

ESTUDO DE FRACIONAMENTO DE MANGANÊS EM SPOTS PROTEICOS DE TECIDO MUSCULAR DE PINTADO (*PSEUDOPLATYSTOMA CORRUSCANS*) POR 2D PAGE E XRF SR

Neves, R. C. F^{1*}, Martins, O. A¹, Ávila, F. C¹, Castro, R. G², Silva, F.A³

¹Departamento de Exatas, Faculdades Integradas Regionais de Avaré, Fundação Regional Educacional de Avaré, Avaré, São Paulo, Brasil; ²Instituto de Biociências Departamento de Química e Bioquímica, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil; ³ Universidade Estadual Paulista - Univesp polo Botucatu SP. *E-mail:

renatocassio_neves@hotmail.com

**Resumo – O fracionamento de manganês no músculo do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), foi realizada após a separação de proteínas por 2D-PAGE. A análise de fluorescência de raio-x radiação Síncrotron indicaram a presença de manganês em spots de proteínas dois spots de proteínas do músculo, respectivamente peixes no estado região do Pantanal de Mato Grosso do Sul MS. A indicação de manganês foram encontrados sendo distribuído principalmente em proteínas com uma massa molar inferior a 54 kDa e maior do que 13 kDa, com pI na faixa de 5,0 a 9,0. A concentração de manganês ligado a estas proteínas foi determinada por GFAAS, mostrando as concentrações no intervalo de 1,20-4,82 mg g⁻¹.
Palavra Chave–2Dpage, Proteínas, Eletroforese.**

Abstract

The copper fractionation in muscle of Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), was performed after proteins separation by 2D-PAGE. The SR XRF analysis indicated the presence of manganese in protein spots two protein spots of muscle, respectively fish in the Pantanal region state of Mato Grosso do Sul MS. Manganese ions were found to be distributed mostly in proteins with a molar mass of less than 54 kDa and larger than 13 kDa, with pI in the range of 5.0 to 9.0. The manganese concentration bound to these proteins was determined by GFAAS, showing concentrations in the range of 1.20 to 4.82 mg g⁻¹.

Key- Words – 2 D page, Protein, Electrophoresis

I. INTRODUÇÃO

Na nutrição de peixes, como de outros animais, o manganês é elemento dietético essencial. Tanto a deficiência quanto o excesso desse mineral podem causar alterações nas funções fisiológicas e na resposta imunológica, aumentando a susceptibilidade do animal a infecções [1,2]. Esse mineral possui importantes funções no organismo dos peixes, sendo necessário no metabolismo de vários nutrientes e como constituinte de diversas enzimas. Destaca-se como referência de sua importância a participação como cofator, dentre outras, da enzima ALA-desidrogenase, a qual participa na síntese do heme em sua incorporação no pigmento hemoglobina. Além disso, é indiretamente responsável também pela formação do colágeno e da elastina, e pela conversão da tirosina em melanina em destruição de ânions superóxido, que são espécies reativas do oxigênio, potencialmente destrutivos para as células [1-4].

A importância dos minerais como componentes estruturais e funcionais dos organismos vivos e o fato de grande parte das proteínas e enzimas requerer a presença de um íon metálico para realizar alguma atividade biológica levaram os pesquisadores que trabalham com aquicultura a desenvolverem trabalhos relacionados à influência das metaloproteínas na fisiologia, genética e nutrição de peixes [4-9].

Nesse contexto, atualmente, o desenvolvimento de metodologias analíticas que permitam uma avaliação segura das metaloproteínas e/ou proteínas ligadas a metais presentes no sangue e em tecidos de animais se tornou fundamental.

