

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

**ANA CLARA FELIX VIDA**

**A eletroforese capilar para a separação das metalotioneínas da  
cianobactéria (*Synechococcus* PCC 7942) e de mamíferos**

**Piracicaba  
2011**

**ANA CLARA FELIX VIDA**

**A eletroforese capilar para a separação das metalotioneínas da  
cianobactéria (*Synechococcus* PCC 7942) e de mamíferos**

Dissertação apresentada ao Centro de Energia  
Nuclear na Agricultura da Universidade de São  
Paulo para obtenção do título de Mestre em  
Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura  
e no Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Maria Fernanda  
Georgina Giné Rosias

**Piracicaba  
2011**

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
**Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP**

Vida, Ana Clara Felix

A eletroforese capilar para a separação das metalotioneínas da cianobactéria (*Synechococcus* PCC 7942) e de mamíferos / Ana Clara Felix Vida; orientadora Maria Fernanda Georgina Giné Rosias. - - Piracicaba, 2011. 72 f.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Eletroforese capilar de zona 2. Método de separação 3. Proteínas  
4. Química analítica instrumental I. Título

CDU 543.545.2:577.112

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra. Maria Fernanda G. Gine Rosias pela orientação.

Ao Programa de Pós-Graduação do CENA/USP.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À Profa. Dra. Marli de Fátima Fiore e Dra. Estela Stenico pelas amostras das metalotioneínas da cianobactéria *Synechococcus* PCC 7942 purificadas.

À Seção de Química Analítica.

À Marília Ribeiro Garcia Henyei pelas referências bibliográficas.

## RESUMO

VIDA, A. C. F. **A eletroforese capilar para a separação das metalotioneínas da cianobactéria (*Synechococcus* PCC 7942) e de mamíferos.** 2011. 72 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

Metalotioneínas (MTs) são proteínas de baixa massa molecular, que tem como principal função a regulação dos níveis de metais nos organismos. A caracterização das MTs da cianobactéria *Synechococcus* PCC 7942 por eletroforese capilar foi feita em comparação com os padrões comerciais de MTs de rim de cavalo e de fígado de coelho. As MTs de mamíferos apresentam diferentes arranjos moleculares, classificadas em isoformas. Na aplicação da eletroforese capilar como metodologia analítica para a otimização da separação das isoformas existentes, foram investigados a influência da composição da solução eletrolítica, variações da voltagem, comprimento do capilar e diâmetro interno do capilar. Os perfis eletroforéticos das misturas das MTs purificadas a partir de rim de cavalo e fígado de coelho comparados com a de cianobactéria mostraram uma diferenciação no tempo de migração. Para a separação foram testados eletrólitos tais como fosfato, borato e TRIS-HCl, sendo que os melhores resultados foram obtidos com o tampão TRIS-HCl (70 mM, pH 8,2) com adição de 5% de metanol. A separação eletroforética foi testada em capilares de sílica fundida de 75 e 25  $\mu\text{m}$  d.i., comprimento de 40, 50 e 60 cm. As soluções das amostras em volume de 327 nL foram introduzidas por injeção hidrodinâmica. As diferenças de potencial testadas foram de 10, 15, 20 e 25 kV. As melhores condições de separação foram atingidas empregado TRIS-HCl com 5% metanol como solução eletrolítica, em capilar de 60 cm e diferença de potencial de 20 kV o que estabilizou a corrente de separação em 42  $\mu\text{A}$ . Os resultados mostraram que a eletroforese capilar mostrou-se eficiente para separação das MTs de mamífero e da *Synechococcus* devido às diferenças de carga e tamanho das moléculas.

Palavras-chave: Metalotioneínas de cianobacteria. Metalotioneínas de mamíferos. Separação por eletroforese capilar.

## ABSTRACT

VIDA, A. C. F. **Capillary electrophoresis for the separation of cyanobacterial metallothionein (*Synechococcus* PCC 7942) and mammals.** 2011. 72 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

Metallothioneins (MTs) are low molecular weight proteins, which main functions are the regulation of metals levels in the body and detoxification. The capillary electrophoresis (CE) characterization of MT from *Synechococcus* cyanobacteria was attained by comparison with commercial standards of horse kidney and rabbit liver MTs. The influence of electrolyte, such as phosphate, borate and TRIS-HCl buffers on the separation performance were tested. Also, parameters such as voltage potential, capillary length and capillary inner diameter were investigated to attain optimized separation of mammal and *Synechococcus* MTs. The electrophoretic profiles of MTs revealed four abundant metallothionein isoforms for the horse kidney sample, one for rabbit liver MTII and two for cyanobacteria *Synechococcus*. The separation by CE of horse and cyanobacteria MTs mixtures differentiated two sets of signals, the first with four peaks corresponding to the horse sample and the last to *Synechococcus*. The mixture of rabbit liver MT and cyanobacteria MTs presented a first peak for rabbit MTII and a second for cyanobacteria. Tests were performed trying phosphate, borate and TRIS-HCl buffers, however the best results were attained with TRIS-HCl buffer (70 mM, pH 8.2) with addition of 5% methanol. Different capillary lengths of 40, 50 and 60 cm and two internal diameters of 75 and 25 $\mu$ m were tested. Also, voltages of 10, 15, 20 and 25 kV were studied. The best experimental conditions were attained using a 60 cm long capillary, TRIS-HCl plus 5% methanol as electrolyte, the application of 20 kV which allowed maintaining a separation current of 42  $\mu$ A. Results demonstrated that capillary electrophoresis was efficient for separation of MTs of mammals from that of *Synechococcus* due their differences on size to charge.

Keywords: Mammal metallothioneins. Cyanobacteria metallothioneins. Capillary electrophoresis separation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura	página
Figura 1 -Homeostase do zinco em cianobactérias. Sensores são reguladores transcricionais, que podem ser repressores ou ativadores da transcrição de metaloproteínas. ABC são proteínas com alta afinidade pelo zinco e a ATPase ZiaA transporta ativamente o zinco para o citosol. BmtAs são metalotioneínas complexadoras de zinco na célula .....	16
Figura 2 -Estruturas das metalotioneínas de cianobactéria e de mamíferos, mostrando as similaridades entre os agrupamentos. (a) $Zn_4Cys_9His_2$ de <i>Synechococcus</i> : A, B, C e D representam os metais das cisteínas (amarelo) e das histidinas (azul escuro). As setas antiparalelas em azul claro representam estruturas antiparalelas folhas- $\beta$ e $\alpha$ -hélice em vermelho. (b) $Cd_4Cys_{11}$ - $\alpha$ -domínio de MT de rato: I, V, VI e VII são os sítios de ligação dos metais pelas cisteínas (amarelo).....	19
Figura 3- Diagrama esquemático do sistema CE. R1 e R2 são os recipientes contendo solução eletrolítica onde se encontram os eletrodos (e1 e e2) conectados à fonte de potência (F). Os círculos brancos representam os íons, as áreas representam as massas e os sinais negativos e positivos indicam as cargas. A detecção radial da absorção molecular é representada por uma fonte de radiação (v) e um detector (D) acoplado a um computador (C). No retângulo é mostrado o registro temporal dos sinais .....	23
Figura 4-Sistema de eletroforese capilar do Laboratório de Química Analítica (CENA/USP). 1. Base, 2. Hastes, 3. Vareta, 4. Injetor, 5. Recipiente coletor, 6. Unidade controladora de gás, 7. Circuito eletrônico, 8. Detector UV/Visível, 9. Válvulas solenóide, 10. Fonte de alta voltagem.....	36
Figura 5- Corrente observada no sistema CE para os tampões 70 mM TRIS-HCl pH 8,2, 20 mM borato pH 8,2 e 30 mM fosfato pH 7,4 para o capilar de 60 cm .....	39
Figura 6- Degradação da MT de cavalo provocado pelo aquecimento em CE quando empregou-se tampão borato (20 mM, pH 8,2), voltagem 20 kV, 60 $\mu$ A e capilar de 50 cm.....	40

