10 µL de ácido acético ultra-puro. Os peptídeos foram purificados e dessalinizados por extração em fase sólida (SPE) em uma coluna de C18 de, aproximadamente, 100 mg e solução aquosa de acetonitrila 50% v v⁻¹ e ácido fórmico 0,1% v v⁻¹. Concentrou-

se a amostra por *speed-vacc* antes da análise por LC-MS/MS para identificação proteica.

O esquema abaixo, apresentado na Figura 2.1, resume as etapas descritas nos itens 2.4.3 a 2.4.7.

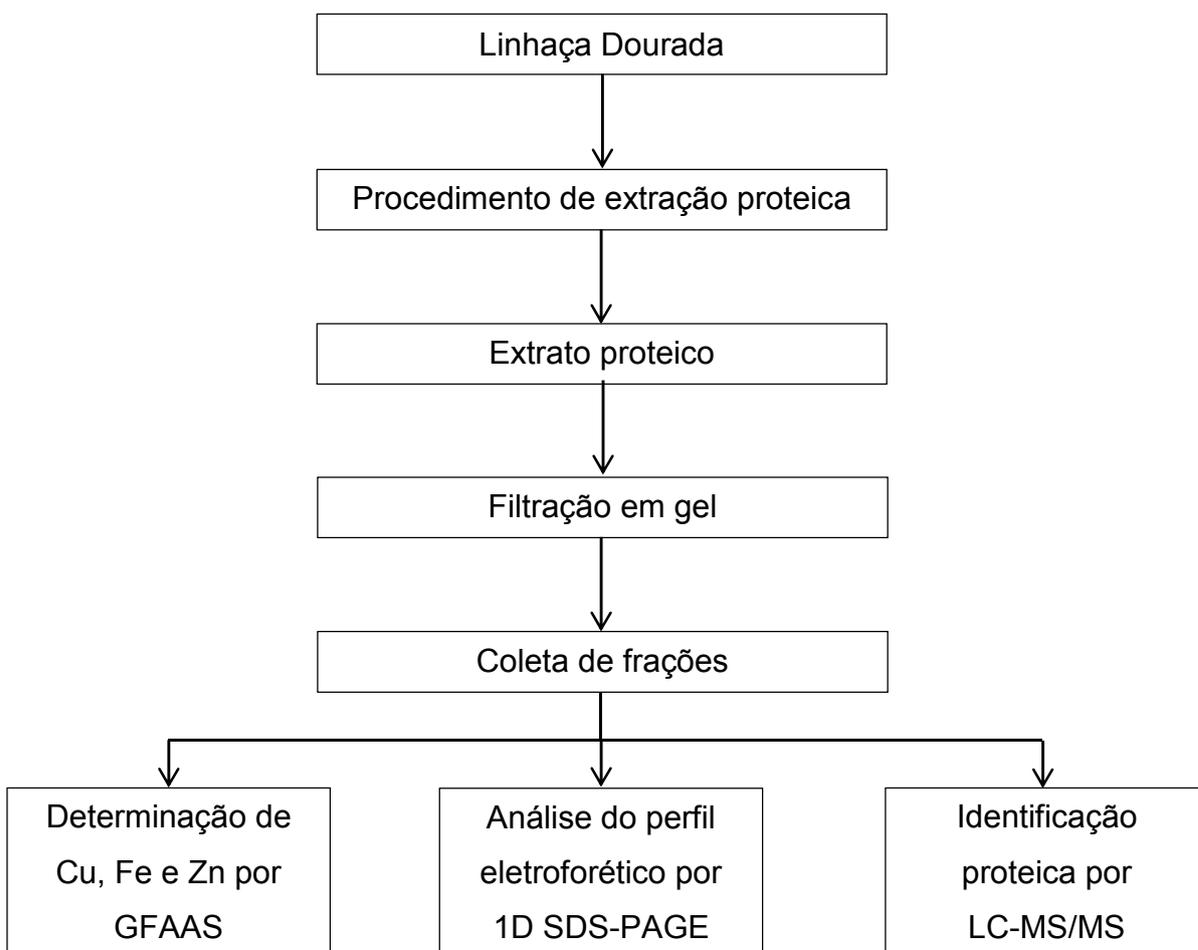


Figura 2.1. Resume das etapas descritas nos itens 2.4.3 a 2.4.7

2.4.8. Extração proteica de amostras de linhaça dourada e determinação do teor proteico, perfil eletroforético e concentração de cobre, ferro e zinco

Outras cinco marcas diferentes de linhaça dourada, além da utilizada no item 2.4.3, foram submetidas à extração proteica. Os procedimentos de extração da fase lipídica e proteica foram iguais, mas metade da solução em Tris-HCl foi retirada para as proteínas serem concentradas com sulfato de amônio, enquanto a outra parte

foi armazenada sob resfriamento para ser analisada diretamente.

Para isso, 5,0 g, de cada amostra moída foram maceradas com gral e pistilo. A fase lipídica foi removida com adição de 20,0 mL de hexano e agitação em vortex. O material sólido foi recuperado por filtração a vácuo. Esse procedimento foi realizado em triplicata. Em seguida, cerca de 25,0 mL Tris-HCl 0,025 mol L⁻¹ em pH 7,2 (volume suficiente para alcançar 5 vezes o volume do sólido obtido) e 5 µL mL⁻¹ de Coquetel Inibidor de Protease foram adicionados. Essa mistura foi mantida em agitação por 3 h sob resfriamento. Após este tempo, foi realizado uma centrifugação a 12500 rpm a 4°C por 40 min. O sobrenadante foi retirado.

O volume líquido foi dividido em duas partes. Uma metade foi armazenada para análises futuras. Na outra metade, adicionou-se sulfato de amônio para atingir 80% m v⁻¹ de saturação. O precipitado foi retirado após nova centrifugação (12500 rpm 4°C por 20 min) e ressolubilizado em Tris-HCl 0,025 mol L⁻¹ em pH 7,2 e glicerol 1% v⁻¹ para ser dialisado por 24 h, em envoltório de membrana de celulose. Ao final, o extrato proteico foi retirado do interior da membrana e armazenado para análises futuras.

Após os procedimentos de extração proteica, a quantificação do teor de proteínas totais em cada extrato foi determinada pelo método de BCA, utilizando o kit da Thermo Scientific e o procedimento para microensaios, conforme recomendado pelo fabricante. Em 25 µL de cada amostra ou padrão adicionaram-se 200 µL de uma mistura composta pelos reagentes A (carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, ácido bicinconínico e tartarato de sódio em hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹) e B (solução aquosa de sulfato de cobre 4% m v⁻¹).