Principalmente, em relação aos chamados microminerais, como o manganês, os quais apresentam faixas de essencialidade e toxicidade muito próximas e que são transportados em nível celular por diferentes proteínas. Considerando a importância que essas biomoléculas exercem sobre as atividades biológicas dos seres vivos, uma nova área científica denominada metalômica foi proposta recentemente e permitiu a integração de estudos tradicionalmente analíticos com estudos inorgânicos e bioquímicos. O estudo da metalômica das diferentes espécies de peixes poderá fornecer informações valiosas sobre como um íon metálico está distribuído e coordenado às proteínas, como também da concentração individual da espécie metálica, contribuindo assim na elucidação dos aspectos fisiológicos e funcionais dessas biomoléculas [10-13]. Recentemente foram publicados por pesquisadores brasileiros os primeiros resultados obtidos no estudo metaloproteômico da espécie de peixe tilápia do Nilo [14,15]. Nessas publicações, os autores, utilizando 2D-PAGE no fracionamento das proteínas de plasma e tecido hepático, identificaram, por SR XRF, manganês e zinco em 10 proteínas do plasma e cálcio, ferro e zinco em 26 proteínas do fígado. Essas metaloproteínas apresentaram valores de massa molar de 12 a 70 kDa, com ponto isoelétrico (pI) entre 4,7 e 9,4.

Com base no exposto, o presente trabalho teve como objetivo investigar manganês, qualitativa e quantitativamente, em spots de proteínas de amostra de músculo de Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) por SR XRF, após separação por 2D-PAGE. Os dados apresentados no presente trabalho dão continuidade aos estudos iniciais da metalômica dessa espécie de peixe [14,15].

II. MATERIAIS E MÉTODOS

Equipamentos

Além de vidrarias convencionalmente utilizadas em laboratório de Química Analítica, foram empregados os seguintes equipamentos e acessórios: espectrofotômetro UV/visível, marca ThermoSpectronic, modelo Genesys 6, (Rochester,

EUA), sistema para eletroforese 2D-PAGE, marca GE Healthcare, modelo Ettan™ DaltSix (Uppsala, Suécia), sistema para focalização isoelétrica, marca Amersham Biosciences, modelo EPS1001 (Uppsala, Suécia), Scanner (GE Healthcare), espectrômetro de absorção atômica Shimadzu, modelo AA-6800 (Tokyo, Japão) e forno de micro-ondas Provector Analítica, modelo DGT 100 plus (Campinas/São Paulo, Brasil).

Reagentes e soluções

Água ultrapura (18,2 MW cm⁻¹) obtida pelo sistema Elga modelo Purelab Ultra Ionic foi utilizada em todo o trabalho no preparo das soluções. Ácidos acético (J. T. Backer) e fosfórico (Mallinckodt) de pureza analítica, nítrico e clorídrico (Merck) de grau espectroscópico foram utilizados em todo o trabalho no preparo das soluções usadas nas separações eletroforéticas. Todos os solventes orgânicos utilizados (e.g. etanol, acetona, metanol) foram de pureza analítica e de procedência Merck. As soluções utilizadas nas separações eletroforéticas e nas determinações de proteína total foram preparadas com reagentes de pureza analítica de procedência Amersham Biosciences. Todas as soluções foram estocadas em frascos de polipropileno e/ou vidro, sendo que as soluções utilizadas nas separações eletroforéticas foram guardadas em refrigerador a 4 °C ou em freezer a -20 °C. Todos os frascos de estocagem das soluções tampões, soluções extratoras, padrões proteicos e vidrarias foram lavados com ácido nítrico 10% v/v por 24 h e, em seguida, enxaguados com água ultrapura e secos por jatos de ar puro antes da utilização.