- Figura 7- Separação das MTs de coelho e da cianobactéria empregando-se o tampão fosfato (30 mM, pH 7,4) 42  $\mu$ A e capilar de 60 cm. Temporalmente observa-se o sinal da MT de coelho seguida do sinal da MT de cianobactéria.....41
- Figura 8- Separação das MTs de coelho e da cianobactéria com tampão borato (20 mM, pH 8,2), 42  $\mu$ A, capilar de 60 cm. A sequência dos picos é igual aos da Figura 7.....41
- Figura 9- Eletroferogramas do tampão TRIS-HCl 5% de metanol (70 mM, pH 8,2), 42  $\mu$ A, capilar de 60 cm (A) e MTs de coelho e da cianobactéria (B).A sequência de picos é a mesma da Figura 7.....42
- Figura 10- Eletroferograma mostrando o primeiro pico correspondente a MT-IB e os dois picos seguintes correspondente a MT-IA de cavalo (A). Separação das isoformas da MT de cavalo e da MT da cianobactéria. A sequência temporal apresenta três sinais atribuídos a MT cavalo separado do único sinal da MT de cianobactéria. Condições da separação: tampão fosfato (30 mM, pH 7,4), 20 kV, 42  $\mu$ A, capilar de 60 cm.....43
- Figura 11- Eletroferograma mostrando o primeiro pico correspondente a MT-IB e os três picos seguintes não separados correspondente a MT-IA de cavalo (A). Separação das MTs de cavalo e da cianobactéria (B): à esquerda têm-se os sinais da MT de cavalo e a direita um único sinal para a MT da cianobactéria. Condições de separação: tampão borato (20 mM, pH 8,2), 20 kV, 42  $\mu$ A, capilar de 60 cm .....44
- Figura 12- Eletroferograma mostrando o primeiro pico correspondente a MT-IB, três picos não identificados (\*) e os três picos seguintes correspondentes a MT-IA de cavalo (A). Separação das MTs de cavalo e da cianobactéria (B). À esquerda têm-se os quatro primeiros sinais das isoformas da MT de cavalo e à direita a MT da cianobactéria. Condições de separação: tampão TRIS-HCl com 5% de metanol (70 mM, pH 8,2), 20 kV, 42  $\mu$ A, capilar de 60 cm .....45
- Figura 13- Comparação de diferentes soluções-tampão na separação das MTs em pratos teóricos.....46
- Figura 14- Misturas de MTs de coelho e da cianobactéria em pH 7,5 (A) e pH 8,2 (B). Condições da separação: tampão 70 mM TRIS-HCl 5% de metanol, 10 kV, capilar de 50 cm.....47



- Figura 15- Eletroferograma da Separação das MTs, sendo o primeiro sinal correspondente a MTII de coelho e o segundo, MT da cianobactéria. Condições de separação: tampão TRIS-HCl (70 mM, pH 8,2), 15 kV, 24  $\mu$ A, capilar de 60 cm.....48
- Figura 16- Eletroferograma correspondente à separação das MTs de coelho e da cianobactéria. A sequência dos sinais é a mesma da Figura 15. Condições da separação: tampão TRIS-HCl (70 mM, pH 8,2), 25 kV, 78  $\mu$ A, capilar de 60 cm .....50
- Figura 17- Eletroferograma mostrando o primeiro pico correspondente a MT-IB e os três picos seguintes correspondentes a MT-IA de cavalo (A). Separação das MTs de cavalo e da cianobactéria (B). À esquerda têm-se os quatro primeiros sinais das isoformas da MT de cavalo e à direita a MT da cianobactéria. Condições de separação: tampão TRIS-HCl com 5% de metanol (70 mM, pH 8,2), 15 kV, 24  $\mu$ A, capilar de 60 cm 51
- Figura 18- Eletroferogramas das isoformas MT-IB e MT-IA de cavalo (A) e da separação das MTs de cavalo e da cianobactéria (B). A sequência de sinais correspondentes às MTs é a mesma da Figura 17. Condições da separação: tampão TRIS-HCl 5% de metanol (70 mM, pH 8,2), 25 kV, 78  $\mu$ A, capilar de 60 cm .....52
- Figura 19- Pratos teóricos da variação das voltagens aplicadas.....53
- Figura 20- Eletroferograma da mistura das MTs de coelho e da cianobactéria com a mesma sequência de sinais da Figura 15. Condições da separação: tampão TRIS-HCl 5% de metanol (70 mM, pH 8,2), 42  $\mu$ A, capilar de 40 cm .....54
- Figura 21- Eletroferogramas das misturas de MTs de cavalo e da cianobactéria. Em sequência, o primeiro sinal corresponde a MT-IB de cavalo, o segundo conjunto de picos não separados de MT-IA e o último sinal correspondente a MT da cianobactéria obtidos em capilares de 40 cm (A) e 50 cm (B) de comprimento. Condições de separação: tampão TRIS-HCl com 5% de metanol (70 mM, pH 8,2).....55
- Figura 22- Pratos teóricos da variação do comprimento do capilar.....56
- Figura 23- Eletroferogramas da separação das MTs de cavalo e da cianobactéria: (A) 75  $\mu$ m, injeção 20 kPa por 5s e (B) 25  $\mu$ m, injeção 20 kPa por 10 s.

