

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

Leila Moreira Bittencourt

DETERMINAÇÃO DE METAIS LIGADOS AS PROTEÍNAS DE AVEIA, LINHAÇA, TRIGO
E SOJA EMPREGANDO DIFERENTES PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO PROTEICA.

Belo Horizonte
2012

UFMG/ICEx/DQ.918^a

T. 404^a

LEILA MOREIRA BITTENCOURT

**DETERMINAÇÃO DE METAIS LIGADOS AS PROTEÍNAS DE AVEIA,
LINHAÇA, TRIGO E SOJA EMPREGANDO DIFERENTES PROCEDIMENTOS
DE EXTRAÇÃO PROTEICA.**

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

Belo Horizonte

2012

Bittencourt, Leila Moreira

B624d Determinação de metais ligados às proteínas de
2012 aveia, linhaça, trigo e soja empregando diferentes
T procedimentos de extração proteica / Leila Moreira
Bittencourt. 2012.
124 f. : il.

Orientadora: Letícia Malta Costa.
Coorientador: Rodinei Augusti.

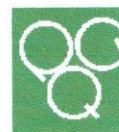
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas
Gerais. Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

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

CDU 043



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEX
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3499-5732
FAX: 031 - 3499-5700
E-MAIL: pgquimic@zeus.qui.ufmg.br



**"Determinação de Metais Ligados as Proteínas de Aveia, Linhaça, Trigo e Soja
Empregando Diferentes Procedimentos de Extração Proteica"**

Leila Moreira Bittencourt

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Leticia Malta Costa - Orientadora
UFMG

Dra. Ana Rita de Araújo Nogueira
EMBRAPA

Prof. Efraim Lázaro Reis
UFV

Profa. Cláudia Carvalhinho Windmüller
UFMG

Prof. Evandro Piccin
UFMG

Belo Horizonte, 17 de agosto de 2012.

“A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria”.

Paulo freire

*Aos meus pais Anacleto e Maria Auxiliadora,
Meu querido irmão Lucas,
Meu noivo João Paulo,
Com amor dedico.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela presença constante em minha vida e por estar sempre me amparando e iluminando;

Aos meus pais, pelo incentivo, torcida e orações;

Ao meu irmão pelo apoio e momentos de alegria só com ele vividos;

Ao meu noivo, João Paulo, pelo amor, paciência, companheirismo e incentivo;

Aos familiares, principalmente minhas avós Dolôres e Lelena, pelas orações;

À Profa. Dra. Letícia Malta Costa pela oportunidade, desafio e confiança. Por todo aprendizado e carinho, obrigada por TUDO;

Ao Prof. Dr. Rodinei Augusti pelos ensinamentos e disponibilidade. Você sempre será lembrado como exemplo de profissional e ser humano;

A todos do Laboratório de Venenos e Toxinas Animais, principalmente ao Prof. Dr. Adriano Pimenta pela oportunidade e receptividade em seu laboratório e ao Agenor, Ana Paula e Daniel pelo aprendizado e ajuda incondicional;

Ao Diogo pela amizade, colaboração efetiva nos experimentos e por todo o tempo dedicado;

À Aline e Jaqueline pela paciência e convivência durante estes quatro anos.

Aos colegas do Departamento de Química: Aline, Deyse, Frank, Gisele, Helga, Leonel, Luciano, Patrícia, Reginaldo, Rita, Silvéria, pelas discussões de nossos experimentos e pelos momentos de descontração;

Às minhas amigas Kamilla, Kiki, Ilmara, Georgia, Jussara, Juliana, Ana Paula por ter preenchido minha vida com muita alegria, sempre;

À Universidade Federal de Minas Gerais, em especial ao Departamento de Química pelo espaço para a realização do trabalho;

Ao CNPq e Capes pela concessão da bolsa de estudo;

A todos que contribuíram com este trabalho,

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O objetivo principal deste trabalho foi determinar metais (Cu, Fe, Mn e Zn) ligados à estrutura das proteínas das amostras de aveia, linhaça, trigo e soja, empregando diferentes procedimentos de extração da fração proteica. Para tanto, as amostras estudadas foram submetidas a três procedimentos de extração (1, 2 e 3) utilizando diferentes soluções extratoras.

Inicialmente, foi feita a quantificação dos elementos Cu, Fe, Mn e Zn por FAAS ou GF AAS em cada fração proteica e posterior dosagem de proteínas totais pelo método Bradford. Foi possível verificar a presença dos elementos Cu, Fe, Mn e Zn nas frações proteicas da aveia, linhaça, trigo e soja obtidas após aplicação dos procedimentos de extração.

O procedimento de extração 1 baseia-se na extração preferencial das proteínas do grupo da albumina, globulina, prolamina e glutelina, utilizando como extratores: Água, NaCl, Etanol e NaOH, respectivamente. Os resultados mostraram que, de modo geral, os elementos Cu, Fe, Mn e Zn estão associados às proteínas do grupo globulina para as matrizes avaliadas. Elevada concentração de proteínas totais foi determinada nas frações extraídas com NaOH.

O procedimento de extração 2 utiliza como soluções extratoras: NaOH, HCl, tampão Tris-HCl, tampão Tris-HCl contendo SDS 1% e água. Este procedimento extrai grupos proteicos que diferenciam entre si, basicamente, pela sua solubilidade em água e peso molecular. Desta forma, foi realizada a associação de Cu, Fe, Mn e Zn às diferentes frações proteicas das amostras de aveia, linhaça, trigo e soja, sendo possível concluir que, de modo geral, a fração com maior concentração do metal apresentava elevado teor de proteínas totais.

O procedimento de extração 3 fundamenta-se na extração preferencial de proteínas solúveis em água, utilizando solução tampão Tris-HCl para esta finalidade. Os resultados indicaram que o elemento Mn pode estar associado às proteínas solúveis extraídas das amostras de aveia e trigo. Para as amostras de linhaça e soja, verificou-se que as proteínas extraídas podem estar ligadas, preferencialmente, aos elementos Zn e Fe, respectivamente. De acordo com os

resultados apresentados, a amostra de soja apresenta maior teor de proteínas totais, comparando-a as demais amostras estudadas.

Neste trabalho também foi realizado um estudo comparativo entre os métodos de quantificação de proteínas totais: Bradford e ácido bicinconínico (BCA). Os resultados indicaram, de modo geral, maiores concentrações de proteínas totais nas determinações realizadas pelo o método BCA. Este método foi o mais indicado para as quantificações de proteínas totais nas frações das amostras de trigo e soja, baseado nos resultados de sensibilidade e linearidade da curva analítica.

Finalmente, foi realizado o estudo dos metais ligados às proteínas das amostras de aveia, linhaça, trigo e soja. Para tanto, as amostras foram submetidas aos procedimentos de extração 2 e 3 foram submetidas à separação eletroforética (gel) e cromatográfica para separação proteica. As bandas (eletroforese em gel) e frações (HPLC) proteicas foram devidamente tratadas, os metais determinados por GF AAS e as proteínas identificadas por MALDI-TOF-MS/MS. Diversas proteínas presentes nas amostras de aveia, linhaça, trigo e soja foram identificadas e associadas aos metais Cu, Fe, Mn e Zn, cuja presença é imprescindível para a função das proteínas em organismos de origem vegetal e animal.

Neste trabalho, as técnicas de separação eletroforética (1D SDS-PAGE) e cromatográfica (HPLC-UV) foram empregadas de forma complementar em estudos metaloproteômicos, tornando possível a identificação de proteínas ligadas à Cu, Fe, Mn e Zn.

ABSTRACT

The main objective of this study was to determine metals (Cu, Fe, Mn and Zn) associated to proteins from oats, flaxseed, wheat and soybeans, using different extraction procedures. For this purpose, the samples were subjected to three extraction procedures named 1, 2 and 3, using different extraction solutions.

Initially, Cu, Fe, Mn and Zn were determined by FAAS or GFAAS in each protein fraction. Total protein measurement was made by Bradford method. It was possible to verify the presence of Cu, Fe, Mn and Zn in protein fractions of oats, flaxseed, wheat and soybeans samples.

The extraction procedure 1 is based on the protein extraction of the group albumin, globulin, prolamin and glutelin, using water, NaCl, NaOH and ethanol as extraction solution, respectively. The results showed that generally, the elements Cu, Fe, Mn and Zn were associated with globulin proteins group. High concentration of total protein was determined in the extracted fraction with NaOH solution.

The extraction procedure 2 was realized using NaOH, HCl, Tris-HCl buffer, Tris-HCl buffer containing 1% SDS and water as extractant solutions. This procedure allowed extraction of proteins water soluble. The combination of Cu, Fe, Mn and Zn with different protein fractions of oats, linseed, wheat and soybeans samples was observed. It was possible to conclude that, in general, the fraction with high protein concentration showed high metal content total protein.

The extraction procedure 3 is based on the extraction of water soluble proteins using Tris-HCl buffer solution. The results indicated that the Mn was the major element associated to soluble proteins extracted from wheat and oats samples. For flaxseed and soybean, it was found that the extracted proteins could be associated to Zn and Fe, respectively. According to the results soybean sample presented the highest content of total protein, when compared to other samples.

In this work it was also carried out a comparative study to measure total protein by Bradford and bicinchoninic acid (BCA) methods. BCA method presented

higher concentrations of total protein in comparison with Bradford. . This method is suitable for total protein quantification in all fractions of wheat and soybean samples.

Finally, we performed the study of protein-bound to metal in oats, flaxseed, wheat and soybeans samples. For this purpose, the samples were subjected to extraction procedures 2 and 3 and the fractions were submitted to gel electrophoretic analysis (GE) and chromatographic separation. The metals were quantified in the bands (gel electrophoresis) and protein fractions (HPLC) after adequate treatment by GF AAS. In addition, the proteins were identified by MALDI-TOF-MS/MS. Thus, we identified several proteins present in all samples and we associate them with the metals Cu, Fe, Mn and Zn, whose presence is essential for adequate function of proteins in vegetable and animal organisms.

In this paper, techniques of electrophoretic separation (1D SDS-PAGE) or chromatographic (HPLC-UV) were used in studies of complementary shape metalloproteômicos, making it possible to identify bound proteins Cu, Fe, Mn and Zn.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Forno de micro-ondas com cavidade, Milestone, modelo ETHOS 1.	34
Figura 2. Concentração, em $\mu\text{g g}^{-1}$, de Cu, Fe, Mn e Zn nas amostras de aveia, linhaça, trigo e soja <i>in natura</i> .	46
Figura 3. Porcentagem de Cu, Fe, Mn e Zn nas frações da amostra de aveia submetida ao procedimento de extração 1.	48
Figura 4. Porcentagem de Cu, Fe, Mn e Zn nas frações da amostra de linhaça submetida ao procedimento de extração 1.	49
Figura 5. Porcentagem de Cu, Fe, Mn e Zn nas frações da amostra de trigo submetida ao procedimento de extração 1.	50
Figura 6. Porcentagem de Cu, Fe, Mn e Zn nas frações da amostra de soja submetida ao procedimento de extração 1.	50
Figura 7. Porcentagem de Cu, Fe, Mn e Zn nas frações da amostra de aveia submetida ao procedimento de extração 2.	53
Figura 8. Porcentagem de Cu, Fe, Mn e Zn nas frações da amostra de linhaça submetida ao procedimento de extração 2.	54
Figura 9. Porcentagem de Cu, Fe, Mn e Zn, nas frações da amostra de trigo submetida ao procedimento de extração 2.	55
Figura 10. Porcentagem de Cu, Fe, Mn e Zn, nas frações da amostra de soja submetida ao procedimento de extração 2.	56
Figura 11. Precipitação das proteínas presentes em aveia.	58
Figura 12. Precipitação das proteínas presentes em linhaça.	59
Figura 13. Concentração Cu, Fe, Mn e Zn na fração proteica das amostras de aveia, linhaça, trigo e soja submetidas ao procedimento de extração 3.	60

- Figura 14.** Teor de proteínas totais, em mg g^{-1} , em aveia, linhaça, trigo e soja submetidas ao procedimento de extração sequencial 1. 62
- Figura 15.** Teor de proteínas totais, em mg g^{-1} , em aveia, linhaça, trigo e soja submetidas ao procedimento de extração sequencial 2. 63
- Figura 16.** Eletroforese em gel das frações da amostra de trigo obtidas após procedimento de extração 2 com: (2) NaOH; (3) HCl; (4) Tris-HCl; (5) Tris-HCl contendo SDS; (6) H_2O . O padrão de proteína com seus respectivos peso moleculares estão apresentados em (1). 91
- Figura 17.** Eletroforese em gel para a amostra padrão e fração das amostras de aveia, linhaça, trigo e soja obtidas após procedimento de extração 3. 95
- Figura 18.** Espectro PMF e dois espectros de MS/MS obtido para banda proteica da amostra de aveia (± 24.0). 100
- Figura 19.** RP-HPLC-UV: Separação da fração proteína da amostra de aveia submetida ao procedimento de extração 3. 105
- Figura 20.** RP-HPLC-UV: Separação da fração proteína da amostra de linhaça submetida ao procedimento de extração 3. 105
- Figura 21.** RP-HPLC-UV: Separação da fração proteína da amostra de trigo submetida ao procedimento de extração 3. 106
- Figura 22.** RP-HPLC-UV: Separação da fração proteína da amostra de soja submetida ao procedimento de extração 3. 106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros instrumentais utilizados para a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn por FAAS.	31
Tabela 2. Parâmetros instrumentais utilizados para a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn por GF AAS.	32
Tabela 3. Programa de aquecimento do forno de micro-ondas com cavidade.	34
Tabela 4. Programa de aquecimento otimizado para determinação de Cu em sementes por GF AAS.	38
Tabela 5. Programa de aquecimento otimizado para determinação de Fe em sementes por GF AAS.	38
Tabela 6. Programa de aquecimento otimizado para determinação de Mn em sementes por GF AAS.	39
Tabela 7. Programa de aquecimento otimizado para determinação de Zn em sementes por GF AAS.	39
Tabela 8. Faixa de trabalho aplicada para determinação de As, Cu, Fe, Mn e Zn por FAAS e GF AAS.	40
Tabela 9. Parâmetros das curvas analíticas obtidos para quantificação de Cu, Fe, Mn e Zn por FAAS.	41
Tabela 10. Parâmetros das curvas analíticas obtidos para quantificação de As, Cu, Fe Mn e Zn por GF AAS.	41
Tabela 11. Limite de detecção e quantificação de As, Cu, Fe, Mn e Zn por FAAS e GF AAS, considerando os diferentes meios extratores utilizados no procedimento de extração 1.	43

Tabela 12. Limite de detecção e quantificação de Cu, Fe, Mn e Zn por FAAS e GF AAS, considerando os diferentes meios extratores utilizados no procedimento de extração 2.	43
Tabela 13. Limite de detecção e quantificação de Cu, Fe, Mn e Zn por GF AAS, considerando os meios extratores: ácido e tampão Tris-HCl pH 7,4 utilizados no procedimento de extração 3.	44
Tabela 14. Concentrações de As, Cu, Fe, Mn e Zn, em $\mu\text{g g}^{-1}$, encontrados nas amostras <i>in natura</i> (média \pm desvio padrão; n = 3).	45
Tabela 15. Concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn, em $\mu\text{g g}^{-1}$, encontrados nas frações residuais das amostras após procedimentos de extração 1, 2 e 3 (média \pm desvio padrão; n = 3).	45
Tabela 16. Concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn, em $\mu\text{g g}^{-1}$, nas amostras de aveia, linhaça, trigo e soja submetidas à digestão em MW e comparadas aos valores nutricionais da TACO (média \pm desvio	47
Tabela 17. Concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn, em $\mu\text{g g}^{-1}$, nas frações da amostra de aveia submetida ao procedimento de extração 1 (média \pm desvio padrão; n = 3).	48
Tabela 18. Concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn, em $\mu\text{g g}^{-1}$, nas frações da amostra de linhaça submetida ao procedimento de extração 1 (média \pm desvio padrão; n = 3).	49
Tabela 19. Concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn, em $\mu\text{g g}^{-1}$, nas frações da amostra de trigo submetida ao procedimento de extração 1 (média \pm desvio padrão; n = 3).	49
Tabela 20. Concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn, em $\mu\text{g g}^{-1}$, nas frações da amostra de soja submetida ao procedimento de extração 1 (média \pm desvio padrão; n = 3).	50
Tabela 21. Distribuição de Cu, Fe, Mn e Zn nas frações proteicas das amostras de aveia, linhaça, trigo e soja extraídas pelo procedimento de extração 1.	51

Tabela 22. Concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn, em $\mu\text{g g}^{-1}$, nas frações da amostra de aveia submetida ao procedimento de extração 2 (média \pm desvio padrão; n = 3).	52
Tabela 23. Concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn, em $\mu\text{g g}^{-1}$, nas frações da amostra de linhaça submetida ao procedimento de extração 2 (média \pm desvio padrão; n = 3).	53
Tabela 24. Concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn, em $\mu\text{g g}^{-1}$, nas frações da amostra de trigo submetida ao procedimento de extração 2 (média \pm desvio padrão; n = 3).	54
Tabela 25. Concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn, em $\mu\text{g g}^{-1}$, nas frações da amostra de soja submetida ao procedimento de extração 2 (média \pm desvio padrão; n = 3).	55
Tabela 26. Grupos proteicos extraídos, preferencialmente, com diferentes soluções extratoras.	57
Tabela 27. Distribuição de Cu, Fe, Mn e Zn nas frações proteicas das amostras de aveia, linhaça, trigo e soja extraídas pelo procedimento de extração 2.	57
Tabela 28. Concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn, em $\mu\text{g g}^{-1}$, na fração das amostras de aveia, linhaça, trigo e soja submetidas ao procedimento de extração 3 (média \pm desvio padrão; n = 3).	60
Tabela 29. Teor de proteínas totais, em mg g^{-1} , em aveia, linhaça, trigo e soja submetidas ao procedimento de extração 1 (média \pm desvio padrão; n = 3).	61
Tabela 30. Teor de proteínas totais, em mg g^{-1} , em aveia, linhaça, trigo e soja submetidas ao procedimento de extração 2 (média \pm desvio padrão; n = 3).	62
Tabela 31. Teor de proteínas totais, em mg g^{-1} , em aveia, linhaça, trigo e soja submetidas ao procedimento de extração 3 (média \pm desvio padrão; n = 3).	63

Tabela 32. Teor de proteínas totais determinada pelos métodos Bradford e BCA, nas frações das amostras de trigo e soja extraídas pelo procedimento de extração 1 (média ± desvio padrão, n = 3).	74
Tabela 33. Teor de proteínas totais determinada pelos métodos Bradford e BCA, na fração das amostras de trigo e soja extraída pelo procedimento de extração 3 (média ± desvio padrão, n = 3).	75
Tabela 34. Reagentes utilizados durante a digestão proteica.	90
Tabela 35. Determinação de Cu, Mn e Zn, por GF AAS, nas bandas proteicas da amostra de trigo submetida ao procedimento de extração 2.	92
Tabela 36. Concentração de Cu, Fe, Mn e Zn, em $\mu\text{g g}^{-1}$, nas bandas proteicas da amostra de aveia submetidas ao procedimento de extração 3.	96
Tabela 37. Concentração de Cu, Fe, Mn e Zn, em $\mu\text{g g}^{-1}$, nas bandas proteicas da amostra de linhaça submetidas ao procedimento de extração 3.	96
Tabela 38. Concentração de Cu, Fe, Mn e Zn, em $\mu\text{g g}^{-1}$, nas bandas proteicas da amostra de trigo submetidas ao procedimento de extração 3.	97
Tabela 39. Concentração de Cu, Fe, Mn e Zn, em $\mu\text{g g}^{-1}$, nas bandas proteicas da amostra de soja submetidas ao procedimento de extração 3.	97
Tabela 40. Proteínas identificadas nas bandas proteicas da amostra de aveia e soja.	102

Tabela 41. Determinação de Cu, Fe, Mn e Zn, por GF AAS, nas frações proteicas das amostras de aveia, linhaça, trigo e soja obtidas após análise por RP-HPLC-UV.	107
Tabela 42. Proteínas identificadas nas frações proteicas das amostras de aveia e linhaça, obtidas após análise por RP-HPLC-UV.	109
Tabela 43. Proteínas identificadas nas frações proteicas das amostras de trigo, obtidas após análise por RP-HPLC-UV.	109
Tabela 44. Proteínas identificadas nas frações proteicas das amostras de soja, obtidas após análise por RP-HPLC-UV.	110
Tabela 45. Funções das proteínas identificadas nas amostras de aveia, linhaça, trigo e soja.	113

LISTA DE ABREVIATURAS

ICP-MS	Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado
HPLC-MS	Espectrometria de Massas com Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
AAS	Espectrometria de Absorção Atômica
ETAAS	Espectrometria de Absorção Atômica Eletrotérmica
FAAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Chama
SEC-UV	Cromatografia por Exclusão de Tamanho
GF AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite
MALDI-TOF-MS	Espectrometria de Massas com Ionização a Laser Assistida por Matriz e Analisador de Tempo de Vôo
μSR-XRF	Fluorescência de Raio-X com Radiação Síncrotron
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Acrilamida Contendo Dodecil Sulfato de Sódio
MS	Espectrometria de Massas
LA-ICP-MS	Ablação com Laser em Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado
ICP-OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado
2D-PAGE	Eletroforese em Gel de Acrilamida em Duas Dimensões
ESI-MS	Espectrometria de massas com fonte de ionização eletrospray

RP-HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa
PMF	Impressão Digital de Massas Peptídicas (do inglês: Peptide Mass Fingerprinting)
1D-PAGE	Eletroforese em Gel de Acrilamida em Uma Dimensão
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial
TFA	Ácido trifluoracético
MW	Micro-ondas
EtOH	Etanol
BCA	Ácido Bicinconínico

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
Introdução	1
CAPÍTULO 2	6
Revisão Bibliográfica.....	6
2.1. Amostras: aveia, linhaça, trigo e soja.....	7
2.2. Constituintes Inorgânicos.....	9
2.3. Extração de metaloproteínas: Extração sequencial sólido-líquido e extração em fase única.....	12
2.4. Análise Metaloproteômica	14
2.5. Referências Bibliográficas.....	17
CAPÍTULO 3	27
Estudo da distribuição de Cu, Fe, Mn, e Zn nas frações das amostras de aveia, linhaça, trigo e soja	27
3.1. INTRODUÇÃO	28
3.2. OBJETIVOS	30
3.2.1. Objetivo Geral	30
3.2.2. Objetivos Específicos	30
3.3. PARTE EXPERIMENTAL.....	31
3.3.1 Amostras	31
3.3.2. Determinação dos Metais.....	31
3.3.2.1. Instrumentação.....	31
3.3.2.2. Linearidade da Curva Analítica, Limites de Detecção e Quantificação	32
3.3.2.3. Determinação da Concentração Total de Cobre, Ferro, Manganês e Zinco.	33
3.3.2.4. Procedimentos de Extração Proteica	34
3.3.3. Proteínas.....	36
3.3.3.1. Quantificação do Teor de Proteínas Totais	36
3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37

3.4.1. Otimização das Condições Analíticas para Análise de Cu, Fe, Mn e Zn por GF AAS.....	37
3.4.2. Determinação da Concentração Total de As, Cu, Fe, Mn e Zn em aveia, linhaça, trigo e soja	44
3.4.2.1. Comparação da Concentração Total de Cu, Fe, Mn e Zn com Valores Nutricionais das Amostras de Aveia, Linhaça, Trigo e Soja	46
3.4.3. Procedimentos de Extração Proteica	48
3.4.3.1. Procedimento de Extração 1	48
3.4.3.2. Procedimento de Extração 2	52
3.4.3.3. Procedimento de extração 3	59
3.4.4. Proteínas.....	61
3.4.4.1. Quantificação das proteínas totais	61
3.5. CONCLUSÕES	65
3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
 CAPÍTULO 4	 70
Estudo comparativo entre os métodos Bradford e ácido bicinconínico para quantificação de proteínas totais.....	70
4.1. INTRODUÇÃO	71
4.2. OBJETIVOS	72
4.2.1. Objetivo Geral	72
4.2.2. Objetivos Específicos.....	72
4.3. PARTE EXPERIMENTAL.....	73
4.3.1. Instrumentação	73
4.3.2. Extração das frações proteicas	73
4.3.3. Quantificação do teor de proteínas totais.....	73
4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4.4.1. Quantificação do teor de proteínas totais: comparação entre os métodos Bradford e BCA.....	74
4.5. CONCLUSÕES	77
4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

CAPÍTULO 5	80
ESTUDO DOS METAIS LIGADOS ÀS PROTEÍNAS DA AVEIA, LINHAÇA, TRIGO E SOJA:.....	80
5.1. INTRODUÇÃO	81
5.2. OBJETIVOS	82
5.2.1. Objetivo Geral	82
5.2.2. Objetivos Específicos.....	82
5.3. PARTE EXPERIMENTAL.....	83
5.3.1. Amostras	83
5.3.2. Instrumentação	83
5.3.2.1. GF AAS.....	83
5.3.2.2. 1D SDS-PAGE	83
5.3.2.3. RP-HPLC-UV	84
5.3.2.4. MALDI-TOF-MS/MS.....	84
5.3.3. Procedimento de extração 2: Amostra de Trigo.....	85
5.3.3.1. Extração das Frações Proteicas	85
5.3.3.2. Determinação dos Metais nas Bandas Proteicas.....	86
5.3.3.3. Identificação de Proteínas nas Bandas Proteicas	86
5.3.3.4. Identificação de Proteínas nas Frações de Trigo	87
5.3.4. Procedimento de extração 3: Amostras de Aveia, Linhaça, Trigo e Soja	88
5.3.4.1. Extração da Fração Proteica.....	88
5.3.4.2. Determinação dos Metais nas Bandas Proteicas.....	88
5.3.4.3. Identificação de Proteínas nas Bandas Proteicas	88
5.3.4.4. Determinação dos Metais nas Frações obtidas após separação por RP-HPLC-UV	89
5.3.4.5. Identificação das Proteínas nas Frações obtidas após separação por RP-HPLC-UV	89
5.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
5.4.1. Procedimento de Extração 2: Amostra de Trigo.....	91
5.4.1.1. Determinação dos Metais nas Bandas Proteicas.....	91

5.4.1.2. Identificação de Proteínas nas Bandas Proteicas	93
5.4.1.3. Identificação de Proteínas nas Frações de Trigo	93
5.4.2. Procedimento de extração 3: Amostra de Aveia, Linhaça, Trigo e Soja	95
5.4.2.1. Determinação dos Metais nas Bandas Proteicas	95
5.4.2.2. Identificação de Proteínas nas Bandas Proteicas	98
5.4.2.3. Determinação dos Metais nas Frações obtidas após separação por RP-HPLC-UV	104
5.4.2.4. Identificação das Proteínas nas Frações obtidas após separação por RP-HPLC-UV	108
5.4.3. Comparação dos resultados obtidos após separação proteica por 1D SDS-PAGE e RP-HPLC-UV	114
5.5. CONCLUSÕES	116
5.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
CAPÍTULO 6	125
Anexos	125

CAPÍTULO 1

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A identificação, separação e quantificação das formas químicas sob as quais um elemento pode estar presente em uma determinada matriz são cruciais para o entendimento do impacto desse elemento no ambiente e na saúde humana. Atualmente, a demanda por informações específicas é cada vez maior e, esse tipo de exigência refere-se à forma química do elemento presente nos alimentos e a qual proteína ele se encontra ligado. Contudo, até o momento, informações relacionadas às ligações entre metais e proteínas são escassas, tornando o estudo bastante atrativo. Sendo assim, a investigação dessas espécies metálicas em alimentos é essencial para o entendimento de sua essencialidade, toxicidade e impacto bioquímico em sistemas biológicos.

A maioria dos íons metálicos presente em alimentos encontra-se ligado a proteínas ou enzimas específicas e exerce seu papel como centros estruturais ou de ativação, comandando processos como catálise, transporte e armazenamento [1].

Alguns estudos têm sido realizados a fim de entender as interações entre os metais e as proteínas e enzimas presentes em alimentos [1-3]. Nessas espécies, o metal se liga às proteínas por meio de interações de alta afinidade; como exemplo, os íons de metais de transição, Cu(II), Fe(II), Mn(II), Mo(II), e Zn(II). Elementos não-metálicos como Se(IV), apresentam as mais fortes interações coordenadas, por serem incorporados à estrutura proteica que contenha cisteínas e metioninas, formando metaloproteínas classificadas como selenocisteínas e selenometioninas [4, 5].

Nestes estudos, inicialmente, deve-se aplicar um procedimento eficiente para a extração das metaloproteínas. A extração sequencial sólido-líquido tem sido empregada por alguns autores para este fim [1,6]. A amostra é tratada com diferentes agentes extratores, aumentando a extensão e a capacidade de interação com a matriz orgânica. A amostra sólida pode ser dividida nas frações específicas que podem ser extraídas seletivamente usando reagentes apropriados. Já a extração em fase única pode ser utilizada como estratégia

quando se pretende extrair um grupo específico de metaloproteínas, minimizando as etapas de preparo de amostra, empregando-se comumente neste tipo de extração, o tampão Tris [7-10].

Geralmente, a determinação dos elementos nas diferentes frações do procedimento de extração é realizada por técnicas como a espectrometria de absorção e/ou emissão atômica [11-13], a separação das proteínas é realizada por SEC-UV-ICP-MS, RP-HPLC-UV e/ou eletroforese [14-16] e a sua identificação por MALDI-TOF-MS/MS e ESI-MS/MS [17,18].

Neste trabalho, as amostras de aveia, linhaça, trigo e soja foram submetidas aos procedimentos de extração sequencial e em fase única. De acordo com a literatura, soluções extratoras específicas extraem, preferencialmente, um grupo de proteínas. Desta maneira, em cada fração obtida após os procedimentos de extração foram determinadas as concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn e os possíveis grupos proteicos extraídos com a solução extratora. Posteriormente, para estudar especificamente os metais ligados às proteínas, as frações obtidas após os procedimentos de extração foram analisadas por RP-HPLC-UV e 1D SDS-PAGE, obtendo-se a separação proteica. As frações e bandas proteicas obtidas por cromatografia e eletroforese, respectivamente, foram analisadas por GF AAS para determinação dos constituintes inorgânicos e MALDI-TOF-MS para identificação das proteínas. Deste modo, pode-se quantificar os metais ligados às proteínas identificadas, podendo-se inferir as possíveis metaloproteínas existentes nas amostras avaliadas.

Referências Bibliográficas

[1] NAOZUKA, J.; OLIVEIRA, P. V. Cu, Fe, Mn and Zn Distribution in Protein Fraction 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.

[2] NAOZUKA, J.; MARANA, S. R.; OLIVEIRA, P. V. Water-soluble Cu, Fe, Mn and Zn species in nuts and seeds. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 23, p. 78–85, 2010.

[3] KANNAMKUMARATH, S. S.; WUILLOUD, R. G.; CARUSO, J. A. Studies of Various Elements of Nutritional and Toxicological Interest Associates with Different Molecular Weight Fractions in Brazil Nuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, p. 5773-5780, 2004.

[4] CHÉRY, C. C.; CHASSAIGNE, H.; VERBEECK, L.; CORNELIS, R.; VANHAECKE, F.; MOENS, L. Detection and quantification of selenium in proteins by means of gel electrophoresis and electrothermal vaporization ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 12, p. 576-580, 2002.

[5] CHÉRY, C. C.; MOENS, L.; CORNELIS, R.; VANHAECKE, F. Capabilities and limitations of gel electrophoresis for elemental speciation: A laboratory's experience. *Pure Applied Chemistry*, v. 78, p. 23-35, 2006.

[6] CHUNHIENG, T.; PÉTRITIS, K.; ELFAKIR, C.; BROCHIER, J.; GOLI, T.; MONTET, D. Study of Selenium Distribution in the Protein Fractions of the Brazil Nut, *Betholletia excelsea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, p. 4318-4322, 2004.

- [7] MUNOZ, A. H. S.; KUBACHKA, K.; WROBEL, K.; CORONA, F. G.; YATHAVAKILLA, S. K. V.; CARUSO, J. A.; WROBEL, K. Metallomics Approach to Trace Element Analysis in *Ustilago maydis* Using Cellular Fractionation, Atomic Absorption Spectrometry, and Size Exclusion Chromatography with ICP-MS Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 5138-5143, 2005.
- [8] TASTED, L.; SCHUMLOFFEL, D.; LOBINSKI, R. ICP-MS-assisted proteomics approach to the identification of selenium-containing proteins in selenium-rich yeast. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 23, p. 309-317, 2008.
- [9] PEDRERO, Z.; MADRID, Y.; CÁMARA, C.; SCHRAM, E.; LUTEN, J. B.; FELDMANN, I.; WAENTIG, L.; HAYEN, H.; JAKUBOWSKI, N. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 24, p. 775-784, 2009.
- [10] TRAN, M. Q. T.; NYGREN, Y.; LUNDIN, C.; NAREDI, P.; BJORN, E. *Analytical Biochemistry*, v. 396, p. 76-82, 2010.
- [11] VERBI, F. M.; ARRUDA, S. C. C.; RODRIGUEZ, A. P. M.; ARRUDA, M. A. Z. Metal-binding proteins scanning and determination by combining gel electrophoresis, synchrotron radiation X-ray fluorescence and atomic spectrometry. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 62, p. 97-109, 2005.
- [12] BREWER, T. M.; MARCUS, R. K. Determination of "free" iron and iron bound in metalloproteins via liquid chromatography separation and inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy (LC-ICP-OES) and particle beam/hollow cathode-optical emission spectroscopy (LC-PB/HC-OES) techniques. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 22, p. 1067-1075, 2007.
- [13] MOUNICOU, S.; MEIJA, J.; CARUSO, J. Preliminary studies on selenium-containing proteins in *Brassica juncea* by size exclusion chromatography and fast protein liquid chromatography coupled to ICP-MS. *Analyst*, v. 129, p. 116-123, 2004.

[14] JAYASINGHE, S. B.; CARUSO, J. A. Investigation of Se-containing proteins in *Bertholletia excelsa* H.B.K. (Brazil nuts) by ICPMS, MALDI-MS and LC–ESI-MS methods. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 307, p. 16-27, 2011.

[15] CHASSAIGNE, H.; BROHÉE, M.; NORGAARD, J. V.; HENGEL, A. J. V. Investigation on sequential extraction of peanut allergens for subsequent analysis by ELISA and 2D gel electrophoresis. *Food Chemistry*, v. 105, p. 1671-1681, 2007.

[16] LÓPEZ, M. C. G.; CANAS, V. G.; ALEGRE, M. L. M. Reversed-phase high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry profiling of transgenic and non-transgenic maize for cultivar characterization. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 7222-7228, 2009.

[17] NATARAJAN, S. S.; KRISHNAN, H. B.; LAKSHMAN, S.; GARRETT, W. M. An efficient extraction method to enhance analysis of low abundant proteins from soybean seed. *Analytical Biochemistry*, v. 394, p. 259-268, 2009.

[18] TASTET, L.; SCHAUMLOFFEL, D.; BOUYSSIERE, B.; LOBINSKI, R. Identification of selenium-containing proteins in selenium-rich yeast aqueous extract by 2D gel electrophoresis, nanoHPLC-ICP-MS and nanoHPLC-ESI-MS/MS. *Talanta*, v. 75, p. 1140-1145, 2008.

CAPÍTULO 2

Revisão Bibliográfica

2.1. Amostras: aveia, linhaça, trigo e soja

A aveia (*Avena sativa L.*) é uma planta originária da Europa oriental que atualmente é cultivada em todo o mundo devido à sua ampla utilização na culinária [1].

A aveia é um cereal nutritivo, que possui elevadas quantidades de proteínas, vitaminas, carboidratos, fibras, cálcio, ferro, zinco, manganês e em menores quantidades, cobre. Atualmente, ela está em evidência pelo alto poder benéfico de suas fibras solúveis relacionadas a um bom funcionamento intestinal. Além disso, vem sendo relacionada à manutenção do colesterol em níveis adequados.

Os grãos de aveia possuem elevados teores proteicos, com valores médios entre 15 e 20% [1, 2] e boa qualidade proteica quando comparada com outros cereais [3]. Possuem, geralmente, 50 a 90 g de gordura por quilo do grão, destacando-se altas quantidades de ácidos oléicos e linoléicos, que aumentam seu valor nutricional [4].

A linhaça é uma semente oleaginosa, proveniente da planta linho (*Linum usitatissimum L.*). Atualmente, grande parte da demanda mundial da linhaça está voltada para o aproveitamento industrial do óleo, que é utilizado como agente de secagem em tintas e vernizes [5].

A semente de linhaça vem se popularizando ao longo dos últimos anos com a divulgação de informações sobre seus efeitos curativos em casos de inflamações do estômago e intestinos, nas inflamações da bexiga e nas doenças respiratórias [6]. É considerada um dos melhores remédios naturais na regularização das funções intestinais, além de seu efeito sobre a flora intestinal [7, 8]. Além disso, contém ligninas em sua composição, as quais se associam as propriedades anticancerígenas, principalmente em relação ao câncer de mama e cólon.

A linhaça é rica em gordura, com composição nutricional aproximada de 30-40% [8]. Sua composição lipídica apresenta baixa concentração de ácidos graxos saturados (9%), moderada quantidade de monoinsaturados (18%) e elevado teor

de ácidos graxos poliinsaturados (73%), destacando-se o ácido α -linolênico que ao ser ingerido diminui o risco de doenças cardiovasculares em humanos [6, 9, 10].

As sementes de linhaça contêm de 20-25% de proteína [8, 11] e de 20-28% de fibra [8]. A composição de aminoácidos da linhaça é comparável à da soja (apresentam altas taxas de ácido aspártico, glutamina, leucina e arginina), caracterizando uma proteína completa e com efeito sobre as funções imunológicas do organismo [5]. Contém também vitaminas B1, B2, C, E e caroteno, além de Ca, Fe, K, Mg, P e Zn [7]. No Brasil, vem crescendo o consumo da linhaça e as informações sobre os seus benefícios.

O trigo (*Triticum aestivum* L.), originário do sudoeste asiático, é considerado a segunda maior cultura de cereais, perdendo apenas para o cultivo de milho. No Brasil, a produção anual oscila entre 5 e 6 milhões de toneladas, sendo o rendimento mundial total de 550-600 milhões de toneladas por ano [12]. O trigo apresenta propriedades antioxidante, calmante, neurotônica, nutritiva, reconstituente e vitaminizante [1]. Além de ser uma fonte de energia, o cereal é um fornecedor preliminar de proteína, o que desperta o interesse em tentar relacionar a quantidade, composição ou a estrutura da proteína à qualidade do cereal e a outras características funcionais [12, 13].

Na composição do trigo, encontra-se aproximadamente 60-70% de carboidratos, 12% de proteína (glúten), 2% de lipídios, ácido ascórbico, vitamina E, entre outros [14]. Vale ressaltar ainda que o trigo é rico em nutrientes essenciais, como ferro e zinco [15, 16, 17].

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma planta pertencente à família leguminosae, com importância econômica mundial. A planta é originária da China, constituindo-se na base alimentar do povo chinês a mais de 5 mil anos [18].

Atualmente, a soja é cultivada em todos os estados brasileiros, fazendo com que o Brasil seja o segundo maior produtor mundial, produzindo cerca de 57 milhões de toneladas na safra 2006/2007, ficando atrás somente dos EUA. Com estes números, o Brasil representa 38% do comércio mundial de soja [19, 20].

A soja tem sido relacionada a diversos efeitos benéficos sobre a saúde humana, incluindo a redução do risco à doenças cardiovasculares, câncer,

osteoporose e derrames [21]. Além disso, uma dieta a base de soja tem efeito sobre a perda de peso, devido a presença de fibras dietéticas em sua composição nutricional [22].

O grão de soja é considerado uma fonte de proteína completa, isto é, contém quantidades significativas de todos os aminoácidos essenciais que devem ser providos ao corpo humano [20, 23], além de ser uma fonte rica de sais minerais e de Ca, Cu, Fe, K, Mg, P e Zn [24, 25].

Em virtude do crescente consumo de aveia, linhaça, trigo e soja pela população mundial é de extrema importância determinar a concentração total dos constituintes inorgânicos nessas amostras e suas diferentes formas, assim como avaliar a qual proteína estes metais estão ligados.

2.2. Constituintes Inorgânicos

O metabolismo, crescimento e bem estar humano e animal depende da ingestão apropriada e equilibrada de nutrientes. Atualmente, 49 componentes nutritivos são conhecidos por sua essencialidade no sustento da vida humana [26].

Elementos que ocorrem geralmente em baixas concentrações em tecidos vivos são designados elementos traço ou micro minerais. Embora a essencialidade de alguns elementos traço tenha sido questionada, ainda são considerados essenciais e benéficos à espécie mamífera [27].

Elementos metálicos, presentes em baixas concentrações, têm função importante, pois estão ligados a proteínas ou enzimas específicas, exercendo papel efetivo nas suas atividades biológicas. Porém, o intervalo de concentração que determina a essencialidade é, geralmente, muito estreito, com implicações graves quando esses limites não são respeitados. Os elementos tóxicos afetam negativamente vários processos metabólicos e, quando presentes em concentrações relativamente altas, podem causar danos irreversíveis e até levar a morte do indivíduo [27].

Uma das fontes naturais de elementos essenciais ao nosso organismo são os alimentos. Informações sobre sua distribuição nos alimentos é importante para estimar a absorção de elementos essenciais e para avaliar os potenciais riscos à saúde causados pela exposição a elementos tóxicos.

O organismo humano adulto contém de 3 a 5 g de ferro; aproximadamente 2000 mg como hemoglobina e 8 mg como enzimas. O Fe é bem conservado pelo organismo e 90% são intensivamente recuperados e reutilizados. A absorção deste mineral depende de vários fatores, como a fonte alimentar, o estoque corporal e o conteúdo fornecido pela dieta, além de receber influência dos outros alimentos ingeridos na mesma refeição [28]. Sabe-se que a absorção do ferro-heme é mais eficiente (15%) do que a do ferro não-heme (< 5%). O Fe não-heme pode ser encontrado em alimentos como Fe(II) ou Fe(III), sendo a disponibilidade do Fe(II) maior que a do Fe(III), porque este último é menos solúvel no lúmen intestinal [29].

A deficiência de Fe é um dos maiores problemas nutricionais no mundo, particularmente nos países em desenvolvimento, provocando várias perturbações, como taquicardia, fadiga, redução da função leucocitária, sendo a mais comum a anemia [30, 31]. O excesso de Fe pode provocar cefaléia, convulsões, febre, choque anafilático além de produzir espécies reativas de oxigênio levando ao estresse oxidativo, sendo acumulado principalmente no fígado, baço e coração, causando perda das funções conhecidas como hemocromatose [32].

O cobre é essencial para diversas funções no organismo, como a mobilização do ferro para a síntese de hemoglobina, produção de colágeno, problemas no sistema reprodutor, além de ser componente de várias enzimas [28, 33].

A absorção do cobre ocorre por transporte ativo e por difusão duodenal. Em média, 40 a 50% do total ingerido são absorvidos. Uma vez absorvido é transportado para o fígado ligado à albumina e transcupreína, incorporando-se então a ceruloplasmina e várias metaloenzimas, que permitem o transporte do cobre para os tecidos extra-hepáticos. A excreção é por via fecal e, em maior teor, pela bile, assim como na urina e suor [28].

Sua toxicidade provoca diarreia, náusea, cirrose, anemia e bronquite [28]. O envenenamento crônico de cobre pela ingestão em alimentos é pouco comum, pois o fígado possui uma grande capacidade para excretar cobre [33].

O zinco é o segundo microelemento mais abundante no corpo (cerca 3 g em um adulto), presente nos tecidos, órgãos e fluidos corporais [32]. Possui funções semelhantes às do cobre, como a constituição de enzimas, mas também apresenta outras específicas como a mobilização hepática da vitamina A, atuação no crescimento e maturação sexual, funções imunológicas, dentre outras [28].

O zinco é absorvido mais eficientemente do que o ferro não-heme, porém, ao contrário do ferro, o Zn não é armazenado em nosso organismo [34]; portanto é de total importância a ingestão diária desse elemento.

A deficiência deste elemento provoca retardo no crescimento, falta de apetite, lesões cutâneas e alterações de comportamento, enquanto sua toxicidade provoca náusea, vômitos, cefaléia e deficiência de cobre [28].

O manganês é um elemento traço conhecido por ativar algumas enzimas envolvidas em processos metabólicos, sendo necessário também para o metabolismo de proteínas e gorduras. Atua na regulação de açúcar no sangue, na diminuição de radicais livres e na utilização de vitaminas B1 e E [35].

O Mn é aparentemente absorvido em toda a extensão do intestino delgado, sendo mais absorvido em mulheres que em homens. A excreção ocorre principalmente pelas fezes. Sua deficiência causa perda de peso, dermatite, afeta a capacidade reprodutora, a função pancreática e o metabolismo dos carboidratos. O excesso deste elemento produz os sintomas do tipo Parkinson, alterações de humor, depressão e agitação [36].

As técnicas de emissão e/ou absorção atômica são descritas na literatura com a finalidade de se determinar macro e micronutrientes presentes em amostras de origem vegetal e/ou animal.