Coleta e preparo das amostras

As amostras de músculo foram obtidas a partir do Pintado (*Pseudoplatystoma Porruscans*) coletadas na região do Pantanal Mato Grosso do Sul, na cidade de Corumbá, bacia do rio Paraguai, com auxílio Embrapa Pantanal. Os peixes foram anestesiados com solução de benzocaína (100 mg L⁻¹) para coleta de sangue do vaso caudal com auxílio de seringa de 1,0 mL para obtenção da amostra de plasma. Após este procedimento, os peixes anestesiados com benzocaína foram eutanasiados para retirada de filés do músculo. As amostras de músculo foram então transferidas para

frascos de polipropileno de 15 mL e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Preparação das amostras para eletroforese

Aproximadamente 1 g das amostras de músculo foi macerada separadamente em água ultrapura, com auxílio de almofariz e pistilo. Em seguida, os extratos contendo as proteínas de músculo e fígado foram separados da parte sólida por centrifugação a 13000 rpm e a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min, em ultracentrífuga refrigerada. Os extratos proteicos obtidos dessas amostras foram transferidos para tubos do tipo Eppendorf e utilizados posteriormente para quantificação dos teores proteicos e corridas eletroforéticas.

As amostras de músculo e o extrato proteico de foram submetidos a um processo de remoção de albumina por meio do uso de um kit de remoção de albumina (Millipore), visto que essas amostras apresentam altas concentrações dessa proteína [16,17]. Após o procedimento de remoção de albumina, foram tratados com solução gelada de acetona 80% (v/v) na proporção 1:4 (amostra: acetona) para precipitação das proteínas. Essa precipitação foi conduzida durante 3 h a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, garantindo que a precipitação ocorresse de maneira quantitativa. Em seguida, os precipitados proteicos foram centrifugados a 13000 rpm em ultracentrífuga refrigerada por 10 min e o sobrenadante foi retirado. Os precipitados proteicos foram lavados duas vezes com a solução de acetona gelada utilizada para a precipitação. Após estes procedimentos parte dos precipitados foi ressolubilizado em solução de NaOH a $0,50\text{ mol L}^{-1}$ para quantificação do teor total de proteínas, e outra parte foi ressolubilizada em tampão contendo ureia a 7 mol L^{-1} , tiourea a 2 mol L^{-1} , CHAPS a 2% (m/v), anfólitos de pH 3 a 10 a 0,5% (v/v), azul de bromofenol a 0,002% (m/v) e 2,8 mg de DTT para ser utilizada nas separações eletroforéticas [18].

Determinação da concentração de proteínas totais

A concentração de proteínas totais nos extratos proteicos foi determinada de acordo com o método de Bradford. 19 Curvas analíticas de calibração foram feitas com padrões de 25 a 100

mg mL^{-1} a partir de solução padrão estoque de 500 mg mL^{-1} de albumina de soro bovino. O procedimento experimental utilizado foi: em cubetas de vidro foram adicionados 200 mL de padrão e/ou amostra diluída apropriadamente, e 2,5 mL do reagente de Bradford. Após 5 min de reação, as leituras de absorvância foram medidas a 595 nm em espectrofotômetro.

Separações eletroforéticas

Antes do início das separações eletroforéticas, volumes de 250 mL dos extratos proteicos (contendo 1 mg mL^{-1} de proteína total) foram aplicados em fitas de 13 cm que continham o gel pré-fabricado com os anfólitos imobilizados de pH 4 a 7 para amostras do plasma e de pH 3 a 10 para amostras de músculo e tecido hepático. Essas fitas, utilizadas na etapa de focalização isoeletrica, foram colocadas em um aparato sobre o qual permaneceram por 12 h à temperatura ambiente para serem hidratadas com o extrato proteico. Além do extrato proteico, foram adicionados também cerca de 900 mL de óleo mineral sobre essas fitas, a fim de evitar o ressecamento das mesmas. Após este período, a fita hidratada foi levada ao sistema para focalização isoeletrica para corrida em primeira dimensão da eletroforese bidimensional, utilizando a seguinte programação de tensão: [14,15] etapa 1 = 500 V, com acúmulo de 500 Vh; etapa 2 = 1000 V, com acúmulo de 800 Vh; etapa 3 = 10000 V, com acúmulo de 11300 Vh; etapa 4 = 10000 V, com acúmulo de 3000 Vh.