Condições de separação: tampão TRIS-HCl com 5% de metanol (70 mM, pH 8,2), 10 kV, capilar de 40 cm de comprimento. ....	57
Figura 24- Pratos teóricos da variação do diâmetro interno do capilar .....	57
Figura 25- Eletroferograma de MT de rim de cavalo, mostrando o primeiro pico correspondente a MT-IB e os três picos seguintes correspondentes a MT-IA de cavalo. Condições de separação: tampão TRIS-HCl com 5% de metanol (70 mM, pH 8,2), 15 kV, 24 $\mu$ A, capilar de 60 cm.....	59
Figura 26- Eletroferograma da única isoforma de MTII de fígado de coelho com o tampão TRIS-HCl 5% de metanol (70 mM, pH 8,2), 20 kV, 42 $\mu$ A, capilar de 60 cm .....	60
Figura 27- Eletroferograma da MT da cianobactéria <i>Synechococcus</i> com o tampão 70 mM de TRIS-HCl 5% de metanol, 20 kV, 42 $\mu$ A, capilar de 60 cm. A seta mostra o pico de menor intensidade .....	60

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1. Cianobactérias.....	15
2.2. Homeostase de Zinco em Cianobactérias.....	15
2.3. Metalotioneínas (MTs).....	17
2.4. Metalotioneínas de <i>Synechococcus</i> .....	18
2.5. O zinco nas MTs de <i>Synechococcus</i> .....	20
2.6. Reatividade de Zn e Cd nas MTs.....	21
2.7. Fundamentos da eletroforese capilar.....	22
2.7.1. Separação.....	23
2.7.2. Mobilidade eletroforética.....	24
2.7.3. Fluxo eletrosmótico.....	25
2.8. Efeito Joule.....	25
2.9. Soluções Tampão.....	26
2.10. Estudo das MTs utilizando CE.....	27
2.11. Capilares eletroforéticos para a separação das MTs.....	28
2.11.1. Capilares não recobertos.....	28
2.11.2. Capilares recobertos.....	30
2.11.3. Adsorção das proteínas nas paredes do capilar.....	31
3. OBJETIVOS.....	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1. Soluções.....	33
4.1.1. Preparação das soluções eletrolíticas para CE.....	33
4.2. Amostras.....	34

4.2.1. Amostra da metalotioneína de <i>Synechococcus</i> purificada.....	34
4.2.2. Preparo das soluções das amostras.....	34
4.3. Equipamentos e acessórios.....	35
4.3.1. Sistema de eletroforese capilar .....	36
4.3.2. Pré-condicionamento e condicionamento do capilar eletroforético.....	37
4.4. Efeito da composição dos tampões na separação das isoformas das MTs....	37
4.5. Efeito do pH do eletrólito.....	37
4.6. Influência do comprimento do capilar eletroforético.....	37
4.7. Influência da diferença de potencial (ddp) aplicada.....	38
4.8. Efeito do diâmetro interno do capilar .....	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
5.1. Efeito da composição do tampão na separação das isoformas das metalotioneínas .....	39
5.2. Efeito do pH do eletrólito.....	46
5.3. Influência da variação das voltagens na separação .....	48
5.4. Influência da variação dos comprimentos do capilar na separação.....	53
5.5. Efeito do diâmetro interno do capilar .....	56
5.6. Separação das isoformas das MTs .....	58
6. CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS.....	63

## 1. INTRODUÇÃO

Metalotioneínas (MTs) são proteínas com baixa massa molecular (5-7 kDa) e foram descobertas em 1957, a partir de sua extração do córtex de rim de cavalo. Essas proteínas têm sido estudadas em uma grande variedade de organismos, tais como procariotos, plantas, invertebrados e vertebrados. A importante função biológica é a homeostase de metais no organismos devido a sua alta afinidade aos íons metálicos.

As metalotioneínas de vertebrados são ricas em cisteínas, caracterizadas por vinte resíduos de tióis, justapostos aos resíduos de lisina e arginina, arranjados em dois grupos, denominados de  $\alpha$  e  $\beta$  domínios. Um mol de metalotioneína liga-se a 7 mols de íons metálicos divalentes. Naturalmente estes compostos ocorrem nos mamíferos devido à presença de zinco necessária para as funções fisiológicas. Entretanto, a sua formação é induzida pela presença de outros metais como por exemplo, Cu, Cd e Hg. Em mamíferos, essas proteínas podem ser reservatórios de zinco e cobre para síntese de apoenzimas e reguladores de transcrição. A presença das MTs nos rins e fígado dos mamíferos tem sido relacionada principalmente com ação detoxificadora.

Diferentemente das MTs de mamíferos, as de cianobactérias do gênero *Synechococcus* possuem essencialmente a função dupla, de detoxificação e de garantir e regular o nível de zinco na célula, uma vez que o zinco é essencial para a ativação de enzimas fundamentais, na fotossíntese, tais como as carbônico-anidrases (BLINDAUER, 2008). Em estrutura, diferem-se das metalotioneínas de mamíferos, uma vez que os metais encontram-se também em dois resíduos de histidinas. Estes resíduos de histidina ou imidazoles, garantem a ligação do Zn necessária para sua fisiologia (BLINDAUER, 2001).

Para maior compreensão das funções biológicas das metalotioneínas, diferentes metodologias analíticas de separação, identificação e quantificação dessas espécies têm sido empregadas. As estruturas de MTs de invertebrados e vertebrados têm sido determinadas por técnicas de ressonância magnética nuclear (NMR) (WUTHRICH, 1991). As técnicas de separação descritas para a detecção das metalotioneínas são a eletroforese capilar (CE), eletroforese em gel e cromatografia líquida (LC) (ALVAREZ-LLAMAS, 2003). A detecção molecular é comumente realizada por espectrofotometria UV embora também descrita por espectrometria de

massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) (COLE, 1997). A detecção dos metais associados nas MTs tem sido efetuada por espectrometria de emissão ótica com fonte de plasma (ICP-OES) e a espectrometria de massas com fonte de plasma (ICP-MS) (PRANGE; SCHAUMLÖFFEL, 2002).

A eletroforese capilar tem sido eficientemente aplicada na separação de moléculas de baixo peso molecular, tais como peptídeos e proteínas pelas diferenças entre carga e tamanho. No caso as MTs de mamíferos apresentam estrutura molecular e carga diferentes das MT de *Synechococcus* (WITTRISCH, 1997; BLINDAUER, 2007) o que valida o estudo da aplicação da eletroforese capilar para caracterizar e separar estas MTs, bem como avaliar a possibilidade de evidenciar isoformas da MT *Synechococcus*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Cianobactérias

As cianobactérias são procariotos fotossintetizantes e formam um grupo amplamente diverso (STANIER, 1977). O gênero *Synechococcus* compõe um grupo de cianobactérias unicelulares e com divisão binária dentro da ordem Chroococcales. As cianobactérias possuem uma história evolutiva de adaptação às mudanças na composição de metais nos ambientes primitivos (ROBINSON et al., 2000).

*Synechococcus* é um dos gêneros mais representativos dos fitoplânctons presentes nos ecossistemas marinhos e são responsáveis por 50 % da fixação de CO<sub>2</sub>, sendo mais abundante na zona eufótica de ecossistemas marinhos. Análises de 16 rRNA e de ITS de seu genoma vêm permitindo a descrição de várias linhagens desse gênero e este número parece aumentar ainda mais. Tais estudos relatam que o gênero *Synechococcus* é dominante em regiões costeiras de clima temperado e também nos mesotrópicos. Entretanto há dados que apontam a presença de exemplares congelados desse gênero do Norte do Atlântico Sul. Atualmente, há vários genomas totalmente seqüenciados para várias linhagens de *Synechococcus*, devido ao interesse crescente pelos mecanismos adaptativos desses organismos frente às variações de temperatura, presença de metais pesados e salinidade em seus habitats de ocorrência (ZWIRGLMAIER, et al., 2008).