Huang et al. [37] determinaram a concentração dos metais Hg, As, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn e Cd, por ICPOES, em amostras de solo e grãos de trigo em diferentes regiões de Kunshan, China, e estimaram os riscos para a saúde da população, devido a ingestão deste cereal. De acordo com os resultados, as concentrações

dos metais em amostras de solo superior (0-15 cm) encontram-se na ordem: Zn>Cr>Ni>Pb>Cu>As>Hg>Cd. As concentrações de Zn, Cr, Cd, Hg e Ni estavam acima do limite máximo permitido para solo que é de 200; 250, 0,3; 0,5 e 50 mg kg⁻¹, respectivamente. Para amostras de grãos de trigo, as concentrações dos metais decresceram de acordo com a ordem: Zn>Cu>Pb>Ni>Cd>As>Hg. Algumas amostras de trigo apresentaram concentrações de Zn, Pb e Cd acima do permitido pela legislação chinesa que é de 50; 0,4 e 0,1 mg kg⁻¹, respectivamente. Os autores concluíram que as discrepâncias nas concentrações dos metais em diferentes regiões de Kunshan surgiram pela influência ambiental e climática.

Rogez e colaboradores [38] determinaram a composição química de três frutas típica da Amazônia: araçá-boi, bacuri e cupuaçu utilizando a técnica ICP-OES. Neste estudo foi relatada a composição de acordo com o teor de proteína e gordura, índice dietético, minerais, dentre outros. O zinco apresentou níveis entre 0,18–1,04 mg/100g de amostra fresca. A concentração de cobre nas amostras de bacuri e cupuaçu foi de 0,38 e 0,26 mg/100g, respectivamente. As três frutas apresentaram baixos teores de ferro e são consideradas pobres em manganês. Os resultados obtidos indicam que as polpas de frutas da Amazônia são de interesse nutritivo e devem ser utilizadas frequentemente, pelo menos regionalmente.

2.3. Extração de metaloproteínas: Extração sequencial sólido-líquido e extração em fase única.

Em estudos metaloproteômicos, o preparo da amostra é uma etapa importante da sequência analítica, o qual deve ser realizado de forma eficiente, buscando manter a integridade da proteína e do metal ligado a ela. Sendo assim, os procedimentos de extração devem ser criteriosamente escolhidos, de forma a atender esta exigência.

O procedimento de extração sequencial trata a amostra com diferentes agentes extratores, aumentando a extensão e a capacidade de interação com a matriz orgânica. Conceitualmente, a amostra sólida é submetida a diferentes

reagentes extratores, o que favorece a extração seletiva de frações específicas da amostra.

O fracionamento obtido por este procedimento é influenciado por alguns fatores como: tipo de reagente usado, tempo de extração, incompleta seletividade e readsorção [39], podendo ainda ser afetado por propriedades das espécies químicas, como tamanho, solubilidade, afinidade, hidrofobicidade e carga [40].

Chunhieng e colaboradores [33] estudaram a distribuição de Se nas frações de proteína da Castanha-do-Pará (*Bertholletia excelsa*). As amostras de castanhas foram tratadas com água deionizada, NaCl, etanol e NaOH. A extração com água, solução salina e NaOH levou à obtenção de espécies de Se ligadas principalmente a três famílias de proteínas: albumina, globulina e gluteína. A fração extraída com água representou aproximadamente 18% da proteína total e era a fração mais rica em selênio, com um valor de 153 ppm. A análise por HPLC-MS mostrou que o selênio estava ligado covalentemente a dois aminoácidos para formar a selenometionina e selenocisteína. A selenometionina representou menos de 1% da quantidade total de metionina.

A extração em fase única vem sendo descrita por alguns autores como estratégia para a extração de um grupo específico de metaloproteínas, o que permite a minimização das etapas de preparo de amostra e a diminuição de interferentes.

Pedrero et al. [41] estudaram a distribuição de selênio na fração proteica solúvel extraída do tecido muscular do peixe bagre africano. Dois procedimentos de extração foram aplicados para a extração das proteínas de tecido muscular; um utilizando sonda ultrassônica e o outro um homogeneizador de vidro. Em ambos as extrações foram realizadas com Tris-HCl a partir de 1 g de amostra. Os autores descreveram que a extração ultrassônica foi a mais eficiente, rápida e simples. De acordo com os resultados obtidos, após a separação das proteínas por 1D SDS-PAGE, onze bandas proteicas contendo selênio foram identificadas por LA-ICP-MS, das quais seis foram selecionadas para identificação. Após a digestão trípica e análise por nano-HPLC/ESI-MS/MS, sete proteínas foram identificadas.

2.4. Análise Metaloproteômica

A metaloproteômica engloba conhecimentos e técnicas capazes de identificar um conjunto de metaloproteínas produzidas por uma célula e também de revelar as interações e interdependência dos processos biológicos.

O estudo de proteínas ganhou impulso a partir da década de 90 com a difusão da espectrometria de massas (MS) nas ciências biológicas, uma vez que se tornou possível analisar proteínas tão reduzidas quanto as encontradas na natureza [42].

O reconhecimento da importância dos metais em sistemas biológicos e os avanços tecnológicos na instrumentação analítica levaram à emergência de novas áreas de pesquisas dentro da metaloproteômica [43].

O estudo metaloproteômico divide-se basicamente em duas etapas: a primeira consiste na separação das proteínas a partir do fracionamento de um extrato celular. Para tanto, diferentes técnicas são utilizadas, destacando-se as eletroforéticas [44, 45, 46, 47] e cromatográficas [48, 49, 50, 51].

A segunda etapa consiste na identificação dos constituintes inorgânicos e proteicos. Para a determinação inorgânica, as técnicas de fluorescência de raio-X com radiação síncroton (SRXRF), absorção atômica (FAAS e GF AAS), ablação a laser (LA-MS) e emissão atômica (ICP-MS) são comumente empregadas [45, 52, 53, 54]. As técnicas MALDI-TOF-MS/MS [55, 56, 57] e ESI-MS/MS [54, 58] são utilizadas para a identificação das proteínas.

Na primeira etapa, propriedades fundamentais como massa molecular e estado de cargas são utilizadas. Na segunda etapa, deve-se, em princípio, obter a sequência dos aminoácidos que compõem a proteína através do método de sequenciamento, que pode ser realizado por técnicas modernas de espectrometria de massas. O sequenciamento completo da proteína nem sempre é possível, ou nem sempre é necessário, podendo-se utilizar informações já existentes em banco de dados genômicos e proteômicos, identificando a proteína apenas com dados parciais, como, por exemplo, pelo espectro de massas dos peptídeos resultantes da digestão enzimática de uma proteína [59].

Além de descrever a função das proteínas, sua localização celular, modificação pós-tradução, estrutura e interação proteína-proteína, a proteômica vem se preocupando cada vez mais em entender as interações entre os metais e as proteínas e/ou enzimas presentes em alimentos, podendo classificá-lo com um estudo metaloproteômico [52, 60-61].

A maioria dos metais presentes em alimentos está ligada a determinadas proteínas ou enzimas, responsáveis por funções específicas do metabolismo corporal. A função destes metais é crucial em vários processos dos organismos vivos, pois eles atuam como reguladores da expressão genética, cofator para algumas enzimas, catalisadores, dentre outras. Acredita-se, que o estudo das metaloproteínas esclarece um terço de todas as proteínas do organismo [53].

O conhecimento da composição química do metal ligado a biomoléculas (proteínas e peptídeos ou ácidos nucleicos) e sua forma química (metalômica) e a interação metal-biomolécula (metaloproteômica) dentro das células ou tecido é exigido cada vez mais para estudar os processos biológicos e avaliar a extensão e impacto nos organismos [62, 63]. Sabe-se, por exemplo, que proteínas específicas do plasma distribuem os elementos traço essenciais nos órgãos internos e que doenças humanas genéticas estão associadas com o aumento ou diminuição das concentrações das metaloproteínas no plasma sanguíneo [48].

Vale destacar que a compreensão do papel do metal e da proteína depende da qualidade de informação obtida após a análise da metaloproteína [62]. Um importante ponto quando se trabalha com esta análise é que as etapas de preparação da amostra devem ser eficientes de forma a manter a integridade da proteína e do metal ligado a ela.

Diante disto, alguns trabalhos que envolvem este campo de pesquisa estão descritos na literatura.

Naozuka e colaboradores [64] avaliaram a distribuição de proteínas solúveis em água para as amostras de Castanha-do-Pará, sementes de cupuaçu e polpa de coco e determinaram a concentração de Cu, Fe, Mn e Zn. Para tanto, as técnicas SEC-UV, GF AAS E MALDI-TOF-MS foram utilizadas. Os resultados da SEC-UV mostraram a prevalência de espécies de elevada massa molecular,

sendo de 79-1.7 kDa para amostra de Castanha-do-Pará, 50-1.7 kDa para polpa de coco e 34-1.7 kDa para sementes de cupuaçu. Os resultados obtidos pelas análises utilizando SEC-UV, GF AAS E MALDI-TOF-MS confirmaram a associação destes metais com os compostos presentes em água. Os elementos estudados foram associados com proteínas de massa molecular de 1.2-16 kDa para a amostra de Castanha-do-Pará, 1.7-13 kDa para polpa de coco e 1.2-7.6 kDa para sementes de cupuaçu. Os limites de detecção do método para Cu, Fe, Mn e Zn foram de 0,72; 1,40; 0,66 e 1,00 ng g⁻¹, respectivamente. Os autores concluíram que os resultados fornecidos por SEC-UV e GF AAS mostraram que a associação dessas técnicas é uma alternativa para a investigação da especiação do metal e estudo metalômico.

Becker et al. [63] estudaram a ocorrência de metais ligados às proteínas em amostras de rim e fígado de rato. A extração da fração proteica foi feita com tampão Tris-HCl e o extrato obtido foi analisado pela técnica de eletroforese 1D em gel de poliacrilamida não-desnaturante (BN-PAGE). Para a amostra de rim os elementos Zn, Cu, Cd e Pb foram identificados por LA-ICP-MS em proteínas de 65 à 100 kDa. Já para a amostra de fígado, Zn, Cu, Fe, Cr foram determinados nas bandas proteicas de 65 à 200 kDa. A identificação das proteínas foram feitas por MALDI-TOF-MS, sendo possível identificar nas amostras de fígado e rim, 7 e 11 proteínas, respectivamente.

Chassaigne & Lobinski [54] utilizaram as técnicas de MS com ionização eletrospray, ICP-MS e HPLC em fase reversa para caracterização do complexo metálico com biomoléculas, isto é, para a especiação de cádmio ligado a metalotioneína. Amostra de fígado de coelho purificada foi eluída em uma coluna C₈ com uma programação que incluía inicialmente uma etapa de pré-concentração em 2 min contendo 100% da fase A (5 mmol L⁻¹ tampão acetato em água pH 6,0). Em seguida, um gradiente linear até 100% de B (5 mmol L⁻¹ tampão acetato em metanol-água 50% pH 6,0) em 48 min. A utilização da espectrometria de massas com ionização eletrospray permitiu a determinação da massa molecular dos compostos eluídos. A combinação das técnicas ESI-MS, ICP-MS e RP-HPLC foi

descrita pelos autores como sendo uma poderosa ferramenta para a especificação de metais associados com biomoléculas.

Brandão et al. [65] obtiveram imagem comparativa para o gel 2D PAGE de sementes de soja transgênica e não-transgênica para identificar possíveis diferenças na expressão proteica. Desta forma, verificou-se dez spots proteicos diferentes comparando os géis obtidos para as amostras transgênica e não-transgênica. Foi possível identificar, por MALDI-TOF-MS, oito proteínas que participam do armazenamento de substratos nutritivos.

O estudo metaloproteômico é imprescindível para compreender a função de um determinado elemento ligado a uma proteína, sendo assim, pesquisas devem ser realizadas neste campo, empregando diversas técnicas analíticas.

2.5. Referências Bibliográficas

[1] MORAIS, E. P. Hidrólise de castanha-do-Pará, aveia e trigo com resina de troca catiônica e determinação de aminoácidos, ácidos graxos e sacarídeos utilizando eletroforese capilar. São Paulo. Universidade de São Paulo. *Dissertação de mestrado*. 2007.

[2] KLOSE, C.; SCHEHL, B. D.; ARENDT, E. K. Fundamental study on protein changes taking place during malting of oats. *Journal of Cereal Science*, v. 49, p. 83-91, 2009.

[3] Centro de ciências agrárias (CCA) – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. Aveia. Disponível em: <http://cca.ufsc.br/dcal/labs/ceres/aveia.html>, acessado em: 05/04/2010.

[4] SVIHUS, B.; GULLORD, M. Effect of chemical content and physical characteristics on nutritional value of wheat, barley and oats for poultry. *Animal Feed Science and Technology*, v. 102, p. 71-92, 2002.

- [5] OOMAH, B. D. Flaxseed as a functional food source. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.81, p. 889-894, 2001.
- [6] FIGUEIREDO, M. S.; MOURA, E. G.; LISBOA, P. C.; TROINA, A. A.; TREVENZOLI, I. H.; OLIVEIRA, E.; BOAVENTURA, G. T.; PASSOS, M. C. F. Flaxseed supplementation of rats during lactation changes the adiposity and glucose homeostasis of their offspring. *Life Sciences*, v. 85, p. 365-371, 2009.
- [7] Os benefícios da semente de linhaça. Disponível em: <http://www.segs.com.br/linhaça.htm>, acessado em: 05/03/2012.
- [8] COSKUNER, Y.; KARABABA, E. Some physical properties of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *Journal of Food Engineering*, v. 78, p. 1067-1073, 2007.
- [9] STRUIJS, K.; VINCKEN, J. P.; VERHOEF, R.; CASTEREN, W. H. M.; VORAGEN, A. G. J.; GRUPPEN, H. The flavonoid herbacetin diglucoside as a constituent of the lignan macromolecule from flaxseed hulls. *Phytochemistry*, v. 68, p. 1227-1235, 2007.
- [10] MATIAS, A. C. G. Avaliação de efeitos fisiológicos da fração fibra alimentar dos grãos de amaranto (*Amaranthus cruentus* L.) e linhaça (*Linus usitatissimum* L.). São Paulo. Universidade de São Paulo. *Dissertação de mestrado*. 2007.
- [11] BOMBO, A. J. Obtenção e caracterização nutricional snacks de milho (*Zea mays* L.) e linhaça (*Linus usitatissimum* L.). São Paulo. Universidade de São Paulo. *Dissertação de mestrado*. 2006.
- [12] BEANA, S. R.; BIETZB, J. A.; LOOKHARTC, G. L. High-performance capillary electrophoresis of cereal proteins. *Journal of Chromatography A*, v. 814, p. 25-41, 1998.

[13] BEAN, S. R.; LOOKHART, G. L. Electrophoresis of cereal storage proteins. *Journal of Chromatography A*, v. 881, p. 23-36, 2000.

[14] WEISS, M.; MANNEBERG, M.; JURANVILLE, J. F.; LAHM, H. W.; FOUNTOULAKIS, M. Effect of the hydrolysis method on the determination of the amino acid composition of proteins. *Journal of Chromatography A*, v. 795, p. 263-275, 1998.

[15] STOMPH, T. J.; JIANG, W.; STRUIK, P. C. Zinc biofortification of cereals: rice differs from wheat and barley. *Trends in Plant Science*, v. 14, p. 123-124, 2009.

[16] SINGH, B.; DATTA, P. S. Effect of low dose gamma irradiation on plant and grain nutrition of wheat. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 79, p. 819-825, 2010.

[17] ZHAO, C. X.; RONG, M. H.; WANG, Z. L.; WANG, Y. F.; LIN, Q. Effects of different water availability at post-anthesis stage on grain nutrition and quality in strong-gluten winter wheat, *Comptes Rendus Biologies*, v. 332, p. 759–764, 2009.

[18] EMBRAPA. Tecnologia de produção de soja para a região central do Brasil 2003: A importância da soja. Londrina. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Soja/SojaCentralBrasil2003/index.htm>, acessado em 06/04/2012.

[19] BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Brasília: Departamento Nacional de Produção Vegetal. 365p, 1992. Soja Brasil: Série histórica da área cultivada, produção e produtividade. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acessado em: 06/04/2012.

[20] WIKIPÉDIA - A enciclopédia livre. Soja. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Soja>. Acessado em: 06/11/2011.

[21] RAH, J. H.; HASLER, C. M.; PAINTER, J. E.; NOVAKOFSKI, K. M. C. Applying the Theory of Planned Behavior to Women's Behavioral Attitudes on and Consumption of Soy Products. *Journal of Nutrition Education and Behavior*, v. 36, p. 238-244, 2004.

[22] LIAO, F. H.; SHIEH, M.J.; YANG, S. C.; LIN, S. H.; CHIEN, Y. W. Effectiveness of a soy-based compared with a traditional low-calorie diet on weight loss and lipid levels in overweight adults. *Nutrition*, v. 23, p. 551-556, 2007.

[23] BRICARELLO, L. P.; KASINSKI, N.; BERTOLAMI, M. C.; FALUDI, A.; PINTO, L. A.; RELVAS, W. G. M.; IZAR, M. C. O.; IHARA, S. S. M.; TUFIK, S.; FONSECA, F. A. H. Comparison Between the Effects of Soy Milk and Non-Fat Cow Milk on Lipid Profile and Lipid Peroxidation in Patients With Primary Hypercholesterolemia. *Nutrition*, v. 20, p. 200-204, 2004.

[24] Gomes, J.C., Coelho, D.T., Leite de soja na alimentação humana, Universidade Federal de Viçosa, MG, 1998.

[25] YAMADA, L. T. P.; BARCELOS, M. F. P.; SOUSA, R. V.; LIMA, A. L. Composição química e conteúdo de ferro solúvel em soja [*Glycine Max.*(L.) Merrill]. *Ciência Agrotécnica*, Lavras, v. 27, p. 406-413, 2003.

[26] PEDERSEN, H. B.; BORG, S.; TAURIS, B.; HOLM, P. B. Molecular genetic approaches to increasing mineral availability and vitamin content of cereals. *Journal of Cereal Science*, v. 46, p. 308-326, 2007.

[27] HOUSE, W. A. Trace element bioavailability as exemplified by iron and zinc. *Field Crops Research*, v. 60, p. 115-141, 1999.

- [28] ANDRADE, E. C.; ALVES, S. P.; TAKASE, I. Avaliação do uso de ervas medicinais como suplemento nutricional de ferro, cobre e zinco. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, p. 591-596, 2005.
- [29] CÁMARA, F.; AMARO, M. A.; BARBERÁ, R.; LAGARDA, M. J. Speciation of bioaccessible (heme, ferrous and ferric). *European Food Research Technology*, v. 221, p. 768-773, 2005.
- [30] DUTRA, J. B.; BARIN, C. S.; ELLENSOHN, R. M.; BARIN, J. S. Análise de ferro em flocos de milho fortificados. Congresso Paranaense de Integração Universidade, Centro de Pesquisa e Empresa. Universidade Norte do Paraná, 2008.
- [31] MANGUEIRA, T. F. B.; TRAVASSOS, A. E. R.; FIOREZE, R.; MEDEIROS, R. S. Adição de ferro ao leite e sua retenção na coalhada dessorada. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 22, p. 305-307, 2002.
- [32] PEREIRA, R. M. Determinação de constituintes inorgânicos em amostras de ervas e raízes medicinais por espectrometria de absorção atômica com chama. Belo Horizonte. Universidade Federal de Minas Gerais. *Dissertação de Mestrado*. 2010.
- [33] CHUNHIENG, T.; PÉTRITIS, K.; ELFAKIR, C.; BROCHIER, J.; GOLI, T.; MONTET, D. Study of Selenium Distribution in the Protein Fractions of the Brazil Nut, *Betholletia excelsea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, p. 4318-4322, 2004.
- [34] TAIT, S. J. F. The importance of trace element speciation in nutritional. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, v. 363, p. 536-540, 1999.

- [35] MICHALKE, B. Manganese speciation using capillary electrophoresis–ICP-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1050, p. 69-76, 2004.
- [36] EMEDIX. Vitaminas e Sais Minerais. Manganês. Disponível em: http://emedix.uol.com.br/vit/vit028_1f_manganes.php. Acessado em: 08/04/2012.
- [37] HUANG, M.; ZHOU, S.; SUN, B.; ZHAO, Q. Heavy metals in wheat grain: Assessment of potential health risk for inhabitants in Kunshan, China. *Science of The Total Environment*, v. 405, p. 54-61, 2008.
- [38] ROGEZ, H.; BUXANT, R.; MIGNOLET, E.; SOUZA, J. N. S.; SILVA, E. M.; LARONDELLE, Y. Chemical composition of the pulp of three typical Amazonian fruits: araçá-boi (*Eugenia stipitata*), bacuri (*Platonia insignis*) and cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). *European Food Research Technology*, v. 218, p. 380-384, 2004.
- [39] GOLÇALVES, A. M.; FERNANDES, K. G.; RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, E. T. G.; NÓBREGA, J. A. Determination and Fractionation of Barium in Brazil Nuts. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 20, p. 760-769, 2009.
- [40] RAPIN, F.; TESSIER, A.; CAMPBELL, P. G. C.; CARIGNAN, R. Potential Artifacts in the Determination of Metal Partitioning in Sediments by a Sequential Extraction Procedure. *Environmental Science & Technology*, v. 20, p. 836-840, 1986.
- [41] PEDRERO, Z.; MADRID, Y.; CÁMARA, C.; SCHRAM, E.; LUTEN, J. B.; FELDMANN, I.; WAENTIG, L.; HAYEN, H.; JAKUBOWSKI, N. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 24, p. 775-784, 2009.
- [42] CELEDÓN, P. A. F. Identificação de proteínas da região cambial de *Eucalyptus grandis* por eletroforese bidimensional e espectrometria de massas.

Piracicaba. Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz” (ESALQ/USP). *Tese de Doutorado*. 2006.

[43] BARNETT, J. P.; SCANLAN, D. J.; BLINDAUER, C. A. Protein fractionation and detection for metalloproteomics: challenges and approaches. *Journal of analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 402, p. 3311-3322, 2012.

[44] LIU, N.; SHI-LI LO, L.; ASKARY, S. H.; JONES, L. T.; KIDANE, Z.; NGUYEN, T. T. M.; GOFORTH, J.; CHU, Y. H.; VIVAS, E.; TSAI, M.; WESTBROOK, T.; LINDER, M. C. Transcuprein is a macroglobulin regulated by copper and iron availability. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 18, p. 597-608, 2007.

[45] VERBI, F. M.; ARRUDA, S. C. C.; RODRIGUEZ, A. P. M.; ARRUDA, M. A. Z. Metal-binding proteins scanning and determination by combining gel electrophoresis, synchrotron radiation X-ray fluorescence and atomic spectrometry. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 62, p. 97-109, 2005.

[46] NATARAJAN, S. S.; KRISHNAN, H. B.; LAKSHMAN, S.; GARRETT, W. M. An efficient extraction method to enhance analysis of low abundant proteins from soybean seed. *Analytical Biochemistry*, v. 394, p. 259-268, 2009.

[47] CHASSAIGNE, H.; BROHÉE, M.; NORGAARD, J. V.; HENGEL, A. J. V. Investigation on sequential extraction of peanut allergens for subsequent analysis by ELISA and 2D gel electrophoresis. *Food Chemistry*, v. 105, p. 1671-1681, 2007.

[48] MANLEY, S. A.; BYRNS, S.; LYON, A. W.; BROWN, P.; GAILER, J. Simultaneous Cu-, Fe-, and Zn-specific detection of metalloproteins contained in rabbit plasma by size-exclusion chromatography–inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, v. 14, p. 61-74, 2009.

[49] WANG, J.; ZHANG, Q. H.; WANG, Z. H.; LI, H. M. Determination of Major Bovine Milk Proteins by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, v. 37, p. 1667-1670, 2009.

[50] GARCÍA, M. C.; DOMÍNGUEZ, M.; RUIZ, C. G.; MARINA, M. L. Reversed-phase high-performance liquid chromatography applied to the determination of soybean proteins in commercial heat-processed meat products. *Analytica Chimica Acta*, v. 559, p. 215-220, 2006.

[51] LÓPEZ, M. C. G.; CANAS, V. G.; ALEGRE, M. L. M. Reversed-phase high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry profiling of transgenic and non-transgenic maize for cultivar characterization. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 7222-7228, 2009.

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

[53] BECKER, J. S.; LOBINSKI, R.; BECKER, J. S. Metal imaging in non-denaturing 2D electrophoresis gels by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) for the detection of metalloproteins. *Metallomics*, v. 1, p. 312-316, 2009.

[54] CHASSAIGNE, H.; LOBINSKI, R. Speciation of metal complexes with biomolecules by reversed-phase HPLC with ion-spray and inductively coupled plasma mass spectrometric detection. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, v. 361, p. 267-273, 1998

[55] FOUNTOULAZIS, M. Proteomics: Current technologies and applications in neurological disorders and toxicology. *Amino Acids*, v. 21, p. 363-381, 2001.

[56] CELEDON, P. A. F.; ANDRADE, A.; MEIRELES, K. G. X.; CARVALHO, M. C. C. G.; CALDAS, D. G. G.; MOON, D. H.; CARNEIRO, R. T.; FRANCESCHINI, L. M.; ODA, S.; LABATE, C. A. Proteomic analysis of the cambial region in juvenile *Eucalyptus grandis* at three ages. *Proteomics*, v. 7, p. 2258-2274, 2007. .

[57] QIAN, Y.; PRESTON, K.; KROKHIN, O.; MELLISH, J.; ENS, W. Characterization of Wheat Gluten Proteins by HPLC and MALDI TOF Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, v. 19, p. 1542-1550, 2008.

[58] JAYASINGHE, S. B.; CARUSO, J. A. Investigation of Se-containing proteins in *Bertholletia excelsa* H.B.K. (Brazil nuts) by ICPMS, MALDI-MS and LC-ESI-MS methods. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 307, p. 16-27, 2011.

[59] MOREIRA, C. A. F.; MENCK, C. F. M.; SILVA, C. L.; ABDELHAY, E.; RECH, E.; DIAS, E. N.; SALZANO, F. M.; OLIVA, G.; VANNUCCHI, H.; KALIL, I. R. J.; OLIVEIRA, J. E. D.; ZANETTINI, M. H.; VIEIRA, M. L. C.; ZATZ, M.; VELLO, N. N. N.; ARRUDA, P.; BISCH, P. M.; OLIVEIRA, R. B. S. C.; PENA, S. *Genômica*. São Paulo: Editora Atheneu, 5ª edição, 2004.

[60] KANNAMKUMARATH, S. S.; WUILLOUD, R. G.; CARUSO, J. A. Studies of Various Elements of Nutritional and Toxicological Interest Associates with Different Molecular Weight Fractions in Brazil Nuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, p. 5773-5780, 2004.

[61] TASTET, L.; SCHAUMLOFFEL, D.; BOUYSSIÈRE, B.; LOBINSKI, R. Identification of selenium-containing proteins in selenium-rich yeast aqueous extract by 2D gel electrophoresis, nanoHPLC-ICP-MS and nanoHPLC-ESI-MS/MS. *Talanta*, v. 75, p. 1140-1145, 2008.

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

[63] BECKER, J. S.; MOUNICOU, S.; ZORIY, M. V.; BECKER, J. S.; LOBINSKI, R. Analysis of metal-binding proteins separated by non-denaturing gel electrophoresis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Talanta*, v. 76, p. 1183-1188, 2008.

[64] NAOZUKA, J.; MARANA, S. R.; OLIVEIRA, P. V. Water-soluble Cu, Fe, Mn and Zn species in nuts and seeds. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 23, p. 78–85, 2010.

[65] BRANDÃO, A. R.; BARBOSA, H. S.; ARRUDA, M. A. Z. Image analysis of two-dimensional gel electrophoresis for comparative proteomics of transgenic and non-transgenic soybean seeds. *Journal of Proteomics*, v. 73, p. 1433-1440, 2010.

CAPÍTULO 3

PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO PROTEICA:

Estudo da distribuição de Cu, Fe, Mn, e Zn nas frações das amostras de aveia, linhaça, trigo e soja

3.1. INTRODUÇÃO

Diferentes procedimentos de extração proteica são descritos na literatura, os quais envolvem extração sequencial ou extração em fase única. A escolha do procedimento deve ser baseada na complexidade da amostra e principalmente no objetivo do estudo proposto.

Neste trabalho, foram realizados dois procedimentos de extração sequencial sólido-líquido e um procedimento de extração em fase única para a extração de diferentes frações proteicas.

O primeiro procedimento de extração sequencial baseou-se em um estudo desenvolvido por Naozuka & Oliveira [1]. Para tanto, as amostras de aveia, linhaça, trigo e soja foram previamente moídas, peneiradas e a fração lipídica foi extraída utilizando uma mistura de metanol e clorofórmio 1:2 (v/v). Em seguida, as amostras foram submetidas à extração das frações proteicas empregando diferentes soluções extratoras: água, NaCl 0,5 mol L⁻¹, etanol 70% (v/v) e NaOH 0,5 mol L⁻¹ para a extração das proteínas do grupo das albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas, respectivamente. As frações proteicas obtidas foram armazenadas em freezer (por 24h) para posterior análise dos constituintes inorgânicos e orgânicos.

O segundo procedimento de extração sequencial foi adaptado de Kannamkumarath et al. [2]. As amostras de aveia, linhaça, trigo e soja (sem a fração lipídica) foram submetidas a cinco diferentes condições de extração: (1) NaOH 0,05 mol L⁻¹, (2) HCl 0,05 mol L⁻¹, (3) tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹ pH 8,0, (4) tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹ com 1% m/v de SDS pH 8,0 e (5) água à 60 °C. Após as extrações, foi adicionada acetona (80% v/v) às frações (1)–(4) para precipitação proteica. Sendo assim, as amostras foram mantidas em freezer a -14 °C por 1h. Após este período, o sobrenadante foi descartado e a proteína precipitada foi dissolvida em 4,0 mL de solução tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹ pH 8,0 e armazenadas até o momento das análises. A fração proteica extraída com água (fração 5) foi armazenada (por 24h) para posterior análise, sem ser submetida ao procedimento de precipitação de proteínas.

O terceiro procedimento de extração, em fase única, utilizou como extrator uma solução tampão Tris-HCl, reagente comumente empregado nos

estudos proteicos [3-5]. Este procedimento foi proposto com o objetivo de diminuir as etapas de preparo da amostra e, principalmente, extrair preferencialmente um grupo de proteínas. As frações proteicas de aveia, linhaça, trigo e soja também foram submetidas ao procedimento de precipitação de proteínas utilizando acetona.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. Objetivo Geral

O objetivo principal desta etapa do trabalho foi comparar diferentes procedimentos de extração de metaloproteínas para as amostras de aveia, linhaça, trigo e soja e avaliar a distribuição de Cu, Fe, Mn e Zn nas frações proteicas.

3.2.2. Objetivos Específicos

- Otimizar as condições analíticas para a quantificação de Cu, Fe, Mn e Zn por GF AAS.
- Aplicar o procedimento de extração 1 para aveia, linhaça, trigo e soja utilizando as soluções extratoras: água; NaCl; Etanol; NaOH e quantificar os elementos nessas frações por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) ou forno de grafite (GF AAS).
- Aplicar o procedimento de extração 2 para aveia, linhaça, trigo e soja utilizando as soluções extratoras: NaOH; HCl; tampão Tris-HCl pH 8,0; tampão Tris-HCl pH 8,0 contendo SDS 1%; água e quantificar os elementos nessas frações por FAAS ou GF AAS.
- Aplicar o procedimento de extração 3 para aveia, linhaça, trigo e soja utilizando solução tampão Tris-HCl pH 7,4 e quantificar os elementos nessas frações por GF AAS.
- Determinar o teor de proteínas totais nas frações obtidas após os procedimentos de extração.

3.3. PARTE EXPERIMENTAL

3.3.1 Amostras

Amostras de grãos de aveia, linhaça, trigo e soja de uma única marca foram adquiridas no comércio de Belo Horizonte – MG. As amostras foram moídas em liquidificador e passadas por uma peneira plástica (1mm). Somente às amostras de soja, foi adicionada água deionizada em sistema Milli-Q (Merck Millipore) para facilitar sua moagem. Depois de moída, esta amostra foi seca em estufa a 35° C. As amostras foram armazenadas em frascos plásticos descontaminados e em seguida foram fechados.

3.3.2. Determinação dos Metais

3.3.2.1. Instrumentação

Para determinação de Cu, Fe, Mn e Zn foram utilizados espectrômetros de absorção atômica PerkinElmer, modelo AAnalyst 200 e 400, equipados com chama e forno de grafite, respectivamente; com correção de fundo por lâmpada de deutério (Norwalk, CT, EUA) e lâmpada de cátodo oco para determinação dos metais (Norwalk, CT, EUA).

Todas as medidas seguiram as recomendações do fabricante. Os parâmetros instrumentais utilizados para a determinação Cu, Fe, Mn e Zn por FAAS e GF AAS estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1. Parâmetros instrumentais utilizados para a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn por FAAS.

Parâmetros	Cu	Fe	Mn	Zn
Comprimento de onda (nm)	324,75	248,33	279,48	213,86
Fenda (nm)	2.7/0.8	1.8/1.35	1.8/0.6	2.7/1.8
Vazão de ar (L min ⁻¹)	2,5	2,5	2,5	2,5
Vazão de acetileno (L min ⁻¹)	10,0	10,0	10,0	10,0

Tabela 2. Parâmetros instrumentais utilizados para a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn por GF AAS.

Parâmetros	Cu	Fe	Mn	Zn
Comprimento de onda (nm)	324,75	248,33	279,48	213,86
Fenda (nm)	2.7/0.8	1.8/1.35	1.8/0.6	2.7/1.8
Corrente (mA)	12	18	18	18

Para as determinações por GF AAS, fez-se uma otimização univariada avaliando: temperatura de pirólise, temperatura de atomização e modificador permanente, a fim de se obter as melhores condições analíticas para quantificação de Cu, Fe, Mn e Zn.

Todas as medidas foram baseadas em valores de absorvância integrada (área do pico). O volume de amostra e padrão injetado no tubo de grafite pelo pipetador automático foi de 20 µL. Argônio de alta pureza foi utilizado em todos os experimentos (99,996% da White Martins, Belo Horizonte, MG, Brasil). Tubos de grafite pirolítico com plataforma de L'Vov inserida (PerkinElmer) foram usados em todos as análises.

Durante as etapas de preparo da amostra foram utilizados também: Purificador de água Milli-Q[®], Millipore, modelo Direct-Q 3, Water Purification System, MA, EUA; chapa aquecedora TECNAL, modelo TE-0851, São Paulo, Brasil; agitador mecânico do tipo orbital, BIOCICLO, Modelo 109, Belo Horizonte, Brasil; balança analítica, SHIMADZU, modelo AX 200, São Paulo, Brasil; centrífuga FANEM[®], Excelsal II, modelo BL 206, São Paulo, Brasil; Estufa TECNAL, modelo TE 394/1, estufa com circulação e renovação de ar, São Paulo, Brasil.

3.3.2.2. Linearidade da Curva Analítica, Limites de Detecção e Quantificação

Neste trabalho, algumas figuras de mérito foram avaliadas previamente à quantificação dos analitos de interesse.

A linearidade é definida como a habilidade em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito nas amostras, em

uma dada faixa de concentração dos padrões, denominada faixa de trabalho [6].

Sendo assim, para quantificação de Cu, Fe, Mn e Zn por FAAS ou GF AAS, foram construídas curvas analíticas, relacionando as absorvâncias com as concentrações dos elementos. A linearidade foi avaliada pelo coeficiente de correlação linear (R) determinado pela regressão linear, com valores aceitáveis acima de 0,99 [7].

Segundo o guia do INMETRO [7], limite de detecção é definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança, na qual a concentração do analito é maior que zero. Já o limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão.

Os cálculos dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para cada elemento, nos diferentes meios extratores, foram realizados baseados nos parâmetros da curva analítica [7], em que o LD e o LQ podem ser expressos como:

$$LD = 3,3 * b/a$$

$$LQ = 10 * b/a$$

Onde:

b = estimativa do coeficiente linear da curva analítica.

a = inclinação ou coeficiente angular da curva analítica.

Para obtenção destes dados, curvas analíticas foram construídas em cada meio extrator, obedecendo a faixa linear de cada elemento.

3.3.2.3. Determinação da Concentração Total de Cobre, Ferro, Manganês e Zinco.

As digestões das amostras de aveia, linhaça, trigo e soja foram realizadas no forno de micro-ondas com cavidade, modelo ETHOS 1 (Milestone, Sorisole, Itália), ilustrado na Figura 1.



Figura 1. Forno de micro-ondas com cavidade, Milestone, modelo ETHOS 1.

No procedimento de digestão foram pesados diretamente nos frascos reacionais de PFA[®] (perfluoroalcoxi) aproximadamente 200 mg de amostra de aveia, linhaça, trigo e soja, moídas em liquidificador (digestão total), e dos resíduos obtidos após os procedimentos de extração (digestão do resíduo). Foram adicionados 6,0 mL de ácido nítrico concentrado nas amostras, e após 30 min, 1,0 mL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). As amostras foram submetidas ao programa de aquecimento mostrado na Tabela 3.

Tabela 3. Programa de aquecimento do forno de micro-ondas com cavidade.

Etapas	Potência (W)	t rampa (min)	T (°C)	t patamar (min)
1	750	10	180	-
2	750	-	180	20
Ventilação	0	0	30	-

Os frascos foram deixados em repouso por 30 min após o procedimento de digestão. As amostras foram transferidas para frascos de polipropileno e o volume final ajustado para 20,0 mL com água deionizada.

3.3.2.4. Procedimentos de Extração Proteica

Neste trabalho foram propostos três procedimentos de extração das frações proteicas para as amostras aveia, linhaça, trigo e soja.

No procedimento 1, adaptado de Naozuka & Oliveira [1], foram pesados aproximadamente 5,0 g das amostras de aveia, linhaça, trigo e soja *in natura*

(trituras em liquidificador). Adicionou-se às amostras 10 mL de uma solução de metanol:clorofórmio (1:2 v/v) que ficou em contato por 15 min sob agitação à 200 rpm. Este procedimento foi repetido duas vezes para as amostras de aveia e trigo e três vezes para as amostras de linhaça e soja, baseando-se no teor de gordura de cada matriz. Em seguida, as amostras foram submetidas ao procedimento de extração 1. As soluções extratoras utilizadas foram: (1) água deionizada, (2) NaCl 0,5 mol L⁻¹, (3) etanol 70% (v/v) e (4) NaOH 0,5 mol L⁻¹. Em cada etapa, adicionou-se às amostras 10 mL de cada extrator e manteve-se sob agitação mecânica por 30 min a 200 rpm. Após este tempo, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 1800 rpm e os sobrenadantes, de cada uma das frações, recuperados, avolumados para 15,0 mL e armazenados em geladeira (24h) até o momento da análise.

No procedimento 2, adaptado de Kannamkumarath et al [2], pesou-se aproximadamente 2,0 g das amostras de aveia, linhaça, trigo e soja e retirou-se a fração lipídica, como descrito anteriormente. As soluções extratoras (15 mL) utilizadas foram: (1) NaOH 0,05 mol L⁻¹, (2) HCl 0,05 mol L⁻¹, (3) tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹ pH 8,0, (4) tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹ com 1% m/v de SDS pH 8,0 e (5) água à 60 °C. Os tubos com os agentes extratores de (1) a (4) foram agitados por 1h em agitador mecânico a 200 rpm, centrifugados por 10 min a 3500 rpm e o sobrenadante recolhido. Ao resíduo da amostra foi acrescentado 15 mL de água deionizada, mantendo-a por 30 min à 60 °C e após centrifugação, este sobrenadante foi recolhido e armazenado até análise. Neste procedimento, a precipitação das proteínas foi realizada nos sobrenadantes de (1) a (4), após adição de acetona na concentração final de 80% (v/v). Para tanto, essas amostras foram deixadas em freezer a -14 °C por 1h. Após este período, as amostras foram novamente centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. A proteína precipitada foi dissolvida em 4,0 mL de solução tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹ pH 8,0 e armazenadas (24h) até o momento da análise.

Para o procedimento de extração 3, avaliou-se três soluções tampão Tris-HCl com diferentes valores de pH: 6,0; 7,4 e 8,0. Pesou-se 2,0 g das amostras de aveia, linhaça, trigo e soja, sem a presença da fração lipídica e adicionou-se 15 mL de solução tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹ pH 7,4, escolhido por apresentar maiores percentuais de extração. As amostras foram agitadas

mecanicamente por 1h a 200 rpm, centrifugadas por 10 min a 3500 rpm e o sobrenadante recuperado em tubo falcon. A precipitação das proteínas presentes em cada fração foi feita com a adição de acetona 80% (v/v), como descrito anteriormente. A proteína precipitada foi solubilizada em 6,0 mL de solução tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹ pH 7,4 e armazenada em freezer (até 48h).

Todos os procedimentos de extração foram feitos em triplicata para cada solução extratora utilizada.

Os resíduos sólidos finais dos três procedimentos foram submetidos à digestão no forno de micro-ondas, empregando o programa de aquecimento descrito na Tabela 3. Após a digestão, o digerido foi avolumado para 20,0 mL com água deionizada.

Os elementos de interesse foram determinados em todas as frações obtidas após os procedimentos de extração e nos digeridos dos resíduos (fração residual) por FAAS ou GF AAS.

3.3.3. Proteínas

3.3.3.1. Quantificação do Teor de proteínas totais

As amostras de aveia, linhaça, trigo e soja foram submetidas aos procedimentos de extração descritos no item 3.3.2.4, mantendo-as em gelo, para evitar a degradação das proteínas pela atuação da enzima protease.

A quantificação do teor de proteínas totais em cada fração obtida após os procedimentos de extração 1, 2 e 3, foi determinada pelo método de Bradford (kit da BioAgency), utilizando-se o procedimento para microensaios recomendado pelo fabricante.

Para a preparação da curva analítica, preparou-se 200,0 µL de uma solução de albumina (BSA) a 1,0 µg µL⁻¹ e, a partir desta solução, fez-se as diluições seriadas em água (Mili-Q) para construção da curva analítica (0,025; 0,050; 0,125; 0,250; 0,500 µg µL⁻¹). A cada solução foram adicionados 40,0 µL do reagente Bradford concentrado.

A placa de 96 poços contendo as amostras e os padrões de albumina foi agitada vagarosamente por 30 segundos e incubada por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram analisadas em um espectrofotômetro da marca Hach, modelo DR4000 e cada amostra teve sua absorvância determinada à $\lambda = 595 \text{ nm}$.

3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1. Otimização das Condições Analíticas para Análise de Cu, Fe, Mn e Zn por GF AAS

Para determinação de Cu, Fe, Mn e Zn por GF AAS foram otimizados alguns parâmetros: tipo de modificador permanente, temperatura de pirólise e temperatura de atomização. Para otimização utilizou-se as frações extraídas com solução de NaCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (procedimento 1) e a condição ótima foi aplicada para as demais frações. Foi escolhida a fração extraída com solução de NaCl, porque a amostra apresentou-se viscosa e conseqüentemente, mais susceptível à interferências durante a análise.

Inicialmente, foi realizada a triagem do modificador permanente, utilizando as condições recomendadas pelo fabricante para as etapas de pirólise e atomização. De acordo com os resultados obtidos, o modificador que apresentou uma maior intensidade do sinal analítico para Fe, Mn e Zn foi o nióbio e para Cu sem a utilização de modificador permanente.

A temperatura de pirólise em que ocorre a destruição da matriz, e conseqüentemente a eliminação dos concomitantes da amostra, foi otimizada univariadamente, fixando-se a temperatura de atomização em 2300, 2400, 2200 e 1800 °C para Cu, Fe, Mn e Zn, respectivamente. Uma maior intensidade do sinal analítico foi observada utilizando as temperaturas de pirólise de 1000, 1400, 1200 e 700 °C, para as determinações de Cu, Fe, Mn e Zn, respectivamente.

A temperatura de atomização também foi otimizada univariadamente, utilizando-se a temperatura de pirólise e o tipo de modificador permanente previamente escolhidos. As temperaturas de atomização em que se obteve

uma maior absorvância na determinação de Cu, Fe, Mn e Zn foram de 2500, 2300, 2000 e 1800°C, respectivamente.

Desta maneira, os programas de aquecimento otimizados para determinação de Cu, Fe, Mn e Zn nas frações proteicas estão descritos nas Tabelas 4, 5, 6 e 7.

Tabela 4. Programa de aquecimento otimizado para determinação de Cu em sementes por GF AAS.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Tempo de retenção (s)	Fluxo de argônio (mL min ⁻¹)
Secagem	100	5	20	250
Secagem	140	15	15	250
Pirólise	1000	10	20	250
Atomização	2500	0	5	0
Limpeza	2600	1	5	250
Resfriamento	20	1	10	250

Tabela 5. Programa de aquecimento otimizado para determinação de Fe em sementes por GF AAS.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Tempo de retenção (s)	Fluxo de argônio (mL min ⁻¹)
Secagem	100	5	20	250
Secagem	140	15	15	250
Pirólise	1400	20	20	250
Atomização	2300	0	5	0
Limpeza	2600	1	5	250
Resfriamento	20	1	10	250

Tabela 6. Programa de aquecimento otimizado para determinação de Mn em sementes por GF AAS.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Tempo de retenção (s)	Fluxo de argônio (mL min ⁻¹)
Secagem	100	5	20	250
Secagem	140	15	15	250
Pirólise	1200	10	20	250
Atomização	2000	0	5	0
Limpeza	2600	1	5	250
Resfriamento	20	1	10	250

Tabela 7. Programa de aquecimento otimizado para determinação de Zn em sementes por GF AAS.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Tempo de retenção (s)	Fluxo de argônio (mL min ⁻¹)
Secagem	100	5	20	250
Secagem	140	15	15	250
Pirólise	700	10	20	250
Atomização	1800	0	5	0
Limpeza	2600	1	5	250
Resfriamento	20	1	10	250

3.4.2. Linearidade da Curva Analítica, Limites de Detecção e Quantificação

As curvas analíticas obtidas foram avaliadas quanto a sua linearidade. A linearidade do sinal analítico de Cu, Fe, Mn e Zn em espectrometria de absorção atômica por chama e forno de grafite foi avaliada na faixa de trabalho descrita na Tabela 8.