O programa de separação em primeira dimensão durou em média 4,5 h. Após o término da focalização isoeletrica, a fita com as proteínas separadas em função do pI foi equilibrada em duas etapas. Na primeira, foram utilizados 10 mL de solução contendo ureia 6 mol L^{-1} , SDS 2% (m/v), glicerol 30% (v/v), Tris-HCl 50 mmol L^{-1} , azul de bromofenol 0,002% (m/v) e DTT 1% (m/v). Esta etapa denominada redução tem a finalidade de manter as proteínas em suas formas reduzidas. Na segunda etapa foi utilizada uma solução de composição similar, porém, substituindo-se o DTT por iodoacetamida 2,5% (m/v). Esta etapa é denominada alquilação e sua finalidade é alquilar os grupos tióis das proteínas, prevenindo que elas sejam reoxidadas

durante o processo eletroforético. Cada uma destas etapas durou 15 min e foi feita sob leve agitação em mesa agitadora [14-18].

Após a etapa de equilíbrio das fitas foi feita a segunda dimensão do processo eletroforético (SDS-PAGE). A fita de proteínas do plasma foi aplicada em gel de poliacrilamida 10% (m/v) e as fitas de músculo e fígado em gel de poliacrilamida 12,5% (m/v), previamente preparados em placa de vidro de 180 x 160 x 1,5 mm. Os géis de poliacrilamida foram preparados a partir das seguintes soluções: acrilamida, N,N'-metilenobisacrilamida, tris-hidroximetil amino metano, dodecil sulfato de sódio (SDS), N,N',N,N'-tetrametilenodiamina (TEMED), ácido clorídrico e persulfato de amônio. Foi colocado sobre o gel de poliacrilamida, ao lado da fita, um pedaço de papel de filtro ao qual foram aplicados 10 mL de padrão de massa molar contendo as proteínas β -fosforilase (97,0 kDa), albumina (66,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa). A fita e o papel de filtro foram vedados. Com solução quente de agarose 0,5% (m/v) em tampão adequado, de modo a garantir o contato destes com o gel de poliacrilamida. Em seguida, a corrida eletroforética em segunda dimensão foi efetuada em sistema para eletroforese 2D-PAGE, em duas etapas, utilizando a seguinte programação: 14,15 etapa 1 – tensão (V) = 90, corrente elétrica (mA) = 25, potência (W) = 100, tempo (h) = 0,5; etapa 2 – tensão (V) = 250, corrente elétrica (mA) = 25, potência (W) = 100, tempo (h) = 5.

Após o período de corrida (aproximadamente 5,5 h) as proteínas foram fixadas durante 1 h empregando-se solução contendo ácido acético 10% (v/v) e etanol 40% (v/v). Posteriormente, as proteínas foram reveladas empregando-se o corante coomassie coloidal, que consiste em uma solução de sulfato de amônio 8% (m/v), ácido fosfórico 1,6% (v/v), azul de coomassie G-250 0,08% (m/v) e metanol 25% (v/v). O corante ficou em contato com o gel durante 72 h e depois foi removido por sucessivas lavagens com água ultrapura [20]. Os géis obtidos, feitos em triplicata para os três tipos de amostra, foram escaneados em scanner GE Healthcare. As imagens escaneadas foram analisadas utilizando o programa ImageMaster 2D Platinum 7.0 para se obter a correlação entre as repetições de géis,

a contagem de spots em cada réplica de gel e a estimativa da massa de proteína presente nos spots.