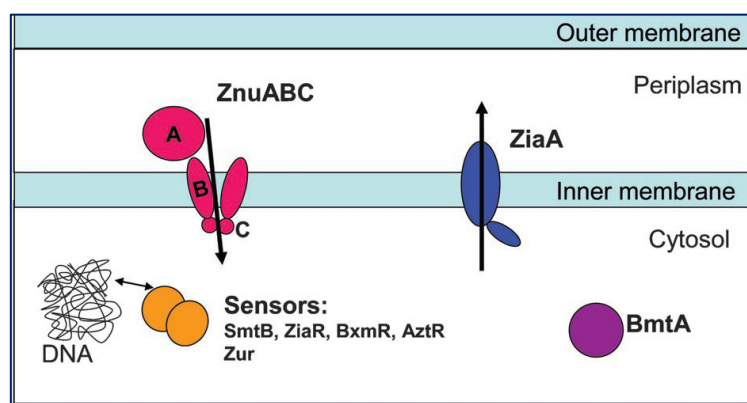
### 2.2. Homeostase de Zinco em Cianobactérias

Cianobactérias foram os primeiros organismos produtores de oxigênio a 2.75-3.2 bilhões de anos. O oxigênio na atmosfera levou ao aumento da concentração dos ions Zn<sup>2+</sup>, em virtude da oxidação do sulfeto de zinco (ZnS) e isso explica a presença de genes para a homeostase de zinco em cianobactérias. Basicamente, esse sistema consiste de um sensor de zinco (MORBY et al., 1993; BUSENLEHNER et al., 2003) que regula a expressão da proteína de acordo com a sua concentração. Tanto as proteínas de membrana quanto as metalotioneínas estão envolvidas no sequestro de Zn<sup>2+</sup> (ROBINSON, 2001)(figura 1).

O zinco é um micronutriente essencial com funções nos processos fisiológicos, é um cofator enzimático e também importante para a manutenção de

estruturas proteicas (KLAASSEN, et al., 1999). A sua concentração é fortemente controlada para manter baixos níveis de  $Zn^{2+}$  nas células (OUTTEN et al., 2001), pois em excesso pode ser tóxico (BLINDAUER, 2001).

Em geral, os mecanismos de homeostase do zinco consistem em (fig.1): a) proteínas que capturam metais ancoradas na membrana celular, por transporte ativo, por difusão, ou proteínas e b) sensores que regulam a quantidade de proteínas que capturam metais na célula (BLINDAUER, 2008).



**Figura 1** - Homeostase do zinco em cianobactérias. Sensores são reguladores transcricionais, que podem ser repressores ou ativadores da transcrição de metaloproteínas. ABC são proteínas com alta afinidade pelo zinco e a ATPase ZiaA transporta ativamente o zinco para o citosol. BmtAs são metalotioneínas complexadoras de zinco na célula (BLINDAUER, 2008)

A interação entre cianobactérias e o zinco é necessária para a fotossíntese, pois atua como cofator enzimático. A fixação do carbono ocorre no ciclo de Calvin e a principal enzima responsável por esse processo é a RuBisCO (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase). Entretanto, pela baixa afinidade dessa enzima com  $CO_2$ , é preciso que a célula acumule altas concentrações desse gás que envolve a captura de  $CO_2$ , conversão a  $HCO_3^-$  e subsequente regeneração de  $CO_2$ . A conversão de  $HCO_3^-$  a  $CO_2$  ocorre pela ação de enzimas ativadas pelo zinco, tais como as carbônico-anidrases (CA). Todo esse processo é realizado em microcompartimentos especializados, os carboxissomas, encontrados somente nas cianobactérias (BLINDAUER, 2008).



### 2.3. Metalotioneínas (MTs)

Metalotioneínas foram inicialmente isoladas do rim de cavalo por Margoshes e Vallee em 1957, caracterizada e classificada por Kägi e Vallee em 1960. São proteínas com massa molecular de 6 a 7 KDa e consiste de 20 cisteínas (32%), acetilmetionina (N-terminal), alanina (C-terminal) e sem resíduos de histidinas. São termicamente estáveis e formadas por dois agrupamentos:  $M_4Cys_{11}$  ( $\alpha$ -domínio) e  $M_3Cys_9$  ( $\beta$ -domínio), que se ligam a sete metais como Zn, Cd, Hg e Cu, através dos grupos sulfídricos (-SH). Tais domínios são conectados por uma haste formada por duas lisinas. O  $\alpha$ -domínio tem um papel fundamental na integridade conformacional da proteína (CODY; HUANG, 1994) e as serinas estabilizam as ligações dos metais com os grupos -SH. Os metais interligados às cisteínas têm importante papel estrutural, e previne a sua degradação por enzimas proteolíticas (WINGE; MIKLOSSY, 1982).

Nos organismos, as MTs contêm zinco predominantemente, constituindo-se no segundo íon mais abundante presente nas células. Os grupos -SH das apo-MT (metalotioneína sem metais ancorados) têm alta afinidade pelo zinco, entretanto esse grupo é altamente reativo, sendo capaz de transferi-lo a outras proteínas (JACOB et al., 1998). MTs são essenciais para a homeostase de Zn, no controle da concentração de íons  $Zn^{2+}$  livres nas células e na sua transferência para várias enzimas e fatores transcricionais durante o desenvolvimento e síntese de outras proteínas (NORDBERG, 2009).

No processo de contaminação por metais nas células, há o aumento da síntese de MT, sendo o cádmio um potente indutor (PISCATOR, 1964), e acúmulo do complexo Cd-MT para a detoxificação. Em mamíferos contaminados por cádmio, há um significativo aumento das MTs nos tecidos dos rins, fígado e intestino. Estudos com ratos transgênicos que superexpressam MTs demonstraram maior tolerância à hepatotoxicidade e letalidade causada pela contaminação por cádmio do que os ratos não transgênicos (DALTON et al., 1996).

A composição das MTs varia quanto ao número e tipos de aminoácidos ligados às cisteínas nas cadeias polipeptídicas dos organismos, e dessa forma são classificadas em três classes: MTI, MTII e MTIII. MTI contém cisteínas altamente conservadas e é encontrada na maior parte dos vertebrados; MTII contém cisteínas menos conservadas, com a presença de histidinas e foram identificadas nas

cianobactérias, algas e plantas e MTIII são os fitoquelantes, presentes em plantas, algas e alguns fungos (PERALES-VELA, et al., 2006).

As MTs dos mamíferos são longas cadeias polipeptídicas com 61 a 68 aminoácidos com acetilmetionina N-terminal e alanina C-terminal. Os mamíferos contêm vários genes que codificam várias isoformas de MTs, as quais são constituídas em quatro isoformas: MT1, MT2, MT3 e MT4. MT1 e MT2 são as mais estudadas, sendo que MT1 possui carga -2 e pI 3,9 e MT2 carga -3 e pI 4,6 em pH neutro (RICHARDS, 1996; WITTRISCH, 1997). Nesses dois grupos, as sub-isoformas possuem cargas similares mas possuem estruturas distintas (KÄGI, 1991).