Para a construção da curva analítica foram utilizadas as seguintes concentrações de albumina: 0,004; 0,04; 0,25; 0,50; 1,0 mg mL⁻¹. A placa de Elisa contendo as amostras e os padrões de albumina foram agitadas lentamente por 30 s e incubadas por 30 min à temperatura ambiente e a 37 °C. Posteriormente, as amostras foram analisadas no espectrofotômetro com absorvância determinada no comprimento de onda de 562 nm.

O perfil dos dois extratos (com e sem precipitação com sulfato de amônio) obtidos para as cinco marcas, juntamente com a amostra do item 2.4.3, foi analisado através da eletroforese das proteínas em gel de poliacrilamida 12% com SDS e coloração com Azul de Coomassie, realizada de acordo com o método descrito por Laemmli (1970). Dimensões e composição do gel, parâmetros da corrida eletroforética

foram as mesmas descritas no item 2.4.5.

As proteínas separadas nos géis de poliacrilamida foram visualizadas por meio da coloração coloidal com Azul de Coomassie. Os géis foram fixados por 24 h em solução de ácido fosfórico 2% v v⁻¹ e etanol 3% v v⁻¹. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes, mas com duração de 30 min cada. Posteriormente, o gel foi fixado em outra solução de ácido fosfórico 2% v v⁻¹ por 10 min, sendo que esta etapa foi repetida três vezes. Em seguida, o gel foi mantido por 30 min na solução fixadora de ácido fosfórico 2% v v⁻¹, etanol 18% v v⁻¹ e sulfato de amônio 15% m v⁻¹. O gel foi mantido por 2 dias para coloração na solução de Azul de Coomassie 0,1% m v⁻¹, ácido fosfórico 2% v v⁻¹, etanol 18% v v⁻¹ e sulfato de amônio 15% m v⁻¹. Depois de corados, os géis foram lavados com solução de álcool etílico 20% v v⁻¹ até a eliminação completa do excesso de corante e armazenados em água. Todas as etapas foram realizadas sob agitação.

Cobre, ferro e zinco foram determinados nos mesmos extratos estudados na 1D SDS-PAGE, utilizando GFAAS.

2.5. Resultados e discussão

2.5.1. Isolamento de frações proteicas por filtração em gel

O extrato contendo as proteínas extraídas da linhaça dourada em tampão Tris-HCl foi eluído em uma coluna cromatográfica por exclusão molecular. Para cada fração coletada foi medida a absorvância em 280 nm e obteve-se o gráfico fração *versus* absorvância ilustrado na Figura 2.2.

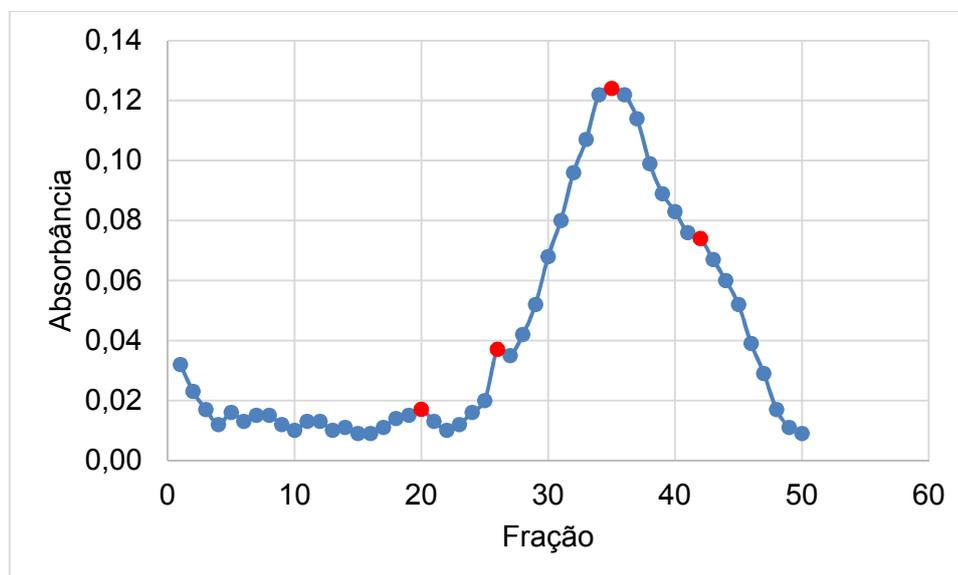


Figura 2.2. Gráfico fração *versus* absorvância do extrato proteico de linhaça dourada obtido das leituras de absorvância em 280 nm de cada fração coletada da cromatografia de exclusão molecular. Os sinais de absorvância de intensidade máxima foram destacados em pontos em vermelho

Pelo gráfico da Figura 2.2, pode-se notar que as proteínas começaram a eluir a partir da fração número 16, finalizando na 50. O primeiro sinal de absorvância detectado possui intensidade máxima na fração 20, o segundo na 26, o terceiro na 36 e o quarto na 42, pontos assinalados em vermelho. As maiores intensidades de absorvância de todas as frações coletadas foram obtidas nas frações 34 a 36.

Todas as proteínas que foram eluídas não possuem elevada massa molecular, pois as moléculas de maior massa não permanecem no interior dos espaços intersticiais por possuírem um tamanho elevado e por passarem rapidamente por toda a coluna.

Dentre as frações 18 a 50, algumas foram selecionadas e analisadas por 1D SDS-PAGE. A Figura 2.3 ilustra o perfil eletroforético obtido.

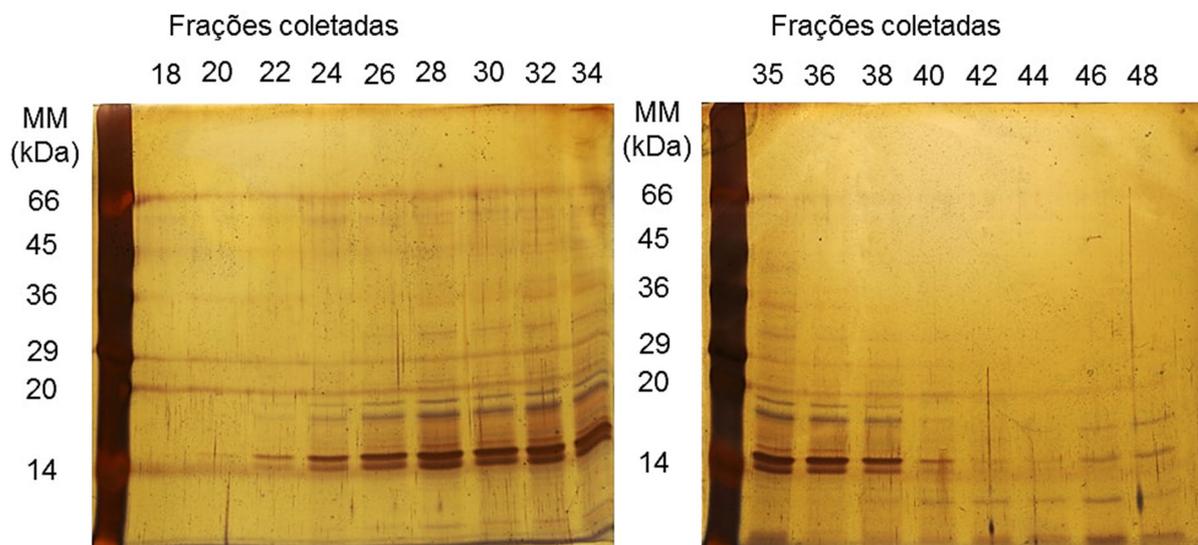


Figura 2.3. Perfil eletroforético 1D SDS-PAGE corado com prata de frações coletadas da cromatografia de exclusão molecular