XRFSR – Fluorescência de raios-X radiação Síncrotron de Mn nos spots proteicos

As determinações qualitativas de manganês nos spots proteicos das amostras de músculo foram feitas em linha de fluorescência de raios-X com radiação Síncrotron, disponível no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, em Campinas-SP/Brasil. Os spots de proteínas foram retirados do gel com o auxílio de uma ponteira de pipeta, secos com lâmpada de infravermelho durante 20 min e fixados em plataforma de alumínio. Após serem estabelecidas as condições de análise, o mapeamento do manganês foi realizado por irradiação do spot por 200 s em dois pontos. Os espectros coletados foram processados por meio do programa AXIL, que permite corrigir a variação da intensidade do feixe da radiação Síncrotron, fazendo-se a normalização da área dos picos das espécies químicas detectadas pela contagem do pico de argônio [21]. Na figura 1, análise de amostra de músculo inserida no suporte para realização de Fluorescência de raios-X radiação Síncrotron.

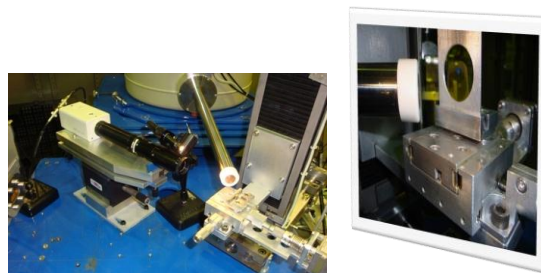


Figura 1. Amostra de músculo para determinação de XRFSR.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Determinação da concentração de proteínas totais nas amostras

As determinações do teor total de proteína nos extratos proteicos das amostras foram feitas

para se obter a melhor massa proteica a ser aplicada nos géis das corridas eletroforéticas por 2D-PAGE, levando-se em consideração a concentração do gel. Os resultados dessas determinações indicaram que os extratos proteicos da amostra músculo continham $25,1 \pm 0,17$; mg mL^{-1} , respectivamente.

Com base nesses resultados, volumes de 10 mL dos extratos das amostras foram diluídos com água ultrapura para um volume de 250 mL e aplicados nas tiras contendo géis pré-fabricados para a etapa de IEF, o que corresponde a uma massa de aproximadamente 250 mg de proteína.

Separações eletroforéticas

Na eletroforese 2D-PAGE cada mancha no gel, ou mais comumente denominado spot, representa uma única proteína [23]. Todas as corridas eletroforéticas dos extratos das amostras foram feitas em triplicata. Análises de correlações e a contagem do número de spots também foram feitas entre as repetições dos géis. As Figuras 1 mostram os géis obtidos a partir dos extratos proteicos das amostras de músculo, com os spots proteicos nos quais foi detectado manganês por SR XRF destacados com um círculo.

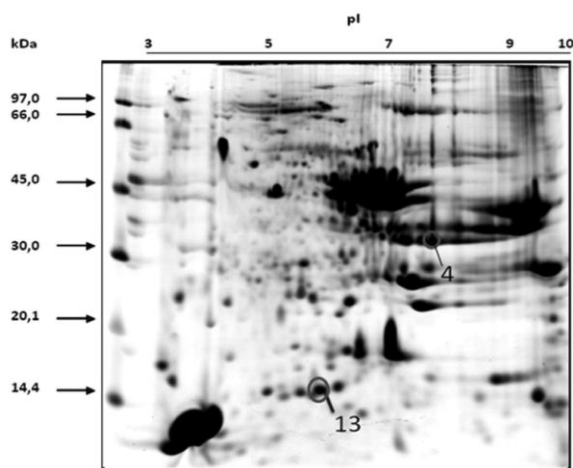


Figura 2. Gel de poliácridamida 12,5% (m/v) do músculo de pintado com pI de 3 a 10 e massa molar de proteína entre 14,4 e 97 kDa

Conforme mostram as Figuras 1, o gel da amostra de músculo apresentaram grande diversidade de spots proteicos, alguns mais intensos, com pI e massa molar entre 5-9 e 10-

70 kDa para o músculo. As análises das imagens das repetições dos géis das amostras de músculo apresentaram correlações de 89,5; 71,7 e 65,35%, com número médio de spots de 555 ± 13 , 470 ± 16 e 505 ± 12 , respectivamente.