As MTs de mamíferos mais estudadas são as MTs de fígado de coelho. Técnicas analíticas como filtração em gel, cromatografia de troca iônica e eletroforese em gel de poli(acrilamida) demonstraram a sua indução por zinco ou cádmio e a presença de duas isoformas (PISCATOR, 1966). Este autor denominou as isoformas MT1 e MT2 de acordo com a ordem de eluição em coluna de troca aniônica e pelas suas diferenças de carga em pH neutro ou alcalino, conferida pela presença ou ausência de um aminoácido no resíduo 10 ou 11 da cadeia N-terminal. A localização dos resíduos de cisteínas nas moléculas são altamente conservadas e as estruturas dos segundos domínios são idênticas, o que conferem-lhes funções similares.

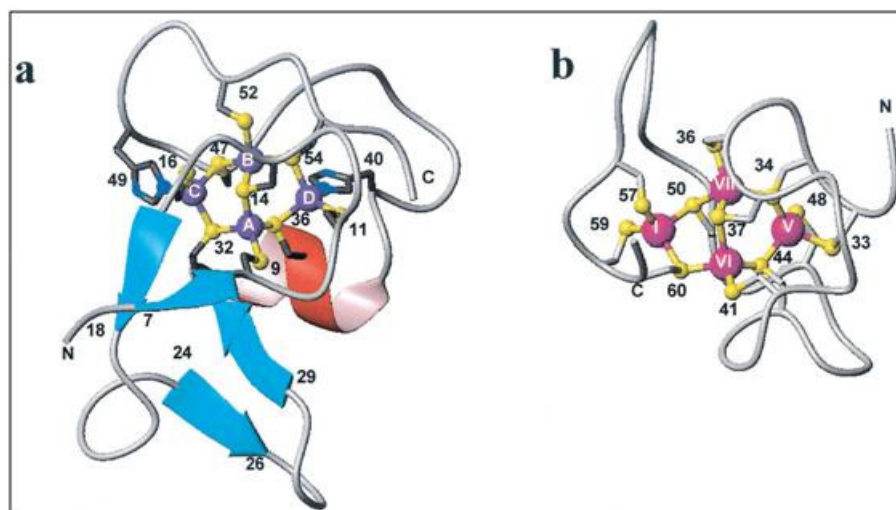
#### **2.4. Metalotioneínas de *Synechococcus***

MTs de *Synechococcus* foram inicialmente isoladas por Olafson em 1979 (OLAFSON et al., 1979) e seqüenciadas pelo mesmo autor em 1988 (OLAFSON et al., 1988). A afinidade das MTs aos metais e a tolerância que elas conferiam à cianobactéria foi inicialmente caracterizada por Robinson (ROBINSON et al., 1990).

O zinco é um forte indutor da síntese de MTs e sua função é seqüestrar o excesso de zinco na célula e também transferi-lo a outras proteínas, como a DNA-primase (BIRD et al., 1998). Estudos demonstraram que as MTs têm alta afinidade por zinco e menor afinidade pelo cádmio e cobre, se comparado às MTs dos mamíferos (SHI et al., 1992; TURNER; ROBINSON, 1995). Mutantes faltando genes para MTs de *Synechococcus* são hipersensíveis ao zinco (TURNER et al., 1993).

A estrutura de MT, utilizando NMR demonstrou conter resíduos aromáticos, como as histidinas (denominadas H40 e H49) e grupos de cisteínas (16% em SmtA,

sendo que MTs de mamíferos são 33%) (BLINDAUER, et al., 2001) (figura 2). A MT de cianobactéria foi caracterizada por um único domínio com onze sítios que se ligam a quatro íons metálicos, sendo nove cisteínas e duas histidinas ( $M_4Cys_9His_2$ ), o qual é similar ao  $\alpha$ -domínio das MTs dos mamíferos (figura 2), embora não haja similaridades entre as estruturas primária, secundária e terciária (K I, 1991). Os sítios A e B contêm quatro cisteínas que se ligam a metais, enquanto os sítios C e D contêm três cisteínas e uma histidina. As cisteínas do sítio B, C e D são acessíveis aos íons metálicos. Já o sítio A é protegido por estruturas secundárias folhas  $\beta$  e  $\alpha$ -hélice, conjunto denominado “dedo de zinco”, inerte a trocas metálicas (BLINDAUER et al., 2003). Em contraste, nas MTs dos mamíferos todos os grupos tióis são reativos aos metais (ROMERO-ISART, 2002b).



**Figura 2** - Estruturas das metalotioneínas de cianobactéria e de mamíferos, mostrando as similaridades entre os agrupamentos. (a)  $Zn_4Cys_9His_2$  de *Synechococcus*: A, B, C e D representam os metais das cisteínas (amarelo) e das histidinas (azul escuro). As setas antiparalelas em azul claro representam estruturas antiparalelas folhas- $\beta$  e  $\alpha$ -hélice em vermelho. (b)  $Cd_4Cys_{11}$ - $\alpha$ -domínio de MT de rato: I, V, VI e VII são os sítios de ligação dos metais pelas cisteínas (amarelo) (BLINDAUER et al., 2001)

Proteínas mutantes têm sido utilizadas para elucidar a importância das histidinas na estabilidade da molécula e na sua reatividade aos metais. Experimentos com  $M_4Cys_9His_2$  (selvagem), e os mutantes  $M_4Cys_{10}His_1$  e  $M_4Cys_{11}$  permitiram concluir que os mutantes  $Cys_{11}$  ainda são capazes de se ligar aos metais, tal como a molécula original. Mas a presença de histidinas provê maior vantagem à molécula, pelo seu caráter aromático, inatividade à oxidação e caráter básico,

desempenhando papel fundamental na estabilidade. As histidinas possuem rápida capacidade de capturar o zinco, frente a outros agentes competitivos, como em outras proteínas (BLINDAUER, 2007).

A histidina H40 liga-se à porção N-terminal do “zinc-finger”. Com a mutação His40-Cys40 formam-se espécies com três íons metálicos, sugerindo que a substituição da histidina enfraquece as ligações MT-metal e liberam metais mais rapidamente que a molécula original ao reagir com EDTA. A molécula  $Zn_1Cys_{10}His_1$  foi a principal espécie formada, sugerindo que H40 tem importância na reatividade nos sítios B, C e D e menos influência no sítio A. A mutação His49-Cys49, ao reagir com EDTA produziu predominantemente espécies  $Zn_3$  estáveis ao longo da reação, com perda de Zn pelo sítio C, o mais exposto (LESZCZYSZYN et al., 2007).

## 2.5. O zinco nas MTs de *Synechococcus*

Proteínas freqüentemente contêm cofatores que geralmente são íons metálicos. O zinco é de fundamental importância estrutural (COLEMAN, 1992; BERG, SHI, 1996) e catalítica, facilita o enovelamento proteico, confere estabilidade à molécula, principalmente nas cadeias polipeptídicas curtas (VALLEE; AULD, 1990); (HARRISON, 1991); (BERG; GODWIN, 1997); (ALBERTS; NADASSY et al., 1998); (GRISHIN, 2001)).