O gel ilustrado na Figura 2.3 demonstra que o perfil eletroforético entre as frações coletadas foi semelhante, apresentando maiores intensidades nas frações 26 a 38. Nestas frações, destaca-se as bandas próximas a 14 kDa (na faixa entre 14 a 36 kDa distingue-se pelo menos 15 bandas). Percebeu-se também a presença de outras bandas menos intensas, entre 36 a 66 kDa e abaixo de 14 kDa.

Chung, Lei e Li-Chan (2005) extraíram as proteínas da linhaça e ao separá-las por cromatografia de exclusão por tamanho, obtiveram três bandas predominantes em 20, 23 e 31 kDa e duas em 40 e 48 kDa por SDS-PAGE. Oomah e Mazza (1998) obtiveram resultados semelhantes: bandas de menores intensidades de 14, 24, 25 e 34 kDa.

Como as bandas de maiores intensidades estão relacionadas às frações em que as absorvâncias se destacaram, nas frações 28 a 44 foi determinado o teor de cobre, ferro e zinco.

Para isso, inicialmente os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados pela análise de 7 replicatas de brancos analíticos, analisados no mesmo dia. O LD e o LQ foram calculados de acordo com as Equações 1.1 e 1.2. Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Limites de detecção e quantificação ($\mu\text{g L}^{-1}$) de cobre, ferro e zinco por GFAAS obtidos para as frações coletadas através da cromatografia de exclusão molecular

Elemento	LD	LQ
Cobre	0,0069	0,027
Ferro	0,047	0,21
Zinco	0,018	0,077

Os limites de detecção e quantificação variaram dependendo do metal analisado e os maiores valores foram os obtidos para ferro.

Posteriormente, obteve-se as concentrações de cobre, ferro e zinco das frações 28 a 44, sendo possível assim, acompanhar a concentração dos metais em conjunto com a eluição das proteínas, resultado ilustrado na Figura 2.4.

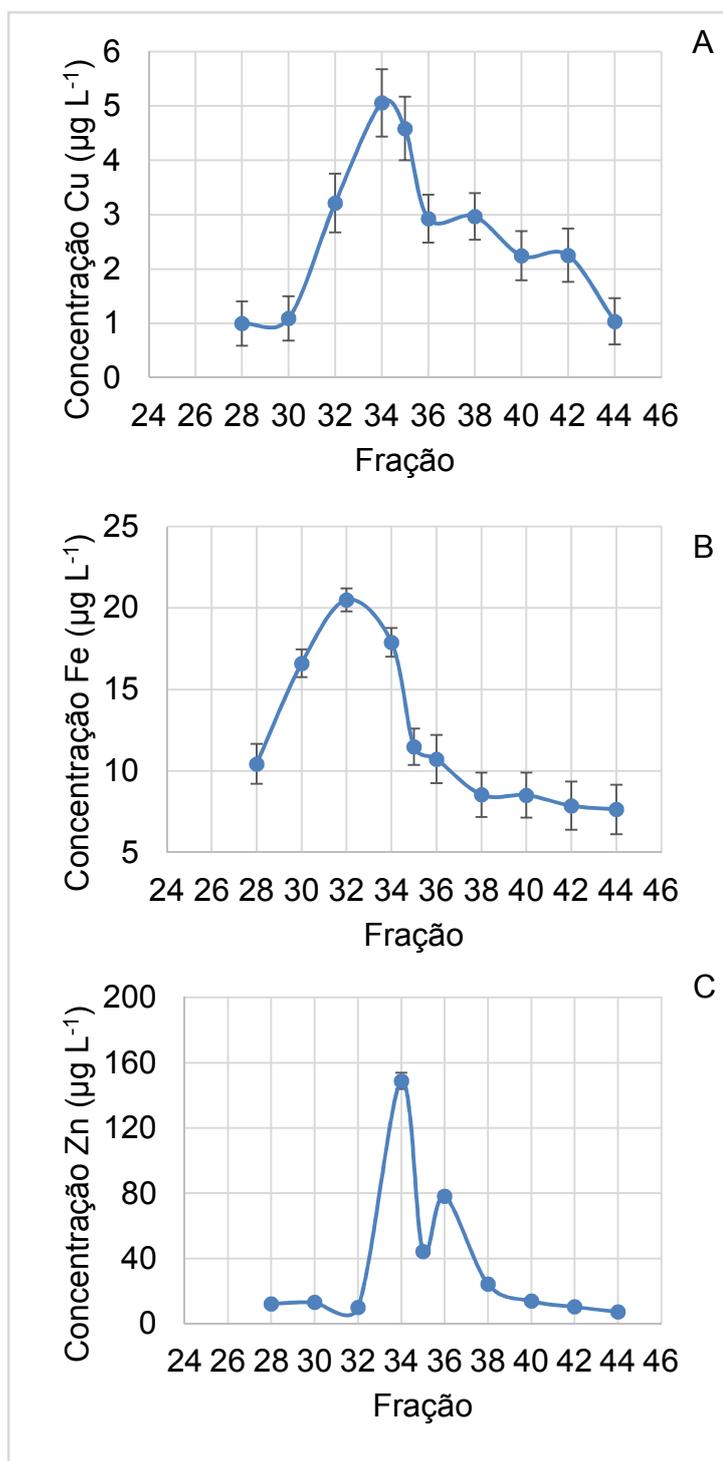


Figura 2.4. Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) e desvios padrão de cobre (A), ferro (B) e zinco (C) em algumas das frações coletadas por cromatografia de exclusão molecular utilizando GFAAS

Comparando-se as Figuras 2.3 e 2.4, percebe-se que a quantidade dos metais acompanha o conteúdo proteico. À medida que as proteínas foram eluídas, o teor dos metais aumentou. Nas frações selecionadas, dentre os metais estudados, o

teor de zinco foi mais elevado. Além disso, foi possível notar que a fração 34 continha altos teores de cobre, ferro e zinco.