Tabela 8. Faixa de trabalho aplicada para determinação de Cu, Fe, Mn e Zn por FAAS e GF AAS.

Espectrometria de Absorção Atômica		
Elementos	Chama (mg L⁻¹)	Forno de Grafite (µg L⁻¹)
Cu	0,1 – 0,6	5,0 – 100,0
Fe	0,25 – 3	5,0 – 100,0
Mn	0,1 – 0,6	5,0 – 100,0
Zn	0,15 – 0,75	2,5 – 50,0

As curvas analíticas utilizadas para quantificação de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de aveia, linhaça, trigo e soja foram preparadas em diferentes meios extratores, de acordo com o procedimento de extração aplicado. Para o procedimento de extração 1, os elementos foram determinados preparando-se curvas analíticas nos meios extratores: HNO₃ 2,0 mol L⁻¹, água, NaCl 0,25 mol L⁻¹, EtOH 35% (v/v) e NaOH 0,25 mol L⁻¹. Para o procedimento de extração 2 e 3 empregou-se curvas preparadas com solução tampão Tris-HCl: 0,05 mol L⁻¹ pH 8,0 e 0,05 mol L⁻¹ pH 7,4; respectivamente.

As curvas foram construídas relacionando-se o sinal analítico (absorbância) em função das concentrações de cada elemento. Os parâmetros das curvas analíticas para Cu, Fe, Mn e Zn nos diferentes meios extratores estão descritos nas Tabelas 9 (FAAS) e 10 (GF AAS).

Tabela 9. Parâmetros das curvas analíticas obtidos para quantificação de Cu, Fe, Mn e Zn por FAAS.

		HNO ₃	H ₂ O	NaCl	EtOH	NaOH	*Tris-HCl pH 8,0
Cu	Coef. (R)	0,9991	0,9963	0,9988	0,9979	0,9962	---
	Inclinação	0,1025	0,1006	0,0991	0,0702	0,0771	---
	Intercepto	0,0003	0,0017	0,0014	0,0009	0,0037	---
Fe	Coef. (R)	0,9994	0,9979	0,9989	0,9963	0,9977	0,9993
	Inclinação	0,0570	0,0533	0,0511	0,0416	0,0475	0,0242
	Intercepto	0,0013	0,0005	0,0026	0,0040	0,0024	0,0009
Mn	Coef. (R)	0,9990	0,9953	0,9996	0,9986	0,9944	0,9923
	Inclinação	0,1338	0,1331	0,1227	0,0958	0,0751	0,0828
	Intercepto	0,0006	0,0004	0,0004	0,0006	0,0017	0,0018
Zn	Coef. (R)	0,9970	0,9983	0,9988	0,9991	0,9983	0,9974
	Inclinação	0,4146	0,4534	0,4229	0,3061	0,3759	0,2745
	Intercepto	0,0035	0,0006	0,0024	0,0016	0,00112	0,0007

* Parâmetros das curvas analíticas para quantificação dos metais a partir das frações extraídas pelo procedimento de extração 2.

Tabela 10. Parâmetros das curvas analíticas obtidos para quantificação de Cu, Fe Mn e Zn por GF AAS.

		HNO ₃	H ₂ O	NaCl	EtOH	NaOH	*Tris pH 8,0	**Tris pH 7,4
Cu	Coef. (R)	0,9959	0,9987	0,9986	0,9983	0,9984	0,9951	0,9995
	Inclinação	0,0106	0,0105	0,0094	0,0109	0,0095	0,0081	0,0117
	Intercepto	0,0016	0,0157	0,0154	0,0236	0,0080	0,0221	0,0012
Fe	Coef. (R)	0,9957	0,9960	0,9902	0,9964	0,9905	0,9953	0,9991
	Inclinação	0,0118	0,0190	0,0202	0,0142	0,0217	0,0111	0,0082
	Intercepto	0,0733	0,0707	0,0928	0,0379	0,0878	0,1034	0,0085
Mn	Coef. (R)	0,9957	0,9921	0,9944	0,9979	0,9958	0,9972	0,9958
	Inclinação	0,0118	0,0125	0,0118	0,0106	0,0115	0,0222	0,0253
	Intercepto	0,0733	0,1054	0,0502	0,0478	0,0585	0,0650	0,0650
Zn	Coef. (R)	---	---	---	---	---	---	0,9933
	Inclinação	---	---	---	---	---	---	0,0415
	Intercepto	---	---	---	---	---	---	0,1656

* Parâmetros da curva analítica para quantificação de Cu a partir das frações extraídas pelo procedimento de extração 2.

** Parâmetros das curvas analíticas para quantificação dos metais a partir das frações extraídas pelo procedimento de extração 3.

A linearidade foi avaliada pelo coeficiente de correlação (R) determinado pela regressão linear. Os valores dos coeficientes estão de acordo com as normas estabelecidas pela ANVISA [8] que recomenda valores superiores a 0,99; indicando que existe uma resposta linear do equipamento na faixa de concentração estudada para os elementos Cu, Fe, Mn e Zn.

As determinações foram realizadas por FAAS ou GF AAS de acordo com a concentração dos elementos presentes nas amostras e em função da sensibilidade dos equipamentos.

Os valores de LD e LQ foram calculados com base nos parâmetros da curva analítica. A determinação do LD e LQ foi realizada considerando-se como 3,3 e 10 vezes, respectivamente, a razão entre a estimativa dos coeficientes linear e angular da curva analítica de cada elemento [6].

Os valores de LD e LQ foram obtidos levando-se em consideração os diferentes meios extratores dos procedimentos de extração 1, 2 e 3 (Tabelas 11, 12 e 13, respectivamente). Os resultados apresentados mostram o LD e LQ, em $\mu\text{g g}^{-1}$, para os elementos determinados por espectrometria de absorção atômica por chama e forno de grafite.

Tabela 11. Limite de detecção e quantificação, em $\mu\text{g g}^{-1}$, para determinação de Cu, Fe, Mn e Zn por FAAS e GF AAS, considerando os diferentes meios extratores utilizados no procedimento de extração 1.

		Cu		Fe		Mn		Zn
		Chama	Forno	Chama	Forno	Chama	Forno	Chama
Ácido	LD	0,97	---	7,5	---	1,5	---	2,8
	LQ	2,9	---	22	---	4,5	---	8,4
H ₂ O	LD	0,13	0,0091	0,062	0,033	0,020	0,57	0,0091
	LQ	0,43	0,027	0,190	0,10	0,060	0,17	0,027
NaCl	LD	0,091	0,017	0,34	0,031	0,020	0,030	0,037
	LQ	0,28	0,050	1,02	0,090	0,060	0,090	0,11
EtOH	LD	0,086	0,020	0,64	0,027	0,040	0,030	0,034
	LQ	0,26	0,060	1,92	0,050	0,120	0,090	0,10
NaOH	LD	0,32	0,0067	0,34	0,027	0,15	0,030	0,020
	LQ	0,96	0,020	1,0	0,080	0,46	0,090	0,060

Tabela 12. Limite de detecção e quantificação, em $\mu\text{g g}^{-1}$, para determinação de Cu, Fe, Mn e Zn por FAAS e GF AAS, considerando os diferentes meios extratores utilizados no procedimento de extração 2.

			Cu		Fe		Mn		Zn
			Chama	Forno	Chama	Forno	Chama	Forno	Chama
Meio Ácido	DT e DTR	LD	0,97	---	7,5	---	1,5	---	2,8
		LQ	2,9	---	22	---	4,5	---	8,4
	H ₂ O	LD	---	0,027	0,38	0,10	0,075	0,10	0,14
		LQ	---	0,0080	1,1	0,31	0,23	0,31	0,42
Tris pH 8	Frações	LD	---	0,017	0,25	0,063	0,14	0,020	0,017
		LQ	---	0,050	0,74	0,19	0,43	0,060	0,051

DT: Digestão Total - Digestão, em MW, das amostras *in natura*.

DTR: Digestão total do resíduo – Digestão, em MW, do resíduo das amostras obtido após extração.

Tabela 13. Limite de detecção e quantificação, em $\mu\text{g g}^{-1}$, para determinação de Cu, Fe, Mn e Zn por GF AAS, considerando os meios extratores: ácido e tampão Tris-HCl pH 7,4 utilizados no procedimento de extração 3.

		Cu		Fe		Mn		Zn	
		Chama	Forno	Chama	Forno	Chama	Forno	Chama	Forno
Meio	LD	0,97	---	7,5	---	1,5	---	2,8	---
Ácido	LQ	2,9	---	22	---	4,5	---	8,4	---
Tris	LD	---	0,0011	---	0,011	---	0,027	---	0,040
pH 7,4	LQ	---	0,0033	---	0,033	---	0,080	---	0,120

De acordo com os dados apresentados nas Tabelas 11 e 12, ao se avaliar os LD's e LQ's de todos os elementos após as determinações por FAAS, verifica-se, de modo geral, que o Zn apresenta maior sensibilidade. Desta forma, foi possível realizar as quantificações de Zn em todas as frações obtidas pelos procedimentos de extração 1 e 2 por FAAS. Observou-se ainda que o Cu apresentou maior sensibilidade nas determinações por GF AAS (Tabelas 11-13).

De acordo com o volume final do extrato e quantidade de amostra utilizada para as digestões em MW (digestão total e residual) e para os procedimentos de extração, pode-se concluir que as concentrações, em $\mu\text{g g}^{-1}$, da maioria dos elementos determinados por FAAS ou GF AAS estão acima do LD e LQ calculados.

3.4.3. Determinação da Concentração Total de Cu, Fe, Mn e Zn em aveia, linhaça, trigo e soja

As tabelas 14 e 15 apresentam os resultados obtidos para Cu, Fe, Mn e Zn nas amostras *in natura* de aveia, linhaça, trigo e soja (digestão total) e nos resíduos destas amostras, após os procedimentos de extração 1, 2 e 3 (digestão total do resíduo). As amostras foram submetidas à digestão ácida em forno micro-ondas com cavidade (item 3.3.2.3) e determinação por FAAS.

Tabela 14. Concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn, em $\mu\text{g g}^{-1}$, encontrados nas amostras *in natura* (média \pm desvio padrão; n = 3).

	Cu	Fe	Mn	Zn
Aveia	4,6 \pm 0,1	39,0 \pm 0,7	29,6 \pm 0,3	31,1 \pm 0,1
Linhaça	13,6 \pm 0,1	48 \pm 2	14,7 \pm 0,4	51,7 \pm 0,4
Trigo	4,3 \pm 0,6	32,5 \pm 0,3	30,6 \pm 0,2	28,5 \pm 0,7
Soja	10,6 \pm 0,1	79 \pm 4	38,0 \pm 0,8	39,8 \pm 0,2

Tabela 15. Concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn, em $\mu\text{g g}^{-1}$, encontrados nas frações residuais das amostras após procedimentos de extração 1, 2 e 3 (média \pm desvio padrão; n = 3).

		Cu	Fe	Mn	Zn
Extração 1	Aveia	3,9 \pm 0,6	41 \pm 2	26,0 \pm 0,2	26,9 \pm 0,2
	Linhaça	13,7 \pm 0,1	59 \pm 2	15,9 \pm 0,1	60 \pm 2
	Trigo	4,35 \pm 0,05	28,1 \pm 0,2	18,9 \pm 0,1	27,0 \pm 0,1
	Soja	9,3 \pm 0,8	83 \pm 5	47,2 \pm 0,9	31,2 \pm 0,1
Extração 2	Aveia	1,30 \pm 0,08	50 \pm 1	30,3 \pm 0,2	29,5 \pm 0,1
	Linhaça	9,6 \pm 0,4	63 \pm 2	25,2 \pm 0,1	67 \pm 2
	Trigo	3,5 \pm 0,3	30 \pm 2	31,9 \pm 0,3	30,9 \pm 0,3
	Soja	9,3 \pm 0,7	76 \pm 3	42 \pm 1	24,6 \pm 0,1
Extração 3	Aveia	3,80 \pm 0,09	39,1 \pm 0,9	30,1 \pm 0,1	30,1 \pm 0,7
	Linhaça	13,0 \pm 0,3	53 \pm 2	17,4 \pm 0,6	51 \pm 1
	Trigo	4,1 \pm 0,3	31,2 \pm 0,8	29,0 \pm 0,6	26,6 \pm 0,3
	Soja	8,9 \pm 0,6	78 \pm 3	42 \pm 1	34,6 \pm 0,3

A concentração de Cu, Fe, Mn e Zn nas amostras de aveia, linhaça, trigo e soja *in natura* também foram apresentadas na forma de gráfico (Figura 2) para melhor visualização.

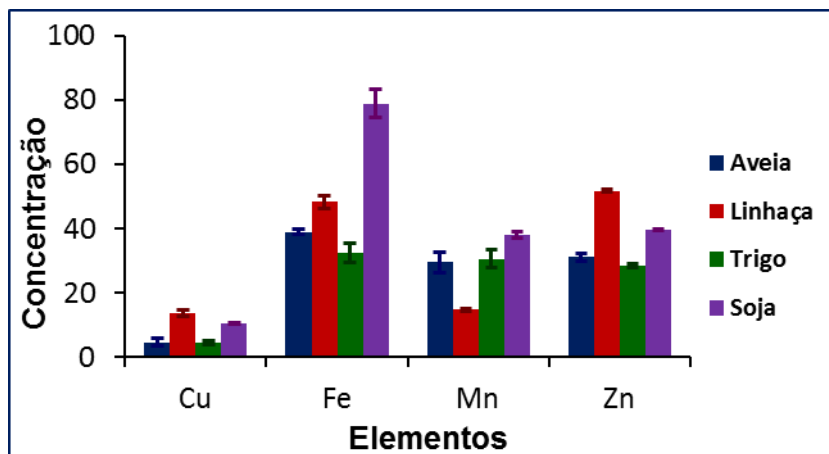


Figura 2. Concentração, em $\mu\text{g g}^{-1}$, de Cu, Fe, Mn e Zn nas amostras de aveia, linhaça, trigo e soja *in natura*.

Comparando-se os dados das Tabelas 14 e 15, observa-se que as concentrações de alguns elementos nas amostras de aveia, linhaça, trigo e soja estão maiores nas frações residuais obtidas após os procedimentos de extração do que nas amostras *in natura*. Este fato pode ter ocorrido por se tratar de um procedimento de extração no qual há manipulação exaustiva das amostras com diferentes reagentes, e conseqüentemente, possíveis contaminações durante o procedimento, elevando a concentração dos elementos nas frações residuais.

Elevadas concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn foram determinadas nas frações residuais obtidas após aplicação dos procedimentos de extração 1, 2 e 3 para aveia, linhaça, trigo e soja (Tabela 15). Este fato indica que os elementos podem estar ligados a substâncias orgânicas ou biomoléculas não extraídas com os extratores selecionados e que permaneceram retidas na fração residual [1].

Pode-se concluir que, de modo geral, as amostras avaliadas são ricas em Fe e apresentaram menores concentrações de Cu (Figura 2).

3.4.3.1. Comparação da Concentração Total de Cu, Fe, Mn e Zn com Valores Nutricionais das Amostras de Aveia, Linhaça e Soja

As concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn determinadas nas amostras *in natura* foram comparadas aos valores nutricionais apresentados na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO), como mostra a Tabela 16.

Este estudo foi realizado pelo Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) [9].

Tabela 16. Concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn, em $\mu\text{g g}^{-1}$, nas amostras de aveia, linhaça e soja submetidas à digestão em MW e comparadas aos valores nutricionais da TACO (média \pm desvio padrão; n = 3).

		Cu	Fe	Mn	Zn	
Digestão	MW	Aveia	4,6 \pm 0,1	39,0 \pm 0,7	29,6 \pm 0,3	31,1 \pm 0,1
		Linhaça	13,6 \pm 0,1	48 \pm 2	14,7 \pm 0,4	51,7 \pm 0,4
		Soja	10,6 \pm 0,1	79 \pm 4	38,0 \pm 0,8	39,8 \pm 0,2
Tabela	Nutricional	Aveia	4,4	44,0	---	26,0
		Linhaça	10,9	47,0	28,1	44,0
		Soja	11,9	70,0	26,8	58,0

Os resultados de valores nutricionais mostrados na Tabela 16 comprovam que as amostras avaliadas são ricas em Fe e que as mesmas possuem menor concentração de Cu em sua composição.

Os dados da tabela TACO para a amostra de trigo estão relacionados a uma mistura de cereais contendo trigo, por isso, não possível fazer a correlação com a amostra estudada neste trabalho.

Vale destacar que os valores nutricionais (TACO) mostrados na Tabela 16 são referentes à aveia em flocos crua, semente de linhaça e extrato solúvel de soja em pó e os valores apresentados neste trabalho são referentes aos grãos destas amostras adquiridas no comércio. Sendo assim, estas divergências nos valores nutricionais são esperadas, pois as amostras comparadas apresentam forma de plantio diferente, o que envolve o tipo de solo, adubação, colheita, secagem, armazenamento [10], fisiologia da planta, uso de fertilizantes e pesticidas nas plantações, condições climáticas, dentre outros fatores que podem afetar a concentração de macro e micronutrientes.

3.4.4. Procedimentos de Extração Proteica

3.4.4.1. Procedimento de Extração 1

As amostras de aveia, linhaça, trigo e soja foram submetidas ao procedimento de extração 1, utilizando os extratores: água deionizada, solução de cloreto de sódio 0,5 mol L⁻¹, solução de etanol 70% (v/v) e solução de hidróxido de sódio 0,5 mol L⁻¹ (item 3.3.2.4).

As concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn encontrados nas frações das amostras estão apresentados nas Tabelas 17 a 20 e Figuras 3 a 6.

Tabela 17. Concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn, em µg g⁻¹, nas frações da amostra de aveia submetida ao procedimento de extração 1 (média ± desvio padrão; n = 3).

Aveia	Cu	Fe	Mn	Zn
H ₂ O	0,16 ± 0,01	0,35 ± 0,04	4,20 ± 0,05	0,87 ± 0,04
NaCl	0,31 ± 0,03	1,70 ± 0,08	2,1 ± 0,1	0,49 ± 0,04
EtOH	0,14 ± 0,01	<LQ	< LQ	0,23 ± 0,01
NaOH	0,15 ± 0,01	0,8 ± 0,1	0,61 ± 0,07	< LQ

* <LQ = valores abaixo do limite de quantificação

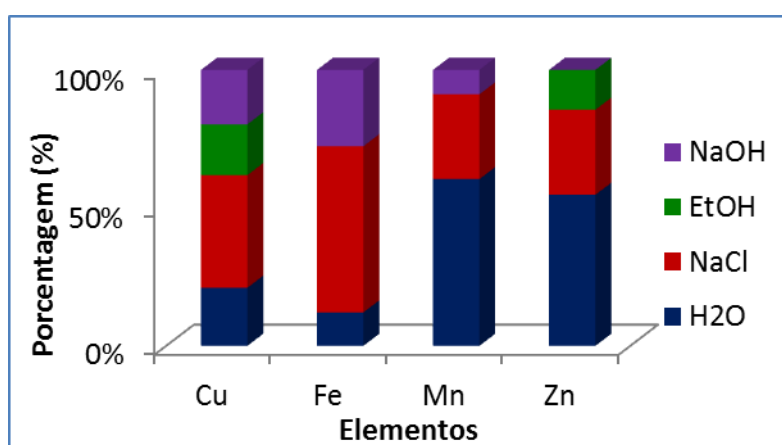


Figura 3. Porcentagem de Cu, Fe, Mn e Zn nas frações da amostra de aveia submetida ao procedimento de extração 1.

Tabela 18. Concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn, em $\mu\text{g g}^{-1}$, nas frações da amostra de linhaça submetida ao procedimento de extração 1 (média \pm desvio padrão; n = 3).

Linhaça	Cu	Fe	Mn	Zn
H₂O	0,13 \pm 0,00	1,1 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1	0,46 \pm 0,03
NaCl	0,31 \pm 0,03	1,71 \pm 0,08	2,1 \pm 0,1	0,29 \pm 0,02
EtOH	0,89 \pm 0,06	0,15 \pm 0,02	<LQ	0,53 \pm 0,05
NaOH	0,69 \pm 0,08	0,50 \pm 0,08	0,36 \pm 0,01	0,29 \pm 0,02

* <LQ = valores abaixo do limite de quantificação

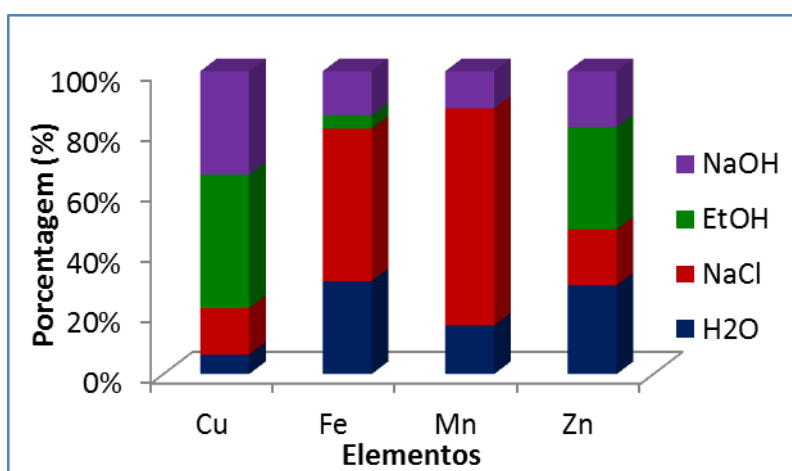


Figura 4. Porcentagem de Cu, Fe, Mn e Zn nas frações da amostra de linhaça submetida ao procedimento de extração 1.

Tabela 19. Concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn, em $\mu\text{g g}^{-1}$, nas frações da amostra de trigo submetida ao procedimento de extração 1 (média \pm desvio padrão; n = 3).

Trigo	Cu	Fe	Mn	Zn
H₂O	0,20 \pm 0,02	0,53 \pm 0,02	3,50 \pm 0,09	0,32 \pm 0,03
NaCl	0,55 \pm 0,06	1,90 \pm 0,01	2,1 \pm 0,2	0,42 \pm 0,05
EtOH	0,11 \pm 0,01	0,36 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	0,11 \pm 0,01
NaOH	0,13 \pm 0,01	0,64 \pm 0,04	0,70 \pm 0,02	< LQ

* <LQ = valores abaixo do limite de quantificação

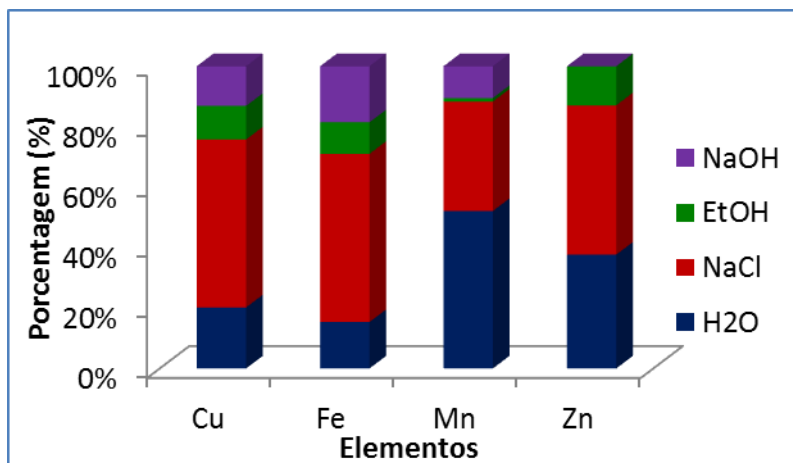


Figura 5. Porcentagem de Cu, Fe, Mn e Zn nas frações da amostra de trigo submetida ao procedimento de extração 1.

Tabela 20. Concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn, em $\mu\text{g g}^{-1}$, nas frações da amostra de soja submetida ao procedimento de extração 1 (média \pm desvio padrão; n = 3).

Soja	Cu	Fe	Mn	Zn
H ₂ O	0,87 \pm 0,01	0,8 \pm 0,1	0,39 \pm 0,01	1,8 \pm 0,2
NaCl	0,95 \pm 0,05	1,7 \pm 0,1	0,46 \pm 0,08	2,5 \pm 0,3
EtOH	0,96 \pm 0,07	< LQ	0,30 \pm 0,09	3,00 \pm 0,04
NaOH	0,64 \pm 0,02	< LQ	1,0 \pm 0,1	1,2 \pm 0,2

* <LQ = valores abaixo do limite de quantificação

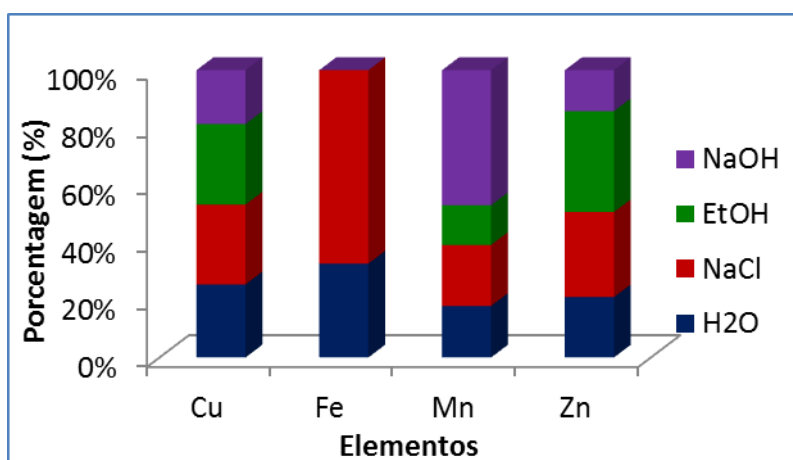


Figura 6. Porcentagem de Cu, Fe, Mn e Zn nas frações da amostra de soja submetida ao procedimento de extração 1.

As concentrações de cada elemento nas frações das amostras de aveia, linhaça, trigo e soja, somadas à concentração na fração residual (Tabela 15), foram comparadas ao valor da concentração do metal na amostra *in natura* (Tabela 14). Sendo assim, para o procedimento de extração 1, as porcentagens de recuperação de Cu, Fe, Mn e Zn foram de 127, 112, 111 e 91% para aveia; 115, 128, 128 e 121% para linhaça; 123, 97, 83, 98% para trigo e de 120, 108, 129, 99% para soja, respectivamente.

Segundo Naozuka & Oliveira [1] e Agboola et al. [11], as proteínas podem ser classificadas de acordo com sua solubilidade em diferentes extratores, sendo que as soluções extratores água, NaCl, etanol e NaOH extraem, preferencialmente, as proteínas albumina, globulina, prolamina e glutelina, respectivamente. Sendo assim, após a determinação da concentração de Cu, Fe, Mn e Zn em cada uma das frações das amostras de aveia, linhaça, trigo e soja (Tabelas 17-20), pode-se inferir a distribuição de cada elemento nas frações proteicas, como apresentado na Tabela 21.

Os dados da Tabela 17 e Figura 3 mostram uma maior concentração de Cu e Fe na fração extraída com solução de NaCl para a amostra aveia, indicando que esses elementos podem estar preferencialmente ligados às proteínas globulinas. Já os elementos Mn e Zn estão presentes em maiores quantidades na fração aquosa; responsável pela extração das proteínas albuminas. Essa associação pode ser feita para as demais amostras avaliadas (Tabela 21).

Tabela 21. Distribuição de Cu, Fe, Mn e Zn nas frações proteicas das amostras de aveia, linhaça, trigo e soja extraídas pelo procedimento de extração 1.

	Cu	Fe	Mn	Zn
Aveia	Globulina	Globulina	Albumina	Albumina
Linhaça	Prolamina	Globulina	Globulina	Prolamina
Trigo	Globulina	Globulina	Albumina	Globulina
Soja	Globulina/ Prolamina	Globulina	Glutelina	Prolamina

De acordo com os dados da Tabela 21, de maneira geral, as proteínas do grupo globulina prevalecem nas frações das amostras de aveia, linhaça,

trigo e soja, com uma porcentagem de aproximadamente 56%, seguida das proteínas prolaminas, albuminas e glutelinas com 23, 18 e 6%, respectivamente.

3.4.4.2. Procedimento de Extração 2

As amostras de aveia, linhaça, trigo e soja foram submetidas ao procedimento de extração 2, utilizando os extratores: (1) NaOH 0,05 mol L⁻¹, (2) HCl 0,05 mol L⁻¹, (3) tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹ pH 8,0, (4) tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹ com 1% de SDS pH 8,0 e (5) água à 60^o C. Adicionou-se acetona 80% (v/v) em cada extrato recuperado, com o objetivo de precipitar as proteínas presentes nestas amostras. A adição da solução de acetona 80% (v/v) nas frações das amostras promove a purificação da proteína por precipitação [11], porém, segundo Tastet et al. [12] perdas de metais podem ocorrer durante o procedimento.

As concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn foram determinadas nas frações das amostras submetidas ao procedimento de extração 2 e os valores estão descritos nas Tabelas 22 a 25 e Figuras 7 a 10.

Tabela 22. Concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn, em µg g⁻¹, nas frações da amostra de aveia submetida ao procedimento de extração 2 (média ± desvio padrão; n = 3).

Aveia	Cu	Fe	Mn	Zn
NaOH	0,58 ± 0,03	1,40 ± 0,07	1,2 ± 0,2	1,9 ± 0,1
HCl	0,07 ± 0,01	6,0 ± 0,6	3,90 ± 0,05	1,90 ± 0,02
Tris	0,07 ± 0,01	1,8 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,60 ± 0,01
SDS	0,18 ± 0,03	3,5 ± 0,3	1,7 ± 0,1	1,90 ± 0,05
H₂O	0,090 ± 0,001	1,1 ± 0,1	0,62 ± 0,06	< LQ

* <LQ = valores abaixo do limite de quantificação

Tris: extração com tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹, pH 8,0

SDS: extração com tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹ com 1% de SDS, pH 8,0

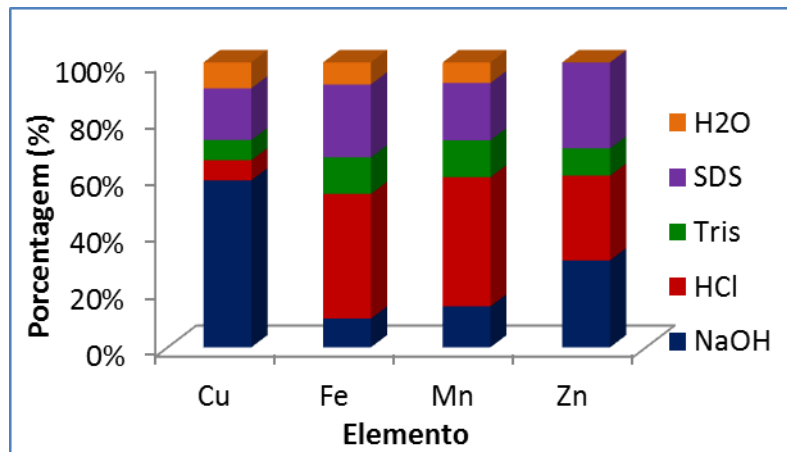


Figura 7. Porcentagem de Cu, Fe, Mn e Zn nas frações da amostra de aveia submetida ao procedimento de extração 2.

Tabela 23. Concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn, em $\mu\text{g g}^{-1}$, nas frações da amostra de linhaça submetida ao procedimento de extração 2 (média \pm desvio padrão; n = 3).

Linhaça	Cu	Fe	Mn	Zn
NaOH	0,76 \pm 0,06	1,3 \pm 0,1	0,25 \pm 0,01	2,1 \pm 0,2
HCl	0,59 \pm 0,01	3,9 \pm 0,2	0,46 \pm 0,03	1,1 \pm 0,1
Tris	0,75 \pm 0,07	1,2 \pm 0,1	0,16 \pm 0,02	0,51 \pm 0,05
SDS	0,54 \pm 0,02	1,4 \pm 0,1	0,12 \pm 0,01	0,53 \pm 0,03
H₂O	0,83 \pm 0,03	0,57 \pm 0,03	< LQ	< LQ

* <LQ = valores abaixo do limite de quantificação

Tris: extração com tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹, pH 8,0

SDS: extração com tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹ com 1% de SDS, pH 8,0

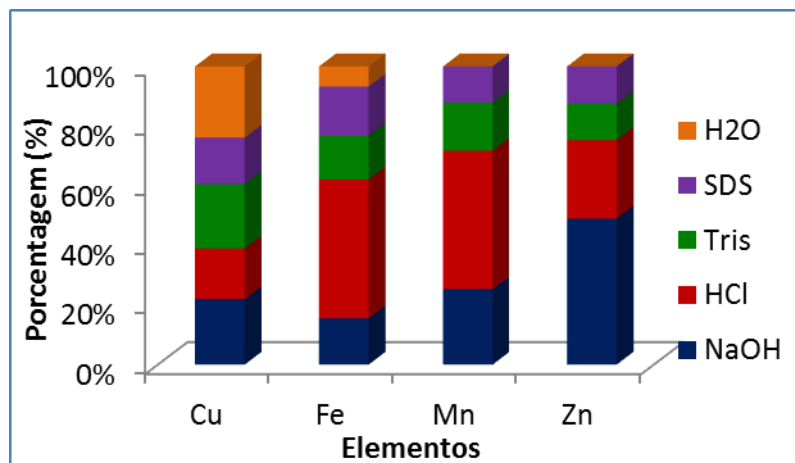


Figura 8. Porcentagem de Cu, Fe, Mn e Zn nas frações da amostra de linhaça submetida ao procedimento de extração 2.

Tabela 24. Concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn, em $\mu\text{g g}^{-1}$, nas frações da amostra de trigo submetida ao procedimento de extração 2 (média \pm desvio padrão; n = 3).

Trigo	Cu	Fe	Mn	Zn
NaOH	0,21 \pm 0,01	0,54 \pm 0,03	0,08 \pm 0,01	0,26 \pm 0,01
HCl	< LQ	0,54 \pm 0,03	0,79 \pm 0,09	0,37 \pm 0,05
Tris	0,11 \pm 0,01	0,68 \pm 0,01	0,36 \pm 0,04	0,33 \pm 0,01
SDS	0,25 \pm 0,02	0,75 \pm 0,05	1,1 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1
H₂O	0,05 \pm 0,01	< LQ	1,2 \pm 0,1	< LQ

* <LQ = valores abaixo do limite de quantificação

Tris: extração com tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹, pH 8,0

SDS: extração com tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹ com 1% de SDS, pH 8,0

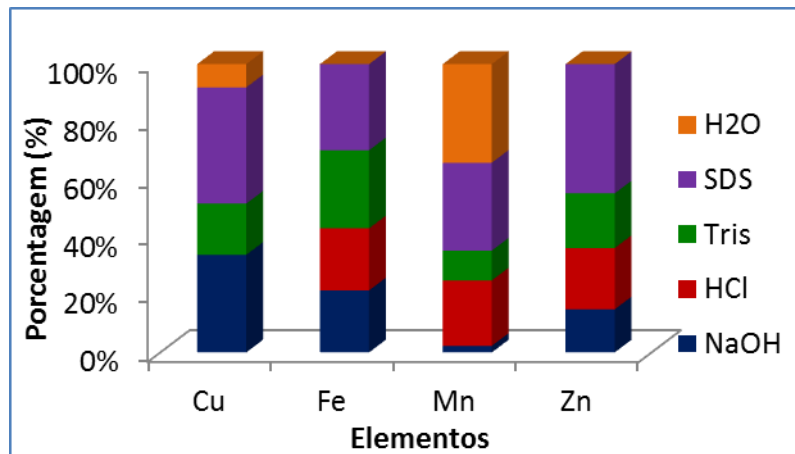


Figura 9. Porcentagem de Cu, Fe, Mn e Zn, nas frações da amostra de trigo submetida ao procedimento de extração 2.

Tabela 25. Concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn, em $\mu\text{g g}^{-1}$, nas frações da amostra de soja submetida ao procedimento de extração 2 (média \pm desvio padrão; n = 3).

Soja	Cu	Fe	Mn	Zn
NaOH	0,90 \pm 0,09	1,0 \pm 0,1	0,71 \pm 0,04	1,10 \pm 0,08
HCl	0,15 \pm 0,01	2,10 \pm 0,01	0,37 \pm 0,01	1,5 \pm 0,2
Tris	0,07 \pm 0,01	1,10 \pm 0,02	0,26 \pm 0,01	0,24 \pm 0,03
SDS	0,092 \pm 0,001	3,0 \pm 0,2	0,69 \pm 0,04	0,67 \pm 0,06
H₂O	0,16 \pm 0,01	3,4 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1	1,8 \pm 0,1

* <LQ = valores abaixo do limite de quantificação

Tris: extração com tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹, pH 8,0

SDS: extração com tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹ com 1% de SDS, pH 8,0

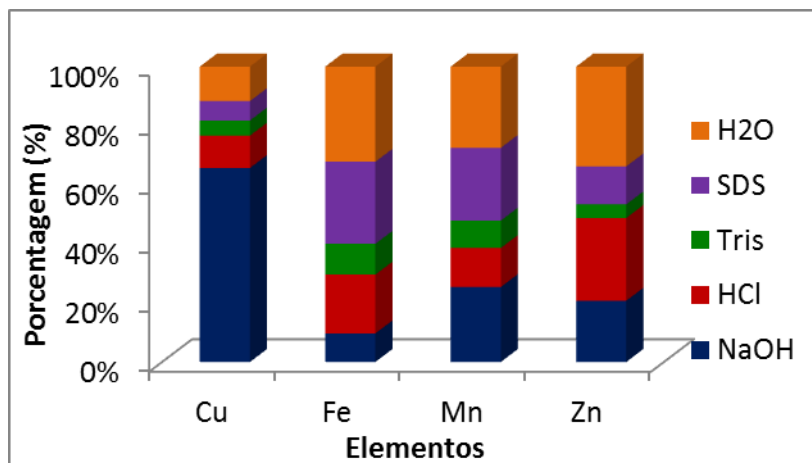


Figura 10. Porcentagem de Cu, Fe, Mn e Zn, nas frações da amostra de soja submetida ao procedimento de extração 2.

As concentrações de cada elemento nas frações das amostras de aveia, linhaça, trigo e soja, somadas à concentração na fração residual (Tabela 15), foram comparadas ao valor da concentração do metal na amostra *in natura* (Tabela 14). Sendo assim, para o procedimento de extração 2, as porcentagens de recuperação de Cu, Fe, Mn e Zn foram de 50, 163, 132 e 115% para aveia; 96, 148, 178 e 137% para linhaça; 96, 100, 116 e 115% para trigo e 101, 110, 118 e 75% para soja, respectivamente.

A utilização de diferentes soluções extratoras pode remover, preferencialmente, grupos de proteínas específicos, conforme comentado anteriormente. Sendo assim, para o procedimento de extração 2, as frações proteicas extraídas com água e solução de NaOH podem ser relacionada às proteínas albumina e glutelina, respectivamente, segundo Naozuka & Oliveira [1] e Agboola et al. [11].

Kannamkumarath et al. [13] relataram que proteínas de elevada e baixa massa molecular foram encontradas em amostra de castanha do Brasil, quando solução de NaOH e HCl foram utilizadas, respectivamente, como extratores. Os autores concluíram ainda que a água quente, na maioria dos casos, extraem proteínas de baixa massa molecular. Sabe-se ainda que proteínas solúveis e insolúveis em água são extraídas ao se utilizar solução tampão Tris-HCl e tampão Tris-HCl com 1% SDS, respectivamente. Já a solução tampão Tris-HCl pH 8,0 pode extrair, preferencialmente, as proteínas globulinas [14].

Na Tabela 26 estão descritos, resumidamente, os grupos proteicos preferencialmente extraídos com cada solução utilizada no procedimento de extração 2.

Tabela 26. Grupos proteicos extraídos, preferencialmente, com diferentes soluções extratoras.

Soluções Extratoras	Proteínas Preferencialmente Extraídas
NaOH	Glutelinas e proteínas de elevada massa molecular
HCl	Proteínas de baixa massa molecular
Tris	Globulina e proteínas solúveis
SDS	Proteínas Insolúveis
H ₂ O	Proteínas solúveis e de baixa massa molecular

Tris: extração com tampão Tris-HCl.

SDS: extração com tampão Tris-HCl contendo SDS.

Desta maneira, pode-se associar os metais determinados em cada fração das amostras com a presença de determinados grupos de proteínas, como descrito na Tabela 27.

Tabela 27. Distribuição de Cu, Fe, Mn e Zn nas frações proteicas das amostras de aveia, linhaça, trigo e soja extraídas pelo procedimento de extração 2.

	Cu	Fe	Mn	Zn
Aveia	Glutelinas ↑ MM	↓ MM	↓ MM	Glutelinas, ↑ e ↓ MM Insolúveis
Linhaça	Globulinas/ Glutelinas Solúveis, ↑ MM	↓ MM	↓ MM	Glutelinas ↑ MM
Trigo	Insolúveis	Insolúveis	Insolúveis	Insolúveis
Soja	Glutelinas, ↑ MM	Solúveis ↓ MM	Glutelinas, ↑ MM, Solúveis e Insolúveis	↓ MM

↑ MM = Proteínas de elevada massa molecular

↓ MM = Proteínas de baixa massa molecular

Os dados da Tabela 22 e Figura 7 mostram uma maior concentração de Fe e Mn na fração extraída com solução de HCl para a amostra aveia, indicando que estes elementos podem estar ligados às proteínas de baixa massa molecular. O Cu está presente em maior concentração na fração NaOH, demonstrando sua possível interação com as glutelinas e/ou proteínas de elevada massa. Já o Zn está presente em maiores quantidades nas frações extraídas com NaOH, HCl e SDS, demonstrando que este elemento pode estar associado às proteínas glutelinas, insolúveis e de elevada ou baixa massa molecular. Esta associação pode ser feita para as demais amostras avaliadas (Tabela 27).

No procedimento de extração 2, as proteínas extraídas em cada fração foram precipitadas com acetona 80% (v/v). As Figuras 11 e 12 ilustram a precipitação das proteínas nas amostras de aveia e linhaça, respectivamente. Para estas amostras, a precipitação proteica foi visualizada instantaneamente ao se adicionar acetona 80% (v/v). Para as amostras de trigo e soja este fato foi observado somente após a permanência das amostras em freezer. Isto pode ser devido ao alto teor de fibras nas amostras de aveia e linhaça, que podem ter precipitado junto às proteínas.

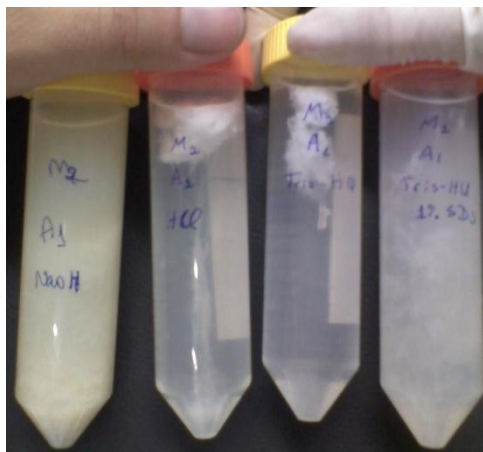


Figura 11. Precipitação das proteínas presentes em aveia.

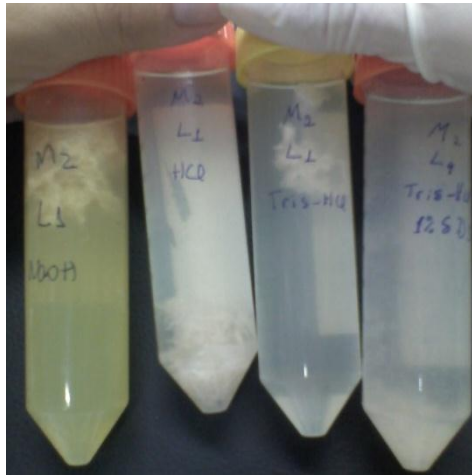


Figura 12. Precipitação das proteínas presentes em linhaça.

3.4.4.3. Procedimento de extração 3

Inicialmente, foi otimizado o pH da solução extratora a ser utilizada durante as extrações. Para tanto, a amostra de trigo foi submetida à extração proteica utilizando soluções tampão Tris-HCl com diferentes valores de pH: 6,0; 7,4 e 8,0. Estes valores de pH foram escolhidos baseados em procedimentos descritos na literatura. Foram realizadas as determinações de Cu, Fe, Mn e Zn e quantificação do teor de proteínas totais nas frações de trigo obtidas após as extrações. De acordo com os resultados, a solução tampão Tris-HCl com pH 7,4 foi mais eficiente para a extração dos metais e proteínas.

Sendo assim, as amostras de aveia, linhaça, trigo e soja foram submetidas ao procedimento de extração 3, utilizando-se como extrator solução tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹ pH 7,4 (item 3.3.2.4).

As concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn determinadas na fração proteica de cada amostra estão apresentados na Tabela 28 e Figura 13.

Tabela 28. Concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn, em $\mu\text{g g}^{-1}$, na fração das amostras de aveia, linhaça, trigo e soja submetidas ao procedimento de extração 3 (média \pm desvio padrão; n = 3).