As MTs dos mamíferos são cadeias polipeptídicas suficientemente longas para conter dois domínios ( $Zn_4S_{11}$  e  $Zn_3S_9$ ), quase sem nenhuma estrutura secundária. Em contraste, SmtA contém estruturas secundárias como curtas cadeias antiparalelas denominadas folhas- $\beta$  e uma  $\alpha$ -hélice. Tais estruturas, juntamente com o sítio A, constituem o “zinc-finger” da proteína (BLINDAUER; SADLER, 2005).

O “zinc finger” das MTs de *Synechococcus* possui um sítio A inerte a trocas metálicas e com fundamental importância estrutural. Em um estudo de descomplexação do zinco com EDTA, as apotioneínas (estruturas proteicas não ligadas a metais) apresentaram-se desnoveladas (LESZCZYSZYN et al., 2007).

Atualmente há pelo menos 400 estruturas de “zinc-fingers” (LANDER et al., 2001). O zinco e os resíduos de histidina e cisteína formam estruturas geométricas tetraédricas (GRISHIN, 2001) que podem ser  $ZnCys_2His_2$ ,  $ZnCys_3His$  ou  $ZnCys_4$  (KLUG, RHODES, 1987; KRISHNA et al., 2003). A estrutura  $ZnCys_2His_2$ , presente em SmtA, é a mais específica para o zinco (KRIZEK et al, 1993).

“Zinc-fingers” tipicamente se ligam a uma variedade de biomoléculas, como os polinucleotídeos, proteínas e lipídeos (GRISHIN, 2001). As seqüências de aminoácidos (25-45 resíduos) diferem consideravelmente de MT de *Synechococcus*, mas as estruturas folhas- $\beta$  e  $\alpha$ -hélice são semelhantes (OMICHIANSKI et al., 1993; KONTAXIS et al., 1998; RAAIJMAKERS et al., 1999; BLINDAUER, 2005). Em “zinc-fingers”, mutações nas histidinas ou cisteínas podem levar a alterações na estrutura terciária da proteína, destituindo-a de sua função. Em proteínas de capsídeo retroviral, em que mutantes de Cys<sub>3</sub>His<sub>1</sub> (Cys<sub>4</sub> e Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>) obtiveram diferentes conformações tornando-os não infecciosos, mas permaneceram ligadas ao zinco (STOTE, 2004).

## 2.6. Reatividade de Zn e Cd nas MTs

Os íons de Zn<sup>+2</sup> e Cd<sup>+2</sup> possuem alta afinidade aos grupos sulfidrilas das proteínas, entretanto a afinidade entre Cd-SH é maior do que Zn-SH (JACOBSON; TURNER, 1980; JONES; CHERIAN, 1990; KRIZEK et al, 1993). Assim Cd<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup> competem pelos grupos sulfidrilas e o Cd<sup>2+</sup> pode deslocar Zn em uma variedade de processos biológicos (GACHOT; POUJEOL, 1992; ENDO et al., 1996, 1997). Um dos metais pode influenciar a captura e atividade do outro, dependendo da concentração. Os mecanismos dessas interações têm sido amplamente debatidos, sendo competitivos (GACHOT; POUJEOL, 1992; ENDO et al., 1996, 1997) ou não (GACHOT, POUJEOL, 1992), dependendo das condições experimentais.

Ao deslocar Zn, Cd interfere na absorção de Zn, distribuição nos tecidos e transporte nas células ou em outras estruturas celulares e pode inibir a sua atividade em vários estágios. Dentre os efeitos tóxicos do Cd são interferências em processos metabólicos mediados ou dependentes de zinco, incluindo produção celular de DNA, RNA e proteínas (SUNDERMAN; BARBER, 1988).

A reatividade das MTs aos metais tem sido extensamente estudada a fim de elucidar os mecanismos de detoxificação. Vários parâmetros têm sido utilizados para medir a afinidade dos grupos sulfidrilas das MTs por Cd<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup> e eles indicam que as MTs tem maior afinidade por Cd<sup>2+</sup> no processo de contaminação. Apo-MTs em solução contendo Zn<sup>2+</sup> ou Cd<sup>2+</sup> complexam Cd<sup>2+</sup> mais rapidamente, formando Cd-MT, pois a constante de reatividade é maior (EJNIK et al., 2002). Para MTII de coelho, a constante de estabilidade para Zn-MT em pH neutro é (3,1-12) x 10<sup>11</sup> molL<sup>-1</sup>

<sup>1</sup> e para Cd-MT  $(6 - 12,5) \times 10^{14} \text{ molL}^{-1}$  (ROMERO-ISART, 2002a). A constante de equilíbrio entre Cd e Zn com -SH favorece termodinamicamente a incorporação de Cd e deslocamento de  $\text{Zn}^{2+}$  (LI et al., 2008b).

Nas MTs de mamíferos é possível substituir  $\text{Zn}_7\text{Cys}_{20}$  por  $\text{Cd}_7\text{Cys}_{20}$  incubando-as com Cd em solução e a seguir determinar a relação estequiométrica entre o enxofre-metal por espectrometria de emissão ótica com fonte de plasma (ICP-OES). No caso da MT da cianobactéria ocorre a substituição de apenas três sítios, formando predominantemente moléculas  $\text{Cd}_3\text{Zn}_1\text{Cys}_9\text{His}_2$ , devido ao sítio A apresentar-se envolto por estruturas secundárias, impedindo a liberação de Zn. A substituição dos quatro sítios pelo Cd só é possível revertendo a MT a apo-proteína em solução com baixo pH para a liberação total de Zn, e posteriormente incubá-la com Cd em solução com pH 7 (BLINDAUER et al., 2001).

Proteínas mutantes também têm sido utilizadas para elucidar o papel das histidinas na afinidade entre Cd e Zn pelos sítios -SH e -NH das MTs de *Synechococcus*. As proteínas selvagens formam predominantemente estruturas  $\text{Cd}_3\text{Zn}_1\text{Cys}_9\text{His}_2$ . Já os mutantes  $\text{M}_4\text{Cys}_{11}$  complexam o Cd nos quatro sítios, formando predominantemente moléculas  $\text{Cd}_4\text{Cys}_{11}$ , sugerindo que a mutação das histidinas pelas cisteínas diminuem a afinidade pelo Zn (BLINDAUER et al., 2007). Em outro estudo com mutação da cisteína para histidina em MTs de humanos, verificou-se um aumento de afinidade da molécula pelo Zn (ZHOU et al., 2000).