Após as determinações elementares, a fração 34 foi submetida à digestão com tripsina a fim de identificar as proteínas por LC-MS/MS.

Os peptídeos separados na cromatografia são ionizados no espectrômetro de massas. A fragmentação dos peptídeos por MS induz a fragmentação de dois íons fragmentos que são classificados como íons que retêm a carga do próton no lado N-terminal (gerando fragmentos $-a$, $-b$, e $-c$, dependendo da ligação que é fragmentada) e como íons que retêm a carga do próton na região C-terminal (gerando fragmentos $-x$, $-y$, e $-z$, dependendo da ligação que é fragmentada), seguindo a nomenclatura proposta por Roepstorff-Fohlmann-Biemann (1984), ilustrada na Figura 2.5. Observe-se que os pares $-a/-x$, $-b/-y$ e $-c/-z$ serão sempre correspondentes aos fragmentos opostos e complementares entre si. No entanto, os pares de fragmentos $-b/-y$ são mais frequentes que os demais pares, pois as ligações peptídicas são as menos energéticas.

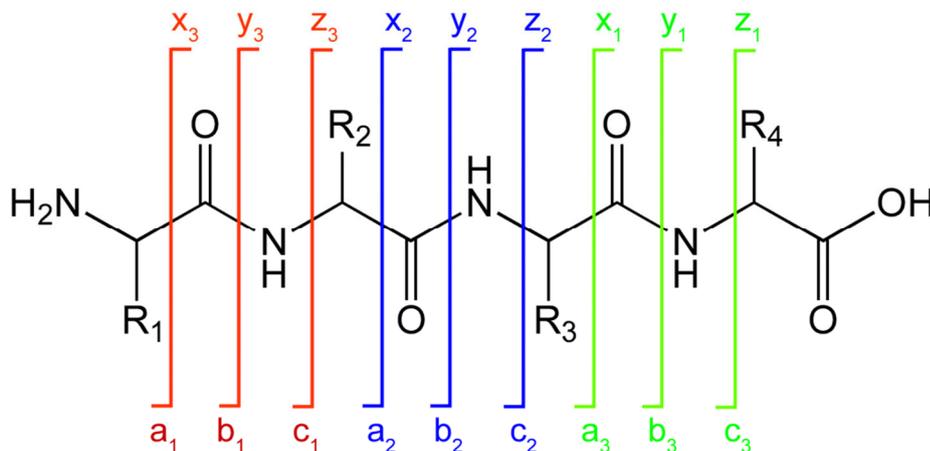


Figura 2.5. Fragmentos (a, b, c, x, y, z) oriundos da dissociação de um peptídeo de acordo com a nomenclatura proposta por Roepstorff-Fohlmann-Biemann (1984).

Uma vez que uma série de íons $-b$ e $-y$ complementares é obtida, a diferença de valores m/z entre dois íons consecutivos do mesmo tipo pode revelar a identidade do resíduo de aminoácido em questão. Os valores de m/z dos fragmentos preditos são comparados com os fragmentos experimentais sendo que, neste caso, a comparação se inicia com base nos íons $-b$ e $-y$ mais intensos (Cantú *et al.*, 2008). Na Figura 2.6 é ilustrado um espectro MS/MS de uma das proteínas identificadas com

os íons $-b$ e $-y$ utilizados para a identificação proteica pelo software Proteome Discover.

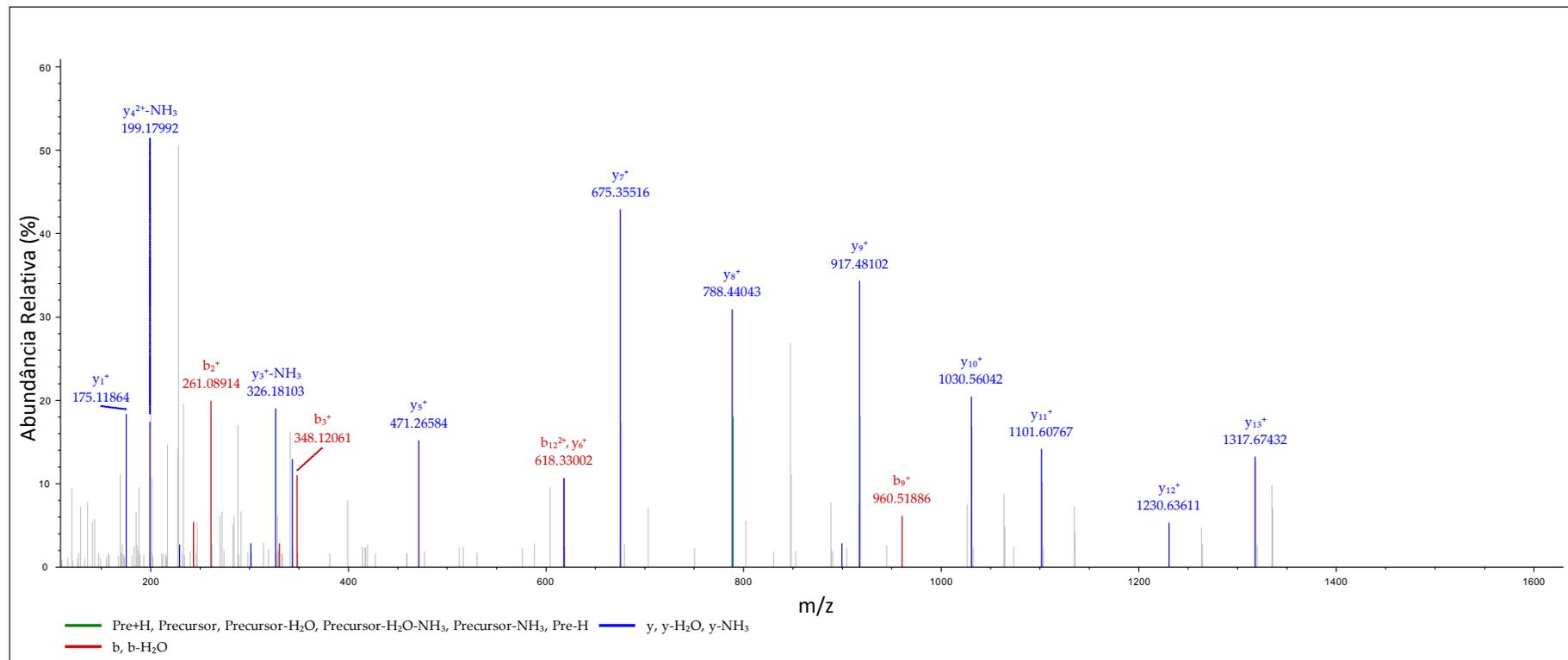


Figura 2.6. Espectro de MS/MS obtido no sequenciamento do peptídeo MESEALELGFAPAR duplamente carregado em que são indicadas as séries -b e -y utilizados para a identificação proteica pelo software Proteome Discover