	Cu	Fe	Mn	Zn
Aveia	0,26 \pm 0,03	0,68 \pm 0,05	1,10 \pm 0,01	0,62 \pm 0,03
Linhaça	0,57 \pm 0,03	0,9 \pm 0,1	0,45 \pm 0,04	1,40 \pm 0,03
Trigo	0,43 \pm 0,01	0,57 \pm 0,08	0,84 \pm 0,04	0,55 \pm 0,06
Soja	1,5 \pm 0,1	3,8 \pm 0,2	1,40 \pm 0,04	0,60 \pm 0,07

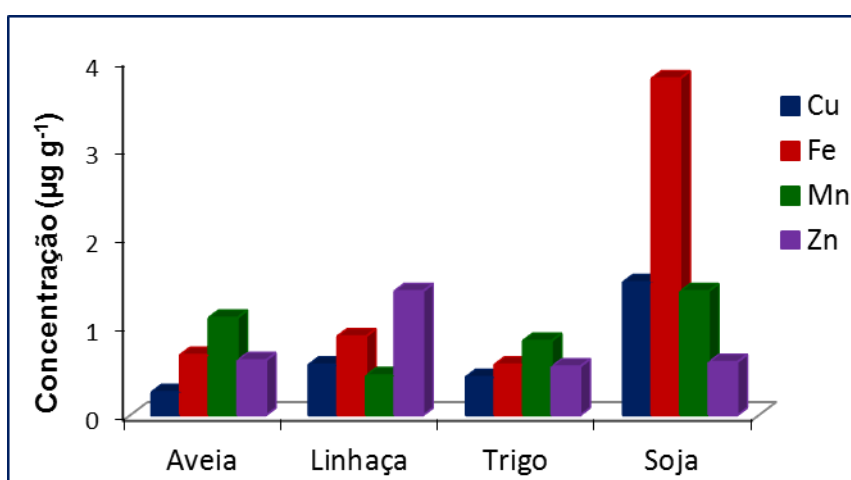


Figura 13. Concentração Cu, Fe, Mn e Zn na fração proteica das amostras de aveia, linhaça, trigo e soja submetidas ao procedimento de extração 3.

A concentração de cada elemento na fração das amostras de aveia, linhaça, trigo e soja, somada à concentração na fração residual (Tabela 15), foram comparadas ao valor da concentração do metal na amostra *in natura* (Tabela 14). Sendo assim, para o procedimento de extração 3, as porcentagens de recuperação de Cu, Fe, Mn e Zn foram de 88, 102, 106 e 99% para aveia; 100, 112, 122 e 102% para linhaça; 105, 98, 97 e 95% para trigo e 99, 103, 114 e 88% para soja, respectivamente.

De acordo com os dados mostrados na tabela 28 e Figura 13, de modo geral, a fração proteica de soja apresentou as maiores concentrações dos metais, com exceção do Zn com maior teor na fração extraída da linhaça.

O procedimento de extração 3, baseou-se em uma extração em fase única com solução tampão Tris-HCl no intuito de extrair preferencialmente as

proteínas solúveis em água. Desta forma, conclui-se que as proteínas extraídas da aveia e trigo podem estar preferencialmente ligadas ao Mn, já as proteínas das amostras linhaça e soja podem estar associadas ao Zn e Fe, respectivamente.

Vale ressaltar que para os procedimentos de extração 1, 2 e 3 baixas concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn foram determinadas nas frações proteicas extraídas das amostras de aveia, linhaça, trigo e soja. Este fato indica que parte destes elementos permaneceram ligados às frações residuais.

Vale ressaltar que o fracionamento de proteínas baseado em sua solubilidade em diferentes reagentes extratores é uma estimativa da composição proteica. A classificação de proteínas é baseada não somente em sua solubilidade, mas também em sua estrutura, composição de aminoácidos e tamanho [15].

3.4.5. Proteínas

3.4.5.1. Quantificação das proteínas totais

O método de Bradford foi utilizado para a determinação do teor de proteínas totais em cada fração das amostras de aveia, linhaça, trigo e soja, submetidas aos procedimentos de extração 1, 2 e 3 e os resultados estão apresentadas nas Tabelas 29 (Figura 14), 30 (Figura 15) e 31, respectivamente.

Tabela 29. Teor de proteínas totais, em mg g^{-1} , em aveia, linhaça, trigo e soja submetidas ao procedimento de extração 1 (média \pm desvio padrão; $n = 3$).

	Aveia	Linhaça	Trigo	Soja
Água	1,76 \pm 0,06	8,0 \pm 0,1	3,80 \pm 0,02	8,20 \pm 0,03
NaCl	4,8 \pm 0,1	6,8 \pm 0,1	3,81 \pm 0,03	7,01 \pm 0,03
EtOH	2,48 \pm 0,03	3,52 \pm 0,04	3,20 \pm 0,04	3,71 \pm 0,01
NaOH	9,22 \pm 0,01	10,81 \pm 0,07	8,22 \pm 0,01	11,2 \pm 0,2

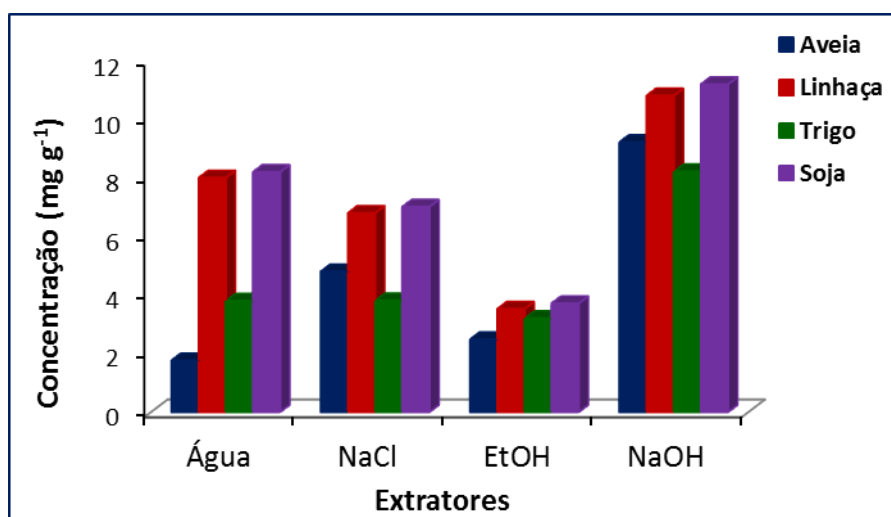


Figura 14. Teor de proteínas totais, em mg g^{-1} , em aveia, linhaça, trigo e soja submetidas ao procedimento de extração sequencial 1.

Tabela 30. Teor de proteínas totais, em mg g^{-1} , em aveia, linhaça, trigo e soja submetidas ao procedimento de extração 2 (média \pm desvio padrão; $n = 3$).

	Aveia	Linhaça	Trigo	Soja
NaOH	6,01 \pm 0,04	9,6 \pm 0,1	3,64 \pm 0,04	10,8 \pm 0,1
HCl	7,21 \pm 0,08	8,1 \pm 0,1	7,6 \pm 0,1	11,6 \pm 0,1
Tris	2,24 \pm 0,07	6,82 \pm 0,03	3,1 \pm 0,2	8,4 \pm 0,2
SDS	3,04 \pm 0,03	9,6 \pm 0,1	6,2 \pm 0,1	10,4 \pm 0,1
Água	0,96 \pm 0,07	5,2 \pm 0,1	2,76 \pm 0,03	4,0 \pm 0,1

Tris: extração com tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹, pH 8,0

SDS: extração com tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹ com 1% de SDS, pH 8,0

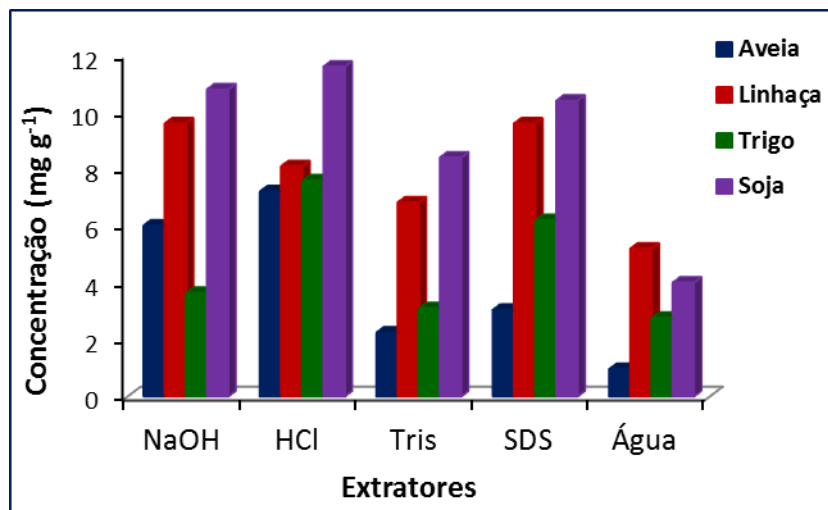


Figura 15. Teor de proteínas totais, em mg g^{-1} , em aveia, linhaça, trigo e soja submetidas ao procedimento de extração sequencial 2.

Tabela 31. Teor de proteínas totais, em mg g^{-1} , em aveia, linhaça, trigo e soja submetidas ao procedimento de extração 3 (média \pm desvio padrão; $n = 3$).

	Amostras			
	Aveia	Linhaça	Trigo	Soja
Tris	$4,8 \pm 0,02$	$2,8 \pm 0,08$	$4,2 \pm 0,04$	$4,4 \pm 0,06$

Tris: extração com tampão Tris-HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4

Somando-se os teores de proteínas totais encontrados em cada fração das amostras submetidas aos procedimentos de extração 1 e 2 (Tabelas 29 e 30), observa-se um maior teor de proteína nas amostras extraídas pelo procedimento de extração 2, indicando que este procedimento foi mais eficiente para a extração proteica.

De maneira geral, a amostra de soja apresentou elevado teor de proteínas totais nos três procedimentos de extração, o que era de se esperar comparando-se aos dados da Tabela Nutricional de Alimentos da USP [16], que mostra um teor de proteínas totais em grãos de soja de $405,0 \text{ mg g}^{-1}$. O teor de proteínas totais nas amostras de aveia em flocos crua [10], farelo de trigo cru [16] e semente de linhaça [9] são de $139,0$; $174,8$ e $141,0 \text{ mg g}^{-1}$.

De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 29, 30 e 31 e o teor de proteínas totais em aveia, linhaça, trigo e soja descritos na tabela TACO [9] e/ou na Tabela Nutricional de Alimentos da USP [16], os

procedimentos de extração 1, 2 e 3 não extraíram completamente as proteínas, as quais permaneceram na fração residual da amostra. Este resultado é esperado uma vez que foram utilizadas soluções extratoras diluídas ou água, pois o objetivo do estudo é avaliar a fração proteica disponível.

A Tabela 29 e Figura 14 mostra os teores de proteínas totais para as amostras submetidas ao procedimento de extração sequencial 1. Observa-se um menor e maior teor de proteínas totais nas frações extraídas com solução de etanol 70% (v/v) e NaOH 0,5 mol L⁻¹, respectivamente. Naozuka & Oliveira [1] observaram a mesma tendência ao quantificar proteínas totais em amostras de Castanha-do-Pará, semente de cupuaçu e polpa de coco e concluíram que o extrator hidróxido de sódio não é seletivo, e por esta razão, supõe-se que outras proteínas além da albumina, globulina e prolamina não extraídas anteriormente podem estar presentes nesta fração.

Vale ressaltar ainda que, para o procedimento de extração 1, menores concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn foram encontrados nas frações que possuem o maior teor de proteínas totais (fração NaOH). Este fato foi observado por Naozuka & Oliveira [1] e por Magalhães & Arruda [17] ao estudarem 11 procedimentos diferentes de extração de proteínas e metaloproteínas em Castanha-da-Índia. Para o procedimento de extração 2 o inverso foi observado, isto é, de maneira geral, maiores concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn foram determinados nas frações com maior teor proteico. Este fato indica que o segundo procedimento de extração pode ser mais eficiente na extração das metaloproteínas.

Para as amostras submetidas ao procedimento de extração 2, de maneira geral, observa-se um menor e maior teor de proteínas totais nas frações extraídas com água e HCl, respectivamente, evidenciando a presença de proteínas de baixa massa molecular nas amostras de aveia, linhaça, trigo e soja (Tabela 26).

Segundo Klose et al. [18] e Holding & Larkins [19], as amostras de aveia possuem em sua composição elevado teor da proteína globulina e baixo teor de prolamina. Pelos dados descritos na Tabela 29, comparando-se os resultados das frações extraídas com NaCl (globulina) e etanol (prolamina), comprova-se este fato.

As principais proteínas da semente de linhaça são predominantemente encontradas na fração solúvel em sal e na fração solúvel em água, o que pode indicar a presença das proteínas globulinas e albuminas, respectivamente [20, 21]. Elas correspondem aproximadamente a 20-42% da proteína da linhaça [22]. Neste trabalho, elevados teores de proteínas foram encontrados nas frações extraídas com água (albumina) e solução de NaCl (globulina), como indicado na Tabela 29.

Holdings e Larkins [19] afirmam que as prolaminas representam aproximadamente 60-70% das proteínas encontradas em milho e trigo. Em sequência, encontram-se em amostras de trigo elevado teor das proteínas pertencente às glutelinas [23]. No procedimento de extração sequencial 1, Tabela 29, observa-se um maior teor de proteínas na fração extraída com solução de NaOH, correspondente à extração das glutelinas.

Nas leguminosas, as globulinas são as principais proteínas armazenadas, representando acima de 70% do total de N da semente [24]. Desta forma, de acordo com os resultados da Tabela 29 para a amostra de soja, o teor de proteínas totais na fração extraída com solução de NaCl (globulinas) foi elevado, sendo menor apenas para a fração NaOH e água.

O teor de proteínas totais indica qual fração da amostra apresenta uma maior quantidade de proteína. Esta dosagem é relevante para se estimar a quantidade de amostra que deverá ser utilizada nos procedimentos de separação proteica.

3.5. CONCLUSÕES

A extração sólido-líquido combinada à espectrometria de absorção atômica foi eficiente no fracionamento e na determinação de elementos associados às proteínas.

O consumo de aveia, linhaça, trigo e soja favorece a dieta alimentar por apresentar altas concentrações de Fe, Zn e Mn e proteínas.

Pelos procedimentos de extração 1, 2 e 3 foi possível verificar a presença dos elementos Cu, Fe, Mn e Zn nas frações proteicas de aveia, linhaça, trigo e soja. Estes procedimentos apresentaram porcentagem de

recuperação entre 50 e 178%, valores que evidenciam a complexidade da amostra.

O procedimento de extração 1, fundamenta-se na extração de diferentes grupos proteicos utilizando reagentes específicos. Desta forma, foi possível concluir que as proteínas do grupo globulina prevalecem nas frações das amostras de aveia, linhaça, trigo e soja, podendo estar associado aos metais Cu, Fe, Mn e Zn. Maiores concentrações de proteínas totais foram determinadas nas frações extraídas com NaOH, a qual apresentou menor concentração dos elementos estudados.

O procedimento de extração 2, baseia-se na utilização de diferentes reagentes no intuito de extrair determinados grupo proteicos que diferenciam entre si, basicamente, pela sua solubilidade em água e massa molecular. Sendo assim, foi possível associar os elementos Cu, Fe, Mn e Zn aos grupos proteicos da aveia, linhaça, trigo e soja. As frações com maiores concentrações de proteínas totais foram extraídas pelo procedimento 2, sendo possível verificar, de modo geral, que a fração com maior teor de proteína possuía a maior concentração dos elementos.

No procedimento de extração 3, em fase única, pode-se concluir que o elemento Mn pode estar associado às proteínas extraídas das amostras de aveia e trigo. Para as amostras de linhaça e soja, verificou-se que as proteínas extraídas podem estar ligadas, preferencialmente, aos elementos Zn e Fe, respectivamente.

O estudo dos metais ligados às proteínas baseado em sua solubilidade em determinadas soluções extratoras é apenas uma estimativa da constituição proteica da amostra. Portanto, para se confirmar a presença de metaloproteínas deve-se realizar um estudo detalhado que envolva a separação proteica, a identificação dos constituintes inorgânicos e a identificação das proteínas baseado na composição peptídica.

3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] NAOZUKA, J.; OLIVEIRA, P. V. Cu, Fe, Mn and Zn Distribution in Protein Fraction 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.

[2] KANNAMKUMARATH, S. S.; WRÓBEL, K.; WUILLOUD, R. G. Studying the distribution pattern of selenium in nut proteins with information obtained from SEC-UV-ICP-MS and CE-ICP-MS. *Talanta*, v. 66, p. 153-159, 2005.

[3] DEITRICH, C. L.; BRAUKMANN, S.; RAAB, A.; MUNRO, C.; PIOSELLI, B.; KRUPP, E. M.; OATES, J. E. T.; FELDMANN, J. Absolute quantification of superoxide dismutase (SOD) using species-specific isotope dilution analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 397, p. 3515-3524, 2010.

[4] MOUNICOU, S.; LOBINSKI, R. Challenges to metallomics and analytical chemistry solutions. *Pure and Applied Chemistry*, v. 80, p. 2565-2575, 2008.

[5] TRAN, M. Q. T.; NYGREN, Y.; LUNDIN, C.; NAREDI, P.; BJORN, E. *Analytical Biochemistry*, v. 396, p. 76-82, 2010.

[6] RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, p. 771-780, 2004.

[7] INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. *Orientações sobre validação de métodos e ensaios químicos*. (2006), revisado (2007).

[8] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução nº 899 de 29/05/03 – *Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos*.

- [9] Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA) e Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). *Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO)*. Versão 2 – Segunda Edição, Campinas, São Paulo, 2006.
- [10] JIN, C. W.; DU, S. T.; ZHANG, K. & LIN, X.; Y. “Factors determining copper concentration in tea leaves produced at Yuyao County, China”. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p. 2054-2061, 2008.
- [11] AGBOOLA, S.; NG, D.; MILLS, D. Characterisation and functional properties of Australian rice protein isolates. *Journal of Cereal Science*, v. 41, p. 283-290, 2005.
- [12] TASTET, L.; SCHAUMLOFFEL, D.; BOUYSSIERE, B.; LOBINSKI, R. Identification of selenium-containing proteins in selenium-rich yeast aqueous extract by 2D gel electrophoresis, nanoHPLC-ICP-MS and nanoHPLC-ESI-MS/MS. *Talanta*, v. 75, p. 1140-1145, 2008.
- [13] KANNAMKUMARATH, S. S.; WUILLOUD, R. G.; CARUSO, J. A. Studies of Various Elements of Nutritional and Toxicological Interest Associates with Different Molecular Weight Fractions in Brazil Nuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, p. 5773-5780, 2004.
- [14] NOGALES, J. M. R.; CIFUENTES, A.; GARCÍA, M. C.; MARINA, M. L. Characterization of Protein Fractions from Bt-Transgenic and Non-transgenic Maize Varieties Using Perfusion and Monolithic RP-HPLC. Maize Differentiation by Multivariate Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 3835-3842, 2007.
- [15] BEAN, S. R.; LOOKHART, G. L. Electrophoresis of cereal storage proteins. *Journal of Chromatography A*, v. 881, p. 23-36, 2000.
- [16] Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP e BRASILFOODS (Rede Brasileira de Dados de Composição de Alimentos). *Tabela Brasileira de*

Composição de Alimentos. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tabela>, acessado em 29/05/2010.

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

[18] KLOSE, C.; SCHEHL, B. D.; ARENDT, E. K. Fundamental study on protein changes taking place during malting of oats. *Journal of Cereal Science*, v. 49, p. 83-91, 2009.

[19] HOLDING, D. R.; LARKINS, B. A. Genetic Engineering of Seed Storage Proteins. *Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology*, v. 1, p. 107-133, 2008.

[20] 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, p. 271-279, 2005.

[21] WANG, B.; LI, D.; WANG, L. J.; OZKAN, N. Effect of concentrated flaxseed protein on the stability and rheological properties of soybean oil-in-water emulsions. *Journal of Food Engineering*, v. 96, p. 555-562, 2010.

[22] Portal Verde: Linhaça. Disponível em: <http://www.portalverde.com.br/alimentacao/beneficios/linhaca.htm>, acessado em: 01/06/2012.

[23] SKYLAS, D. J.; DYK, D. V.; WRIGLEY, C. W. Proteomics of wheat grain. *Journal of Cereal Science*, v. 41, p. 165-179, 2005.

[24] FARIAS, P. C. M.; CHAVES, A. L. S.; BOUCHARD, R.; FINER, J. *Microscopia das proteínas GFP e DsRed em soja*. Pelotas: Editora da UFPel, 2009.

CAPÍTULO 4

PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO PROTEICA:

**Estudo comparativo entre os métodos
Bradford e ácido bicinconínico para
quantificação de proteínas totais**

4.1. INTRODUÇÃO

Uma das etapas fundamentais nos estudos sobre metaloproteínas (ou mesmo proteínas associadas a metais via ligações não-covalentes [1] envolve a quantificação do teor total de proteínas nas amostras. O desenvolvimento de metodologias para a quantificação de proteínas totais é de grande interesse para os profissionais de diversas áreas [2,3].

Os métodos de dosagem de proteína baseiam-se na formação de compostos coloridos devido à reação de certos grupos ou radicais com reagentes químicos específicos. O método Bradford [4] baseia-se na interação do corante G-250 com proteínas que contenham aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas, [5,6] com o complexo colorido absorvendo fortemente em $\lambda=595$ nm. Apesar de ser um método rápido, sensível e de estar sujeito a um número menor de interferentes quando comparado a outros métodos, apresenta algumas desvantagens, tais como variação da absorvidade específica para diferentes proteínas, falta de linearidade na lei de Lambert-Beer e resultados não confiáveis para as amostras que possuem proteínas de baixo peso molecular [6]. O método do ácido bicinconínico (BCA) tem sido recomendado em estudos de comparação de metodologias e se baseia na reação de redução $\text{Cu(II)} \rightarrow \text{Cu(I)}$, em meio alcalino, promovida pelas proteínas. O Cu(I), por sua vez, forma um complexo com o BCA, o qual absorve fortemente na região de $\lambda=562$ nm. Apresenta como desvantagens a dependência da temperatura na incubação das amostras, a variação da absorvidade específica para diferentes proteínas e a variação da absorbância com o tempo [7].

Neste trabalho, foi aplicado um procedimento de extração sequencial sólido-líquido e um procedimento de extração em fase única para a extração de diferentes frações proteicas. As frações foram diluídas dez vezes em água deionizada e a quantificação de proteínas totais foi realizada pelos métodos Bradford e BCA para fins comparativos.

4.2. OBJETIVOS

4.2.1. Objetivo Geral

Comparar os métodos de Bradford e do ácido bicinconínico (BCA) para a quantificação de proteínas totais nas diferentes frações de trigo e soja obtidas após aplicação dos procedimentos de extração 1 e 3.

4.2.2. Objetivos Específicos

- Utilizar o procedimento de extração 1 para trigo e soja utilizando as soluções extratoras: água; NaCl; Etanol; NaOH e quantificar o teor de proteínas totais pelos métodos Bradford e BCA nas frações obtidas.
- Utilizar o procedimento de extração 3 para trigo e soja utilizando solução tampão Tris-HCl pH 7,4 e quantificar o teor de proteínas totais pelos métodos Bradford e BCA nas frações obtidas.
- Comparar os resultados obtidos para quantificação de proteínas totais pelos métodos Bradford e BCA nas diferentes frações proteica.

4.3. PARTE EXPERIMENTAL

4.3.1. Instrumentação

Para as quantificações de proteínas totais nas frações proteicas foi utilizado um espectrofotômetro Hach, modelo DR4000 e cada amostra teve sua absorbância determinada à 595 e 562 nm, para os métodos de Bradford e BCA, respectivamente.

4.3.2. Extração das frações proteicas

A extração das frações proteínas foi realizada aplicando os procedimentos de extração 1 e 3 descrito no item 3.3.2.4. A fim de evitar a degradação das proteínas pela atuação da enzima protease, as amostras foram mantidas em gelo durante o procedimento de extração.

4.3.3. Quantificação do teor de proteínas totais

No estudo comparativo entre os métodos Bradford e BCA foi realizada a quantificação de proteínas totais nas frações de trigo e soja obtidas após aplicação dos procedimentos de extração 1 e 3. Para tanto, as diferentes frações foram diluídas dez vezes para garantir que o teor de proteínas totais estivesse dentro da faixa linear da curva analítica (curva padrão da proteína albumina) e as frações se mantivessem límpidas.

A quantificação do teor de proteínas totais em cada fração obtida após os procedimentos de extração 1 e 3, foi determinada pelo método de Bradford e BCA (kit da BioAgency), utilizando o procedimento para microensaios recomendado pelo fabricante. Foram adicionados 40 μL do reagente concentrado (etanol, ácido fosfórico e o corante azul brilhante de coomassie G250) a 160 μL de cada amostra/padrão. As concentrações da curva analítica por Bradford foram: 0,025; 0,050; 0,125; 0,250; 0,500 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$.

Para o método BCA, adicionou-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) a 25 µL de cada amostra/padrão. As concentrações da curva analítica BCA foram: 0,004; 0,04; 0,25; 0,50; 1,0 µg µL⁻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 para os métodos Bradford e BCA, respectivamente. Posteriormente, as amostras foram analisadas no espectrofotômetro UV-vis e cada reação teve sua absorbância determinada no comprimento de onda de 595 e 562 nm para os métodos Bradford e BCA, respectivamente. Todas as amostras e padrões foram preparados em triplicata.

4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1. Quantificação do teor de proteínas totais: comparação entre os métodos Bradford e BCA

Os resultados dos teores totais de proteínas obtidos pelos dois métodos estão descritos nas Tabelas 32 e 33.

Tabela 32. Teor de proteínas totais determinada pelos métodos Bradford e BCA, nas frações das amostras de trigo e soja extraídas pelo procedimento de extração 1 (média ± desvio padrão, n = 3).

		TRIGO		SOJA	
		Fração	Concentração (mg g ⁻¹)	Fração	Concentração (mg g ⁻¹)
Bradford	H ₂ O		3,8 ± 0,1	H ₂ O	8,2 ± 0,3
	NaCl		3,8 ± 0,5	NaCl	7,0 ± 0,4
	EtOH		3,2 ± 0,5	EtOH	3,7 ± 0,2
	NaOH		8,2 ± 0,5	NaOH	11 ± 1
BCA	H ₂ O		5,2 ± 0,5	H ₂ O	40 ± 2
	NaCl		1,6 ± 0,1	NaCl	22 ± 2
	EtOH		1,20 ± 0,01	EtOH	6,4 ± 0,1
	NaOH		8,2 ± 0,1	NaOH	34 ± 1

Tabela 33. Teor de proteínas totais determinada pelos métodos Bradford e BCA, na fração das amostras de trigo e soja extraída pelo procedimento de extração 3 (média \pm desvio padrão, n = 3).

	TRIGO	SOJA
	Concentração (mg g ⁻¹)	Concentração (mg g ⁻¹)
Bradford	3,2 \pm 0,1	4,3 \pm 0,1
BCA	0,9 \pm 0,1	3,4 \pm 0,3

Os dados apresentados nas Tabelas 32 e 33 mostram que os teores de proteínas totais obtidos pelos dois métodos, nas frações provenientes da amostra de soja, são superiores àqueles da amostra de trigo, o que confirma que a soja é uma matriz com um elevado conteúdo proteico [8].

A albumina (BSA) foi utilizada como padrão para construção das curvas analíticas. Os parâmetros da curva para os métodos de Bradford e BCA foram, respectivamente: $y = 0,013x + 0,1732$ ($R = 0,90$) e $y = 0,0354x + 0,1705$ ($R = 0,99$). De acordo com estes resultados, o valor do coeficiente angular (inclinação da curva) para a curva analítica construída para quantificação das amostras pelo método Bradford (0,013) foi menor comparado à curva BCA (0,0354), indicando uma menor sensibilidade do método Bradford. O valor do coeficiente de correlação linear (R) foi maior para o método BCA (0,99), indicando uma maior linearidade da curva construída para este método [9].

De maneira geral, os resultados da Tabela 32 mostram que as maiores e menores concentrações de proteína foram obtidas nas frações extraídas com solução de NaOH e etanol/água, respectivamente, tanto para as amostras de trigo quanto de soja. Naozuka & Oliveira [10] também observaram esta tendência ao quantificar proteínas totais em amostras de castanha do Brasil, semente de cupuaçu e polpa de coco. Os autores concluíram que a solução de NaOH não é seletiva, podendo extrair proteínas de várias classes. Para as frações da amostra de soja (Tabela 32), verificou-se que os valores de concentração de proteínas totais obtidos pelo método Bradford foram menores que os encontrados pelo método BCA. Este fato também foi observado por Miwa [7] ao comparar diferentes métodos colorimétricos para a quantificação de

proteínas em lagoas de estabilização e por Crossman e colaboradores [11] ao avaliarem diferentes métodos de quantificação de proteína em amostras de algas marinhas.

A menor concentração de proteínas totais determinada pelo método Bradford pode ser explicada levando-se em consideração que peptídeos contendo menos de oito ligações peptídicas não se ligam ao corante G250 e, portanto, não são quantificados. Outra explicação para a subestimação utilizando o método Bradford é a baixa solubilização das proteínas particuladas. Já o método BCA, além de apresentar um reagente específico para proteínas, é capaz de quantificar peptídeos com no mínimo três aminoácidos, ou seja, duas ligações peptídicas [7].

Vale a pena destacar também que o método Bradford apresentou uma curva analítica linear em uma faixa estreita de concentração (albumina), o que pode causar erros nas determinações. Isto acontece, provavelmente, devido a uma variação no pH quando adiciona-se o corante G250 às amostras [7].

Diferentes métodos têm sido empregados para a quantificação de proteínas totais em amostras de origem animal ou vegetal. No entanto, poucos são os trabalhos que compararam os resultados de tais métodos. Diversos fatores devem ser analisados antes da escolha de uma metodologia para a quantificação de proteínas totais, porém o conhecimento da natureza dos constituintes da amostra e de suas concentrações aproximadas é essencial. Isto facilita a identificação dos possíveis interferentes e, conseqüentemente, favorece a escolha de um método mais apropriado para cada situação. Outros fatores importantes são a sensibilidade, que é dependente da concentração de proteína na amostra, o volume de amostra disponível, a rapidez, o custo da metodologia e, não menos importante, o grau de confiabilidade nos resultados obtidos devido aos interferentes do método escolhido.

É importante enfatizar que a quantificação de proteínas totais pode ser afetada pela metodologia empregada e pela composição da amostra e, portanto, um determinado método deve ser empregado levando-se em consideração, primordialmente, sua sensibilidade, a natureza dos constituintes da amostra e o grau de confiabilidade nos resultados obtidos devido aos interferentes da amostra e do método escolhido.

4.5. CONCLUSÕES

O estudo comparativo entre os métodos de quantificação de proteínas totais por Bradford e BCA indicou, de modo geral, maiores teores de proteína nas determinações realizadas por este último. Os resultados apresentados em termos de sensibilidade e linearidade da curva analítica mostram que o método BCA é o mais indicado para quantificação de proteínas totais nas frações das amostras de trigo e soja. Finalmente, a avaliação de metodologias de quantificação de proteínas totais é imprescindível para os trabalhos desenvolvidos em diversas áreas e que englobam diferentes matrizes e, portanto, deve fazer parte da rotina de procedimentos analíticos.

4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] GARCIA, J. S.; MAGALHÃES, C. S.; ARRUDA, M. A. Z. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. *Talanta*, v. 69, p. 1-15, 2006.
- [2] BADDINI, A. L. Q.; CUNHA, L. E. R.; OLIVEIRA, A. M. C.; CASSELLA, R. J. Determination of total protein in hyperimmune serum samples by near infrared spectrometry and multivariate calibration. *Analytical Biochemistry*, v. 397, p. 175-180, 2010.
- [3] QIN, W.; DAN, W.; BIN D.; ZAIJUN, L.; YANQIANG, H. A spectrophotometric method for determination of total proteins in cow milk powder samples using the o-nitrophenylfluorone/Mo(VI) complex. *Journal of Food Composition Analysis*, v. 19, p. 76–82, 2006.
- [4] 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, p. 248-254, 1976.
- [5] KAMIZAKE, N. K. K.; GONÇALVES, M. M.; ZAIA, C. T. B. V.; ZAIA, D. A. M. Determination of total proteins in cow milk powder samples: a comparative study between the Kjeldahl method and spectrophotometric methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 16, p. 507-516, 2003.
- [6] ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química Nova*, v. 21, p. 787-793, 1998.
- [7] MIWA, A. C. P. Comparação e avaliação dos métodos colorimétricos utilizados para determinação de proteínas em lagoas de estabilização. São Paulo. Universidade de São Paulo, Dissertação de mestrado, 2003.

[8] Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA) e Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO). Versão 2 – Segunda Edição, Campinas, São Paulo, 2006.

[9] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução 899 de 29 de maio de 2003- Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos.

[10] NAOZUKA, J.; OLIVEIRA, P. V. Cu, Fe, Mn and Zn Distribution in Protein Fraction 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.

[11] CROSSMAN, D. J.; CLEMENTS, K. D.; COOPER, G. J. S. Determination of protein for studies of marine herbivory: a comparison of methods. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 244, p. 45-48, 2000.

CAPÍTULO 5

**ESTUDO DOS METAIS LIGADOS ÀS PROTEÍNAS
DA AVEIA, LINHAÇA, TRIGO E SOJA:**

**Determinação dos Constituintes
Inorgânicos e Identificação Proteica**

5.1. INTRODUÇÃO

A utilização de diferentes produtos e processos tecnológicos na vida moderna resulta em um número crescente de elementos que podem ser liberados ao ambiente e entrar na cadeia alimentar [1]. Portanto, o estudo da espécie metálica em materiais biológicos tem recebido especial atenção [1-5], uma vez que estas espécies podem ser consideradas agentes sinalizadores de doenças, podem atuar na catálise e modificar a expressão genética, dentre outros efeitos [6].

A fim de compreender as vias toxicológicas e metabólicas de elementos tóxicos e essenciais, estratégias analíticas devem ser desenvolvidas para obter informações qualitativas e quantitativas sobre os elementos, suas interações, transformações e funções em sistemas biológicos [6].

A compreensão do papel do metal e da proteína depende da qualidade de informação obtida após a análise da metaloproteína. Para se investigar a interação das biomoléculas com os íons metálicos, a integridade da ligação deve ser assegurada durante o preparo da amostra [6].

O estudo metaloproteômico engloba basicamente duas etapas: a primeira consiste na separação das proteínas a partir do fracionamento de um extrato celular e a segunda na identificação das espécies inorgânicas e das proteínas.

Desta forma, neste presente trabalho foi possível identificar diversas proteínas presentes nas amostras de aveia, linhaça, trigo e soja e associá-las aos metais Cu, Fe, Mn e Zn.

5.2. OBJETIVOS

5.2.1. Objetivo Geral

O objetivo principal desta parte do trabalho foi identificar algumas metaloproteínas de Cu, Fe, Mn e Zn presentes nas amostras de aveia, linhaça, trigo e soja.

5.2.2. Objetivos Específicos

- Realizar a separação proteica, por 1D SDS-PAGE, nas frações de trigo extraídas pelo procedimento de extração 2.
- Determinar Cu, Fe, Mn e Zn nas bandas proteicas da amostra de trigo.
- Identificar as proteínas, por MALDI-TOF-MS/MS, presentes nas bandas proteicas e nas frações de trigo (NaOH, HCl, Tris, SDS e H₂O) obtidas após aplicação do procedimento de extração 2.
- Realizar a separação proteica, por 1D SDS-PAGE, nas frações da aveia, linhaça, trigo e soja extraídas pelo procedimento de extração 3.
- Determinar os constituintes inorgânicos e identificar as proteínas presentes nas bandas proteicas das amostras avaliadas.
- Realizar a separação proteica, por RP-HPLC-UV, nas frações da aveia, linhaça, trigo e soja extraídas pelo procedimento de extração 3.
- Determinar os constituintes inorgânicos e identificar as proteínas presentes nas frações proteicas da aveia, linhaça, trigo e soja obtidas após separação cromatográfica.
- Correlacionar os metais às proteínas presentes nas amostras de aveia, linhaça, trigo e soja.

5.3. PARTE EXPERIMENTAL

5.3.1. Amostras

As amostras de grãos de aveia, linhaça, trigo e soja adquiridas no comércio de Belo Horizonte – MG, foram moídas em liquidificador, peneiradas e armazenadas em frascos plásticos, conforme descrito no item 3.3.1.

5.3.2. Instrumentação

5.3.2.1. GF AAS

As determinações dos constituintes inorgânicos foram realizadas em um espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite, PerkinElmer (Norwalk, CT, EUA), modelo AAnalyst 400. As condições de análises estão descritas em 3.3.2.1. As determinações dos constituintes inorgânicos foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Absorção Atômica do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

5.3.2.2. 1D SDS-PAGE

As separações proteicas foram feitas em cuba vertical modelo mini Protean (BIO-RAD). O gel foi preparado com 12% (v/v) e 4% (v/v) de acrilamida e a separação eletroforética das proteínas foi realizada com um tampão de corrida (25 mM de Tris base, 192 mM de glicina e 0,1% (p/v) de SDS) sob uma voltagem de 120V. Em cada canaleta foi aplicado 50 µg de amostra. Foi utilizado um padrão de proteína (Invitrogen) com 12 bandas de proteína na faixa de 3.5-200 kDa.

As proteínas separadas nos géis de poliacrilamida foram visualizadas através da coloração coloidal com coomassie brilliant blue R-250 [7]. Os géis foram incubados por 30 min em solução fixadora 1 (2% (v/v) de ácido ortofosfórico e 3% (v/v) etanol); este procedimento foi repetido três vezes. Posteriormente, o gel foi incubado em solução fixadora 2 (2% (v/v) de ácido ortofosfórico) por 10 min. O procedimento foi repetido três vezes e, finalmente,

o gel foi mantido por 30 min na solução fixadora 3 (2% (v/v) de ácido orto-fosfórico, 18% (v/v) etanol e 12% (p/v) de sulfato de amônio). O gel foi mantido por 4 dias em solução de coloração (0,1% (p/v) coomassie brilliant blue G-250; 2% (v/v) ácido orto-fosfórico; 10% (m/v) sulfato de amônio e 20 % (v/v) metanol). Todas as etapas foram realizadas sob agitação. Depois de corados, os géis foram lavados com água deionizada até a eliminação completa do excesso de corante e armazenados em solução de álcool etílico 20% (v/v).

A digitalização das imagens dos géis foi feita em scanner modelo ImageScanner III, Lab Scan 6.0 (GE healthcare).

As separações por eletroforese foram realizadas no Laboratório de Veneno e Toxinas Animais (LVTA) do Departamento de Biologia da UFMG.

5.3.2.3. RP-HPLC-UV

As separações proteicas também foram realizadas em um cromatógrafo líquido AKTA Explorer 10 (Amersham Biosciences, Upsala, Suécia), controlado pelo software UNICORN 4.11.

Para as análises por HPLC foi utilizado coluna de fase reversa Vydac 214 MS C4 5 μm Grace (250 mm x 4.6 mm) equilibrada com solução aquosa de TFA 0,1%, ao fluxo de 1,0 mL min^{-1} . A eluição foi realizada em três gradientes [1º: 0-20% (14 min); 2º: 20-65% (83 min) e 3º: 65-100% (14 min)] com acetonitrila contendo 0,1% TFA (eluente B), em 130 min e acompanhada pelo monitoramento da absorvância a 214 e 280 nm. O volume de amostra injetado foi de 2,0 mL. As frações proteicas obtidas foram coletadas manualmente e armazenadas em freezer a -20 °C.

As separações cromatográficas foram realizadas no Laboratório de Veneno e Toxinas Animais (LVTA) do Departamento de Biologia da UFMG.

5.3.2.4. MALDI-TOF-MS/MS

A identificação das proteínas foi realizada em MALDI-TOF-MS/MS Autoflex III (Bruker Daltonics, Alemanha), controlado pelo programa FlexControl 3.0.

Para as análises de MALDI-TOF-MS/MS as amostras (0,5 µL) obtidas após digestão trípica foram misturadas com uma solução saturada de matriz (ácido α-ciano-4-hidroxinâmico) (1:1) em uma placa de amostras (MTP Anchor Chip 600/384). A incidência de pulsos de laser de nitrogênio (337 nm) sobre as amostras permitiu a dessorção dos íons, os quais foram direcionados ao analisador de massas (TOF). O aparelho foi calibrado com padrões externos (Peptide Calibration Standard II, Bruker Daltonics, Alemanha).

Ambos os espectros MS e MS/MS foram obtidos em modo positivo/refletido e a identificação dos espectros e correlação de possíveis similaridades com proteínas presentes em banco de dados foi realizada automaticamente pelo programa Mascot.

Quando necessário, as amostras foram secas ou concentradas em SpeedVac (Thermo Scientific, USA) e aquecidas em banho-maria digital modelo EVLAB:015-DTP (Londrina PR, Brasil).

As identificações proteicas foram realizadas no Laboratório de Veneno e Toxinas Animais (LVTA) do Departamento de Biologia da UFMG.

5.3.3. Procedimento de extração 2: Amostra de Trigo

5.3.3.1. Extração das Frações Proteicas

A amostra de trigo foi submetida ao procedimento de extração 2 (item 3.3.2.4) e as frações proteicas foram analisadas por 1D SDS-PAGE, em triplicata. As bandas proteicas foram recortadas e conduzidas a um procedimento de digestão trípica em gel de poliacrilamida (uma repetição da separação proteica) e analisadas por MALDI-TOF-MS/MS. Parte destas bandas recortadas (duas repetições) foi digerida em meio ácido e os elementos Cu, Fe, Mn e Zn determinados por GF AAS.

As frações de trigo (NaOH, HCl, Tris, SDS e H₂O) obtidas após aplicação do procedimento 2, foram conduzidas à digestão proteica em solução e as proteínas identificadas por MALDI-TOF-MS/MS.

5.3.3.2. Determinação dos Metais nas Bandas Proteicas

Após o escaneamento dos géis 1D SDS-PAGE, foi possível estimar o peso molecular de cada banda proteica comparando-as, visualmente, ao padrão de proteínas (3.5-200 kDa). As bandas de interesse foram recortadas, secas à temperatura ambiente, pesadas diretamente em vials (HPLC) e submetidas a digestão ácida. Este procedimento também foi realizado para o branco do gel (cinco repetições do branco). Adicionou-se 0,5 mL de ácido nítrico concentrado e mantiveram-se os frascos em placa aquecedora (temperatura ± 80 °C) por 4 horas. Após a digestão ácida foi adicionado 1,5 mL de água deionizada e as amostras analisadas por GF AAS para determinação de Cu, Fe, Mn e Zn.

5.3.3.3. Identificação de Proteínas nas Bandas Proteicas

As bandas proteicas de interesse foram recortadas do gel, transferidas para um frasco eppendorf (1 mL) e submetidas a um procedimento de digestão trípica em gel de poliacrilamida [8]. Adicionou-se 350,0 μ L de água e manteve-se por 5 min. A água foi removida e acrescentou-se 190,0 μ L de acetonitrila por 20 min. Após remoção da acetonitrila, as bandas do gel foram secas em SpeedVac por 15 min e as proteínas foram reduzidas com 100,0 μ L de solução de ditioneitol (DTT) 65,0 mmol L⁻¹ (30 min, 56 °C). Após remoção da solução de DTT, as proteínas foram alquiladas com 100,0 μ L de solução de iodoacetamida 200,0 mmol L⁻¹ (30 min, temperatura ambiente) e esta solução também foi descartada.

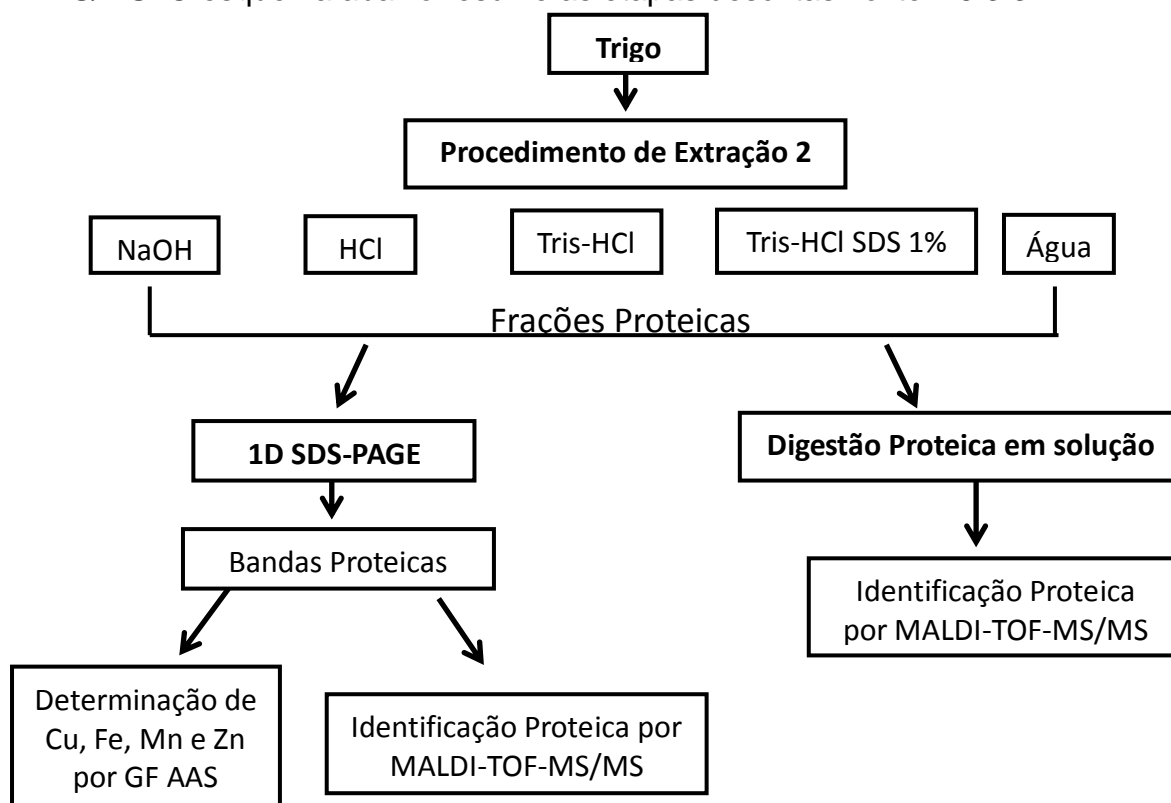
As bandas proteicas foram lavadas com 200,0 μ L da solução de NH₄HCO₃ 100,0 mmol L⁻¹ por 10 min. A solução de bicarbonato de amônio foi removida e adicionou-se 200,0 μ L acetonitrila para desidratação do gel. Este procedimento foi repetido duas vezes. A acetonitrila foi removida e o gel foi seco no SpeedVac por 15 min. Finalmente, 15,0 μ L de solução diluída de tripsina foi adicionada e a amostra mantida em gelo por 60 min. Após remoção da tripsina, a amostra foi incubada em banho-maria por 58 °C por 30 min. A reação foi interrompida com adição de 1,0 μ L de solução de ácido fórmico 5% (v/v). Após tripsinólise, os peptídeos foram purificados, concentrados e

dessalinizados em coluna Zip-Tip (Eppendorf). As amostras foram analisadas por MALDI-TOF-MS/MS para identificação proteica.