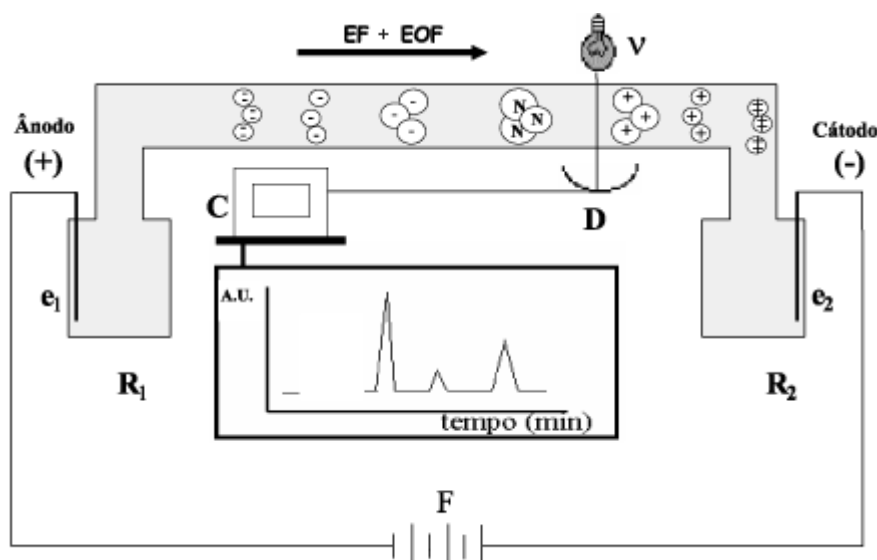
## 2.7. Fundamentos da eletroforese capilar

A eletroforese capilar oferece vantagens para a separação das MTs sobre os métodos cromatográficos devido à injeção de volume reduzido de amostra, baixo consumo de reagentes e diminuição de resíduos. Ambas as técnicas permitem a completa automação da análise, com possibilidade de injeção e detecção em fluxo. Entretanto, as isoformas das MTs podem ser separadas de forma eficiente após serem purificadas em colunas cromatográficas tais como Sephadex G-75 sem a necessidade de analisá-las em outras colunas cromatográficas (BEATTIE et al., 1993). Comparando-se amostras purificadas de MTs separadas por eletroforese capilar e HPLC, verificou-se um maior número de picos na primeira técnica (RICHARDS et al., 1993). Enquanto que a cromatografia separa as proteínas

baseadas na hidrofobicidade, a eletroforese capilar utiliza a combinação de diferenças entre carga e tamanho (MINAMI et al., 2002).

### 2.7.1. Separação

A eletroforese capilar consiste de dois reservatórios que contêm uma solução tampão idêntica e que são conectados entre si por meio de um tubo capilar de sílica fundida, preenchido com a mesma solução tampão, a qual é denominada eletrólito. Em cada reservatório é mantido um eletrodo de platina que o conecta a uma fonte de alta tensão que fornece a diferença de potencial requerida para a separação dos analitos. A mobilidade eletroforética dos íons é determinada por carga/tamanho. A configuração instrumental básica de um equipamento de eletroforese capilar está esquematizada na figura 3.



**Figura 3-** Diagrama esquemático do sistema CE. R1 e R2 são os recipientes contendo solução eletrolítica onde se encontram os eletrodos (e1 e e2) conectados à fonte de potência (F). Os círculos brancos representam os íons, as áreas representam as massas e os sinais negativos e positivos indicam as cargas. A detecção radial da absorção molecular é representada por uma fonte de radiação (v) e um detector (D) acoplado a um computador (C). No retângulo é mostrado o registro temporal dos sinais (GERVASIO et al., 2003)

Na eletroforese capilar, as amostras podem ser introduzidas através de um desses reservatórios pelos modos electrocinético ou hidrodinâmico. Na injeção electrocinética, um gradiente de alta tensão é aplicado na amostra durante um curto

período de injeção, enquanto que na injeção hidrodinâmica utiliza-se um gradiente de pressão. Após a injeção das amostras, o reservatório do tampão é repostado.

A eletroforese capilar é realizada em tubos com dimensões capilares, tipicamente 25-75  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno e 375  $\mu\text{m}$  de diâmetro externo. O uso do capilar apresenta numerosas vantagens, particularmente por favorecer a dissipação de calor, que é causado pela passagem de corrente através do meio condutor (efeito Joule). Um dos fatores desfavoráveis decorrentes do efeito Joule é que moléculas localizadas na região central do meio de separação migrarão mais rapidamente do que as moléculas localizadas nas bordas, causando o efeito de dispersão de zona. Altas temperaturas também podem causar degradação térmica de algumas moléculas, principalmente proteínas. A alta resistência elétrica do capilar permite o estabelecimento de campos elétricos elevados (10-30kV), resultando em separações de alta eficiência e baixo risco para o operador, uma vez que as correntes são de no máximo de 100  $\mu\text{A}$ .

### 2.7.2. Mobilidade eletroforética

Sob a influência do campo elétrico, a espécie é acelerada até que as forças de atrito fazem com que essa espécie atinja o estado estacionário, com movimento constante. A força elétrica atuante é o produto do módulo da carga e do campo elétrico. Já a força de atrito depende da viscosidade do eletrólito e do raio hidratado da espécie. Quando o íon atinge a velocidade constante, a resultante das forças é nula e a mobilidade eletroforética da espécie é determinada pela equação (1):

$$\mu = \frac{|z| e}{6\pi\eta r} \quad (1)$$

sendo,  $\mu$  é a mobilidade da espécie,  $z$  é a carga iônica,  $e$  é a carga elementar,  $\eta$  é a viscosidade do meio e  $r$  é o raio iônico da espécie.



### 2.7.3. Fluxo eletrosmótico

Quando um eletrólito é introduzido dentro do capilar, a superfície interna do capilar adquire carga. Quimicamente, a sílica fundida é caracterizada pela presença de grupos silanóis que são carregados negativamente em pH superior a 3. Os grupos silanoato atraem cátions do eletrólito, formando uma camada interna na parede do capilar (camada fixa). Como estes cátions não neutralizam todas as cargas negativas, uma segunda camada de cátions é formada (camada difusa). Este modelo é conhecido como dupla camada elétrica. Quando um campo elétrico é aplicado, parte dos cations da camada difusa é atraída em direção ao eletrodo de carga oposta. Durante a migração, os íons transportam moléculas de água, induzindo um fluxo de solução como um todo, conhecido como fluxo eletrosmótico (EOF). A mobilidade do fluxo eletrosmótico ( $\mu_{osm}$ ) é dependente das características do tampão, como a constante dielétrica, a viscosidade, o pH e a concentração.

Os dois maiores parâmetros que influenciam o fluxo eletrosmótico são o potencial zeta e a viscosidade. O potencial zeta é influenciado pela concentração do tampão e carga da superfície. A concentração do tampão pode ser facilmente mantida constante. Há formas para mudar a carga da superfície, a qual subsequentemente influencia o EOF, mas muitas delas podem ser facilmente controladas, tais como o pH do tampão. O EOF pode ser pouco reprodutível em pH menor que 2,5 e pH na faixa de 8 a 10, onde um maior tempo de pré-condicionamento do capilar é recomendado. A viscosidade depende da temperatura e do conteúdo de polímeros ou de solvente orgânico.

A mobilidade aparente ( $\mu_{ap}$ ) de um analito pode ser expressa como a soma da mobilidade eletroforética ( $\mu_{ef}$ ) e a mobilidade do fluxo eletrosmótico do sistema ( $\mu_{osm}$ ).

### 2.8. Efeito Joule

Com a aplicação de uma diferença de potencial no sistema de eletroforese capilar ocorre o aquecimento devido à passagem da corrente elétrica no interior do capilar devido ao efeito Joule. Com esse efeito, formam-se gradientes de temperatura que geram correntes de convecção no capilar, comprometendo a eficiência de separação das espécies.