Avaliação Mn por SR XRF nos spots proteicos

A avaliação qualitativa de manganês ligado às proteínas dos spots proteicos foi feita por fluorescência de raios-X radiação Síncrotron-SR XRF, considerando-se a sensibilidade dessa técnica e que possivelmente as concentrações de manganês nos diversos spots estariam na faixa de $\mu\text{g kg}^{-1}$ ou mg kg^{-1} [24]. As Figuras 4-6 apresentam os gráficos dos espectros de fluorescência obtidos nas análises por SR XRF dos spots proteicos 4 e 13 das amostras de músculo de pintado, respectivamente.

De forma geral, todos os espectros obtidos nas análises por SR XRF apresentaram fundos contínuos intensos. Tais fundos se devem principalmente, ao espalhamento Compton dos raios-X incidentes sobre a matriz do gel, o qual pode mascarar os sinais do elemento de interesse.

Dessa forma, utilizando os valores das áreas dos picos normalizados (após desconto do branco analítico) dos espectros de SR XRF, foi possível identificar manganês ($\text{ka}1 = 8,047$, $\text{kb}1 = 8,904$) ligado às proteínas dos spots destacados com um círculo, apresentados nas Figuras 1-3.

Como pode ser visto no espectro da Figura 4, além do manganês foi detectada a presença de outros íons como enxofre e fósforo, não metais que podem estar presentes na estrutura da proteína do spot analisado. A presença de mais de um íon metálico/metalóide em spots de proteínas é aceitável, já que uma única metaloproteína ou proteína metal ligante pode ter vários sítios ativos formados por átomos de íons de diferentes elementos [24]. Os picos de grande intensidade relativos ao argônio ($\text{ka}1 = 2,957$) e ao silício ($\text{ka}1 = 1,740$), que aparecem em todos os espectros, são esperados, pois neste caso o silício está presente na fita em que é fixada a amostra do spot proteico e o argônio está presente no ar ambiente a uma taxa constante de 0,934% v/v. Na Tabela 1 são apresentados os spots nos quais foi identificada a presença de Mn.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 1 pode-se sugerir a presença de manganês em três spots proteicos de músculo. Sendo que, de forma geral, os íons manganês identificados por SR XRF estão ligados a proteínas com massa molar entre 54 e 13 kDa e com pI de 5,3 a 9,3

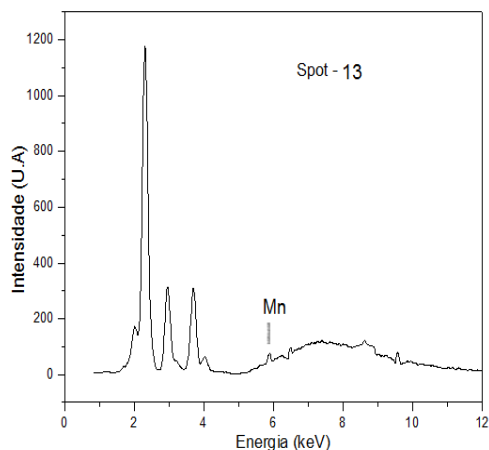


Figura 4. Espectro de fluorescência de raios-X com radiação síncrotron obtido do spot proteico 13 do músculo de tilápia do Nilo

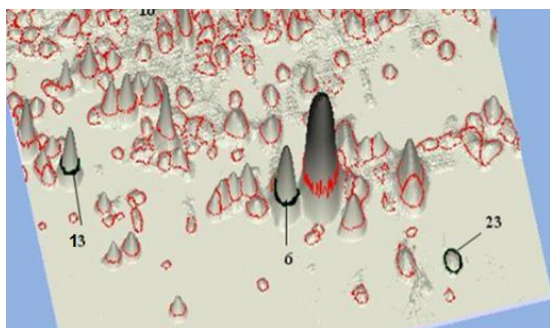


Figura 3. Gel de poliacrilamida em segunda dimensão, imagem em 3D, spot proteico 13 do músculo de tilápia do Nilo