Os espectros de massas obtidos foram comparados com os do banco de dados do *site* plantgdb.org. As sequências de peptídeos encontradas foram consultadas com a ferramenta de busca BLAST (*Basic Local Alignment Sequence Tool*) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) para identificar a proteína. O número de proteínas, grupo de proteínas e número de peptídeos foram filtrados com uma taxa de detecção de falsos positivos menor que 5%. Somente aquelas proteínas caracterizadas por no mínimo 2 peptídeos foram aceitas para identificação. A Tabela 2.2 descreve as proteínas identificadas e inclui o acesso do banco de dados (AD), identidade e acesso (AB) do BLAST, número de peptídeos únicos (PU), porcentagem de cobertura da proteína (%CP) e *score*.

CAPÍTULO 2. SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO PROTEICA POR LC-MS/MS E DETERMINAÇÃO ELEMENTAR POR GFAAS

Tabela 2.2. Proteínas identificadas na fração 34 coletada através da cromatografia de exclusão molecular

AD	Identidade	AB	e-valor	%CP	NU	Score
gi 324935781	Predita: peptídeos antimicrobianos vicilina 2-3	XP_009786980.1	4,00E-09	60,00	2	69,86
gi 324669552	Conlinina	CAC94011.1	7,00E-07	52,00	1	24,59
gi 324737870	Proteína de armazenamento de sementes 2, parcial	AIA57961.1	1,00E-27	51,75	2	242,3
gi 324881065	Precursor de legumina B, putativo	XP_002533465.1	6,00E-05	50,00	1	14,08
gi 324939747	Proteína hipotética B456_011G174400	KJB72367.1	2,00E-14	48,28	1	6,290
gi 324923632	Proteína de armazenamento de sementes 2, parcial	AIA57961.1	3,00E-38	41,18	2	93,66
gi 324860121	Predita: legumina A	XP_012085315.1	1,00E-100	39,18	1	623,8
gi 324937021	Proteína de armazenamento de sementes	AAF73008.1	1,00E-80	32,37	1	384,6
gi 324923199	Conlinina	CAC94010.1	1,00E-53	30,77	2	248,7
gi 324863491	Conlinina	CAC94010.1	1,00E-16	30,61	1	63,55
gi 324933154	Proteína de armazenamento de sementes 1, parcial	AIA57960.1	4,00E-90	30,56	2	411,9
gi 324810924	Proteína da família das leguminas	XP_002307645.2	1,00E-117	29,69	1	859,6
gi 324690478	Proteína de armazenamento de sementes	AAF73008.1	8,00E-88	29,57	1	375,7
gi 324816314	Embryonic abundant protein, putative	XP_002528309.1	6,00E-41	28,09	2	21,52
gi 324806219	Conlinina	CAC94010.1	2,00E-24	26,92	2	28,57
gi 324927633	Conlinina	CAC94010.1	3,00E-20	26,09	1	10,81
gi 324786190	Proteína da família das leguminas	XP_002307645.2	1,00E-37	25,51	1	64,39
gi 324931826	Proteína hipotética B456_011G174400	KJB72367.1	4,00E-10	25,49	1	3,530

CAPÍTULO 2. SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO PROTEICA POR LC-MS/MS E DETERMINAÇÃO ELEMENTAR POR GFAAS

gi 324812858	Precursor da legumina B, putativo	XP_002524198.1	5,00E-36	25	1	63,62
gi 324875883	Conlinina	CAC94010.1	3,00E-112	23,03	3	322,7
gi 324816428	Proteína da família das leguminas	XP_002307645.2	1,00E-60	22,45	1	479,9
gi 324929271	Proteína da família das leguminas	XP_002307645.2	6,00E-111	21,97	1	584,6
gi 324881952	Proteína hipotética, parcial	WP_032688628.1	4,50E+00	21,05	1	3,090
gi 324824329	Predita: proteína não-caracterizada LOC103502173	XP_008464243.1	3,00E-19	18,67	1	10,51
gi 324926241	Proteína da família das leguminas	XP_002307645.2	2,00E-132	18,24	1	525,2
gi 324626332	Proteína hipotética JCGZ_02337	KDP40339.1	1,00E-115	18,01	1	579,7
gi 324724212	Proteína hipotética POPTR_0001s31540g, parcial	XP_006369779.1	2,00E-83	14,62	1	378,4
gi 324842666	Predita: Globulina 11S de armazenamento de sementes	XP_011025981.1	6,00E-75	13,29	1	110,8
gi 324858712	Proteína da família das leguminas	XP_002307645.2	5,00E-125	12,12	2	326,2
gi 324697815	Proteína hipotética EUGRSUZ_J00948	KCW51411.1	3,00E-43	11,5	1	44,66
gi 324923182	Proteína hipotética POPTR_0019s01840g	XP_006370928.1	1,00E-111	10,51	1	205,5
gi 324622448	Amaranthina como lectina	AIU47289.1	1,00E-39	10,08	1	6,470
gi 324958732	Precursor da 48-kDa glicoproteína	AAL86739.1	1,00E-63	9,76	2	13,74
gi 324864043	Predita: Globulina 11S de armazenamento de sementes	XP_011025981.1	4,00E-55	9,47	1	204,5

CAPÍTULO 2. SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO PROTEICA POR LC-MS/MS E DETERMINAÇÃO ELEMENTAR POR GFAAS

gi 324948667	Proteína de armazenamento de sementes 2, parcial	AIA57961.1	6,00E-75	8,64	1	6,520
gi 324626332	Proteína hipotética JCGZ_02337	KDP40339.1	1,00E-115	8,57	1	160,6
gi 324779861	Predita: peptídeos antimicrobianos vicilina 2-2	XP_012064865.1	2,00E-49	6,52	1	25,66
gi 324905166	Proteína hipotética POPTR_0013s02480g	XP_002319022.2	6,00E-113	6,11	1	12,98
gi 324688132	Predita: Globulina 11S de armazenamento de sementes	XP_011025981.1	2,00E-62	5,41	1	28,53
gi 324883476	Nop56 proteína nucleolar, putativo	XP_002524752.1	3,00E-85	5,21	1	68,23

De acordo com a Tabela 2.2, há vinte e uma proteínas identificadas e, dentre elas, o peptídeo “Predita: peptídeos antimicrobianos vicilina 2-3”, um antimicrobiano. Além disso, foi detectada a presença da conlinina e da globulina, pertencentes à classe de leguminas e albuminas 2 e 11 S, respectivamente. Também foram detectadas a legumina, extraída de leguminosas, e a lectina, capaz de aglutinar células.