5.3.3.4. Identificação de Proteínas nas Frações de Trigo

As frações de trigo (NaOH, HCl, Tris, SDS e H₂O) obtidas após aplicação do procedimento 2, foram submetidas a um procedimento de digestão proteica em solução, seguindo o protocolo adaptado de Kinter & Sherman [9].

Cada fração contendo 100 µg de proteína foi dissolvida em 20,0 µL de solução composta por NH₄HCO₃ 0,4 mol L⁻¹, uréia 8,0 mol L⁻¹ e tiouréia 2,0 mol L⁻¹. Em seguida, 5,0 µL de solução 45,0 mmol L⁻¹ de ditiotretol (DTT) foi adicionado e as amostras incubadas por 15 min a 50 °C em banho-maria. Após resfriamento, 5,0 µL de solução 100,0 mmol L⁻¹ de iodoacetamida foi adicionada e as amostras mantidas durante 15 min à temperatura ambiente. Em seguida, 130 µL de água deionizada foi acrescentado com posterior adição de solução de tripsina diluída e as amostras foram mantidas em banho-maria 37 °C durante a noite. Após tripsinólise, os peptídeos foram purificados, concentrados e dessalinizados em coluna Zip-Tip para análise por MALDI-TOF-MS/MS. O esquema abaixo resume as etapas descritas no item 5.3.3.



5.3.4. Procedimento de extração 3: Amostras de Aveia, Linhaça, Trigo e Soja

5.3.4.1. Extração da Fração Proteica

As amostras de aveia, linhaça, trigo e soja foram submetidas ao procedimento de extração 3 (item 3.3.2.4) e as frações proteicas foram analisadas por 1D SDS-PAGE, em triplicata. As bandas proteicas foram recortadas e conduzidas a um procedimento de digestão trípica em gel de poliacrilamida e analisadas por MALDI-TOF-MS/MS. Parte destas bandas recortadas (duas repetições) foi digerida em meio ácido e os elementos Cu, Fe, Mn e Zn determinados por GF AAS.

As frações proteicas da amostra de aveia, linhaça, trigo e soja obtidas após aplicação do procedimento de extração 3 também foram submetidas à análise por RP-HPLC-UV (em triplicata). As frações de proteínas recolhidas foram submetidas à digestão proteica em solução (uma repetição) e as proteínas identificadas por MALDI-TOF-MS/MS. Parte destas frações (duas repetições) foram analisadas por GF AAS para determinação de Cu, Fe, Mn e Zn.

5.3.4.2. Determinação dos Metais nas Bandas Proteicas

As bandas proteicas selecionadas após separação por 1D SDS-PAGE para as amostras de aveia, linhaça, trigo e soja foram submetidas ao procedimento de digestão ácida, conforme descrito no item 5.3.3.2 e analisadas por GF AAS para determinação de Cu, Fe, Mn e Zn.

5.3.4.3. Identificação de Proteínas nas Bandas Proteicas

As bandas proteicas selecionadas também foram submetidas à digestão trípica em gel de poliacrilamida, seguindo um protocolo adaptado de Havlis et al. [8], que segue descrito no item 5.3.3.3. Posteriormente, as amostras foram analisadas por MALDI-TOF-MS/MS e as proteínas identificadas.

5.3.4.4. Determinação dos Metais nas Frações obtidas após separação por RP-HPLC-UV

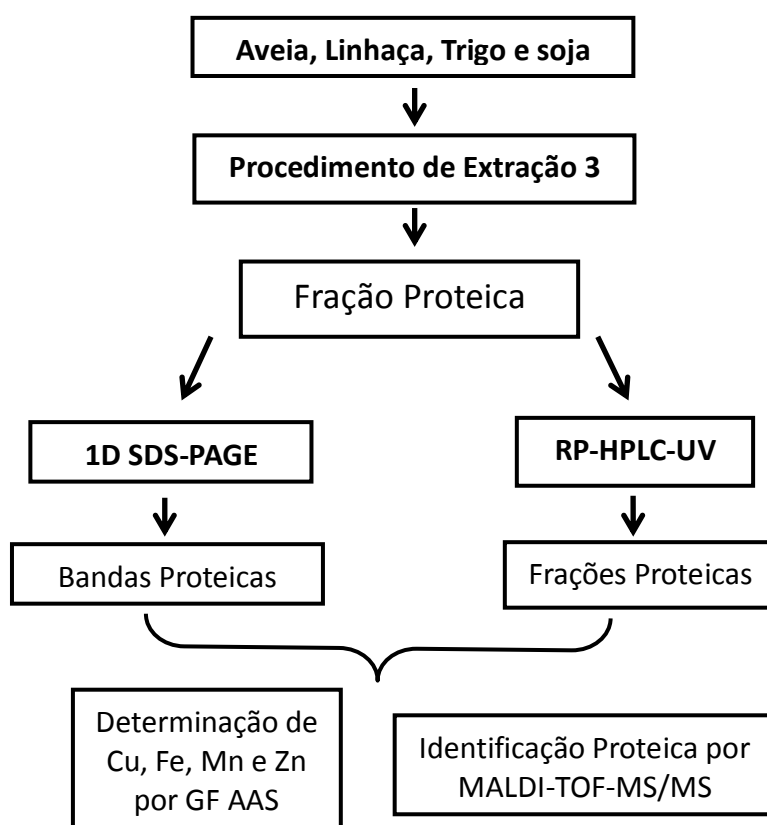
Após separação proteica por RP-HPLC-UV, as frações da aveia, linhaça, trigo e soja recolhidas, foram concentradas em SpeedVac para um volume de 0,5 mL e analisadas por GF AAS para determinação de Cu, Fe, Mn e Zn. O mesmo procedimento foi feito para o branco da amostra (três repetições).

5.3.4.5. Identificação das Proteínas nas Frações obtidas após separação por RP-HPLC-UV

As frações proteicas da aveia, linhaça, trigo e soja obtidas após aplicação do procedimento 3, foram analisadas por RP-HPLC-UV e as frações de proteínas recolhidas foram submetidas a digestão proteica em solução [9,10].

Para este fim, as frações contendo as proteínas, foram concentradas em SpeedVac até um volume de aproximadamente 10,0 μL . Em seguida, adicionou-se 140,0 μL de solução contendo NH_4HCO_3 0,2 mol L^{-1} , uréia 6,0 mol L^{-1} e tiouréia 2,0 mol L^{-1} . Foram recolhidas 18 μL de cada amostra e transferidas para um eppendorf (1,0 mL). Posteriormente, adicionou-se a estas amostras 5,0 μL de solução 45,0 mmol L^{-1} de ditioneína (DTT), mantendo-as a temperatura ambiente por 3 horas. Acrescentou-se, 5,0 μL de solução 100,0 mmol L^{-1} de iodoacetamida (30 min a 25 °C). A cada amostra adicionou-se 140 μL de água deionizada. Finalmente, acrescentou-se 70,0 μL solução de tripsina diluída e as amostras foram mantidas em banho-maria 37 °C durante a noite. Após tripsinólise, os peptídeos foram purificados, concentrados e dessalinizados em coluna Zip-Tip e analisados por MALDI-TOF-MS/MS.

O esquema abaixo resume as etapas descritas no item 5.3.4.



A tabela 34 apresenta a função dos principais reagentes utilizados durante a digestão proteica em gel e em solução.

Tabela 34. Reagentes utilizados durante a digestão proteica.

REAGENTES	FUNÇÃO
SDS	Agente desnaturante, fornece carga às proteínas
Uréia	Agente desnaturante
Tiouréia	Agente desnaturante
Ditiotreitol (DTT)	Agente redutor (romper pontes dissulfeto)
Iodoacetamida	Alquilar a proteína

5.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no estudo dos metais associados às proteínas serão apresentados para a amostra de trigo submetida ao procedimento de extração 2 e para as amostras de aveia, linhaça, trigo e soja submetidas ao procedimento de extração 3.

5.4.1. Procedimento de Extração 2: Amostra de Trigo

5.4.1.1. Determinação dos Metais nas Bandas Proteicas

As frações recolhidas da amostra de trigo após procedimento de extração 2 foram analisadas por 1D SDS-PAGE. A Figura 16 mostra o gel obtido após separação proteica.

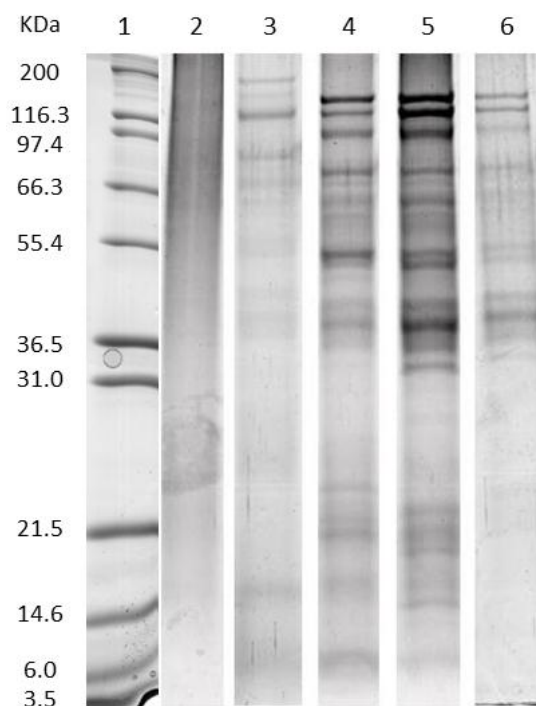


Figura 16. Eletroforese em gel das frações da amostra de trigo obtidas após procedimento de extração 2 com: (1) padrão de proteína; (2) NaOH; (3) HCl; (4) Tris-HCl; (5) Tris-HCl contendo SDS; (6) H₂O.

A separação por 1D SDS-PAGE ilustra o perfil proteico global da amostra, indicando a sua complexidade. Pela Figura 16, verifica-se que o trigo

é rico em proteínas, as quais possuem peso molecular entre 6 a 200 kDa. As frações proteicas extraídas com solução tampão Tris-HCl e solução Tris-HCl com 1% SDS apresentaram a maior quantidade dessas proteínas, enquanto que as proteínas extraídas com solução de NaOH 0,05 mol L⁻¹ foram degradadas, conforme indicado na canaleta 2. Borghet et al. [11] relatam que a solução de NaOH foi eficiente para extração de proteínas em amostras de arroz, porém, causou a sua degradação.

Os resultados para a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn nas bandas da fração HCl, Tris-HCl, Tris-HCl com SDS 1% e H₂O estão descritos na Tabela 35.

Tabela 35. Determinação de Cu, Mn e Zn, por GF AAS, nas bandas proteicas da amostra de trigo submetida ao procedimento de extração 2.

*kDa	Frações			
	HCl	Tris-HCl	Tris-HCl Com SDS 1%	H ₂ O
14.4		Mn		
21.5	Cu, Mn, Zn			
32.5	Mn, Zn			
40.0		Mn		
50.0		Mn	Mn	Mn
55.4		Mn	Cu	
66.3	Cu, Mn, Zn	Cu, Mn, Zn	Mn	
97.4				Cu, Mn
100				Mn, Zn

*kDa = peso molecular (kDa) estimados para as proteínas da banda do gel a partir de uma amostra padrão (Figura 16).

Não foi possível quantificar Fe nas amostras, devido ao elevado valor de absorbância dos brancos. Apesar disto, elevados teores de Fe foram encontrados nas frações extraídas do trigo (Tabela 24), o que sugere sua ligação às proteínas.

De acordo com os dados da Tabela 35, observou-se a presença de Cu, Mn e Zn em proteínas com peso molecular entre 14.4 e 100 kDa, aproximadamente. Os resultados estão descritos de forma qualitativa, pois as

determinações de Cu, Mn e Zn apresentaram desvios padrão elevados, possivelmente, devido à variação da concentração de cada elemento em diferentes pontos do gel. De modo geral, a concentração de Cu, Mn e Zn nas bandas proteicas variaram entre 0,032-5,5; 0,67-4,7 e 1,7-14 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente.

Verificou-se ainda que, Cu e Zn foram identificados em 36% das bandas proteicas de trigo. Já o elemento Mn está associado a 93% das proteínas, indicando que esta matriz contém em maior quantidade metaloproteínas que apresente átomos de manganês.

O grão de trigo apresenta em sua composição proteínas que possuem metais ligados à sua estrutura [12-14]. Estudos recentes destacam a presença de metalotioneínas, ricas em cisteínas, o que permite sua ligação com elementos, como Cu(II) e Zn(II) [15,16]. As metalotioneínas podem sequestrar íons metálicos, diminuindo a sua atividade no organismo [17].

5.4.1.2. Identificação de Proteínas nas Bandas Proteicas

As bandas proteicas foram recortadas (Figura 16), submetidas a um procedimento de digestão trípica em gel de poliacrilamida e analisadas por MALDI-TOF-MS/MS. Não foi possível identificar as proteínas presentes na amostra de trigo.

Possivelmente, o procedimento de redução, alquilação ou tripsinólise proteica não ocorreu de forma eficiente e os peptídeos formados não apresentaram similaridade com as proteínas presentes no banco de dados.

5.4.1.3. Identificação de Proteínas nas Frações de Trigo

As frações de trigo (NaOH, HCl, Tris, SDS e H₂O) obtidas após aplicação do procedimento 2, foram conduzidas à um procedimento de digestão proteica em solução e posteriormente analisadas por MALDI-TOF-MS/MS.

Duas proteínas foram identificadas nas frações extraídas com solução tampão Tris-HCl. Não foi possível a identificação proteica nas outras frações.

As proteínas identificadas foram *lipid transfer* e *grain softness*. A proteína *lipid transfer* (LTP) possui peso molecular igual a 10057 Da e ponto isoelétrico

8,20. De acordo com Guerbette et al. [18], as LTPs são solúveis, relativamente pequenas, contendo de 91 a 95 resíduos de aminoácidos e seu ponto isoelétrico é básico. Esta proteína possui oito resíduos de cisteínas localizados em posições reservadas, formando quatro pontes dissulfetos [18-20].

A presença das LTPs possibilita a regulação do catabolismo de lipídeos e sua transferência entre membranas. Estas proteínas possuem atividade no crescimento e desenvolvimento das plantas, incluindo embriogênese e germinação [21, 22]. Além disso, as LTPs possuem propriedade alergênica capaz de induzir a IgE específica (imunoglobulina E), sendo responsável por mais de 90% das alergias alimentares, que podem ocorrer em amendoim, nozes, leite, ovos, crustáceos, soja e peixes [21].

Segundo Gorjanović et al. [23], a proteína *lipid transfer* mostra elevada afinidade por íons metálicos, como Cu(II), Zn(II), Pb(II), Cd(II), Hg(II) e Ni(II). Isto instigou os autores a estudar a função desta proteína como protetora de plantas, não só para patógenos, mas também contra a exposição aos elementos tóxicos. Verificando que o elemento Pb liga-se mais fortemente à esta proteína.

A proteína *grain softness* possui peso molecular igual a 15608 Da, ponto isoelétrico 8,07 e várias cisteínas [24]. Elas estão geralmente presentes nas sementes de diversas plantas, desempenhando uma função importante na sua defesa natural.

As cisteínas possuem alta afinidade por elementos metálicos, como Cd²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺ e Cu⁺, portanto, quando proteínas apresentam cisteínas, supõe-se que estes elementos estejam ligados à sua estrutura [25,26].

De acordo com os resultados da Tabela 34, o elemento Mn pode estar presente na estrutura da proteína de aproximadamente 14.4 kDa, extraída com solução tampão Tris-HCl. Como a proteína *grain softness* identificada possui peso molecular igual a 15 kDa, sugere-se que esta proteína pode conter átomos de Mn em sua composição.

5.4.2. Procedimento de extração 3: Amostra de Aveia, Linhaça, Trigo e Soja

5.4.2.1. Determinação dos Metais nas Bandas Proteicas

As amostras de aveia, linhaça, trigo e soja foram submetidas ao procedimento de extração 3 e as frações obtidas foram analisadas por 1D SDS-PAGE. A Figura 17 mostra o gel obtido após separação proteica.

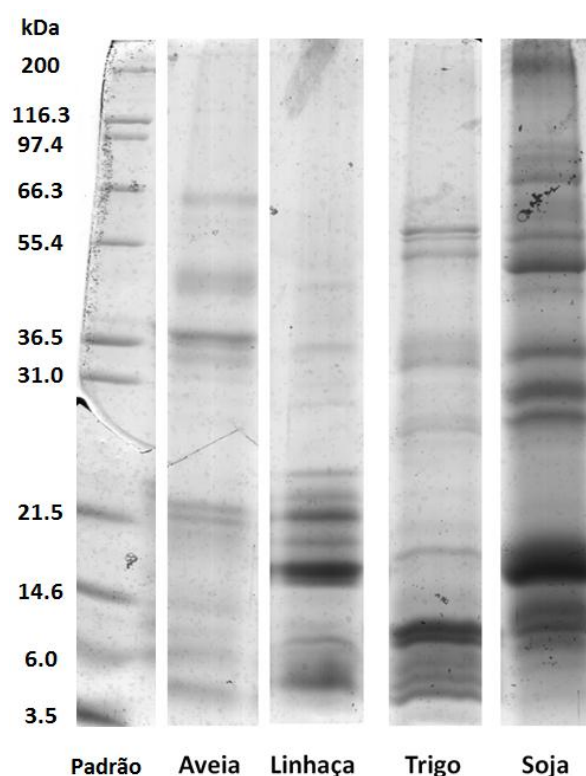


Figura 17. Eletroforese em gel para a amostra padrão e fração das amostras de aveia, linhaça, trigo e soja obtidas após procedimento de extração 3.

Pela análise da Figura 17, verifica-se que as amostras de aveia, linhaça, trigo e soja possuem várias proteínas em sua estrutura. Foi possível comprovar que a soja possui maior quantidade de proteína, comparada às outras amostras, além de conter proteínas com uma faixa de peso molecular ampla (6.0 – 200 kDa). Krishmnan & Natarajan [27] também mostraram em seu estudo um perfil proteico complexo para a amostra de soja. Vale destacar que

a fração proteica utilizando solução tampão Tris-HCl extrai preferencialmente proteínas solúveis em água, como já descrito.

As determinações de Cu, Fe, Mn e Zn nas bandas proteicas da aveia, linhaça, trigo e soja foram realizadas por GF AAS e os resultados estão apresentados nas Tabelas 36-39.

Tabela 36. Concentração de Cu, Fe, Mn e Zn, em $\mu\text{g g}^{-1}$, nas bandas proteicas da amostra de aveia submetidas ao procedimento de extração 3.

*kDa	Aveia			
	Cu	Fe	Mn	Zn
6.0	5,09			
22.0			0,488	
30.0	30,9			
33.0	1,19			
61.5			1,10	
66.3	26,8	12,5	11,1	27,9

*kDa = peso molecular (kDa) estimados para as proteínas da banda do gel a partir de uma amostra padrão (Figura 17).

Tabela 37. Concentração de Cu, Fe, Mn e Zn, em $\mu\text{g g}^{-1}$, nas bandas proteicas da amostra de linhaça submetidas ao procedimento de extração 3.

*kDa	Linhaça			
	Cu	Fe	Mn	Zn
20.5	27,7		6,95	
24.5	1,81		3,34	
25.5	1,93		2,11	
30.5	33,6	12,0	9,98	9,98
36.5	29,1	16,4	13,3	14,7

*kDa = peso molecular (kDa) estimados para as proteínas da banda do gel a partir de uma amostra padrão (Figura 17).

Tabela 38. Concentração de Cu, Fe, Mn e Zn, em $\mu\text{g g}^{-1}$, nas bandas proteicas da amostra de trigo submetidas ao procedimento de extração 3.

*kDa	Trigo			
	Cu	Fe	Mn	Zn
6.0			1,19	
10.0	11,2		7,07	
16.0	8,56			
18.5			2,94	
21.5			0,338	
23.5	0,426		3,05	9,16
28.5		6,23	3,21	18,2
29.5	0,390	40,1	4,75	13,8
32.5	1,57		5,41	7,90
36.5		3,55		
54.5		15,8	6,34	
58.0	0,794	38,8	1,32	
60.0	1,04		4,12	3,30
61.5				
62.0		39,6	0,637	16,0

*kDa = peso molecular (kDa) estimados para as proteínas da banda do gel a partir de uma amostra padrão (Figura 17).

Tabela 39. Concentração de Cu, Fe, Mn e Zn, em $\mu\text{g g}^{-1}$, nas bandas proteicas da amostra de soja submetidas ao procedimento de extração 3.

*kDa	Soja			
	Cu	Fe	Mn	Zn
16.0	17,2		6,62	
29.5	47,2		14,2	
30.0			3,21	13,2
32.0	1,40		5,52	13,3
37.5	13,4		6,85	
50.0	5,10		7,43	
60.0	10,2		7,82	
75.0	10,6	10,9	5,74	7,58
85.0			2,86	
96.0	58,6	45,1	16,2	11,7

*kDa = peso molecular (kDa) estimados para as proteínas da banda do gel a partir de uma amostra padrão (Figura 17).

Novamente desvios padrão elevados foram obtidos na determinação dos metais contidos nas bandas proteicas (para algumas amostras), optando-se por apresentar nas Tabelas 36-39 a concentração aproximada de Cu, Fe, Mn e Zn

nestas bandas. De modo geral, a concentração de Cu, Fe, Mn e Zn nas bandas proteicas das amostras estudadas variaram de: 0,39-59; 3,6-45; 0,34-16 e 3,3-18 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente.

Os dados das Tabelas 36-39 mostram a presença de Cu, Fe, Mn e Zn em várias proteínas das amostras de aveia, linhaça, trigo e soja. Verificou-se que o Mn é o elemento mais abundante, seguido pelo Cu, indicando a presença de Mn como elemento majoritário na estrutura das metaloproteínas.

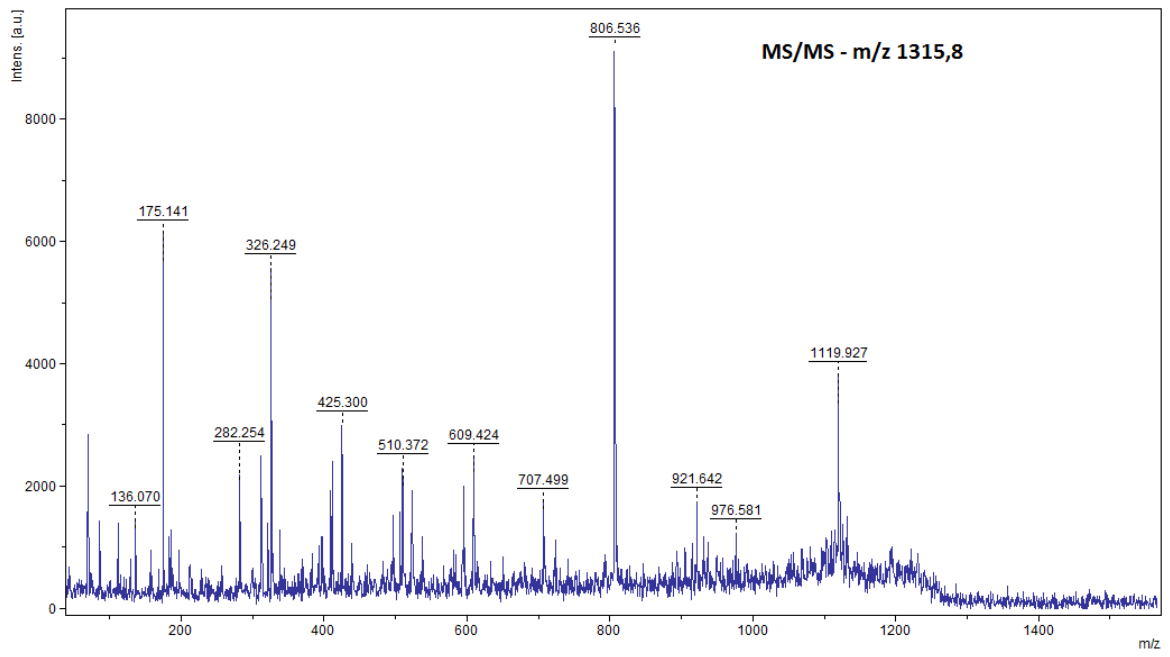
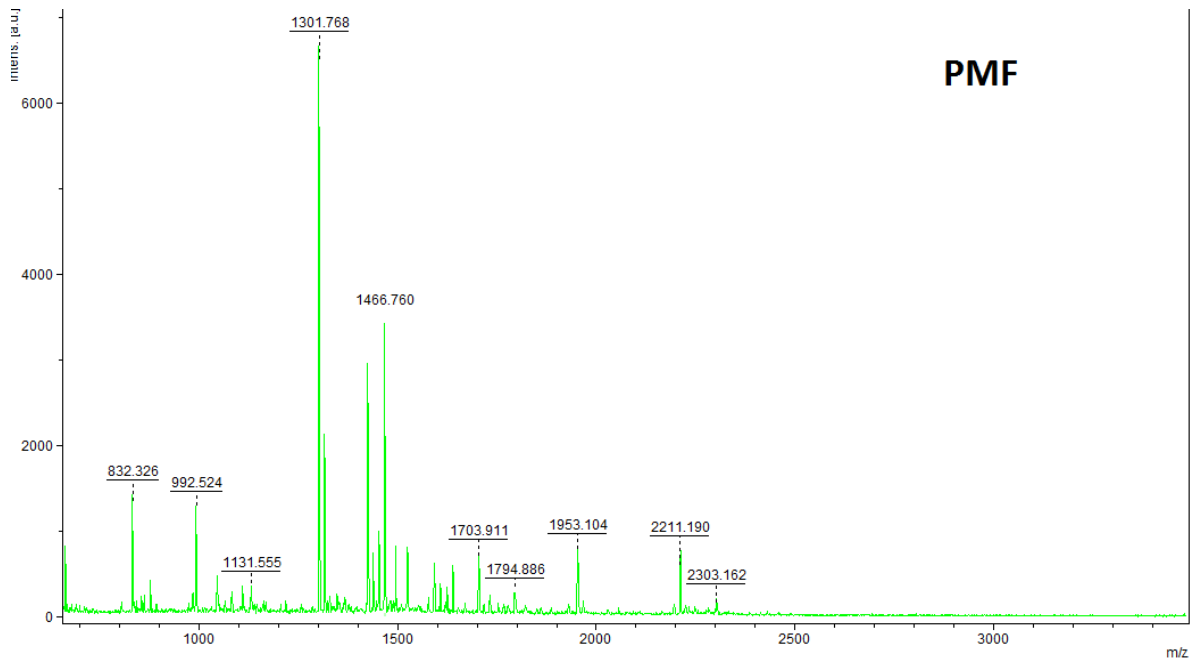
Apesar da amostra de soja apresentar um perfil proteico mais complexo, quando comparado ao trigo, este último apresentou maior presença de Cu, Fe, Mn e Zn, sugerindo que esta amostra apresenta maior quantidade de metaloproteínas.

As proteínas de 66.3 kDa da aveia, 30.5 e 36.5 kDa da linhaça, 29.5 kDa do trigo e 75.0 e 96.0 kDa da soja possuem os quatro elementos estudados em sua estrutura. Isto sugere que mais de uma proteína pode estar presente na banda proteica analisada.

De acordo com os resultados apresentados no item 5.4.1.3 a proteína *grain softness* (15 kDa) de trigo, identificada na fração extraída com Tris-HCl (Procedimento de extração sequencial 2), pode conter o elemento Mn em sua estrutura. Porém, na Tabela 38 não foi possível a identificação do Mn na banda proteica de 16 kDa da amostra de trigo (procedimento de extração 3). A amostra de trigo foi submetida a diferentes procedimentos de extração das frações proteicas e, conseqüentemente, a banda de 14-15 kDa não foi visualizada no gel da Figura 17.

5.4.2.2. Identificação de Proteínas nas Bandas Proteicas

As bandas proteicas obtidas após análise por 1D SDS-PAGE foram submetidas ao procedimento de digestão e identificadas por MALDI-TOF-MS/MS. Para exemplificar os espectros gerados, em seguida é apresentado um espectro PMF e dois espectros MS/MS, obtidos manualmente para a banda proteica da amostra de aveia (± 24 kDa).



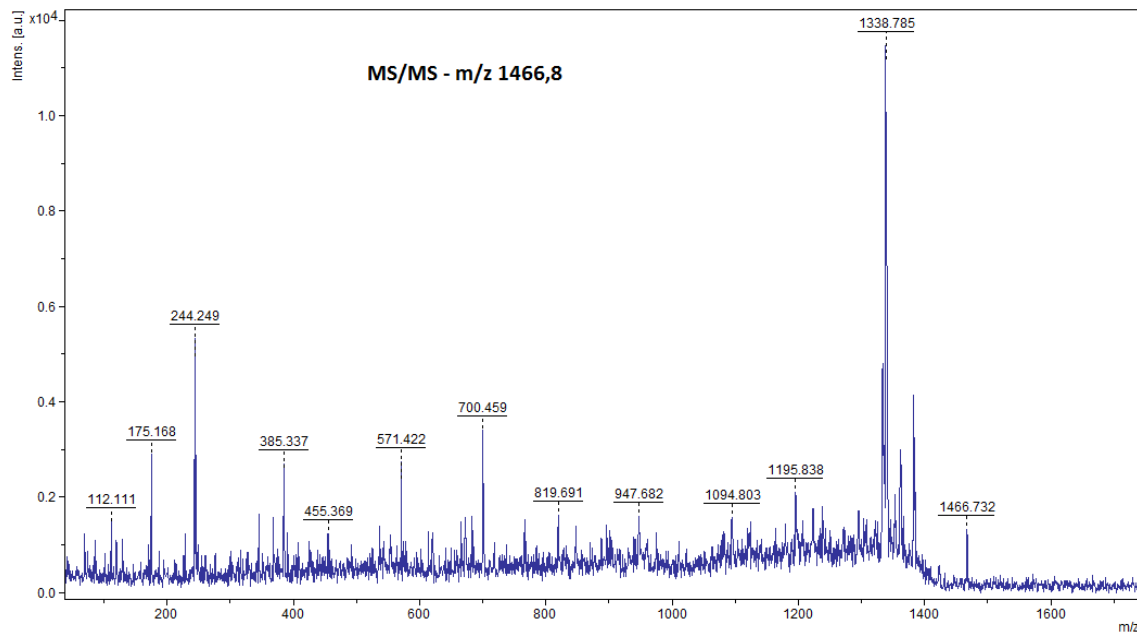


Figura 18. Espectro PMF e dois espectros de MS/MS obtido para banda proteica da amostra de aveia (± 24.0 kDa).

A relação m/z e a intensidade dos picos obtidos pelo espectro de PMF, assim como as razões m/z e intensidades dos picos referentes a cada um dos espectros MS/MS foram identificados pelo software Mascot.

A Tabela 40 apresenta as proteínas identificadas nas bandas proteicas da amostra de aveia e soja, assim como os metais determinados nestas mesmas bandas, os scores obtidos pelo programa Mascot, o peso molecular e ponto isoelétrico. Para identificação proteica foi realizada pesquisas no banco de dados MSDB.

Tabela 40. Proteínas identificadas nas bandas proteicas da amostra de aveia e soja.

	*KDa	Proteína Identificada	Metais Ligados	Score Mascot	Score Proteína	MW (Da)	pI
Aveia	24.0	11S globulin (precursor)	---	53	48	61824	9.14
	24.0	12S seed storage globulin (precursor)	---	53	37	58477	8.78
	22.0	12s globulin (precursor)	Mn	53	74	53395	9.36
Soja	29.5	SOYSBG7S	Cu, Mn	53	24	46363	8.68
	56.2	β -amylase (EC 3.2.1.2) (1,4- α -D-glucan-maltohydrolase)	---	53	54	56107	5.40
	56.2	trypsin (EC 3.4.21.4) (precursor)	---	53	156	24394	7.00
	85.0	β -conglycinin α -subunit	Mn	53	56	70250	5.07

*kDa estimados para as proteínas da banda do gel

Algumas proteínas contidas no gel, principalmente referentes à amostra de linhaça e trigo não foram identificadas ou tiveram identificação sem valor estatístico. Isto pode ter ocorrido devido à baixa concentração de proteínas nas bandas proteicas, incorreta ionização dos peptídeos e a ausência da proteína no banco de dados utilizado.

Na Tabela 40, verifica-se que o peso molecular estimado a partir da amostra padrão foi diferente do peso molecular encontrado para a proteína identificada (Tabela - MW). Esta diferença nos resultados também foi relatada por Kobayashi & de Castro, que justificam esta variação devido a alguns erros que ocorrem durante o processo eletroforético [28, 29], tais como: formação do gel, migração das partículas, potencial aplicado, dentre outros.

O valor score indica se uma determinada proteína apresenta homologia com proteínas de um banco de dados. Se o valor para a proteína for menor que o gerado pelo Mascot, isto indica que o evento é randômico. Porém, se o score atribuído a uma determinada proteína exceder o valor limite a chance da identificação gerada ser um evento randômico é de apenas 5% [30].

Desta maneira, de acordo com os dados da Tabela 40, observa-se que três proteínas foram identificadas sem valor estatístico. Porém, como elas foram classificadas como sendo originárias da aveia e soja, acredita-se na veracidade deste resultado. Ainda, foi possível verificar que os pesos moleculares variaram de 53-62 e 24-70 kDa para as amostras de aveia e soja, respectivamente. O pI das proteínas identificadas nestas matrizes variaram de 5.4-9.4.

Como comentado no item 5.4.2.1, a identificação de alguns elementos metálicos em uma banda proteica específica, indica que esta banda pode possuir mais de uma proteína. O que foi confirmado pelos resultados apresentados na Tabela 40 (aveia 24 kDa e soja 56.2 kDa).

A proteína *12S globulin (precursor)* identificada na banda proteica da aveia (22.0 kDa) pode apresentar Mn em sua composição (Tabela 40). As proteínas *11S* e *12S globulin (precursor)* são proteínas de armazenamento, isto é, reserva de nutrientes para planta. As globulinas da aveia são uma mistura de diferentes proteínas, identificadas e separadas como 12S (o componente principal) e frações 7S e 3S [31]. Estima-se que a proteína 12S da aveia apresenta peso molecular de 54-60 kDa, confirmado pelos dados apresentados na Tabela 40. A proteína *11S globulin (precursor)* pode apresentar magnésio ligado à sua estrutura [32]. Robert et al. [33] também relataram a presença das proteínas globulinas em amostras de aveia.

A proteína *SOYSBG7S* identificada na banda proteica da soja (29.5 kDa) apresenta Cu e Mn em sua composição (Tabela 40), sugerindo a presença desses metais ligados à sua estrutura. Esta proteína provavelmente corresponde as frações 7S das globulinas, as quais representam as principais proteínas de reserva da soja. As globulinas de leguminosas têm sido relatadas entre os alergênicos alimentares mais relevantes encontrados em plantas. A

fração 7S das proteínas da soja compreende aproximadamente 35% das proteínas solúveis [29].

A *β -amylase (EC 3.2.1.2)* é uma enzima com função no metabolismo do amido de tecidos vegetais em sementes, pode evoluir para uma proteína de armazenamento. Podem estimular os macrófagos, sendo potencialmente útil contra as células cancerígenas [34].

A *trypsin (EC 3.4.21.4) (precursor)* tem atividade contra alguns substratos sintéticos, sendo que a forma de cadeia simples é a mais ativa. Possui interação seletiva e não-covalente com alguns íons metálicos, como o Ca^{2+} [35].

A *β -conglycinin α -subunit* de soja possui Mn em sua constituição, podendo estar ligado à sua estrutura proteica. É uma proteína de armazenamento, isto é, ela é acumulada durante o desenvolvimento da semente e hidrolisada após germinação, sendo uma fonte de carbono e nitrogênio, necessários ao crescimento da planta. Brandão et al. [36] também identificaram esta proteína em soja.

Vale ressaltar que as proteínas classificadas como precursoras consistem em proteínas inativas, que podem tornar-se ativas ao passarem por uma mudança pós-traducional. Elas geralmente são utilizadas por um organismo quando a proteína subsequente é potencialmente prejudicial [37].

Vale ressaltar que, a solução tampão Tris-HCl (procedimento de extração 3) é considerada um meio não desnaturante, o que favorece a permanência do metal ligado à proteína e, segundo os resultados, permitiu a identificação de várias proteínas, o que não ocorreu quando o procedimento de extração 2 foi empregado para a amostra de trigo (item 5.4.1.2).

5.4.2.3. Determinação dos Metais nas Frações obtidas após separação por RP-HPLC-UV

As frações proteicas da amostra de aveia, linhaça, trigo e soja obtidas após aplicação do procedimento de extração 3 foram submetidas à análise por RP-HPLC-UV. Os cromatogramas obtidos encontram-se nas Figuras 19-22.



Figura 19. RP-HPLC-UV: Separação da fração proteína da amostra de aveia submetida ao procedimento de extração 3.

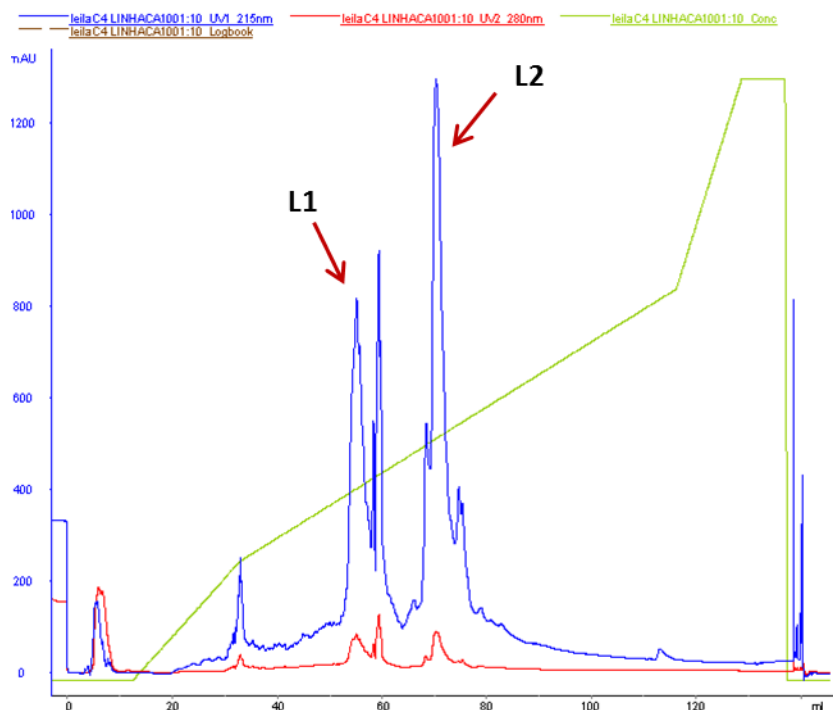


Figura 20. RP-HPLC-UV: Separação da fração proteína da amostra de linhaça submetida ao procedimento de extração 3.

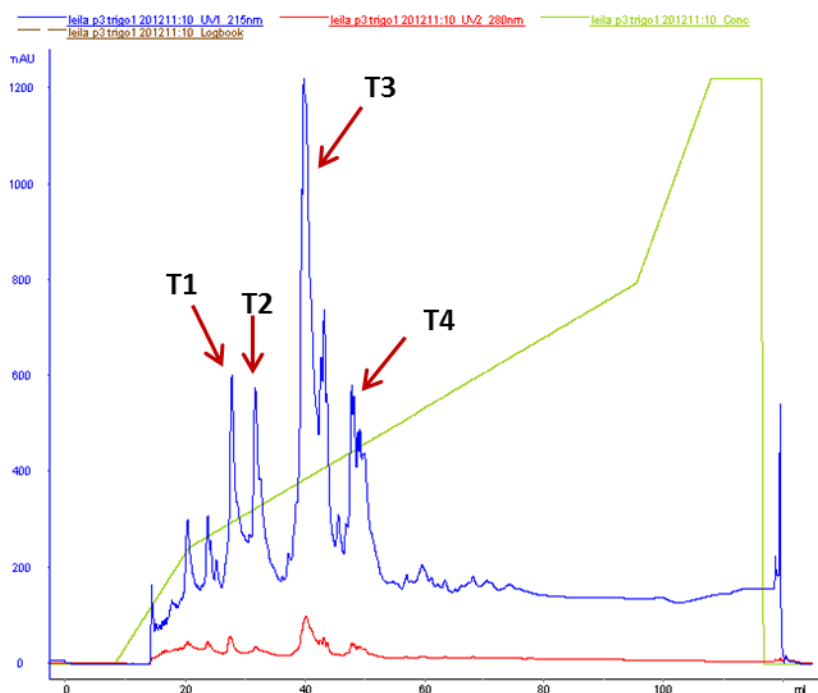


Figura 21. RP-HPLC-UV: Separação da fração proteína da amostra de trigo submetida ao procedimento de extração 3.

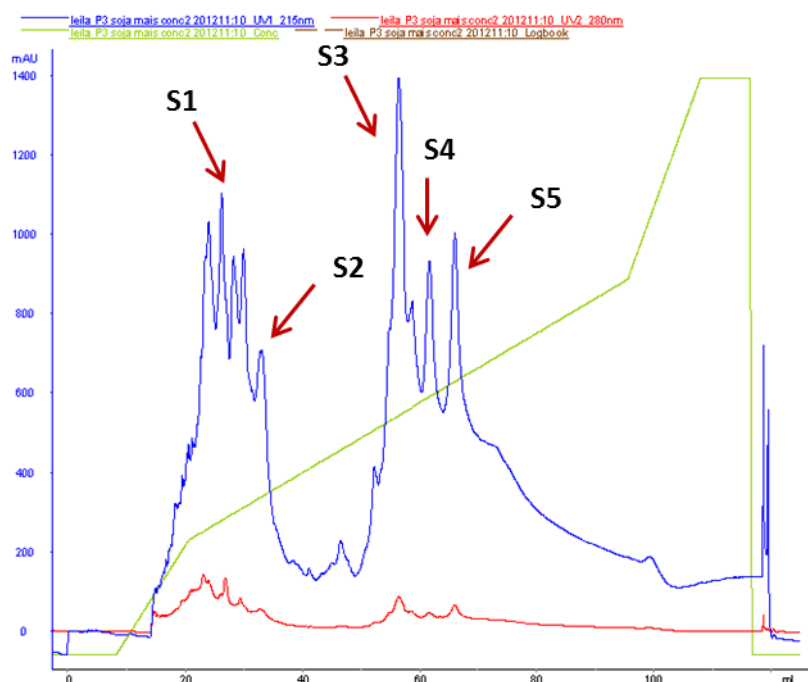


Figura 22. RP-HPLC-UV: Separação da fração proteína da amostra de soja submetida ao procedimento de extração 3.

Como o detector utilizado foi o UV, foram selecionados para análise alguns picos correspondentes às ligações peptídicas, característico pelo

comprimento de onda próximo a 215 nm (picos marcados em azul). Os picos destacados em vermelho, com comprimento de onda de 280 nm, correspondem a anéis aromáticos.

Pelas Figuras 19-22, observam-se picos com melhor resolução e maior intensidade para as amostras de linhaça, trigo e soja, indicando maior quantidade de proteínas, fato comprovado pelos dados apresentados na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) e na Tabela Nutricional de Alimentos da USP [38, 39].

As frações proteicas coletadas após separação por RP-HPLC-UV foram concentradas (0,5 mL) e analisadas por GF AAS. A Tabela 41 apresenta os constituintes inorgânicos identificados nas frações da amostra de aveia, linhaça, trigo e soja.

Tabela 41. Determinação de Cu, Fe, Mn e Zn, por GF AAS, nas frações proteicas das amostras de aveia, linhaça, trigo e soja obtidas após análise por RP-HPLC-UV.

Proteínas	Aveia	Proteínas	Linhaça	Proteínas	Trigo	Proteínas	Soja
A1	Cu, Fe, Mn, Zn	L1	Zn	T1	Mn	S1	Cu, Mn
A2	Cu, Zn	L2	Cu, Zn	T2	Cu	S2	Cu
				T3	Cu, Fe, Mn, Zn	S3	Cu, Fe, Mn, Zn
				T4	Fe, Mn	S4	Zn
						S5	Cu, Mn, Zn

As frações A1-A2, L1-L2, T1-T4 e S1-S5 estão indicadas nos cromatogramas da aveia, linhaça, trigo e soja, respectivamente (Figuras 19-22).

De acordo com os resultados mostrados na Tabela 41, os metais foram determinados em cinco frações da amostra de soja, indicando uma maior quantidade de metaloproteínas nesta matriz, comparada à aveia, linhaça e trigo. Cobre e Zn foram os elementos mais abundantes nas frações analisadas, seguido do Mn. Isto demonstra que as proteínas das amostras avaliadas possivelmente possuem estes elementos ligados à sua estrutura.