IV. CONCLUSÃO

A utilização da eletroforese 2D-PAGE como etapa inicial no estudo de avaliação de metaloproteínas foi eficiente no fracionamento das proteínas presentes em amostras de músculo de Pintado (*Pseudoplatystoma* *Orruscans*). A boa correlação obtida nas repetições dos géis indicou que os procedimentos de extração de proteínas totais preservaram a estrutura metal-proteína, o que possibilitou o mapeamento de manganês nos

spots proteicos por SR XRF e posterior quantificação desse elemento por GFAAS. A quantificação do manganês nos spots proteicos permitiu se fazer uma estimativa do número de átomos desse elemento por molécula de proteína, verificando-se que todas as proteínas dos spots proteicos estudados apresentam proporções de um a dois átomos de manganês por molécula de proteína, indicando, assim, que se pode tratar de metaloproteínas.

AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo e Pesquisa do estado de São Paulo – FAPESP
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- Cnpq – Bolsa PD – Junior
Laboratório Nacional Luz Síncrotron – LNLS-Campinas SP.
Universidade Federal de São Paulo – Unifesp, departamento de Bioquímica

REFERÊNCIAS

1. KNOX D., COWEY, C. B., ADRON, J. W. Effects of dietary copper and copper :zinc ratio on rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Aquaculture*, 27, 111-119, 1982.
2. GATLIN D.M., WILSON P.W. Characterization of iron deficiency and the dietary iron requirement of fingerling channel catfish. *Aquaculture* 52, 191-198, 1986.
3. NEVES R. C. F., MORAES P. M., SILVA F. A., LOUREIRO, V. R., SALEH M. A. D., PADILHA C. C. F., BARROS, M. M., PADILHA P. M. Determination of copper in fish feed by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry using slurry sampling. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety* 2, 274-279, 2008.
4. NEVES, R. C. F.; MORAES, P. M.; SALEH, M. A. D.; LOUREIRO, V. R.; SILVA, F. A.; BARROS, M. M.; PADILHA,