As plantas produzem peptídeos antimicrobianos para se defender contra infecção e insetos predadores. Estes peptídeos são considerados como compostos antibióticos promissores com aplicações biotecnológicas importantes contra vírus humanos, bactérias, fungos, parasitas protozoários e células tumorais (López-García, Segundo e Coca, 2012).

A proteína conlinina foi isolada por Madhusudhan e Singh (1985) em linhaça e caracterizada por um coeficiente de sedimentação de 1.6S, possuindo uma única cadeia polipeptídica de massa molecular entre 15 e 17 kDa. Quando comparada a linina, outra proteína de armazenamento 12S da linhaça dourada, a conlinina apresenta uma estrutura mais ordenada e estável sob diferentes pH e temperaturas. No entanto, segundo Oomah e Mazza (1993), as proteínas 11-12S são predominantes na linhaça, isolada primeiramente por Vassel and Nesbitt (1945).

Dentre as proteínas identificadas na fração 34, somente a lectina foi purificada de *Limulus polyphethnus* e associada com cobre (Gilbride e Pistole, 1981). Para as outras encontradas, a literatura não descreve nenhuma interação com os metais cobre, ferro e zinco. No entanto, como os procedimentos adotados para extração proteica e separação cromatográfica por exclusão de tamanho foram não-desnaturantes, pode-se afirmar que os metais estudados possuem grande afinidade pelas três proteínas identificadas.

2.5.2. Extração proteica de amostras de linhaça dourada e comparação do perfil eletroforético

Outras cinco marcas diferentes de linhaça dourada, além da estudada no item 2.4.3, foram submetidas à extração proteica com solução tampão Tris-HCl. Metade do sobrenadante foi retirado e armazenado, enquanto na outra metade foram adicionadas sulfato de amônio para atingir 80% m v⁻¹ de saturação a fim de comparar

o efeito de concentração da identificação e perfil eletroforético. O precipitado foi retirado após centrifugação, ressolubilizado em Tris-HCl e glicerol para ser dialisado. Ao final, o extrato proteico foi retirado do interior da membrana e armazenado para análises futuras.

Os resultados dos teores totais de proteínas obtidos pelo método BCA estão descritos na Tabela 2.3.

Tabela 2.3. Teor de proteínas totais (mg mL^{-1}) e desvio padrão nos extratos (com e sem precipitação com sulfato de amônio) obtidos para as seis marcas de linhaça dourada ($n = 3$)

Marca	Extrato	Teor
A	Precipitado	$4,42 \pm 0,03$
B	Precipitado	$6,48 \pm 0,06$
	Sem precipitar	$4,37 \pm 0,03$
C	Precipitado	$4,59 \pm 0,06$
	Sem precipitar	$3,50 \pm 0,04$
D	Precipitado	$6,21 \pm 0,07$
	Sem precipitar	$4,25 \pm 0,05$
E	Precipitado	$2,56 \pm 0,05$
	Sem precipitar	$2,68 \pm 0,07$
F	Precipitado	$1,87 \pm 0,07$
	Sem precipitar	$1,93 \pm 0,08$

Os dados apresentados na Tabela 2.3 mostram que os teores de proteínas totais obtidos nos extratos com precipitação com sulfato de amônio foram maiores do que quando a precipitação não foi realizada. Possivelmente, o uso ou não de precipitação permite a extração de diferentes proteínas, confirmado pelo perfil eletroforético obtido posteriormente e ilustrado na Figura 2.7.

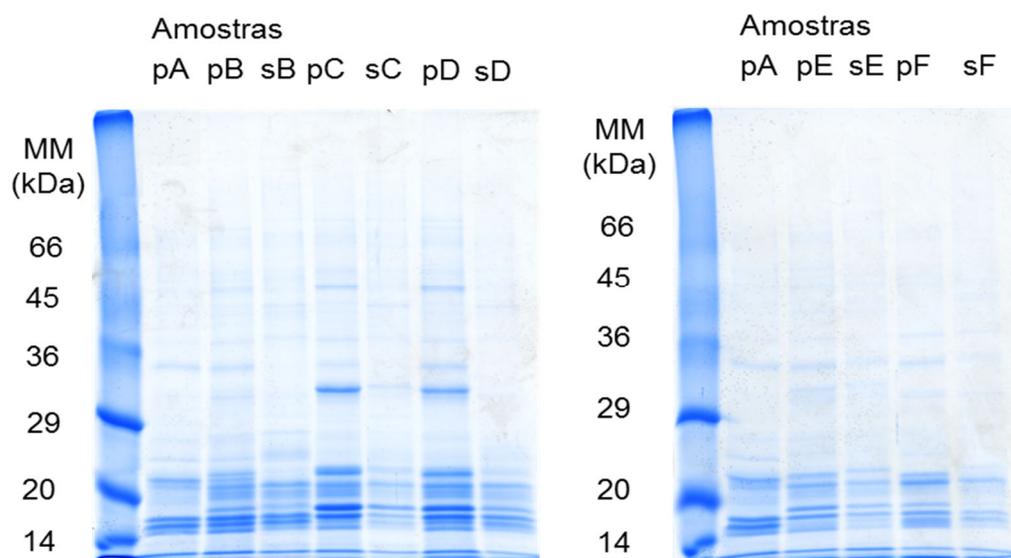


Figura 2.7. Perfil eletroforético 1D SDS-PAGE corado com azul de coomassie dos seis extratos de linhaça dourada com precipitação (p) e sem precipitação (s) com sulfato de amônio

O gel ilustrado na Figura 2.6 demonstra que os perfis eletroforéticos entre os extratos sem e com precipitação realizada e em todas as amostras, as bandas foram predominantes na faixa entre 14 a 20 kDa. Quando foi realizada a precipitação, os perfis eletroforéticos das marcas C e D foram diferentes das demais. Nestas duas marcas pode-se distinguir uma banda intensa entre 29 e 36 kDa e outra próxima a 45 kDa, enquanto que nas marcas A, B, E e F percebeu-se a presença de bandas menos intensas na faixa de 36 a 66 kDa. Em todas as amostras visualizou-se bandas menos intensas, abaixo de 14 kDa.