Para a amostra de linhaça identificou-se apenas Cu e Zn nas frações *L1* e *L2*. Ferro e Mn não estão presentes ou a concentração destes elementos está abaixo do limite de quantificação da técnica.

A maioria das frações proteicas analisadas possuem 2 ou mais constituintes metálicos. Novamente, isto indica que cada fração pode apresentar mais de uma proteína.

5.4.2.4. Identificação das Proteínas nas Frações obtidas após separação por RP-HPLC-UV

As Tabelas 42-44 apresentam as proteínas identificadas nas frações proteicas das amostras de aveia, linhaça, trigo e soja obtidas após análise por RP-HPLC-UV; assim como o metal possivelmente ligado à proteína, os scores obtidos pelo programa Mascot, o peso molecular e o ponto isoelétrico. Para identificação proteica foi realizada pesquisas no banco de dados MSDB.

Tabela 42. Proteínas identificadas nas frações proteicas das amostras de aveia e linhaça, obtidas após análise por RP-HPLC-UV.

		Proteína Identificada	Metal Ligado	Score Mascot	Score Proteína	MW (Da)	pI
Aveia	A2	Glycinin chain A2B1a (precursor)	Cu, Zn	53	83	54299	5.46
	A2	Glycinin A1bB2-784	Cu, Zn	53	83	54264	5.73
Linhaça	L1	11S globulin seed storage protein	Zn	53	59	56636	6.69
	L2	Conlinin	Cu, Zn	53	105	19000	7.51

Tabela 43. Proteínas identificadas nas frações proteicas das amostras de trigo, obtidas após análise por RP-HPLC-UV.

		Proteína Identificada	Metal Ligado	Score Mascot	Score Proteína	MW (Da)	pI
Trigo	T2	trypsin (EC 3.4.21.4) (precursor)	Cu	52	136	24394	7.00
	T3	5a2 protein (Fragment)	Cu, Fe, Mn, Zn	54	47	10432	8.38
	*TR1	Nonspecific lipid-transfer protein 2G (LTP2G)	---	53	48	6974	8.21
	*TR2	α -amylase inhibitor 0.19	---	52	96	13328	7.21
	*TR3	α -amylase inhibitor, tetrameric, chain CM3 (precursor)	---	52	67	18209	7.44
	*TR4	globulin Beg1 (precursor)	---	53	54	72209	6.80

*TR1-TR4 = frações proteicas em que foi identificada apenas proteína.

Tabela 44. Proteínas identificadas nas frações proteicas das amostras de soja, obtidas após análise por RP-HPLC-UV.

	Proteína Identificada	Metal Ligado	Score Mascot	Score Proteína	MW (Da)	pI	
Soja	S1	β -conglycinin α -chain (precursor)	Cu, Mn	51	54	70250	5.07
	S1	Putative dehydrin (Fragment)	Cu, Mn	52	133	20383	5.87
	S2	Proteinase inhibitor (Bowman-Birk) D-II (precursor)	Cu	53	38	11488	4.93
	S2	β -conglycinin α -prime subunit	Cu	52	45	72184	5.47
	S2	Dehydrin	Cu	52	87	23720	5.97
	S2	Glycinin G5 (precursor)	Cu	53	64	57921	5.60
	S2	Glycinin A3B4 (G4) subunit	Cu	52	125	58152	5.55
	S2	glycinin chain A5A4B3 (precursor)	Cu	51	71	63082	5.29
	S2	Trypsin inhibitor A (Kunitz) (precursor)	Cu	51	58	23990	4.99
	S2	Glycinin chain A1aBx (precursor)	Cu	51	41	55472	5.89
	S3	Glycinin chain A1aBx (precursor)	Cu, Fe, Mn, Zn	52	30	55472	5.89
	S3	Trypsin inhibitor A (Kunitz) (precursor)	Cu, Fe, Mn, Zn	52	54	23990	4.99
	*Soj1	Glycinin	---	52	125	53548	5.29

*Soj1 = fração proteica em que foi identificada apenas proteína.

Como já observado no item 5.4.2.2, algumas proteínas foram identificadas, sem valor estatístico. Porém, estas proteínas foram classificadas, pelo programa Mascot, como sendo de origem da matriz avaliada, o que torna o resultado confiável.

De maneira geral, as proteínas identificadas nas amostras de aveia, linhaça, trigo e soja possuem peso molecular de: 54; 19-57; 7-72 e 11-72 kDa, respectivamente e pI entre 4.93 – 8.38.

Para a amostra de aveia, foi possível identificar apenas duas proteínas na fração proteica A2. Provavelmente, as outras frações obtidas continham baixa concentração de proteína, como indica a Figura 19.

Uma quantidade maior de proteínas foi identificada nas frações da amostra de soja, a qual possui elevado teor proteico, comparado às demais matrizes. Ainda para a amostra de soja, observa-se que em uma única fração proteica (S2) obtida após análise por RP-HPLC-UV identificou-se oito proteínas diferentes. Estes resultados mostram que as proteínas não foram eficientemente separadas nas condições cromatográficas utilizadas (Figura 22).

A associação dos constituintes inorgânicos às proteínas identificadas foi realizada após análise por GF AAS e MALDI-TOF-MS/MS de uma determinada fração coletada do HPLC (com repetições das análises cromatográficas).

Como exemplificação, as proteínas *Glycinin chain A2B1a (precursor)* e *Glycinin A1bB2-784* (Tabela 42 – Aveia), pertencem a um mesmo grupo proteico e possuem Cu e Zn em sua composição, podendo estar ligados às suas estruturas. Esta associação pode ser feita para as demais proteínas identificadas nas amostras estudadas.

Reafirmando, para a maioria das frações proteicas mais de um elemento foi identificado, sugerindo a presença de mais de uma proteína na mesma fração. Para as frações A2 (aveia) e S1 (soja) foram identificadas duas proteínas e dois íons metálicos. Vale ressaltar que estudos específicos devem ser realizados para verificar a quantidade de íons metálicos ligados às proteínas.

As duas principais proteínas de reserva de nutrientes em semente de soja são as β -conglycinin (7S globulin) e glycinin (11S globulin) [40]. Sussulini [37] identificou a proteína β -conglycinin α -chain (precursor) em amostra de soja e observou a presença de Fe nesta matriz, após análise por SR-XRF. Neste

estudo, verificou-se que a proteína *β -conglycinin α -chain (precursor)* também pode conter Cu e Mn ligado à sua estrutura (Tabela 44).

Sussulini [37] verificou a associação do Fe a proteína *glicinin G2* de soja. De acordo com os resultados da Tabela 44 as proteínas *glicinin G3*, *G4* e *G5* identificadas na amostra de soja possuem Cu em sua composição.

As estruturas tridimensionais das proteínas *glicinin G2 (precursor)* e *glicinin G4 (precursor)* ainda não foram estabelecidas. Assim sendo, a possibilidade destas proteínas possuírem íons metálicos, como Fe e Cu, pode ser um objeto de estudo [37].

De acordo com os dados da literatura, já são conhecidas algumas metaloproteínas das amostras de linhaça, trigo e soja. Em amostras de soja, as ferritinas são metaloproteínas de armazenamento de ferro, atendendo as necessidades das células metabólicas durante a escassez deste elemento [41]. Bernal et al. [42] também identificaram em amostras de soja a proteína *P1B-ATPase*, responsável pelo transporte de cobre.

Para a amostra de linhaça, proteínas responsáveis pelo transporte de Cd, Cu, Zn e Ca foram estudadas [43]. Oomah et al. [44] concluíram que algumas proteínas de linhaça foram reconhecidas como um componente importante desta semente e suas características básicas não foram explicadas, apesar do avanço de pesquisas envolvendo proteoma, aumentando o interesse no estudo das metaloproteínas desta matriz. Rajaesh et al. [45] relataram que a proteína carboxipeptidase II de trigo possui átomos de zinco ligados à sua estrutura.

Como já relatado anteriormente, as proteínas desempenham papéis fundamentais nos organismos de origem animal e vegetal. Sendo assim, as funções das proteínas identificadas nas amostras de aveia, linhaça, trigo e soja estão descritas na Tabela 45.

Tabela 45. Funções das proteínas identificadas nas amostras de aveia, linhaça, trigo e soja.

Proteínas	Função
11S globulin seed storage protein ^[32]	Reserva de nutrientes
Trypsin (EC 3.4.21.4) (precursor) ^[35]	Atividade contra alguns substratos sintéticos
β -conglycinin ^[46, 47]	Reserva de nutrientes
Putative dehydrin e Dehydrin ^[48]	Proteínas de stress: proteção das plantas contra a desidratação
Proteinase inhibitor (Bowman-Birk) D-II (precursor) ^[49]	Inibe a biossíntese ou atividade da enzima protease
Glycinin ^[29, 50]	Reserva de nutrientes
Trypsin inhibitor A (Kunitz) (precursor) ^[34]	Inibidor de tripsina
5a2 protein ^[51]	Transporte de lipídeos
Nonspecific lipid-transfer protein 2G (LTP2G) ^[52]	Transporte de lipídeos. Pode atuar na defesa das plantas ou biossíntese das camadas de cutícula
α -amylase inhibitor 0.19 ^[53]	Inibidor da α -amilase
α -amylase inhibitor, tetrameric, chain CM3 (precursor) ^[54]	Impede ou reduz a atividade da serina do tipo endopeptidases
Globulin Beg1 (precursor) ^[55]	Reserva de nutrientes
Conlinin ^[56]	Reserva de nutrientes

Natarajan et al. [57] relataram que a grande quantidade de proteínas de armazenamento, β -conglucina e glicinina, em sementes de soja impediam a extração, e conseqüentemente a caracterização das proteínas menos abundantes na amostra. Este fato explica por que as proteínas identificadas nas amostras aveia, linhaça, trigo e soja, de forma geral, apresentam função de reserva de nutrientes para as plantas.

Neste trabalho, algumas proteínas foram identificadas nas amostras de aveia, linhaça, trigo e soja e ainda, foi possível verificar a presença de Cu, Fe, Mn e Zn nas frações proteicas analisadas, o que sugere que estes metais podem estar diretamente relacionados à função proteica.

Os espectros PMF e MS/MS das proteínas identificadas (Tabelas 40, 42-44) estão apresentados no anexo deste trabalho.

5.4.3. Comparação dos resultados obtidos após separação proteica por 1D SDS-PAGE e RP-HPLC-UV

As eletroforese e cromatografia são amplamente empregadas para a separação proteica em matrizes de origem animal e/ou vegetal e podem ser utilizadas de modo complementar.

Neste trabalho foi possível identificar uma maior quantidade de proteína nas amostras avaliadas empregando a cromatografia como técnica de separação. Isto já era esperado, uma vez que a concentração proteica nas frações recolhidas por HPLC excede à encontrada nas bandas do gel.

Os resultados apresentados nas Tabelas 43 e 44 mostram várias proteínas identificadas nas amostras de trigo e soja (7-72 kDa), o que pode indicar a complexidade das mesmas, fato este confirmado ao analisar o gel de poliacrilamida obtido para estas matrizes (Figura 17).

De modo geral, o Mn foi identificado com maior frequência nas bandas e frações proteínas obtidas após separação por 1D SDS-PAGE e RP-HPLC-UV, respectivamente, o que sugere que as amostras estudadas apresentam metaloproteínas contendo o Mn como elemento prioritário.

Para algumas bandas (eletroforese) e frações proteicas (cromatografia) foi possível identificar mais de um constituinte metálico, o que evidencia que diferentes proteínas podem estar presentes em uma única banda/fração.

As proteínas da aveia e soja pertencentes ao grupo das globulinas (*β-conglycinin* e *glycinin*) foram identificadas por MALDI-TOF-MS/MS após separação proteica tanto por eletroforese quanto por cromatografia (procedimento de extração 3), evidenciando a concordância dos resultados.

Comparando os resultados obtidos para a amostra de trigo submetida ao procedimento de extração 2 (separação eletroforética) e procedimento 3 (separação cromatográfica) foi possível identificar a proteína *lipid transfer*, mostrando a conformidade das diferentes técnicas de separação.

De acordo com os resultados apresentados no capítulo 3 (Tabelas 17-20), as amostras de aveia, trigo e soja apresentam elevada concentração das proteínas pertencentes ao grupo das globulinas, sendo que estas proteínas apresentam em maior abundância o manganês. Estes resultados são concordantes aos obtidos no estudo apresentado no capítulo 5 e citado

anteriormente. Ainda comparando os resultados dos capítulos 3 e 5, os dados da Tabela 28 e Figura 13 mostraram que a amostra de linhaça pode conter átomos de Zn ligado às proteínas solúveis. Esta observação foi comprovada ao identificar os metais e proteínas da linhaça, após separação cromatográfica (Tabela 41). Estes fatos demonstram a importância do estudo inicial da distribuição de elementos metálicos nas frações proteicas de uma determinada amostra.

Vale ressaltar que uma fração significativa de proteínas conhecidas necessita de íons metálicos para que sua função biológica seja realizada. As razões para esta necessidade são múltiplas. Os metais desempenham papel estrutural, sendo necessários para estabilizar a estrutura terciária e/ou quaternária da proteína, além de serem indispensáveis para funções como catálise enzimática, transporte de íons, dentre outros. Além disto, os metais são essenciais por se ligarem ao oxigênio e transportá-lo para dentro do organismo, como ocorre na hemoglobina. [58].

Desta forma, o estudo metaloproteômico tornou-se essencial para esclarecer diversos processos metabólicos e o seu desenvolvimento deve ser incentivado nas diversas áreas de pesquisa.

5.5. CONCLUSÕES

A eletroforese em gel e cromatografia líquida aliadas à GF AAS e MALDI-TOF-MS/MS foram eficientes na separação e na identificação de possíveis metaloproteínas existentes nas amostras de aveia, linhaça, trigo e soja.

A técnica RP-HPLC-UV utilizada na separação proteica foi rápida e possibilitou a identificação de maior quantidade de metaloproteínas, comparada à técnica 1D SDS-PAGE.

Foi possível determinar maior quantidade dos metais Cu, Fe, Mn e Zn utilizando a técnica 1D SDS-PAGE, a qual apresenta uma separação de proteínas mais eficiente, além de mostrar em uma única análise o perfil proteico de várias amostras. Além disso, o elemento Mn foi determinado na maioria das bandas e frações proteicas, indicando sua interação com as proteínas da aveia, linhaça, trigo e soja.

As técnicas de separação foram eficientes para posterior identificação proteica, principalmente para as proteínas do grupo das globulinas. As proteínas β -*conglycinin* e *glycinin* pertencentes à aveia e soja foram identificadas por MALDI-TOF-MS/MS após separação proteica por eletroforese e cromatografia, resultados os quais mostram que a utilização simultânea das técnicas de separação, em estudo metaloproteômico, é indispensável.

5.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] JAKUBOWSKI, N.; LOBINSKI, R.; MOENS, L. Metallobiomolecules. The basis of life, the challenge of atomic spectroscopy. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 19, p. 1-4, 2004.
- [2] GARCIA, J. S.; MAGALHÃES, C. S.; ARRUDA, M. A. Z. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. *Talanta*, v. 69, p. 1-15, 2006.
- [3] HAFERBURG, G.; KOTHE, E. Metallomics: lessons for metalliferous soil reediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 87, p. 1271-1280, 2010.
- [4] KRUPP, E. M.; MESTROT, A.; WIELGUS, J.; MEHARG, A. A.; FELDMANN, J. The molecular form of mercury in biota: identification of novel mercury peptide complexes on plants. *Chemical Communication*, v. 28, p. 4257-4259, 2009.
- [5] SANTOS, F. A.; LIMA, P. M.; NEVES, R. C. F.; MORAES, P. M.; PÉREZ, C. A.; SILVA, M. O. A.; ARRUDA, M. A. Z.; CASTRO, G. R.; PADILHA, P. M. metallomic study on plasma samples from Nile tilapia using SR-XRF and GF AAS after separation by 2D PAGE: initial results. *Microchimica Acta*, v. 173, p. 43-49, 2011.
- [6] MESKO, M. F.; HARTWIG, C. A.; BIZZI, C. A.; PEREIRA, J. S. F.; MELLO, P. A.; FLORES, E. M. M. Sample preparation strategies for bioinorganic analysis by inductively coupled plasma mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, v. 307, p. 123-136, 2011.
- [7] NEUROFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D.; EHRHARDT, W. Improved staining of protein in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, v. 9, p. 255-262, 1988.

- [8] HAVLIS, J.; THOMAS, H.; SEBELA, M.; SHEVCHENKO, A. Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. *Analytical Chemistry*, v. 75, p. 1300-1306, 2003.
- [9] KINTER, M.; SHERMAN, N. S. In *Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry*. Ed. Copyright Clearance Center, Elsevier, United State of America, 2nd edn., 1976, vol. 1, ch. 6 , pp. 147-164.
- [10] STONE, K.L., WILLIAMS, K.R. Enzymatic digestion of proteins in solution and in SDS polyacrylamide gel. In: Walker, J.M. (ed), *The protein protocol handbook*. Humana Press Inc. Totowa, NJ, pp. 415-421, 1996.
- [11] BORGHT, A. V. D.; VANDEPUTTE, G. E.; DERYCKE, V.; BRIJS, K.; DAENEN, G.; DELCOUR, J. A. Extractability and chromatographic separation of rice endosperm proteins. *Journal of Cereal Science*, v. 44, p. 68-74, 2006.
- [12] OURY, F. X.; LEENHARDT, F.; RÉMÉSY, C.; CHANLIAUD, E.; DUPERRIER, B.; BALFOURIER, F.; CHARMET, G. Genetic variability and stability of grain magnesium, zinc and iron concentrations in bread wheat. *European Journal of Agronomy*, v. 25, p. 177-185, 2006.
- [13] PEROZA, E. A.; SCHMUCKI, R.; GÜNTERT, P.; FREISINGER, E.; ZERBE, O. The β_E - Domain of Wheat E_C-1 Metallothionein: A Metal-Binding Domain with a Distinctive Structure. *Journal of Molecular Biology*, v. 387, p. 207-218, 2009.
- [14] HUANG, M.; ZHOU, S.; SUN, B.; ZHAO, Q. Heavy metals in wheat grain: Assessment of potential health risk for inhabitants in Kunshan, China. *Science of the Total Environment*, v. 405, p. 54-61, 2008.
- [15] PEROZA, E. A.; KAABI, A. A.; KLAUCKE, W. M.; WELLENREUTHER, G.; FREISINGER, E. The two distinctive metal ion binding domains of the wheat metallothionein Ec-1. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 103, p. 342-353, 2009.

- [16] SALUNKE, R.; RAWAT, N.; TIWARI, V. K.; NEELAM, K.; RANDHAWA, G. S. DHALIWAL, H. S.; ROY, P. Determination of bioavailable-zinc from biofortified wheat using a coupled in vitro digestion/Caco-2 reporter-gene based assay. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 25, p. 149-159, 2012.
- [17] BRANDÃO, A. R. Aspectos proteômicos, enzimáticos e metaloproteômicos em sementes de soja transgênica e não-transgênica. Universidade Estadual de Campinas. Dissertação de Mestrado. 2009.
- [18] GUERBETTE, F.; GROSOIS, M.; JOLLIOT-CROQUIN, A.; KADER, J. C.; ZACHOWSKI, A. Comparison of lipid binding and transfer properties of two lipid transfer proteins from plants. *Biochemistry*, v. 38, p.14131-14137, 1999.
- [19] BOUTROT, F.; GUIRAO, A.; ALARY, R.; JOUDRIER, P.; GAUTIER, M. F. Wheat non-specific lipid transfer protein genes display a complex pattern of expression in developing seeds. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1730, p. 114-125, 2005.
- [20] KADER, J. C. Lipid- Transfer proteins in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 47, p. 627-654, 1996.
- [21] KUPPANNAN, K.; ALBERTS, D. R.; SCHAFER, B. W.; DIELMAN, D.; YOUNG, S. A. Quantification and Characterization of Maize Lipid Transfer Protein, A Food Allergen, by Liquid Chromatography with Ultraviolet and Mass Spectrometric Detection. *Analytical Chemistry*, v. 83, p. 516-524, 2011.
- [22] HAN, G. W.; LEE, J. Y.; SONG, H. K.; MIN, C. C. K.; MOON, J.; SHIN, D. H.; KOPKA, M. I.; SAWAYA, M. R.; YUAN, H. S.; KIM, T. D.; CHOE, J.; LIM, D.; MOON, H. J.; SUH, S. W. Structural basis of non-specific lipid binding in maize lipid-transfer protein complexes revealed by high-resolution X-ray crystallography. *Journal of Molecular Biology*, v. 308, p. 263-278, 2001.

- [23] GORJANOVIĆ, S.; SUZnjeVIĆ, D.; BELJANSKI, M.; HRANISAVLJEVIĆ, J. Barley lipid-transfer protein as heavy metal scavenger. *Environment Chemistry Letters*, v. 2, p. 113-116, 2004.
- [24] MASSA, A. N.; MORRIS, C. F. Molecular Evolution of Puroindoline-A, Puroindoline-B and Grain Softness Protein-1 Genes in the Tribe Triticeae. *Journal of Molecular Evolution*, v. 63, p. 526-536, 2006.
- [25] KINDNESS, A.; SEKARAN, C. N.; FELDMANN, J. Two-Dimensional Mapping of Copper and Zinc in Liver Sections by Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry*, v. 49, p. 1916-1923, 2003.
- [26] MALTEZ, H. F.; TAGLE, M. V.; de LA CAMPA, M. D. R. F.; SANZ-MEDEL, A. Metal metallothioneins like proteins investigation by heteroatom-tagged proteomics in two different snails as possible sentinel organisms of metal contamination in freshwater ecosystems. *Analytica Chimica Acta*, v. 650, p. 234-240, 2009.
- [27] KRISHNAN, H. B; NATARAJAN, S. S. A rapid method for depletion of Rubisco from soybean (*Glycine max*) leaf for proteomic analysis of lower abundance proteins. *Phytochemistry*, v. 70, p. 1958-1964, 2009.
- [28] KOBAYASHI, C. A. N. Análise proteômica em urina e rim de ratos submetidos a tratamento crônico com flúor. Bauru. Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo. Dissertação de Mestrado. 2008.
- [29] de CASTRO, V. A. O. T. Análise comparativa de mapas proteicos de amostras de soja convencionais e tolerantes ao herbicida glifosato visando à inocuidade alimentar. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Tese de Doutorado. 2009.

[30] CHAMRAD, D. C.; KORTINF, G.; STUHLER, K.; MEYER, H. E.; KLOSE, J.; BLUGGEL, M. Evaluation of algorithms for protein identification from sequence databases using mass spectrometry data. *Proteomics*, v. 4, p. 619-628, 2004.

[31] CHANG, Y. W.; ALLI, I.; KONISHI, Y.; ZIOMEK, E. Characterization of protein fractions from chickpea (*Ciner arietinum L.*) and oat (*Avena sativa L.*) seeds using proteomics techniques. *Food Research international*, v. 44, p. 3094-3104, 2011.

[32] Expasy Proteomics Server. Disponível em:

<http://www.uniprot.org/uniprot/P13744>. Acessado em 18/05/2012

[33] ROBERT, L. S.; NOZZOLILLO, C.; ALTOSAAR, I. Homology between rice glutelin and oat 12S globulin. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 829, p. 19-26, 1985.

[34] REN, H.; MADISON, J. T.; THOMPSON, J. F. Identification of an ethanol-soluble protein as β -amilasy and its purification from soybean seed. *Phyrochemistry*, v. 33, p. 535-539, 1993.

[35] Expasy Proteomics Server. Disponível em:
<http://www.uniprot.org/uniprot/P07477>. Acessado em 18/05/2012.

[36] BRANDÃO, A. R.; BARBOSA, H. S.; ARRUDA, M. A. Z. Image analysis of two-dimensional gel electrophoresis for comparative proteomics of transgenic and non-transgenic soybean seeds. *Journal of Proteomics*, v. 73, p. 1433-1440, 2010.

[37] SUSSULINI, A. Avaliação das alterações protéicas e metaloprotéicas em soja após o processo de modificação genética. Universidade Estadual de Campinas. Dissertação de Mestrado. 2007.

[38] Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA) e Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO). Versão 2 – Segunda Edição, Campinas, São Paulo, 2006.

[39] Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP e BRASILFOODS (Rede Brasileira de Dados de Composição de Alimentos). Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tabela>, acessado em 29/05/2012.

[40] MOONEY, B. P.; THELEN, J. J. High-throughput peptide mass fingerprinting of soybean seed proteins: automated workflow and utility of UniGene expressed sequence tag databases for protein identification. *Phytochemistry*, v. 65, p. 1733-1744, 2004.

[41] LI, M.; JIA, X.; YANG, J.; DENG, J.; ZHAO, G. Effect of tannic acid on properties of soybean (*Glycine max*) seed ferritin: A model for interaction between naturally-occurring components in foodstuffs. *Food Chemistry*, v. 133, p. 410-415, 2012.

[42] BERNAL, M.; TESTILLANO, P. S.; ALFONSO, M.; RISUENO, M. D. C.; PICOREL, R.; YRUELA, I. Identification and subcellular localization of the soybean copper P1B-ATPase Gm HMA8 transporter. *Journal of Structural Biology*, v. 158, p. 46-58, 2007.

[43] OOMAH, B. D.; BEREKOFF, B.; LI-CHAN, E. C. Y.; MAZZA, G.; KENASCHUK, E. O.; DUGUID, S. D. Cadmium-binding protein components of flaxseed: Influence of cultivar and location. *Food Chemistry*, v. 100, p. 318-325, 2007.

[44] OOMAH, B. D.; DER, T. J.; GODFREY, D. V. Thermal characteristics of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) proteins. *Food Chemistry*, v. 98, p. 733-741, 2006.

[45] RAJESH, R. V.; BALASUBRAMANIAN, A. S.; BOOPATHY, R. Evidence for presence of Zn⁺² –binding site in acetylcholinesterase. *Biochimie*, v. 91, p. 526-532, 2009.

[46] Expaty Proteomics Server. Disponível em:
<http://www.uniprot.org/uniprot/P13916>. Acessado em: 19/05/2012

[47] Expaty Proteomics Server. Disponível em:
<http://www.uniprot.org/uniprot/Q4LER6>. Acessado em: 19/05/2012

[48] ALLAGULOVA, C. H. R.; GIMALOV, F. R.; SHAKIROVA, F. M.; VAKHITOV, V. A. The plant dehydrins: structure and putative functions. *Biochemsitry*, v. 68, p. 945-951, 2003.

[49] Expaty Proteomics Server. Disponível em:
<http://www.uniprot.org/uniprot/Q43709>. Acessado em: 19/05/2012

[50] Expaty Proteomics Server. Disponível em:
<http://www.uniprot.org/uniprot/Q7GC77>. Acessado em: 19/05/2012

[51] Expaty Proteomics Server. Disponível em:
<http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/GTerm?id=GO:0006869>. Acessado em:
19/05/2012

[52] Expaty Proteomics Server. Disponível em:
<http://www.uniprot.org/uniprot/P82900>. Acessado em: 19/05/2012

[53] Expaty Proteomics Server. Disponível em:
<http://www.uniprot.org/uniprot/P01085>. Acessado em: 19/05/2012

[54] Expaty Proteomics Server. Disponível em:
<http://www.uniprot.org/uniprot/Q6S5B1>. Acessado em: 19/05/2012

[55] ExPASy Proteomics Server. Disponível em:
<http://www.uniprot.org/uniprot/Q03678>. Acessado em: 19/05/2012

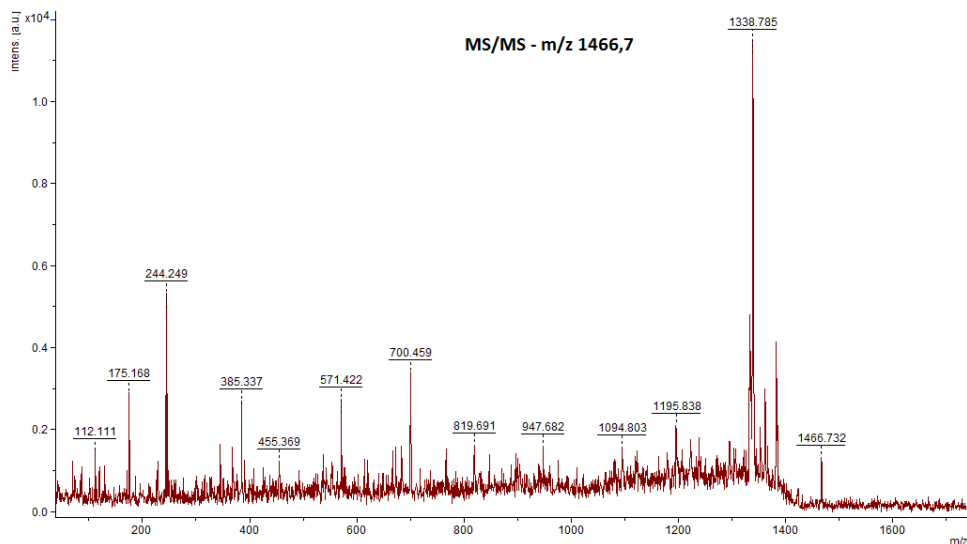
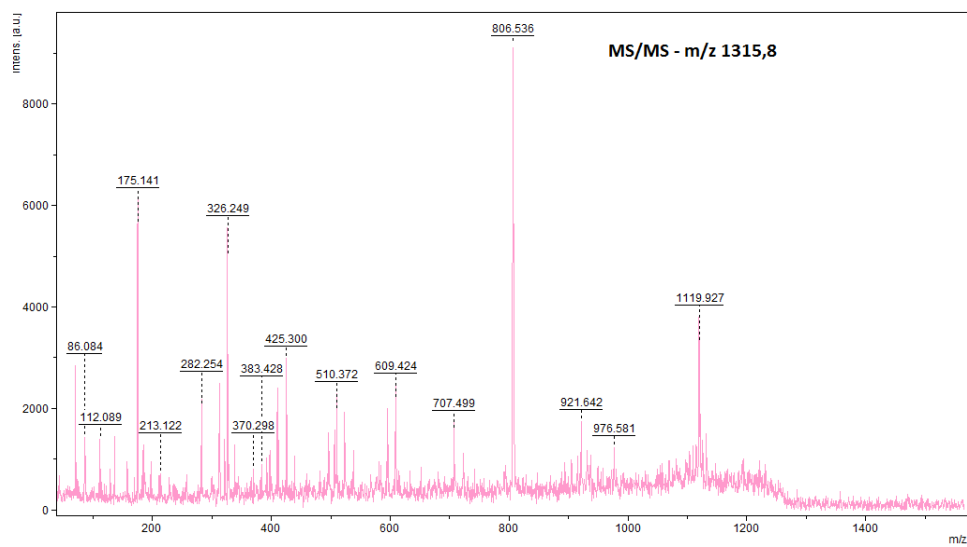
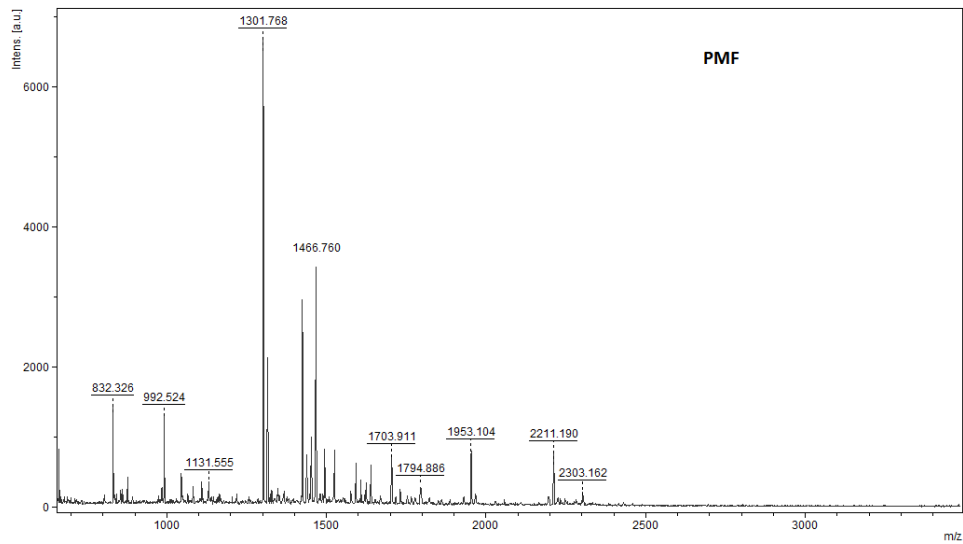
[56] ExPASy Proteomics Server. Disponível em:
<http://www.uniprot.org/uniprot/Q8LPD4>. Acessado em: 19/05/2012

[57] NATARAJAN, S. S.; KRISHNAN, H. B.; LAKSHMAN, S.; GARRETT, W. M. An efficient extraction method to enhance analysis of low abundant proteins from soybean seed. *Analytical Biochemistry*, v. 394, p. 259-268, 2009.

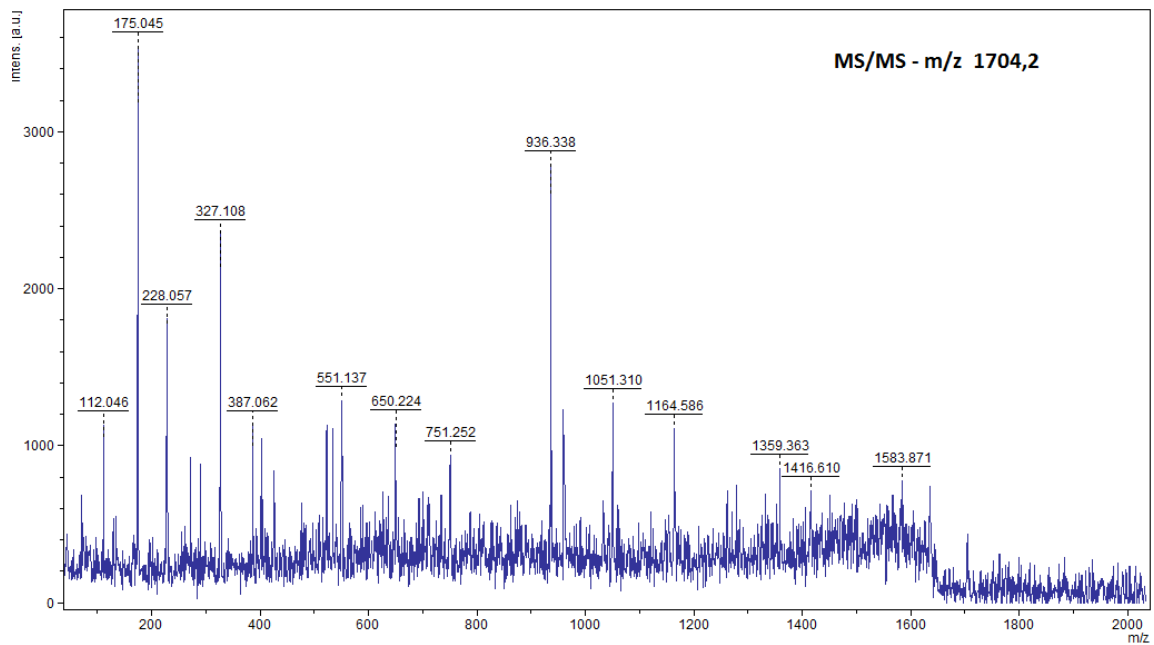
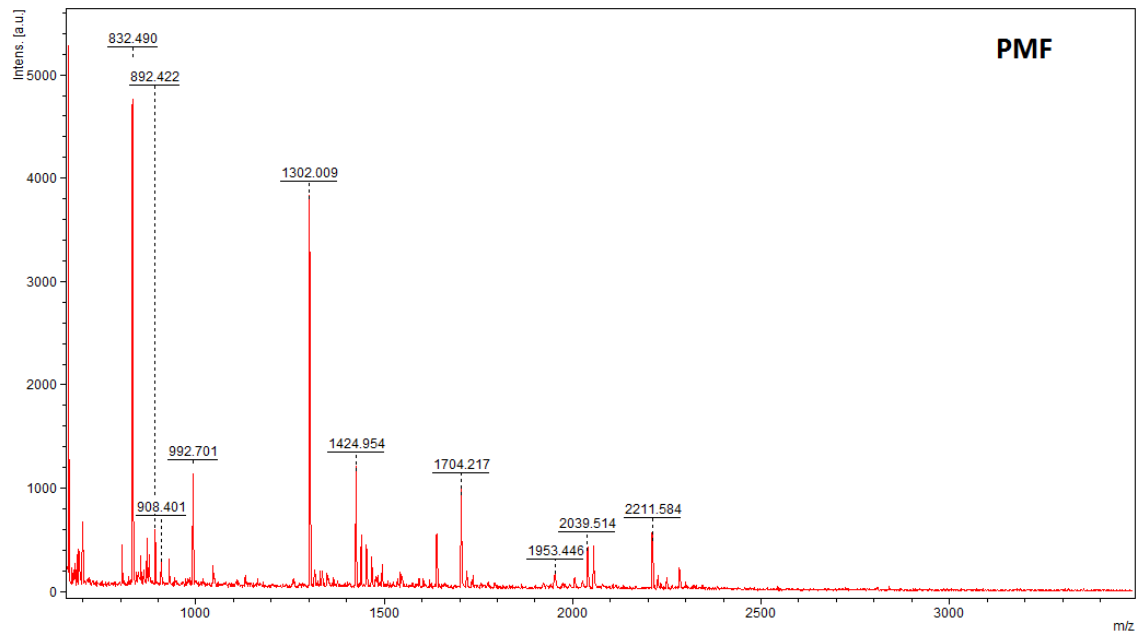
[58] ANDREINI, C.; BERTINI, I.; CAVALLARO, G.; NAJMANOVICH, R. J.; THORNTON, J. M. Structural analysis of metal sites in proteins: Non-heme iron sites as a case study. *Journal of Molecular Biology*, v. 388, p. 356-380, 2009

CAPÍTULO 6

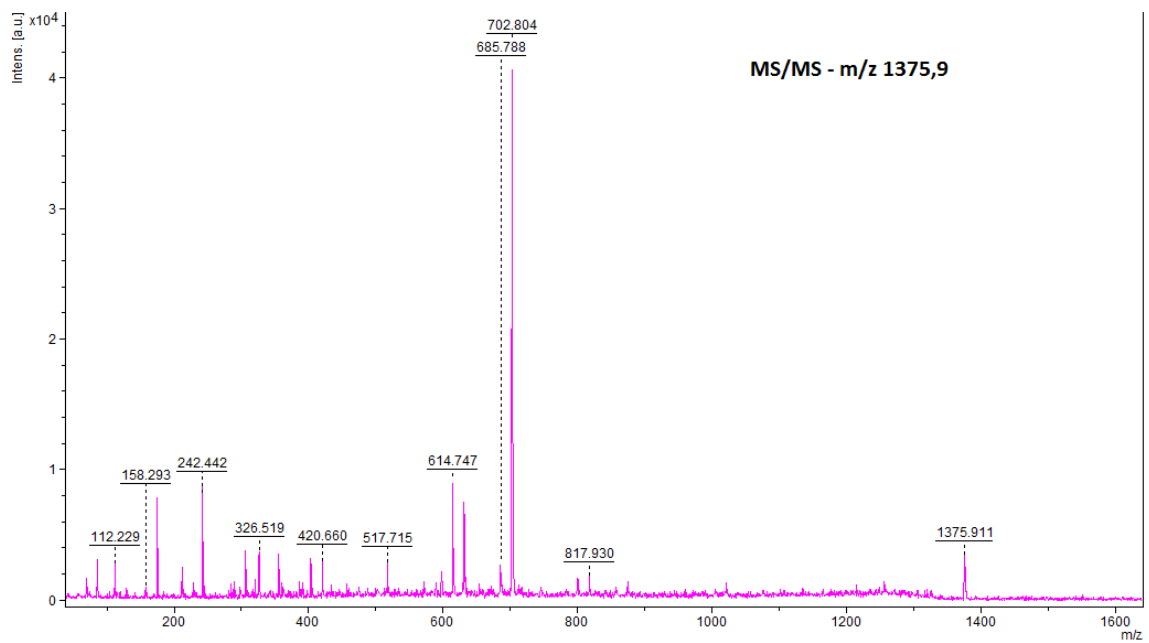
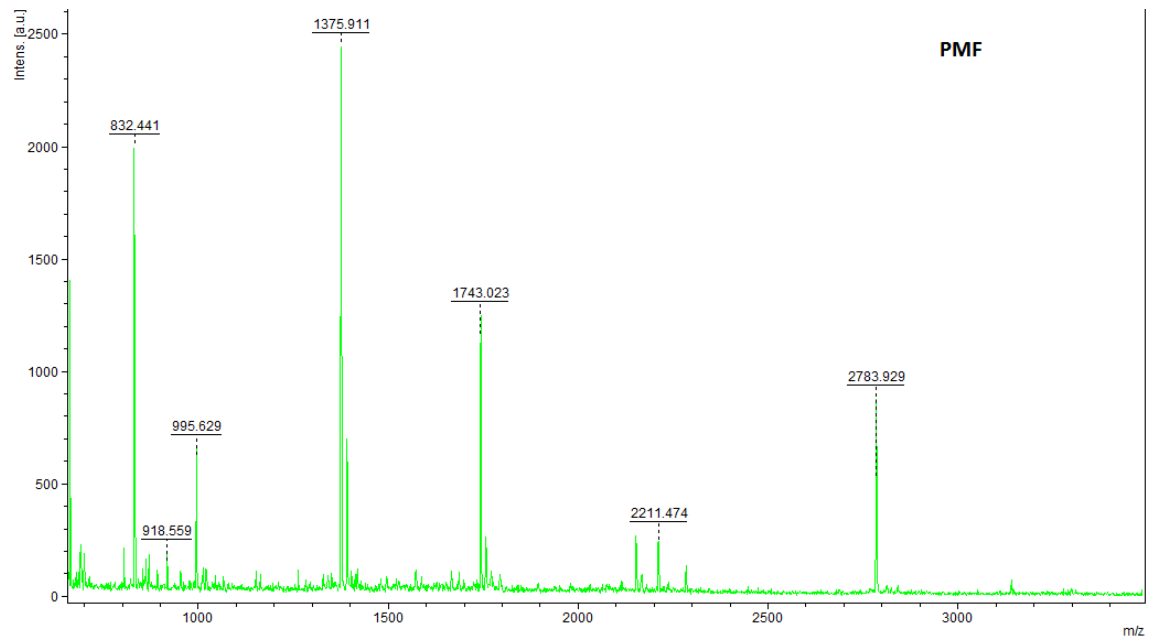
Anexos



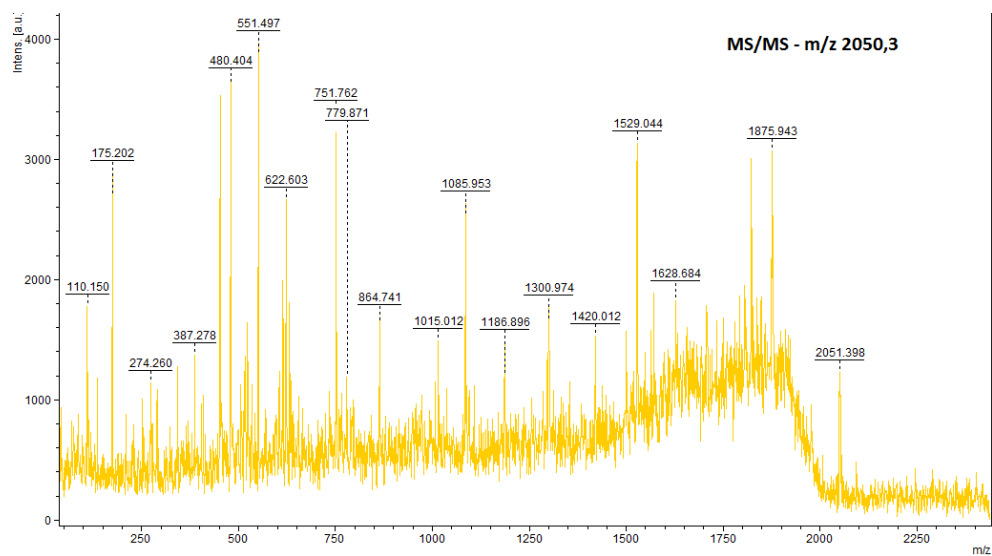
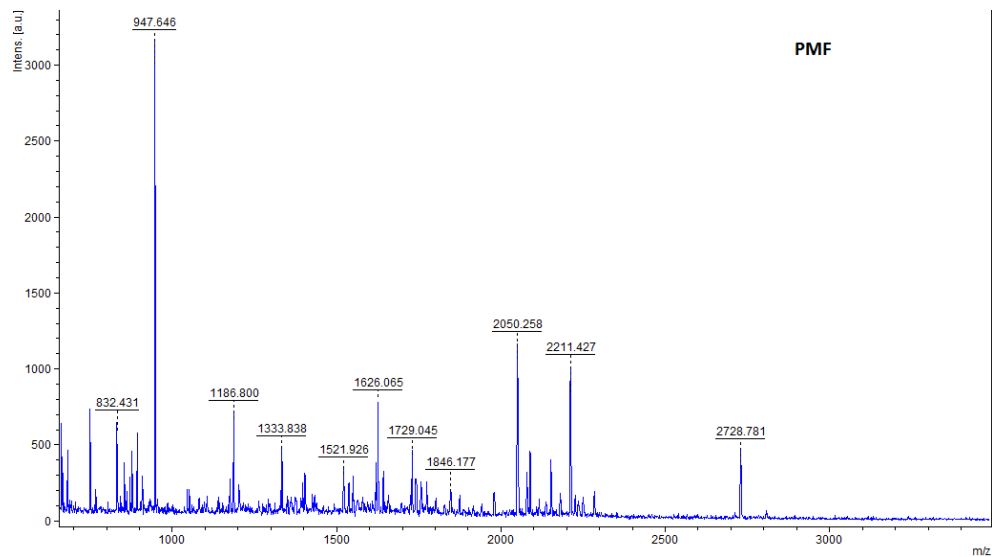
Espectros PMF e MS/MS obtido para as proteínas 11S globulin (precursor) e 12S seed storage globulin (precursor) identificada na banda proteica da amostra de aveia (24.0 kDa -Tabela 40).