- C. C. F.; JORGE, S. M.A.; PADILHA P. M. FAAS determination of metal nutrients in fish feed after ultrasound extraction. *Food Chemistry* 113, 679-683, 2009.
5. SA, M. V. C., PEZZATO, L. E., BARROS, M. M., PADILHA P. M. Optimum zinc supplementation level in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* juveniles diets. *Aquaculture* 238, n.1-4, 385-401, 2004.
6. SA, M. V. C., PEZZATO, L. E., BARROS, M. M., PADILHA P. M. Relative bioavailability of zinc in supplemental inorganic and organic sources for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fingerlings. *Aquaculture Nutrition*, Oslo-Noruega, v. 11, n. 4, p. 273-285, 2005.
7. SILVA, F. A., NEVES, R. C. F., QUINTERO-PINTO, L. G., PADILHA, C. C. F., JORGE, S. M. A., BARROS, M. M., PEZZATO, L. E., PADILHA P. M. Determination of selenium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the bioavailability of this micronutrient in feed used in pisciculture. *Chemosphere* 68, 1542-1547, 2007.
8. LOUREIRO, V. R.; SALEH, M. A. D.; MORAES, P. M.; NEVES, R. C. F.; PADILHA, C. C. F.; PADILHA P. M. Manganese Determination by GFAAS in Feces and Fish Feed Slurries. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 18, 1235-1241, 2007.
9. SILVA, F. A.; PADILHA, C. C. F.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; PADILHA P. M. Determination of chromium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the apparent digestibility of nutrients in feed used in pisciculture. *Talanta* 69, 1025-1030, 2006.
10. HARAGUCHI, H. Metallomics as integrated biometal science, *J. Anal. At. Spectrom.* 19, 5-14, 2004.
- [11] SZPUNAR, P. Metallomics: a new frontier in analytical chemistry, *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 54-56, 2004.
12. GÓMEZ-ARIZA J. L., GARCIA-BARRERA T., LORENZO F., BERNAL, V., VILLEGAS, M. J., OLIVEIRA, V. Use of mass spectrometry techniques for the characterization of metal bound to proteins (metallomics) in biological systems, *Anal. Chim. Acta.* 524, 15-22, 2004.
13. GARCIA J. S., MAGALHÃES C. S., ARRUDA M.A.Z. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis, *Talanta* v. 69, p. 1-15, 2006.
14. HAMES, B. D.; RICKWOOD, D. *Gel Electrophoresis of proteins: A practical approach.* 2ª ed., New York: IRL Press, 1990. 383p.
15. BERKELMAN, T.; STENSTEDT, T.; 2-D Electrophoresis: Principles and Methods. Uppsala: Amersham Biosciences, 1998. 101p.
16. LANÇAS, F.M.; SILVA, J.C.R.; BICUDO, R.C.; NETO, M.B. A química analítica do proteoma. *Analytica*, v.6, p.60-67, 2003.
17. BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of proteins utilizing principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry.* v.72, p.248-254, 1976.
18. CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G.M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P.G. Blue silver: a very sensitive colloidal coomassie G-259 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, v.25, p.1327-1333, 2004.
19. WESELOH, G., KUHBACHER, M., BERTELSMANN, H., OZASLAN, M., KYRIAKOPOULOS, A., KNOCHER, A., BEHNE, D. Analysis of metal-containing proteins by gel electrophoresis and synchrotron radiation X-ray fluorescence. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 259, 473, 2004.
20. SALEH, M. A. D.; NEVES, R. C. F.; SILVA, F. A.; MORAES, P. M.; LOUREIRO, V. R.; ROLDAN, P. S.; PADILHA, P.D.

GFAAS Determination of Zinc in Fish Feed and Feces Using Slurry Sampling .. Food Analytical Methods, 2, 162-168, 2009.

21. GARCIA, J. S., SOUSA, G. H. M. F., EBERLIN, M. N., ARRUDA, M. A. Z. Evaluation of metal-ion stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves through proteomic changes. *Metallomics*, 1, p. 107-113, 2009.

22. VERBI, F. M., ARRUDA, S. C. C., RODRÍGUEZ, A. P. M., PÉREZ, C. A., ARRUDA, M. A. M. Metal-binding proteins scanning and determination by combining gel electrophoresis, synchrotron radiation X-ray fluorescence and atomic spectrometry. *J. Biochem. Biophys. Meth.*, v. 62, p. 97-109, 2005.

23. SUSSULINI, A. ; GARCIA, J. S. ; MESKO, M. F. ; MORAES, D. P. ; FLORES, É. M. ; PEREZ, C. A. ; ARRUDA, M. A. Z. . Evaluation of soybean seed protein extraction focusing on metalloprotein analysis. *Mikrochimica Acta*, 158, p. 173-180, 2007.

24. WIND, M., LEHAMANN, W. D. Element and molecular mass spectrometry – an emerging analytical team in the life sciences. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19, p. 20-25, 2004.

25. Sussulini, A.; Garcia, J. S.; Mesko, M. F.; Moraes, D. P.; Flores, E. M.; Pérez, C. A.; Arruda, M. A. Z.; *Acta* 2007, 158, 173.

26. Wind, M.; Lehamann, W. D.; *J. Anal. At.Spectrom. Espectrometry mas. Microchim.*2004, 19, 20.

27. Padilha, C. C. F.; Moraes, P. M.; Garcia, L. A.; Pozzi, C. M. C.; Lima, G. P. P.; Valente, J. P. S.; Jorge, S. M. A.; Padilha, P. M.; *Food Anal. Meth.* 2011, 4, 325.