

Estudo metaloproteômico de cálcio em tecido muscular de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Paula M. Moraes¹ (PG)*, Bruna Cavecci¹ (IC), Felipe A. Santos¹ (PG), Paula M. Lima² (PG), Carla M. C. Pozzi¹ (PG), Renato C. F. Neves² (PG), Pedro M. Padilha^{1,3} (PQ). *paulamartin@ibb.unesp.br

¹ UNESP - IB – Departamento de Química e Bioquímica – Botucatu, SP

² UNESP - FMVZ – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – Botucatu, SP

³ INCT Bioanalítica – IQ Unicamp – Campinas, SP

Palavras Chave: Cálcio, metaloproteínas, 2D-PAGE, SR XRF, FAAS.

Introdução

Devido à importância que as metaloproteínas exercem sobre as atividades biológicas dos seres vivos, a área científica denominada metalômica foi proposta recentemente e permitiu a integração de estudos tradicionalmente analíticos com estudos inorgânicos e bioquímicos.¹ O estudo das metaloproteínas presentes no sangue e em diferentes tecidos de peixes poderá trazer informações importantes para as áreas de fisiologia, genética e nutrição desses animais.^{1,2} Com base no exposto, no presente trabalho são apresentados resultados preliminares obtidos no estudo metaloproteômico de amostras de tecido muscular de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) utilizando eletroforese bidimensional (2D-PAGE), espectrometria de fluorescência de raios-X com radiação síncrotron (SR XRF) e espectrometria de absorção atômica (FAAS).

Resultados e Discussão

Amostras de músculo em um pool de aproximadamente 1 g foram maceradas em 1 mL de água ultra-pura, com auxílio de almofariz e pistilo. Posteriormente, as proteínas presentes no extrato foram precipitadas com acetona na proporção 1:4 (m/v). O precipitado foi solubilizado em tampão específico e aplicado em fitas de IEF com gel pré-fabricado com anfólitos imobilizados (pH 3 a 10). Depois de hidratadas por 12 h, as fitas foram levadas ao sistema de IEF para corrida em primeira dimensão. Após essa etapa, as fitas foram equilibradas em tampão específico por 15 minutos e aplicadas em géis de poliacrilamida a 12,5% (m/v) juntamente com padrões de massa molar, para corrida em segunda dimensão. Ao término das etapas de separações, os spots protéicos foram fixados no gel e corados com Coomassie Blue. Em seguida, os spots foram recortados do gel, secos com lâmpada infravermelha e analisados por SR XRF para determinação qualitativa de cálcio. Finalmente, os spots protéicos que apresentaram cálcio foram mineralizados para determinação quantitativa por FAAS.^{2,3}

A análise por SR XRF detectou cálcio em oito spots protéicos, com massas molares de 11 a 60 kDa e com pI entre 4,7 e 9,6. As concentrações de cálcio determinadas nos spots protéicos apresentaram valores de 1,1 a 5,5 mg g⁻¹. Essas

concentrações de cálcio nos spots proteicos foram convertidas para número de átomos por molécula de proteína, considerando a massa de proteína em cada spot e as respectivas massas molares. Os resultados obtidos nesses cálculos estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1. Estimativa do número de átomos de cálcio ligados às proteínas dos spots protéicos do pool de amostras de músculo de tilápia do Nilo.

Mm Spot (kDa)	Moléculas Proteínas (10 ¹³)	Átomos de Cálcio (10 ¹³)
23,8	3,54	3,40
35,1	5,32	5,17
40,6	3,26	6,41
56,6	1,38	2,75
14,6	7,92	15,60
14,3	8,90	17,40
58,3	1,65	3,24
11,2	9,14	9,32

Conclusões

A utilização da 2D-PAGE na investigação de proteínas de tilápia do Nilo possibilitou o fracionamento dessas macromoléculas para posterior determinação de cálcio por SR XRF e FAAS. Os resultados obtidos nessas determinações permitiram estimar que as proteínas dos spots protéicos apresentam proporções de um a dois átomos de cálcio por molécula de proteína, indicando assim, que podem ser metaloproteínas ou proteínas de metal ligante.

Agradecimentos

FAPESP, CNPq e LNLS.

¹ Garcia, J. S.; Magalhães, C. S. e Arruda, M. A. Z. *Talanta* **2006**, *69*, 1.

² Lima, P. M. et. al. *Talanta* **2010**, *82*, 1052.

³ Santos F. A. et. al. *Microchim Acta* **2011**, in press.