Segundo Chung, Lei e Li-Chan (2005) os peptídeos presentes na linhaça podem variar de acordo com o local de cultivo da semente. E, neste caso, é possível que haja polimorfismo de composição das subunidades entre as marcas estudadas e, desta forma, a sequência de aminoácidos também pode diferir. A heterogeneidade molecular conduz a espécies moleculares diferentes em composição e massa molecular, que podem ser responsáveis por diferenças nas propriedades funcionais. Mas ainda não houve relatos publicados sobre este aspecto de proteínas de linhaça.

Oomah e Mazza (1998) observaram a presença de quatro polipeptídeos predominantes nos produtos de linhaça entre 14, 24, 25, e 34 kDa, bem como um número de outras bandas menores. As intensidades das bandas variaram dependendo se as proteínas foram extraídas a partir de flocos, farinha, semente *in natura* ou sem a fase lipídica. Marcone e colaboradores (1998b) relataram cinco

bandas com massa molar de 14,4, 24,6, 30,0, 35,2 e 50,9 kDa da globulina extraída da linhaça. O peptídeo de 24,6 kDa foi relatado como uma subunidade básica, enquanto que os peptídeos 30,0 e 35,2 kDa foram identificados como subunidades ácida. Estas subunidades extraídas de plantas puderam ser distinguidas através das homologias das sequências de aminoácidos e reatividade imunológica cruzada (Marcone, Kakuda e Yada, 1998a).

Cobre, ferro e zinco foram determinadas nos mesmos extratos utilizando GFAAS e os resultados estão descritos na Tabela 2.4.

Tabela 2.4. Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) e desvio padrão de cobre, ferro e zinco nos extratos (com e sem precipitação com sulfato de amônio) obtida para as seis marcas de linhaça dourada ($n = 3$)

Marca	Extrato	Metais		
		Cobre	Ferro	Zinco
A	Precipitado	40,6 \pm 2,3	114 \pm 4	21,0 \pm 0,2
B	Precipitado	36,4 \pm 1,6	91,0 \pm 1,3	16,9 \pm 0,1
	Sem precipitar	35,6 \pm 1,2	88,0 \pm 0,3	15,9 \pm 0,1
C	Precipitado	57,5 \pm 1,6	138 \pm 5	25,8 \pm 0,1
	Sem precipitar	55,8 \pm 2,1	133 \pm 3	24,9 \pm 0,4
D	Precipitado	44,0 \pm 2,0	124 \pm 1	23,3 \pm 0,6
	Sem precipitar	43,4 \pm 1,4	122 \pm 1	22,9 \pm 0,5
E	Precipitado	49,5 \pm 1,1	129 \pm 1	24,1 \pm 0,4
	Sem precipitar	48,3 \pm 2,1	126 \pm 3	23,7 \pm 0,6
F	Precipitado	59,2 \pm 2,2	141 \pm 3	26,4 \pm 0,6
	Sem precipitar	59,0 \pm 1,7	139 \pm 4	26,0 \pm 0,5

De acordo com os dados da Tabela 2.4, observou-se a presença de cobre, ferro e zinco nos extratos proteicos das seis marcas de linhaça dourada. O ferro foi o elemento mais abundante, seguido pelo cobre.

No entanto, como os procedimentos adotados para extração proteica são não-desnaturantes, pode-se afirmar que os metais estudados possuem grande afinidade pelas proteínas extraídas.

2.6. Conclusões parciais

Após extração proteica em tampão Tris-HCl, as frações coletadas pela eluição em uma coluna de exclusão molecular mostraram que o perfil eletroforético obtido foi semelhante. Nestas mesmas soluções, pode-se notar que a concentração dos metais acompanha o conteúdo proteico. À medida que as proteínas foram eluídas, o teor dos metais aumentou.

Além disso, percebeu-se que a fração 34 possuía altos teores de cobre, ferro e zinco. Então, pela análise por LC-MS/MS, vinte e uma proteínas foram identificadas e dentre elas, proteínas de armazenamento, característica da amostra.

Todos os procedimentos adotados para extração proteica e separação cromatográfica por exclusão de tamanho foram não-desnaturantes, aumentando a confiabilidade de inferir que os metais estudados possuem uma grande afinidade pelas proteínas identificadas.

Outras marcas de linhaça dourada foram submetidas à extração proteica com solução tampão Tris-HCl. Pode-se observar as diferenças da composição de subunidades entre as marcas investigadas. Cobre, ferro e zinco também foram quantificados nos extratos proteicos das diferentes marcas de linhaça dourada, sendo ferro o elemento mais abundante, seguido pelo cobre.

2.7. Referências bibliográficas

ALFENAS, A. C.; BRUNE, W. Eletroforese em gel de poliacrilamida. In: ALFENAS, A. C. (Editor). Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos. 2 ed. Viçosa: Editora UFV, 2006.

ANDREINI, C. *et al.* Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, v. 13, n. 8, p. 1205-1218, 2008.

BARNETT, J.; SCANLAN, D.; BLINDAUER, C. Protein fractionation and detection for metalloproteomics: challenges and approaches. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 402, n. 10, p. 3311-3322, 2012.

BRUNE, W.; ALFENAS, A. C. Modalidades da Eletroforese. Em: ALFENAS, A. C. (Editor). Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos. 2 ed. Viçosa: Editora UFV, 2006.

CANTÚ, M. D. *et al.* Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. *Química Nova*, v. 31, p. 669-675, 2008.

CHAIT, B. T. Mass Spectrometry: Bottom-Up or Top-Down? *Science*, v. 314, n. 5796, p. 65-66, 2006.

CHEN, C.-H. Review of a current role of mass spectrometry for proteome research. *Analytica Chimica Acta*, v. 624, n. 1, p. 16-36, 2008.

CHUNG, M. W. Y.; LEI, B.; LI-CHAN, E. C. Y. Isolation and structural characterization of the major protein fraction from NorMan flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *Food Chemistry*, v. 90, n. 1-2, p. 271-279, 2005.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G.; BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. Editorada Unicamp, 2006.

CVETKOVIC, A. *et al.* Microbial metalloproteomes are largely uncharacterized. *Nature*, v. 466, n. 7307, p. 779-782, 2010.

GILBRIDE, K. J.; PISTOLE, T. G. The presence of copper in a purified lectin from *Limulus polyphemus*: Possible new role for hemocyanin. *Developmental & Comparative Immunology*, v. 5, n. 2, p. 347-352, 1981.

HAGEL, L. Gel Filtration: Size Exclusion Chromatography. Em: HAGEL, L. Protein Purification. John Wiley and Sons, Inc., 2011.

HAMES, B. D. Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach: A Practical Approach. OUP Oxford, 1998.

INMETRO, I. N. D. M., *NORMATIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL*. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos (DOQ-CGCRE-008), 2011.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LÓPEZ-GARCÍA, B.; SEGUNDO, B. S.; COCA, M. Antimicrobial Peptides as a Promising Alternative for Plant Disease Protection. Em: Peptides for Disease Control: American Chemical Society, v.1095, 2012. cap. 13, p.263-294.