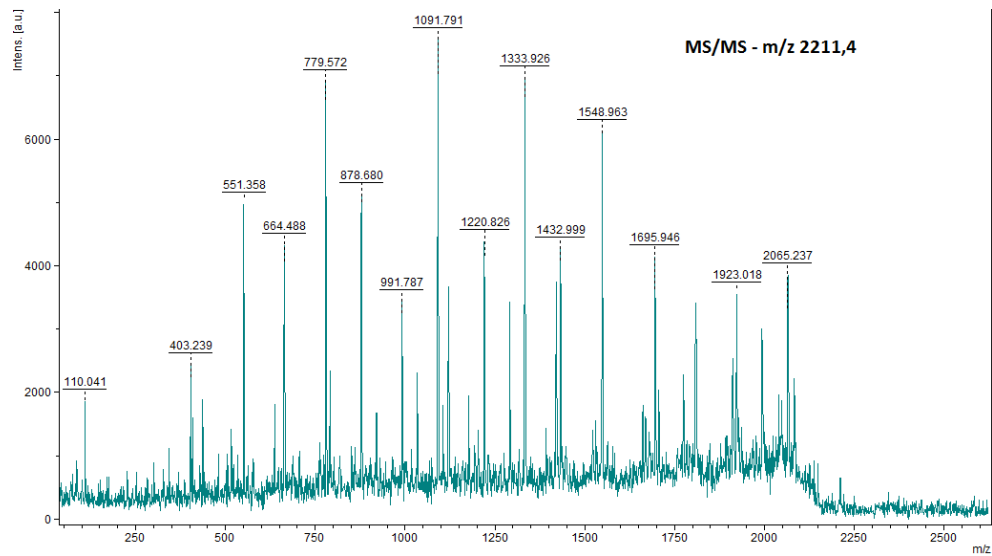


Espectros PMF e MS/MS obtido para a proteína 12s globulin (precursor) identificada na banda proteica da amostra de aveia (22.0 kDa -Tabela 40).

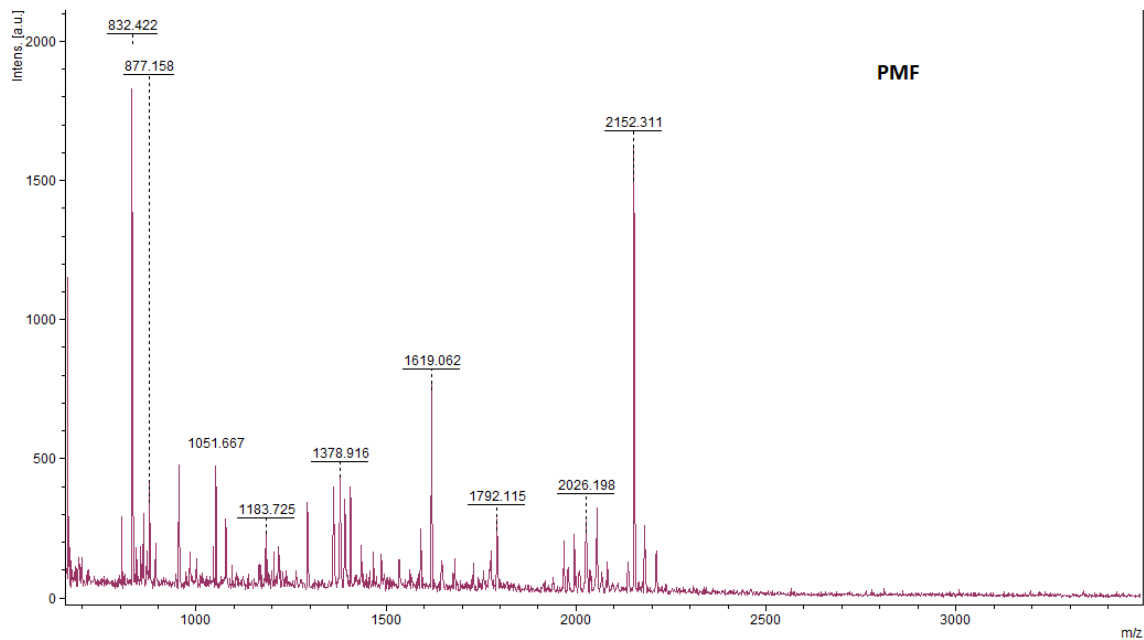


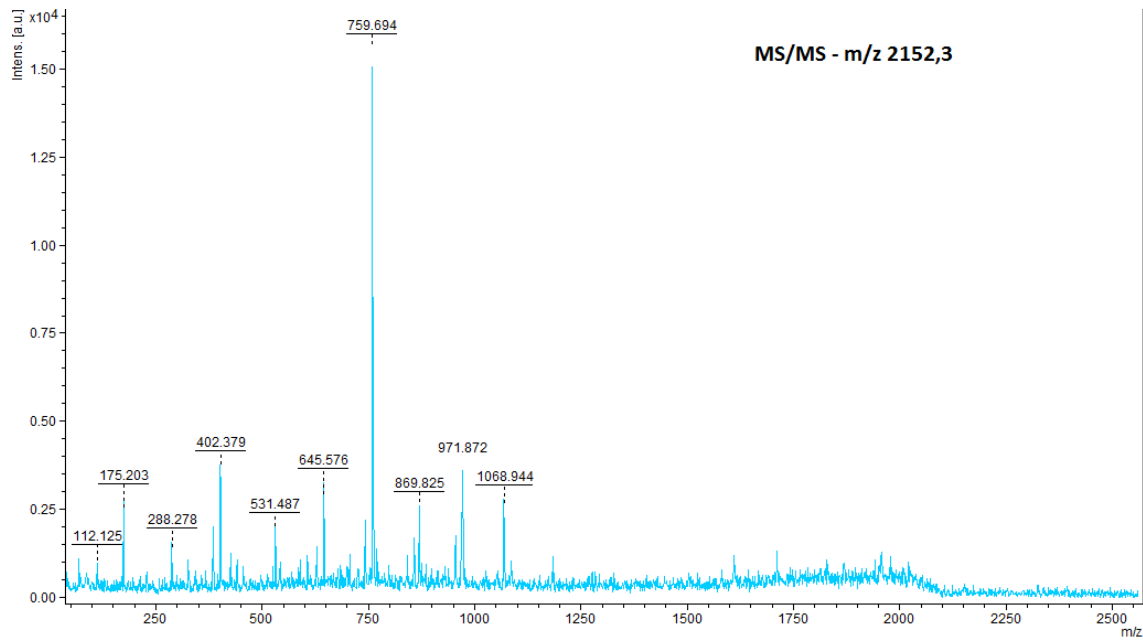
Espectros PMF e MS/MS obtido para a proteína SOYSBG7S identificada na banda proteica da amostra de soja (29.5 kDa - Tabela 40).



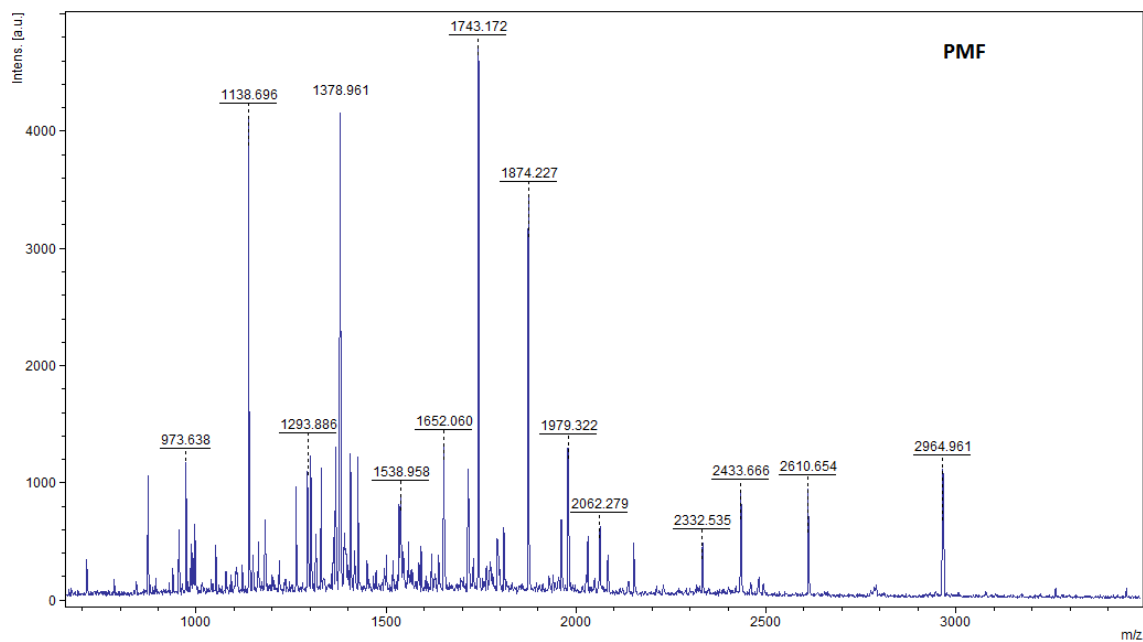


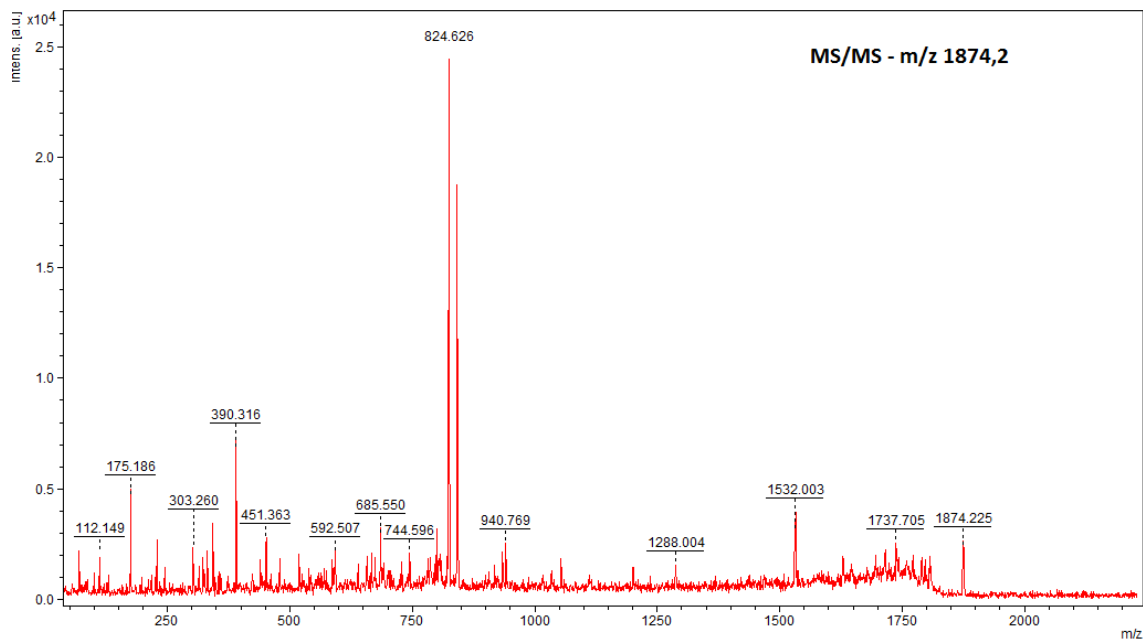
Espectros PMF e MS/MS obtido para as proteínas *β -amylase (EC 3.2.1.2) (1,4- α -D-glucan-maltohidrolase)* e *trypsin (EC 3.4.21.4) (precursor)* identificadas na banda proteica da amostra de soja (56.2 kDa - Tabela 40).



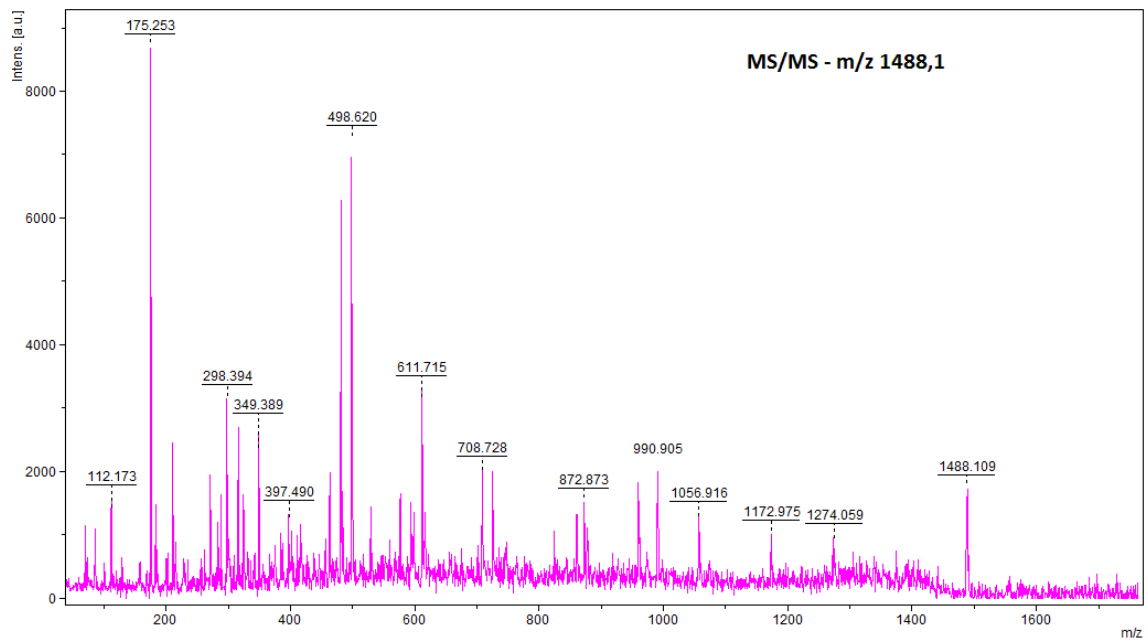
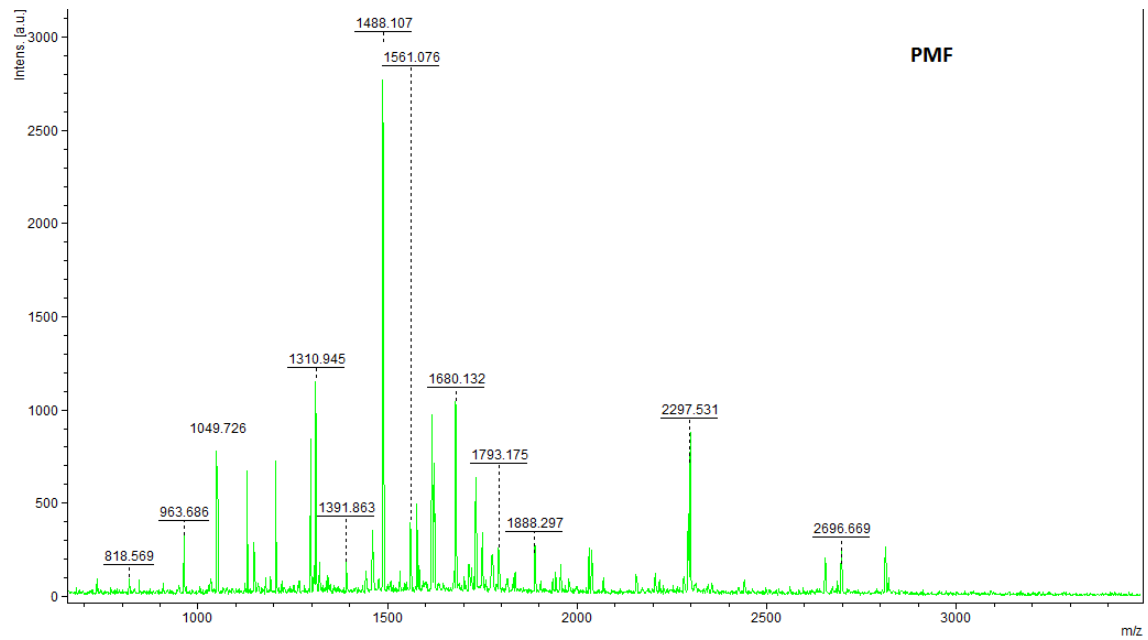


Espectros PMF e MS/MS obtido para a proteína *β -conglycinin α -subunit* identificada na banda proteica da amostra de soja (85.0 kDa - Tabela 40).

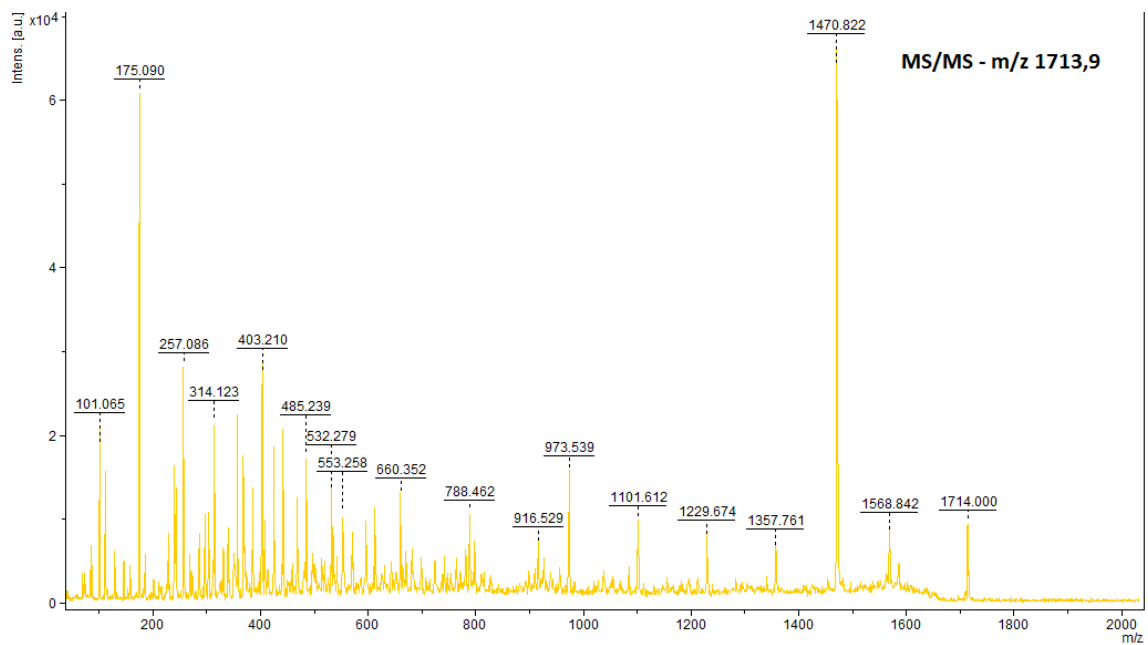
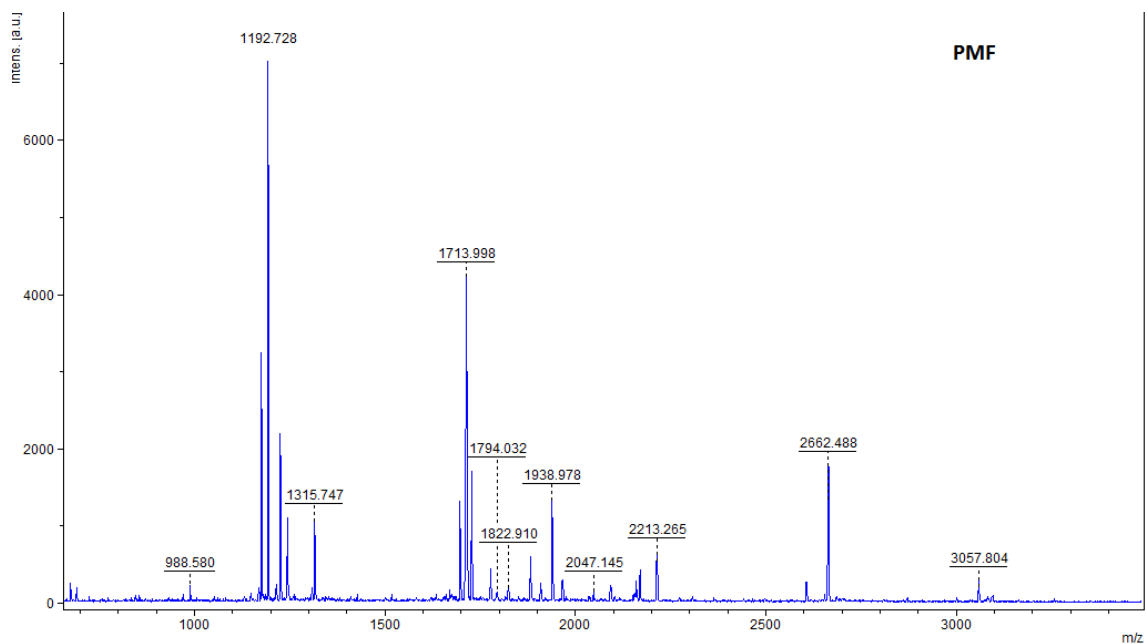




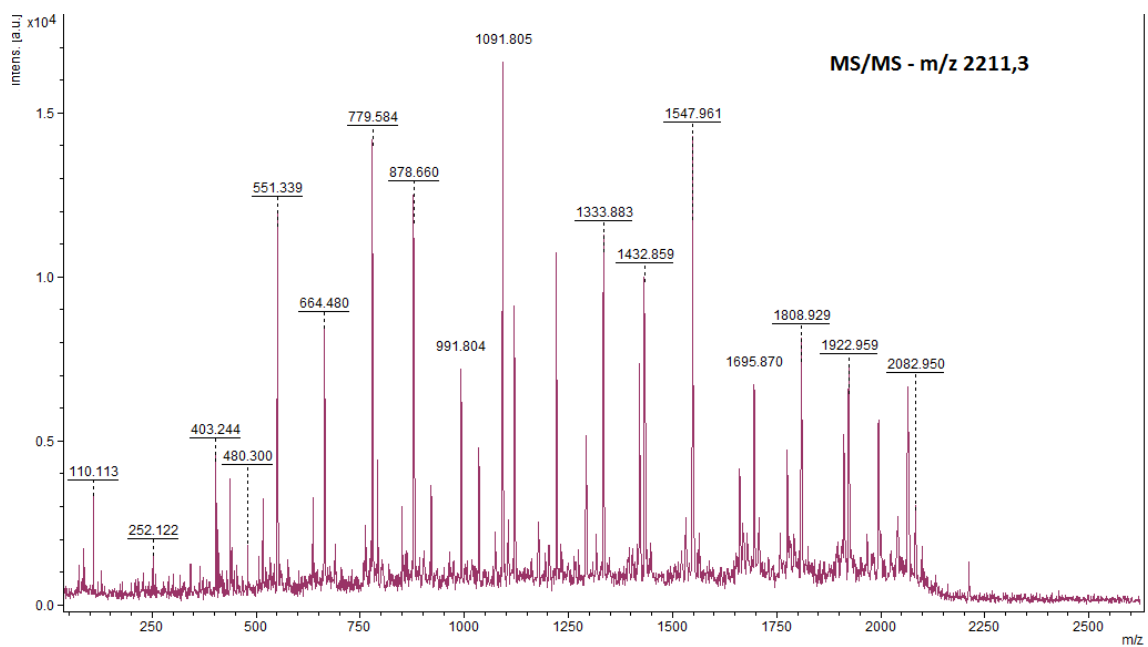
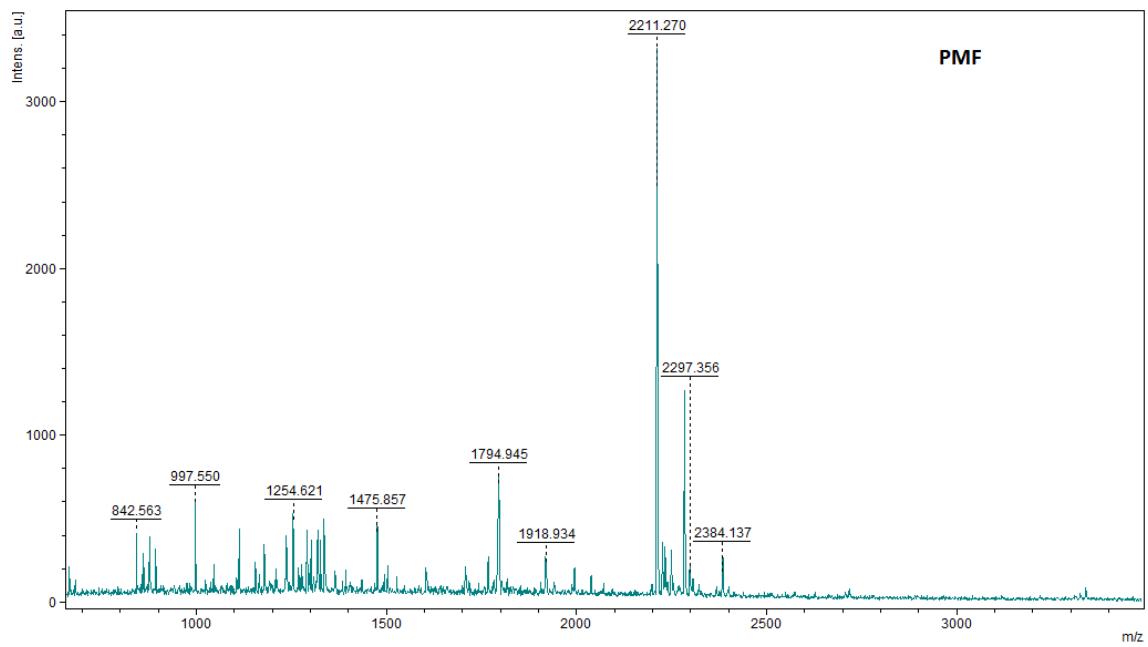
Espectros PMF e MS/MS obtido para as proteínas *Glycinin chain A2B1a* (*precursor*) e *Glycinin A1bB2-784* identificadas na banda proteica da amostra de aveia (A2 - Tabela 42).



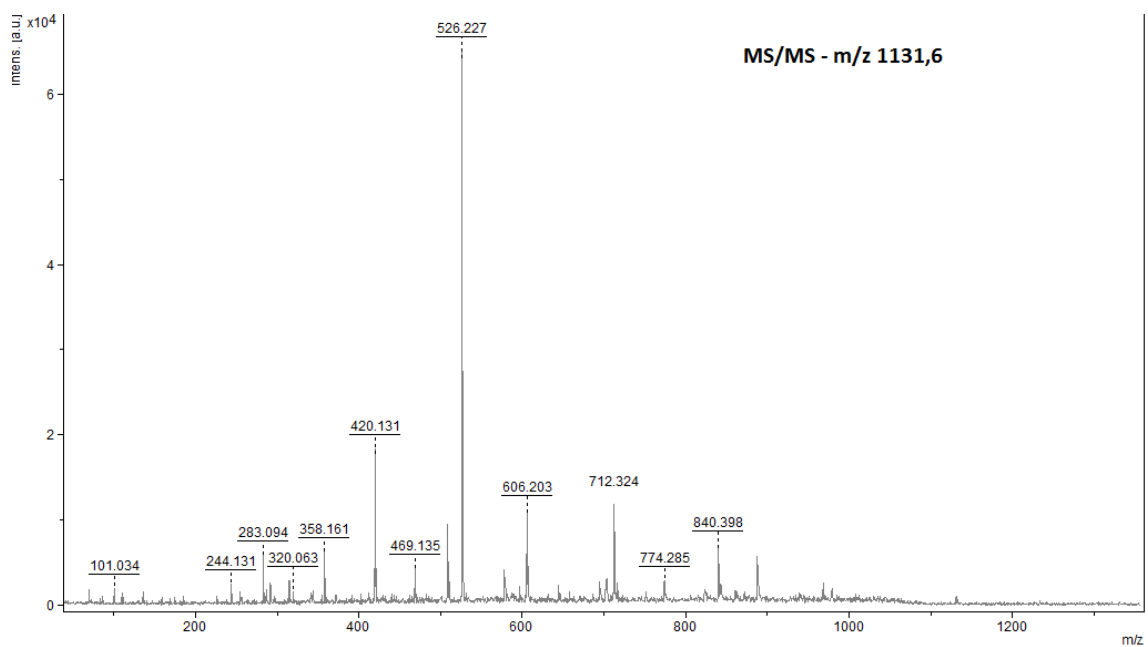
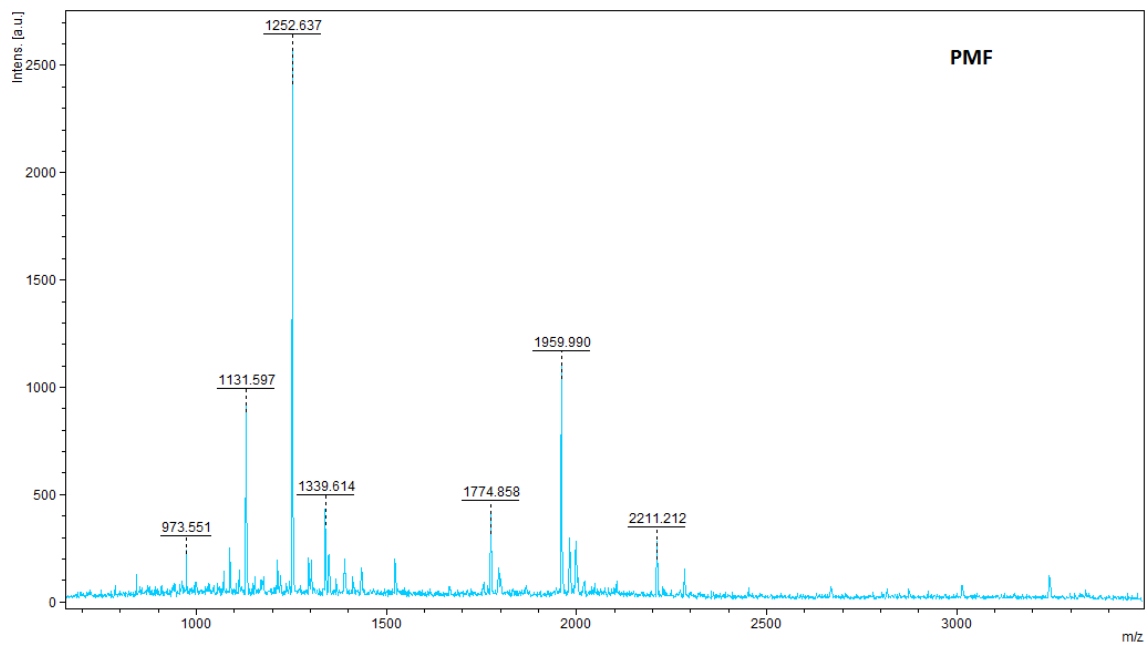
Espectros PMF e MS/MS obtido para a proteína 11S globulin seed storage identificada na banda proteica da amostra de linhaça (L1 - Tabela 42).



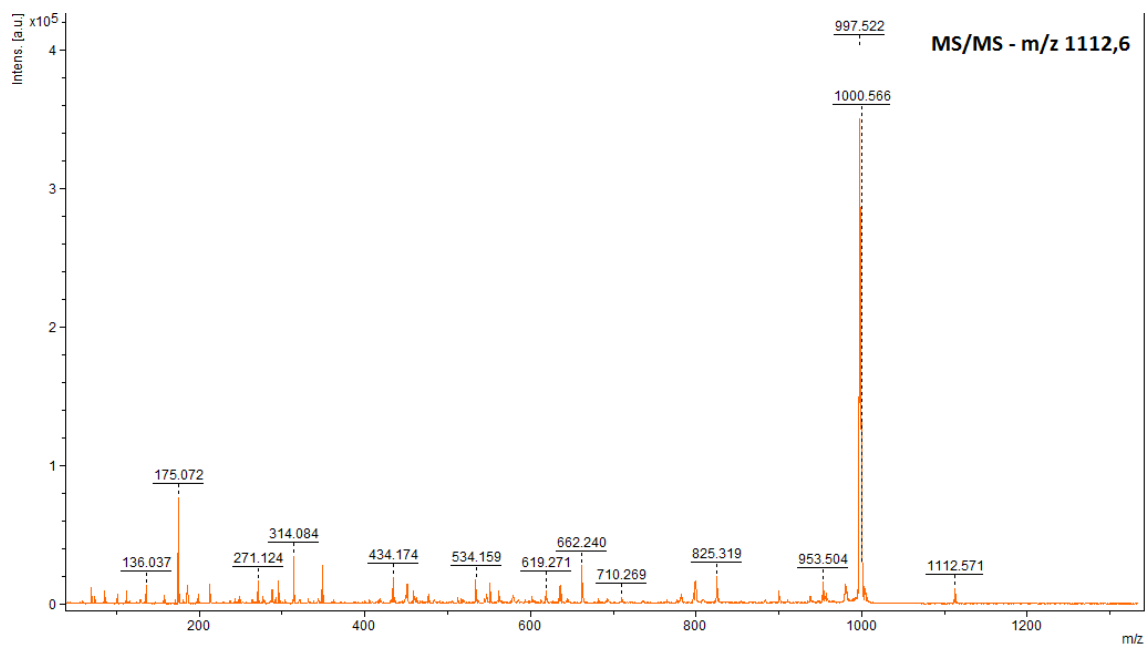
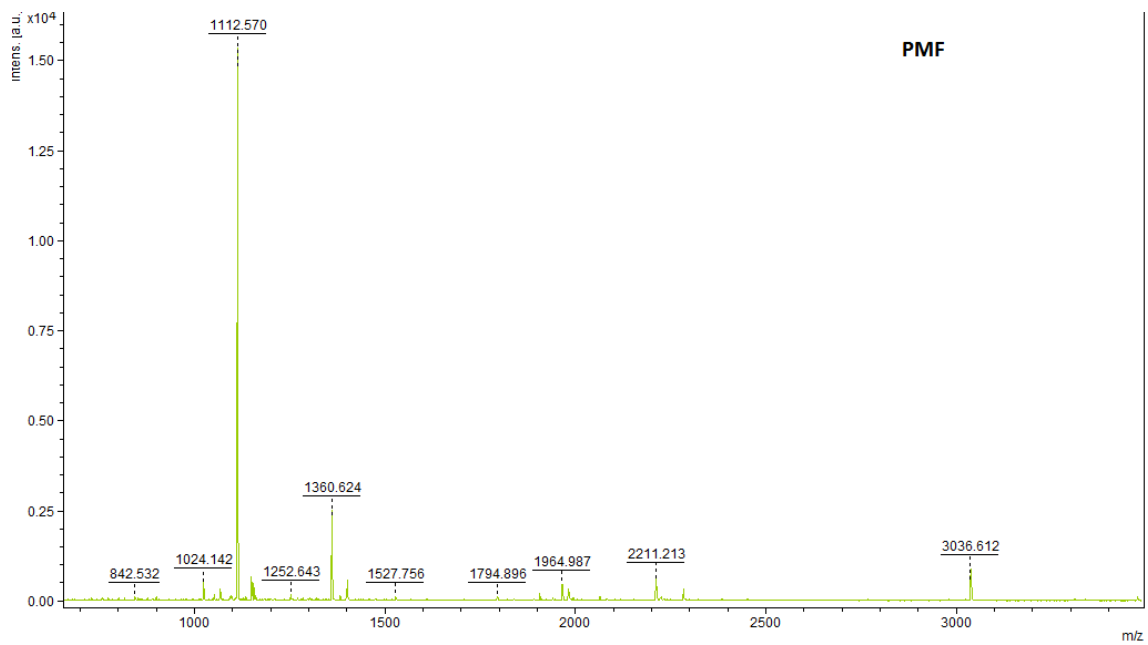
Espectros PMF e MS/MS obtido para a proteína colinin identificada na banda proteica da amostra de linhaça (L2 - Tabela 42).



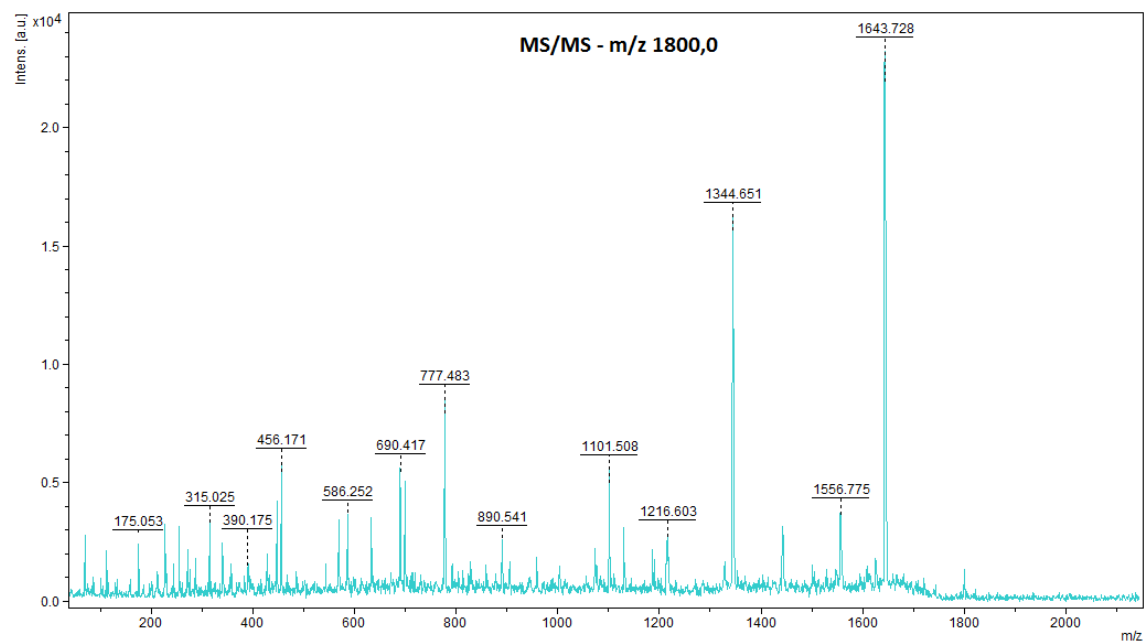
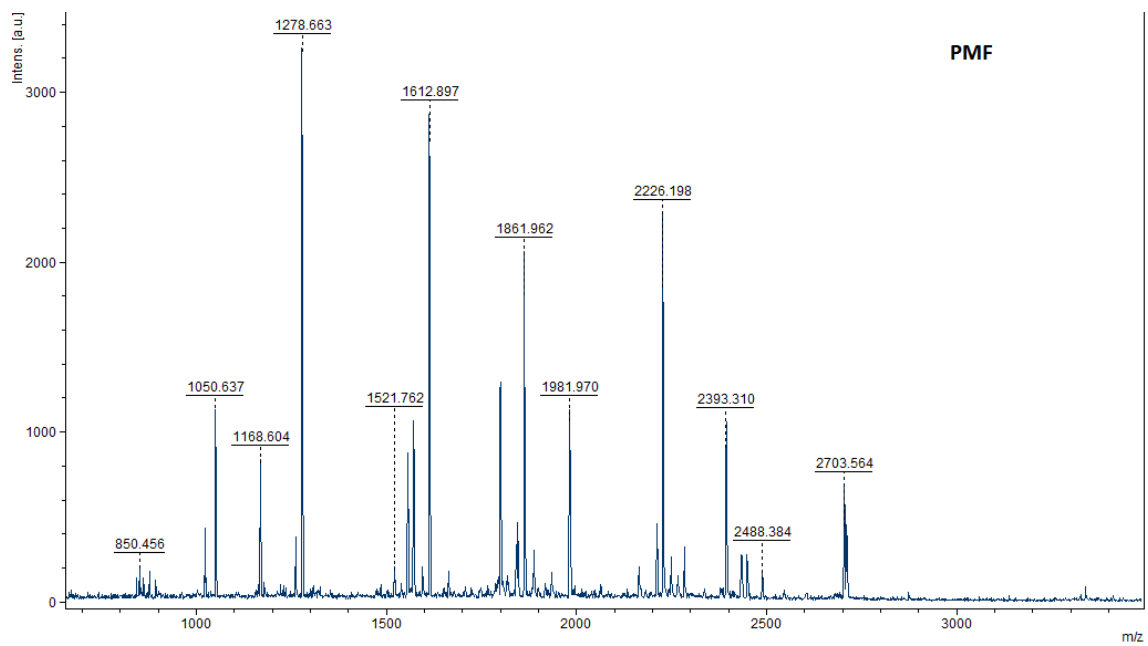
Espectros PMF e MS/MS obtido para a proteína *trypsin (EC 3.4.21.4) (precursor)* identificada na banda proteica da amostra de trigo (T2 - Tabela 43).



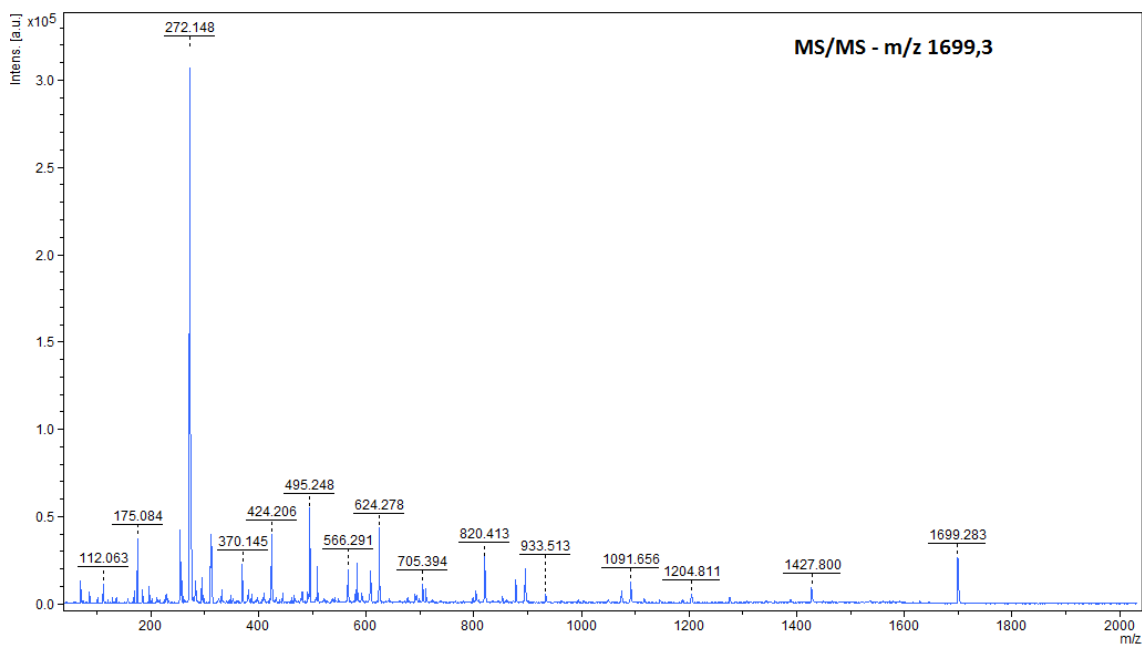
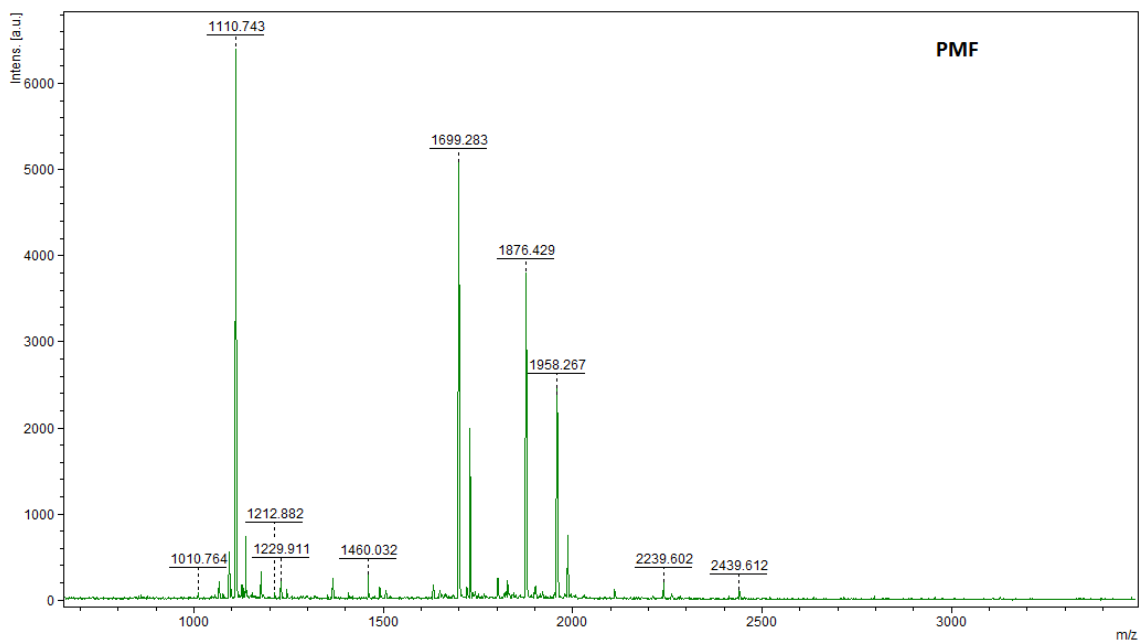
Espectros PMF e MS/MS obtido para a proteína 5a2 protein (Fragment) identificada na banda proteica da amostra de trigo (T3 - Tabela 43).