MADHUSUDHAN, K. T.; SINGH, N. Isolation and characterization of a small molecular weight protein of linseed meal. *Phytochemistry*, v. 24, n. 11, p. 2507-2509, 1985.

MANLEY, S. *et al.* Simultaneous Cu-, Fe-, and Zn-specific detection of metalloproteins contained in rabbit plasma by size-exclusion chromatography–inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, v. 14, n. 1, p. 61-74, 2009.

MARCONE, M. F.; KAKUDA, Y.; YADA, R. Y. Salt-soluble seed globulins of dicotyledonous and monocotyledonous plants II. Structural characterization. *Food Chemistry*, v. 63, n. 2, p. 265-274, 1998a.

_____. Salt-soluble seed globulins of various dicotyledonous and monocotyledonous plants—I. Isolation/purification and characterization. *Food Chemistry*, v. 62, n. 1, p. 27-47, 1998b.

MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Analytical Biochemistry*, v. 117, n. 2, p. 307-310, 1981.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger: Princípios de Bioquímica. 4 ed. São Paulo: Editora Sarvier, 2006. 1636, p.

OOMAH, B. D.; MAZZA, G. Compositional changes during commercial processing of flaxseed. *Industrial Crops and Products*, v. 9, n. 1, p. 29-37, 1998.

_____. Flaxseed proteins—a review. *Food Chemistry*, v. 48, n. 2, p. 109-114, 1993.

OSZVALD, M. *et al.* Characterization of rice storage proteins by SE-HPLC and micro z-arm mixer. *Journal of Cereal Science*, v. 48, n. 1, p. 68-76, 2008.

ROEPSTORFF, P.; FOHLMAN, J.; Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass-spectra of peptides. *Biomedical & Environmental Mass Spectrometry*, v. 11, n. 11, p. 601-601, 1984.

SANTOS, F. *et al.* Metallomic study on plasma samples from Nile tilapia using SR-XRF and GFAAS after separation by 2D PAGE: initial results. *Microchimica Acta*, v. 173, n. 1-2, p. 43-49, 2011.

SHI, W.; CHANCE, M. R. Metalloproteomics: forward and reverse approaches in metalloprotein structural and functional characterization. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 15, n. 1, p. 144-148, 2011.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. Principles of Instrumental Analysis. Thomson Brooks/Cole, 2007.

STEEN, H.; MANN, M. The abc's (and xyz's) of peptide sequencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, v. 5, n. 9, p. 699-711, 2004.

SZPUNAR, J. Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques. *Analyst*, v. 125, n. 5, p. 963-988, 2000.

SZPUNAR, J.; LOBINSKI, R. Species-selective analysis for metal-biomacromolecular complexes using hyphenated techniques. *Pure and applied chemistry*, v. 71, n. 5, p. 899-918, 1999.

WELZ, B.; SPERLING, M. Atomic absorption spectrometry. John Wiley & Sons, 2008.

WRAY, W. *et al.* Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, v. 118, n. 1, p. 197-203, 1981.

ZHOU, H. *et al.* Advancements in Top-Down Proteomics. *Analytical Chemistry*, v. 84, n. 2, p. 720-734, 2011.

CAPÍTULO 3. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos apresentados neste trabalho permitiram observar a presença de espécies inorgânicas concomitantemente a determinadas proteínas da linhaça dourada utilizando uma técnica de separação eficiente, um detector de sensibilidade elevada para o metal quantificado e outro detector específico para compostos orgânicos.

A fim de se conhecer a composição química da linhaça dourada, os teores de cobre, ferro e zinco na linhaça foram determinados por absorção atômica após a digestão da amostra em forno de micro-ondas com cavidade no Capítulo 1. A digestão ácida foi mais eficiente nas amostras sem a fração oleosa, levando a digeridos com menores teores de carbono residual.

Marcas diferentes de linhaça dourada sem fração lipídica foram analisadas e observou-se que a maior concentração foi sempre de ferro, seguido de zinco e cobre.

É notório que os metais desempenham um papel vital em funções biológicas e caso ele esteja associado a uma proteína, a função desta molécula é fortemente dependente desta interação. No Capítulo 1 destacou-se a importância da etapa de preparo da amostra na manutenção da integridade da ligação metal-proteína. Um estudo foi desenvolvido para investigar como solventes orgânicos polares e não polares podem interagir com a fase oleosa e influenciar a quantificação de metais ligados às proteínas da linhaça. As concentrações de cobre, ferro e zinco foram maiores nos sobrenadantes obtidos após a extração de proteínas dos resíduos sem lipídios gerados com hexano como extrator da fase lipídica. Acredita-se que este solvente mantém a proteína nativa e os metais associados às proteínas permanecem na fração aquosa, aumentando a concentração dos metais na fase proteica.

Também com hexano foi realizado o processo de extração de proteínas pelo método sequencial tornando-se possível relacionar a presença de albuminas e globulinas com cobre, ferro e zinco.

No Capítulo 2, a fase oleosa da linhaça dourada foi retirada com hexano e extraiu-se as proteínas do resíduo sem lipídios. Este extrato proteico foi eluído em uma coluna cromatográfica por exclusão molecular. Entre as frações coletadas, o perfil eletroforético foi semelhante e a concentração de

cobre, ferro e zinco acompanhou a eluição proteica. Uma fração que possuía altos teores proteicos e das espécies inorgânicas foi selecionada e analisada por LC-MS/MS e nela, vinte e uma proteínas foram identificadas e dentre elas, as pertencentes à classe de albuminas S, proteínas de armazenamento. Uma vez que os procedimentos adotados para extração proteica e separação cromatográfica foram não desnaturantes, possivelmente os metais estudados possuem grande afinidade pelas proteínas identificadas.

Outras marcas de linhaça dourada foram submetidas à extração proteica e o perfil eletroforético de todos os extratos foi analisado e observou-se diferenças da composição de subunidades entre as marcas investigadas. Os metais cobre, ferro e zinco também foram quantificados nestes extratos, sendo ferro o elemento mais abundante, seguido do cobre.

Uma perspectiva interessante seria a separação cromatográfica por afinidade. Neste caso, poderia ser utilizado uma coluna cuja fase estacionária possuísse o metal escolhido para estudo de imobilização. A proteína que possui afinidade por este metal ficaria retida na coluna enquanto que a outra, que não possui afinidade, seria eluída com uma solução tampão adequada.

Este trabalho de tese evidencia que a identificação de metais e proteínas em conjunto exige aplicações de múltiplas técnicas analíticas, como também exige um cuidadoso preparo da amostra.