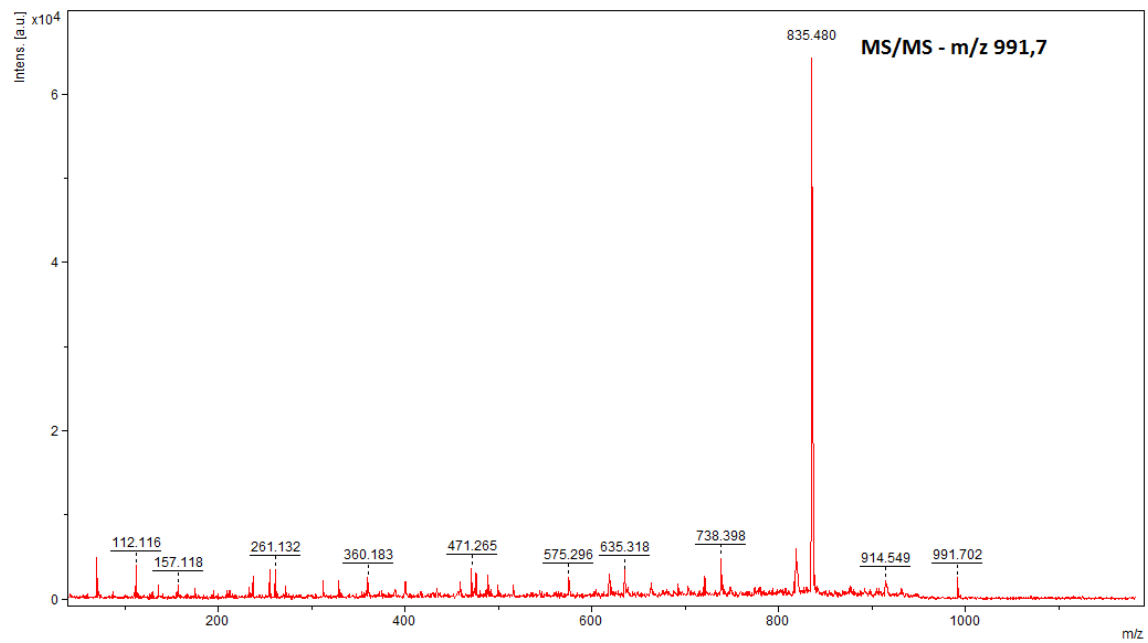
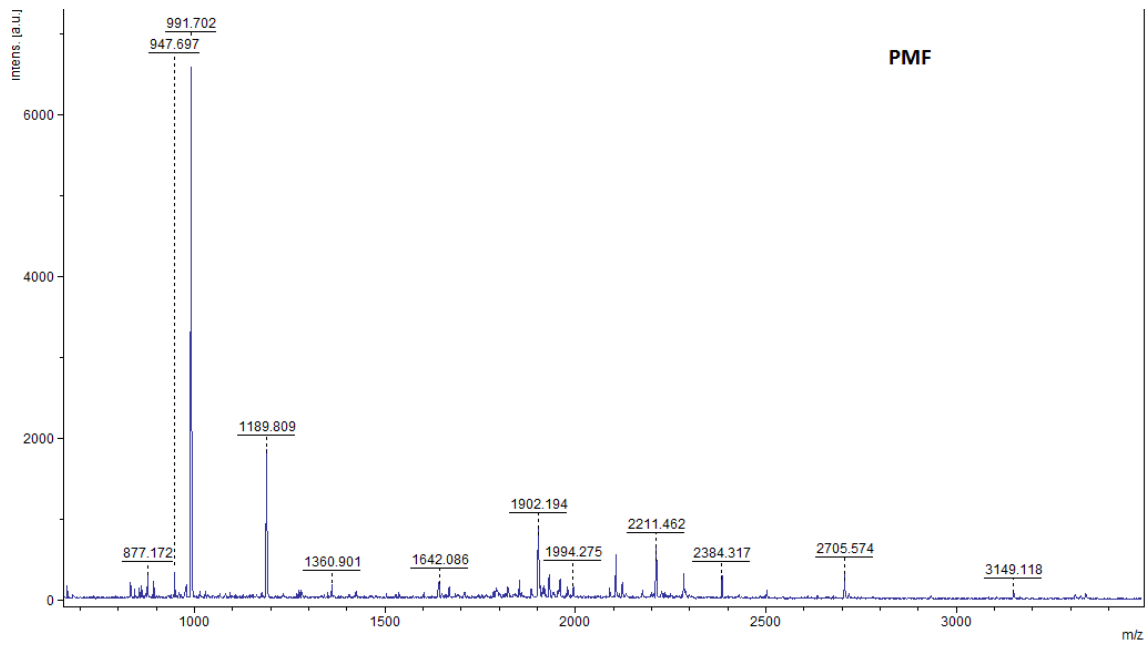
Espectros PMF e MS/MS obtido para a proteína *Nonspecific lipid-transfer protein 2G (LTP2G)* identificada na banda proteica da amostra de trigo (*TR1 - Tabela 43).



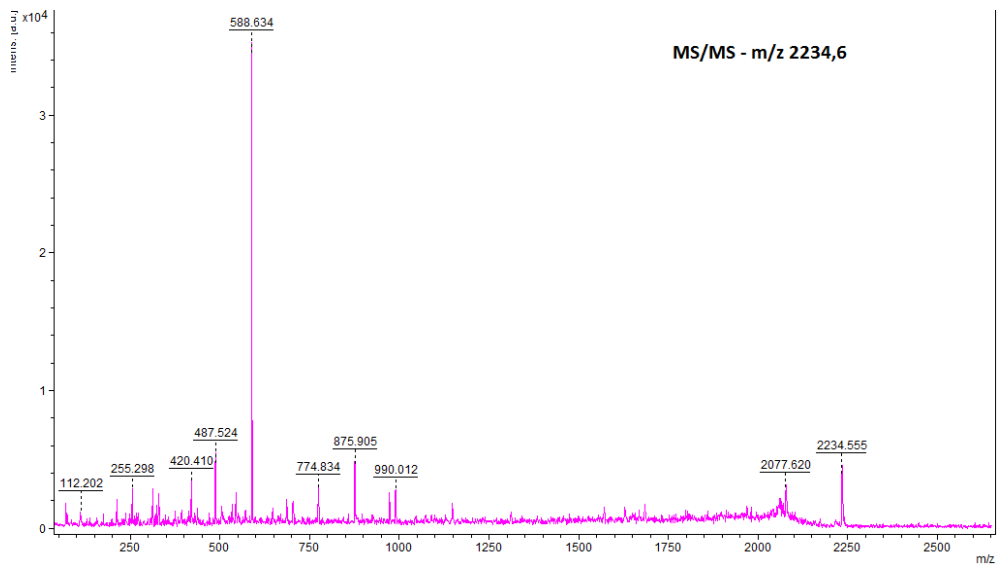
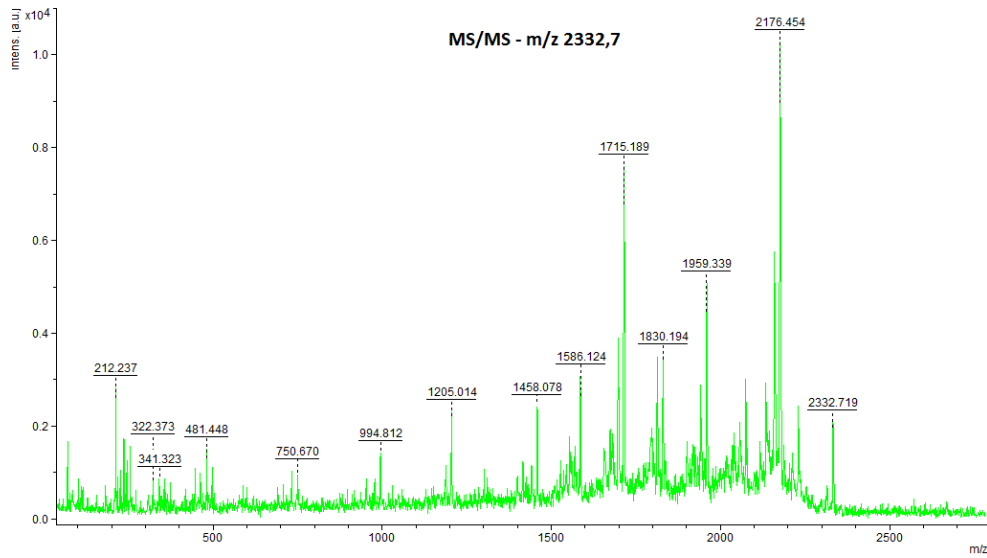
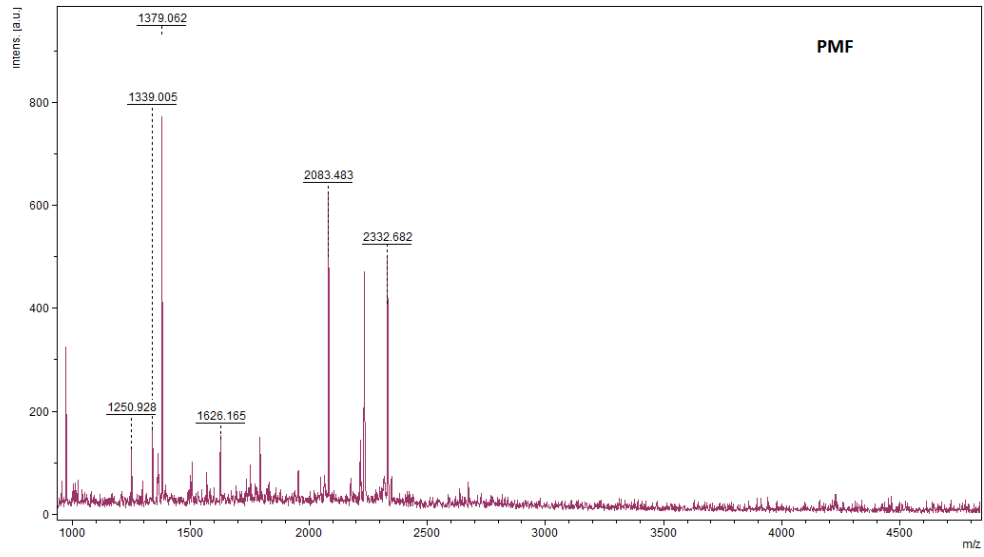
Espectros PMF e MS/MS obtido para a proteína *α-amylase inhibitor 0.19* identificada na banda proteica da amostra de trigo (*TR2 - Tabela 43).



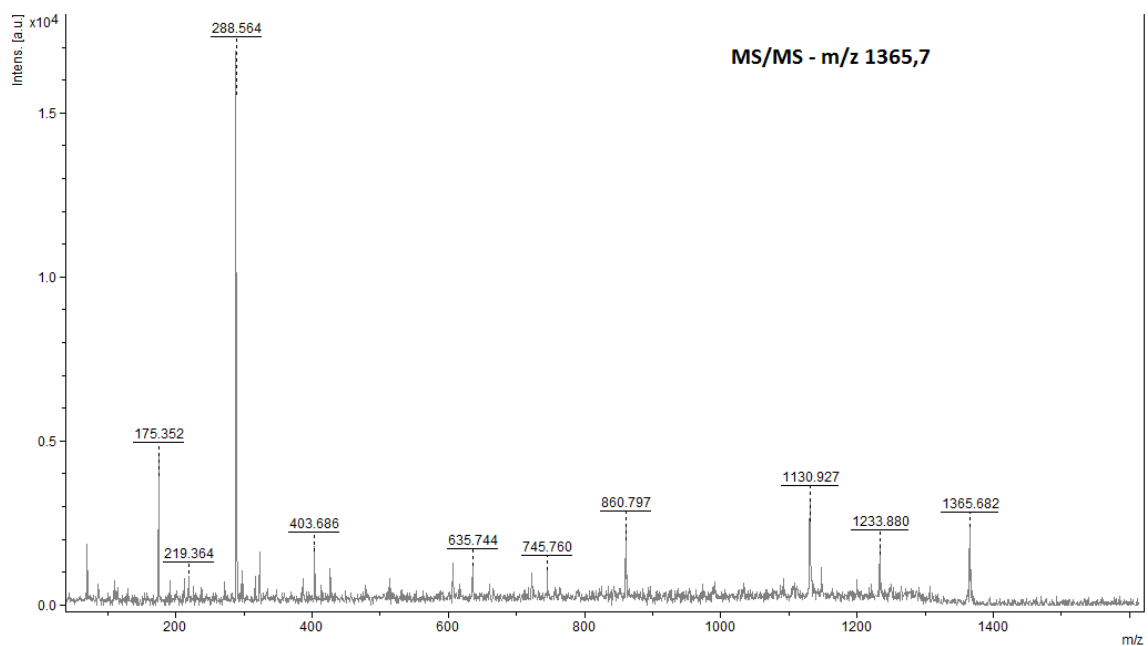
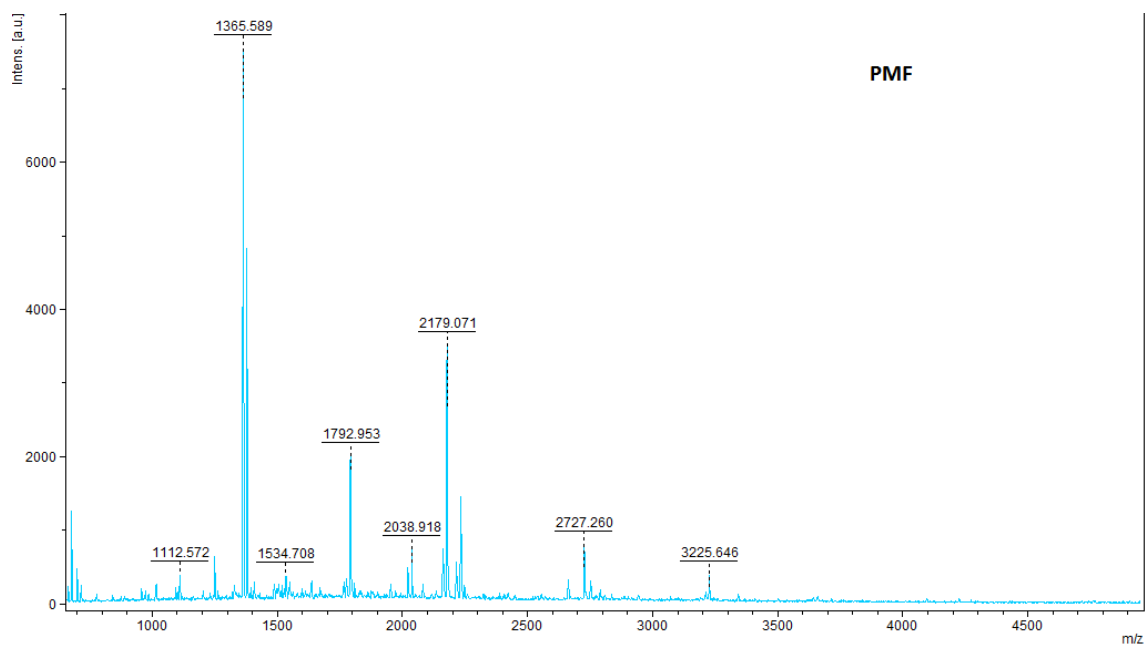
Espectros PMF e MS/MS obtido para a proteína *α -amylase inhibitor, tetrameric, chain CM3 (precursor)* identificada na banda proteica da amostra de trigo (*TR3 - Tabela 43).

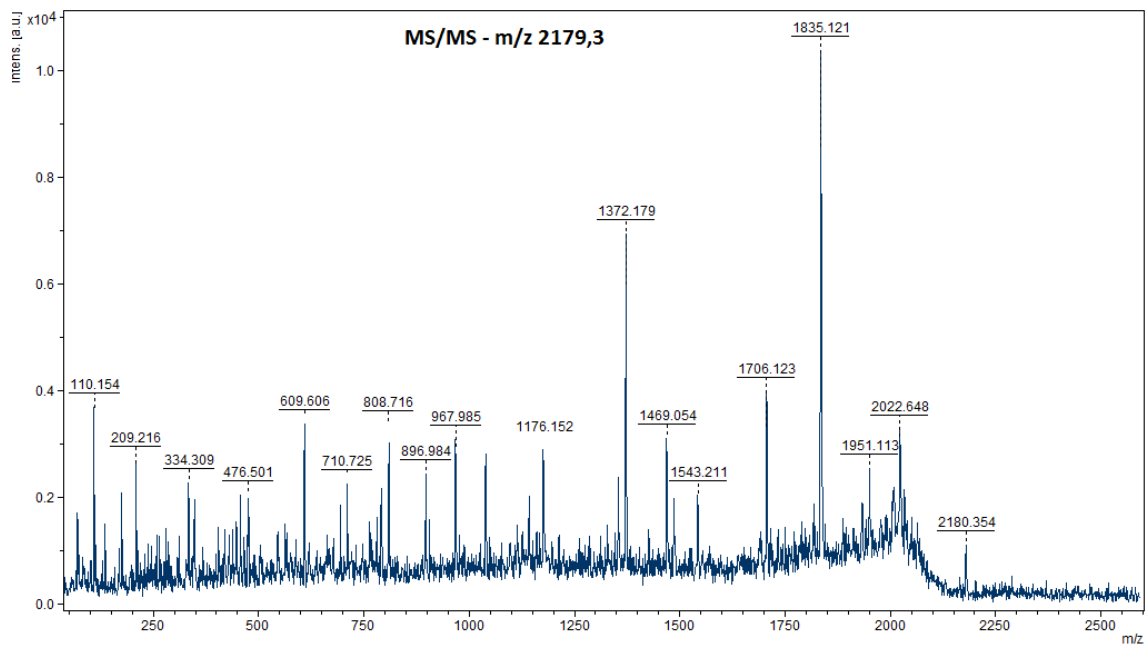
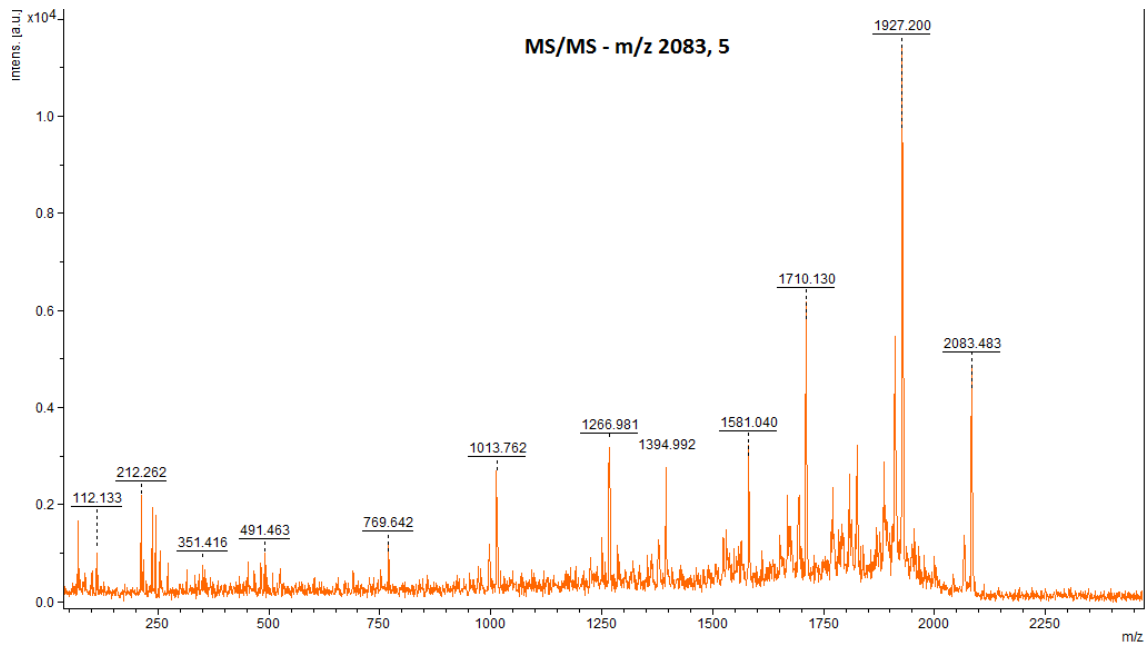


Espectros PMF e MS/MS obtido para a proteína *globulin Beg1* (*precursor*) identificada na banda proteica da amostra de trigo (*TR4 - Tabela 43).

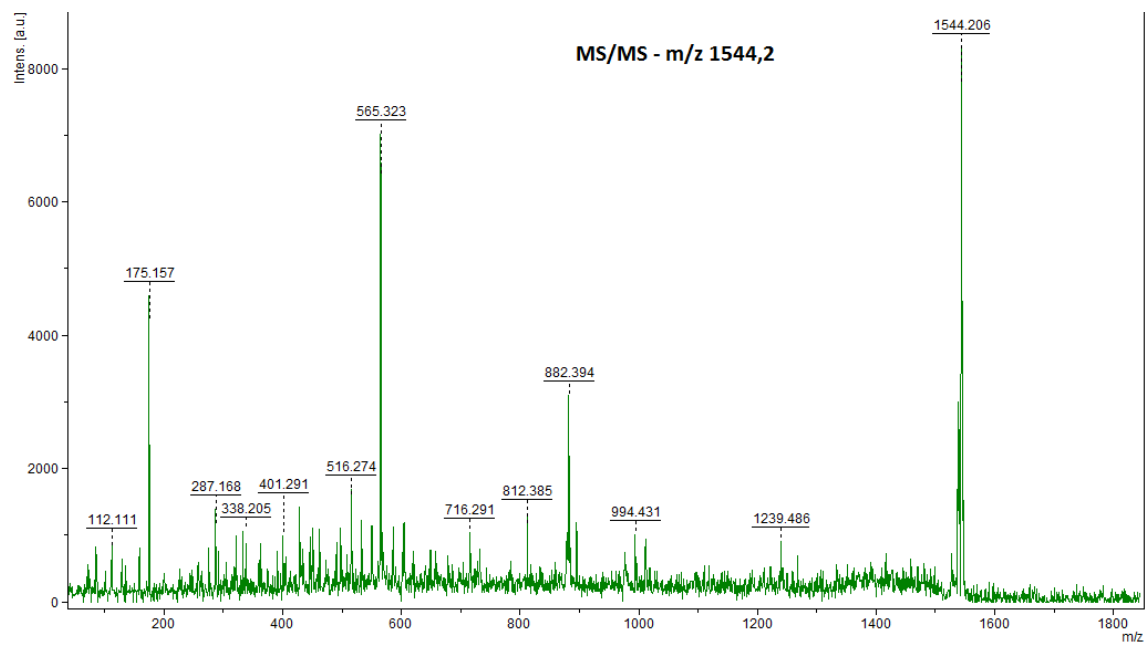
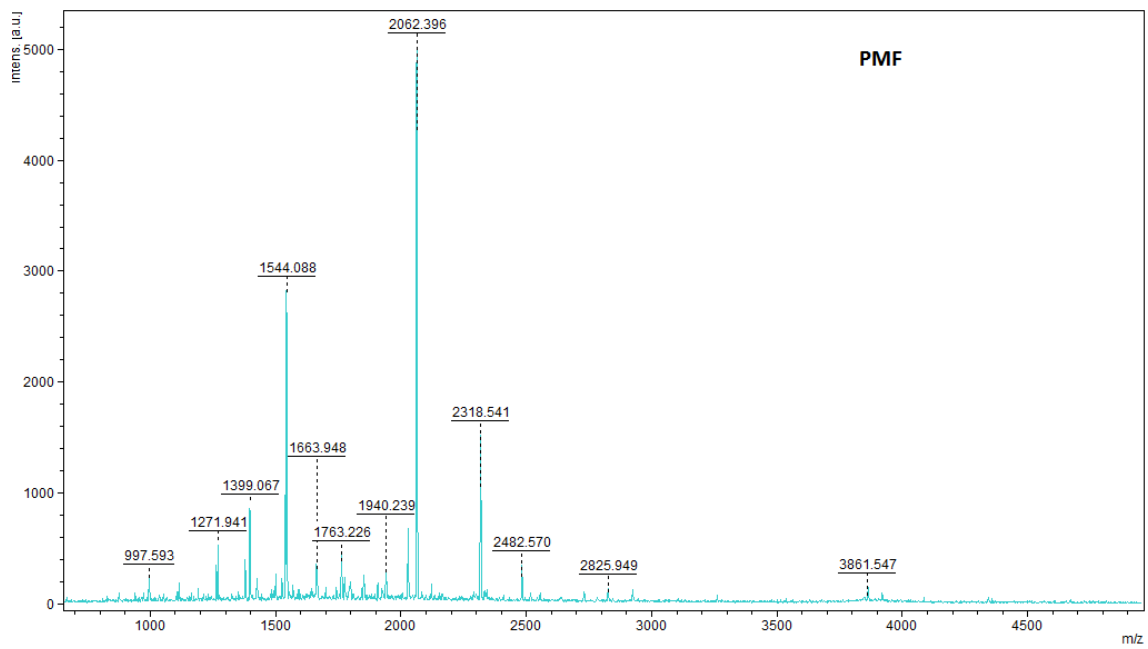


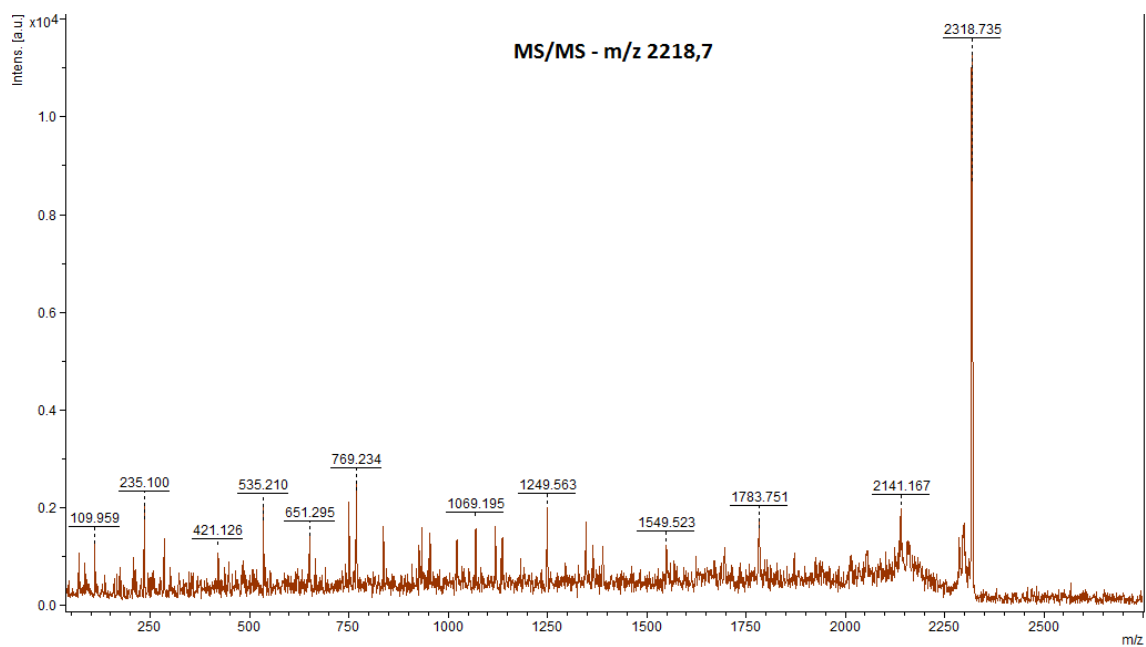
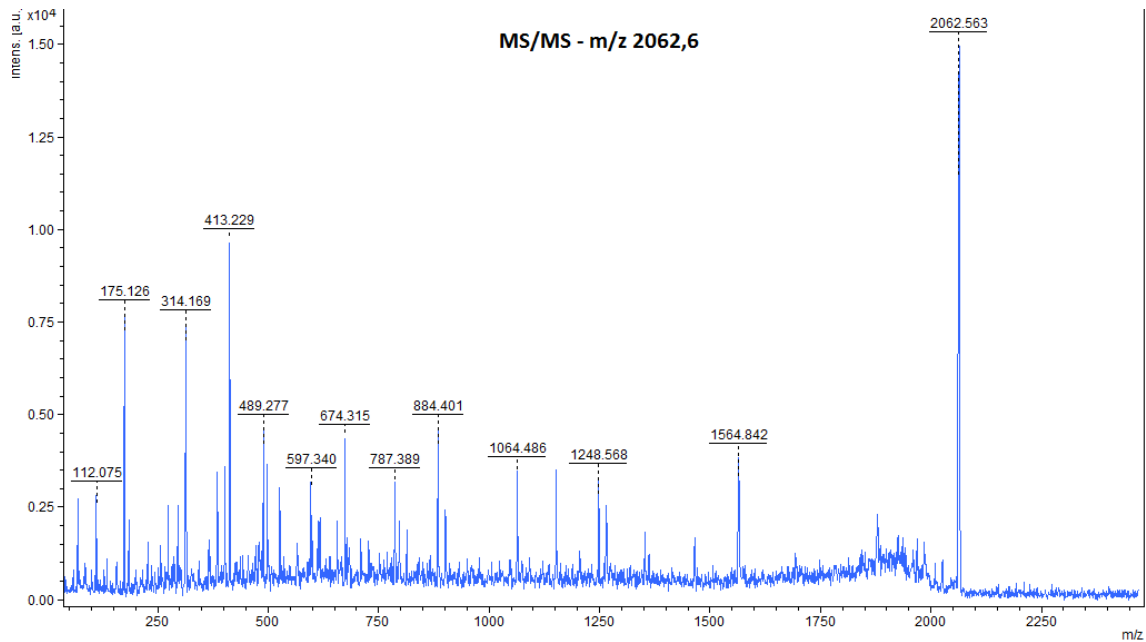
Espectros PMF e MS/MS obtido para as proteínas *β -conglycinin α -chain* (*precursor*) e *Putative dehydrin* (*Fragment*) identificadas na banda proteica da amostra de soja (S1 - Tabela 44).



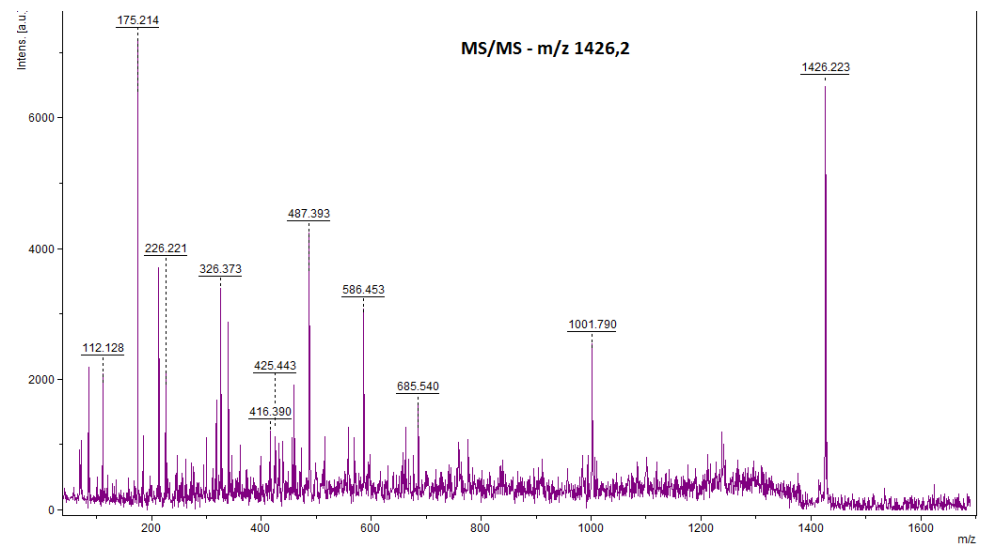
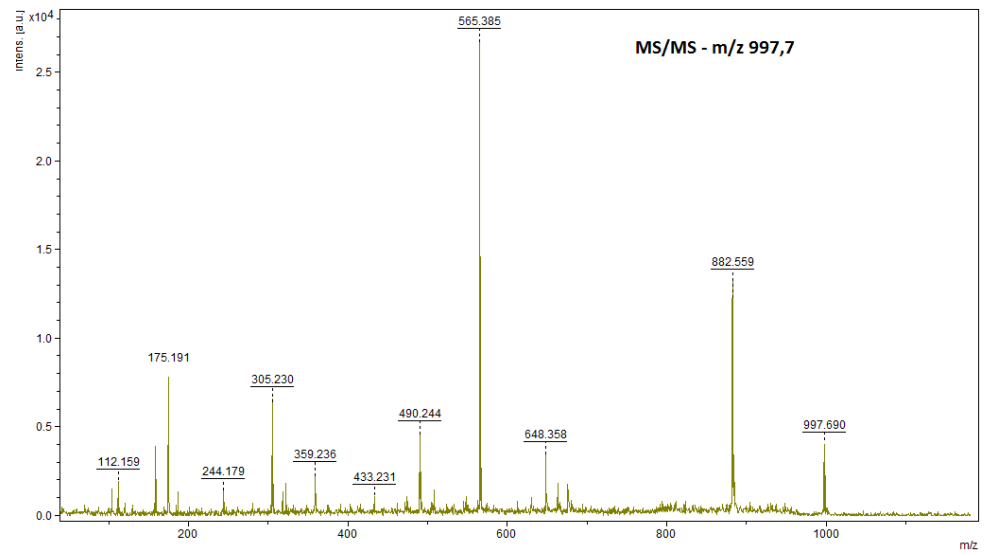
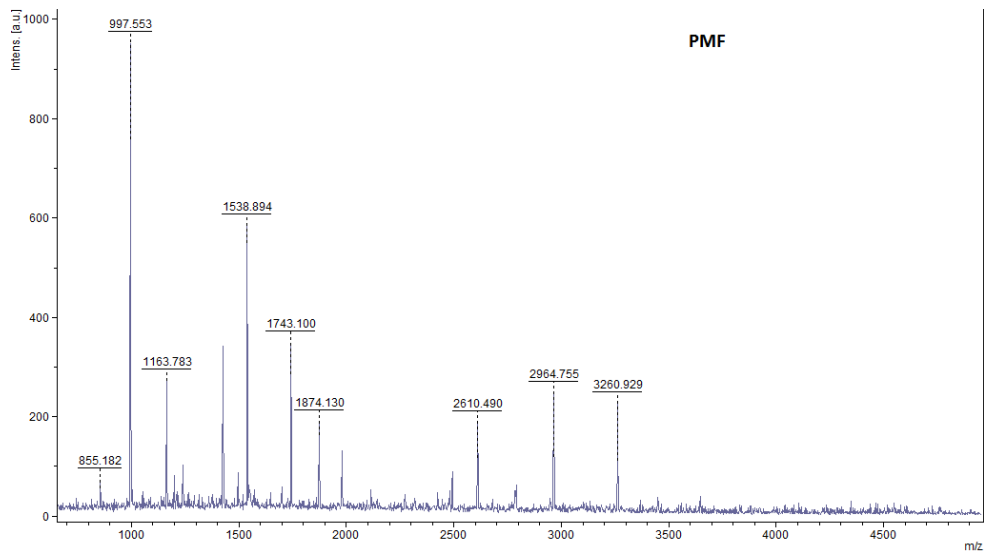


Espectros PMF e MS/MS obtido para as proteínas *Proteinase inhibitor (Bowman-Birk) D-II (precursor)*, *β -conglycinin α -prime subunit* e *Dehydrin* identificadas na banda proteica da amostra de soja (S2 - Tabela 44).

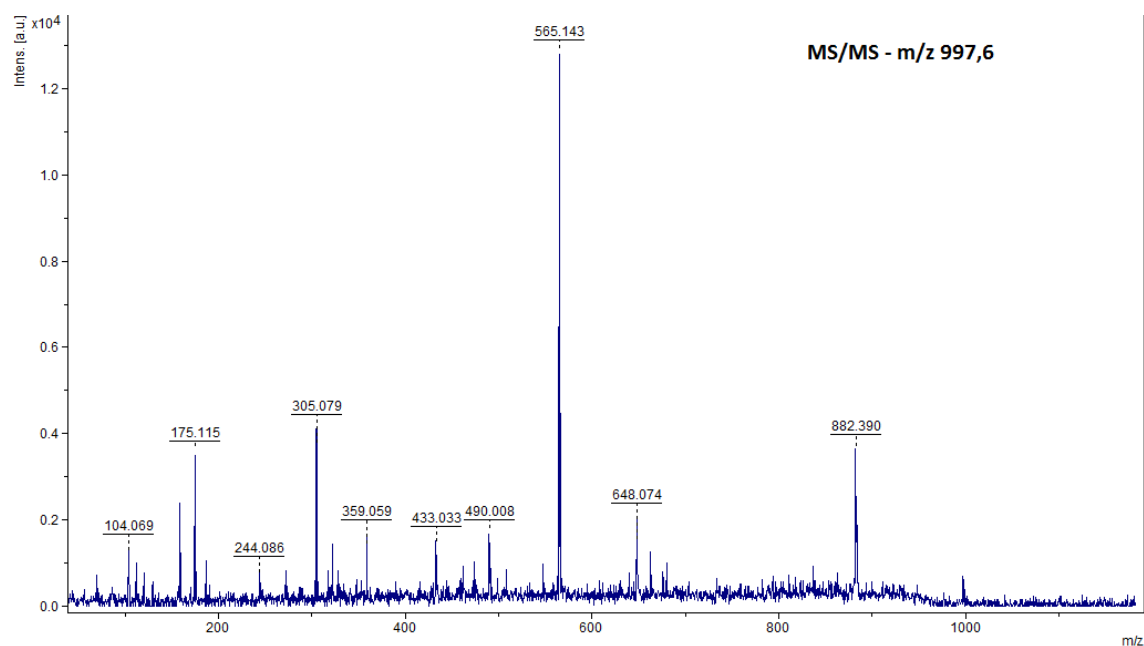
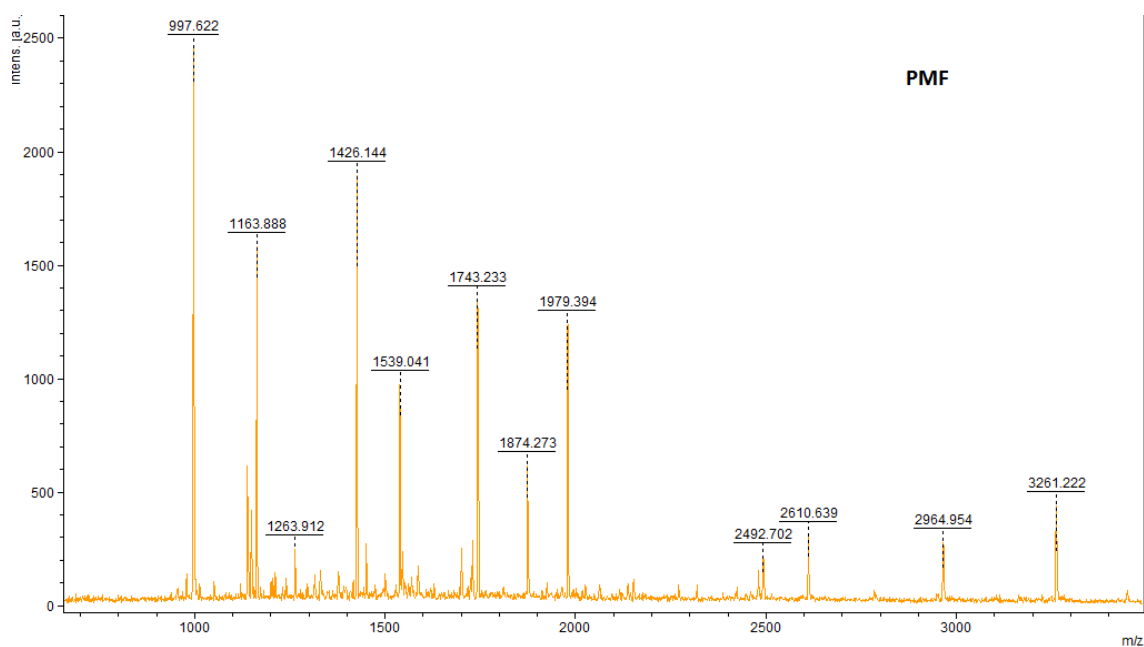




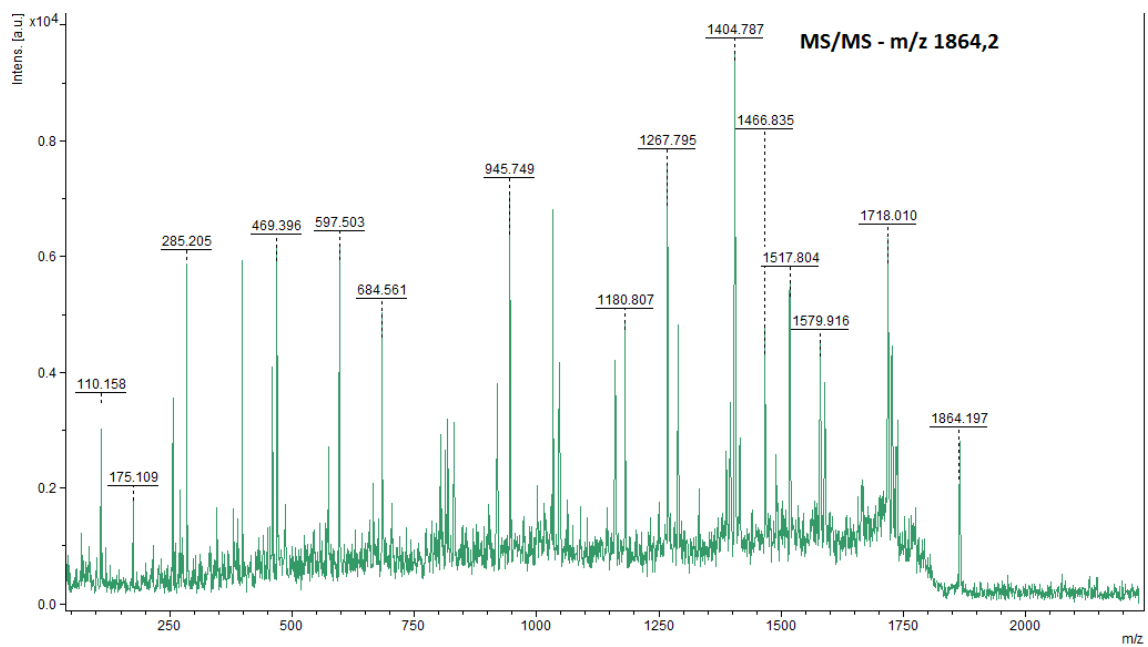
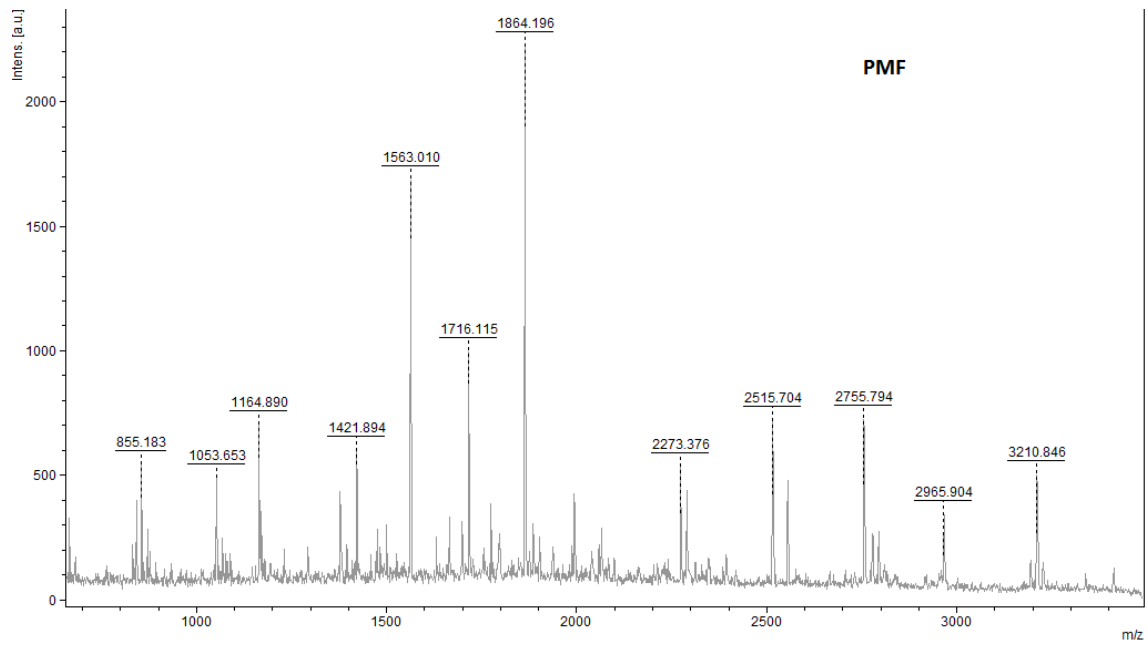
Espectros PMF e MS/MS obtido para as proteínas *Glycinin G5 (precursor)*, *Glycinin A3B4 (G4) subunit* e *Glycinin chain A5A4B3 (precursor)* identificadas na banda proteica da amostra de soja (S2 - Tabela 44).



Espectros PMF e MS/MS obtido para as proteínas *Trypsin inhibitor A (Kunitz)* (*precursor*) e *Glycinin chain A1aBx (precursor)* identificadas na banda proteica da amostra de soja (S2 - Tabela 44).



Espectros PMF e MS/MS obtido para a proteína *Trypsin inhibitor A (Kunitz)* (*precursor*) identificada na banda proteica da amostra de soja (S3 - Tabela 44).



Espectros PMF e MS/MS obtido para a proteína *Glycinin* identificada na banda proteica da amostra de soja (*Soj1* - Tabela 44).