Como consequência do efeito Joule ocorrem os seguintes efeitos: desenvolvimento de um gradiente térmico no capilar, causando o alargamento dos picos (XUAN et al., 2004; HJERTEN, 1990); mudanças no tempo de migração (KNOX; MCCORMACK, 1994; IKUTA et al., 2000), mudanças na especiação em função da temperatura e um aquecimento excessivo da solução eletrolítica, resultando em formação de bolhas que interrompe a continuidade elétrica (GOBIE; IVORY, 1990); (EVENHUIS; HADDAD, 2009).

A dissipação do calor ocorre ao longo do comprimento do capilar, redução do seu diâmetro e diminuição da voltagem utilizada (BEATTIE, 1998; EVENHUIS, 2009).

## 2.9. Soluções Tampão

A mobilidade eletroforética das MTs depende do pH do eletrólito e a escolha de uma solução tampão adequada tem implicações diretas na otimização da separação. As propriedades necessárias do eletrólito são: manutenção do pH, baixa absorvância no comprimento de onda selecionado para a análise, e pouca contribuição na geração de calor por efeito Joule.

De forma geral, os sistemas tampão são eficientes em um intervalo de pH correspondente ao  $pK_a$  próximo de 1. Os tampões mais comumente usados em eletroforese capilar e seus respectivos  $pK_a$  são mostrados na tabela 1 (TAVARES, 1997).

**Tabela 1** - Soluções-tampão utilizadas em eletroforese capilar

Soluções-tampão	$pK_a$
Fosfato	7,21
Borato	9,24
TRIS-HCl	8,3

O intervalo de pH adequado para as separações em eletroforese capilar varia entre 2 e 11 e as concentrações variam entre 5 e 200 mmol/L, dependendo do tampão utilizado. Altas concentrações podem comprometer a separação devido ao excesso de calor gerado. Baixas concentrações podem aumentar a adsorção de

certos solutos na parede do capilar e ocasionar alargamento e distorção das bandas, bem como dificultar a reprodutibilidade dos tempos de migração.

Para melhorar a eficiência da separação e resolução das isoformas, uma prática bem utilizada é a adição de metanol no preparo dos tampões. A adição de 5% de metanol no TRIS-HCl de acordo com o estudo realizado por Alvarez-Llamas, (2001), aumentou a eficiência da separação das isoformas de MTI de coelho. Em um outro estudo para a separação de MTI e MTII de coelho utilizando o TRIS, observou-se da mesma forma um ganho na eficiência na separação dessas isoformas com a adição de metanol no preparo desse tampão (VIRTANEN; BORDIN, 1998).

## **2.10. Estudo das MTs utilizando CE**

As MTs apresentam-se em diferentes organismos e a variedade das isoformas atribuem-se ao papel fisiológico nos tecidos. A eletroforese capilar tem sido utilizada como uma estratégia analítica eficiente para o estudo das propriedades de separação de isoformas de frações citosólicas contaminadas com metais.

Desde os primeiros trabalhos de caracterização das MTs de fígado de coelho por eletroforese capilar com detecção UV e/ou espectrometria de massas (BEATTIE et al., 1993; WILHELMSSEN, OLSVIK et al., 1998), as MTs de ratos (RICHARDS et al., 1996; WILHELMSSEN, 1998; MINAMI, 1998), algas (KUBOTA, 1998; PEREZ-RAMA, 2001), cavalo (WILHELMSSEN, 1998; WILHELMSSEN et al., 2002), humanos (ALVAREZ-LLAMAS et al., 2001; (PRANGE e PROFROCK, 2005), enguias (ALVAREZ-LLAMAS, 2003), ovinos (KNUDSEN; BEATTIE, 1997) e cianobactérias (LAVORANTE et al., 2003) têm sido estudadas.

A eletroforese capilar oferece a vantagem da separação das isoformas das MTs devido a sua alta resolução preservada na análise por CE-ICP-MS (PRANGE; PROFROCK, 2005). A detecção das MTs se dá por absorção em UV, a qual sofre de baixa seletividade, e dessa forma a purificação das MTs é recomendada (MINAMI et al., 1998). As determinações do enxofre e metais simultaneamente por CE-ICP-MS nas metalotioneínas de mamíferos permitiu, utilizando cálculos estequiométricos conhecer a proporção de metais associados (PRANGE e PROFROCK, 2005).

Para a separação das isoformas das MTs foram testados os eletrólitos fosfato de sódio, borato de sódio, TRIS-HCl e tricina (ALVAREZ-LLAMAS et al., 2001). Para

a determinação das mobilidades eletroforéticas das isoformas, os parâmetros mais estudados têm sido o tempo de migração, temperatura, voltagem, comprimento do capilar, pH e concentração do eletrólito. Tais parâmetros contribuem também para melhorar a eficiência da separação e resolução dos picos.

Um dos procedimentos inicialmente utilizados para identificação das MTs em amostras contaminadas com metais é expor as amostras com anticorpos para MTI e MTII. Quando ocorre a ligação entre as MTs e os respectivos anticorpos na análise por eletroforese capilar, os picos das MTs diminuem em tamanho quando comparados com os outros picos de outras moléculas presentes nessa amostra, permitindo identificá-las (KUBO et al., 1999).

## **2.11. Capilares eletroforéticos para a separação das MTs**

### **2.11.1. Capilares não recobertos**

Comumente, capilares não recobertos têm sido descritos para a separação das MTs por CE. Separações de MTs com cargas diferentes foram descritas para as isoformas negativamente carregadas em eletrólitos com pH alcalino, devido a formação de forte EOF em direção ao cátodo (RICHARDS, 1994). Os eletrólitos com alta força iônica provêm maior resolução dos picos e inibem a adsorção das proteínas nas paredes do capilar. Todavia, altas correntes geradas pelos eletrólitos podem gerar efeito Joule e conseqüentemente perda de resolução e os equipamentos com refrigeração contornam esse efeito. Os eletrólitos mais utilizados são fosfato de sódio, borato de sódio e TRIS-HCl. Dependendo da concentração, tanto o borato quanto o fosfato podem prover uma boa resolução. No entanto, o fosfato possui alta condutividade, podendo degradar as proteínas dependendo da voltagem utilizada.

A eficiência na separação têm sido obtida com eletrólitos orgânicos como o TRIS-HCl (BEATTIE et al., 1993). A mistura de eletrólitos como TRIS-borato também tem sido utilizada para a separação de MTs de cavalo e coelho (VIRTANEN et al., 1996). A vantagem de se utilizar eletrólitos orgânicos é a sua baixa condutividade e baixo efeito Joule. No entanto, se a detecção é feita abaixo de 220 nm, a absorvância desses eletrólitos é limitada a altas concentrações (BEATTIE, 1998).

Alguns trabalhos evidenciam separações eficientes com  $300 \text{ mmol L}^{-1}$  para o fosfato de sódio em pH 2,0. Nessa faixa de pH, o zinco e o cádmio são dissociados e apotioneínas são separadas (RICHARDS, 1994). A dissociação desses metais resulta na diminuição da absorbância em UV e dessa forma a concentração de MT na amostra deve ser mais alta o suficiente para uma detecção adequada. Separações das isoformas no pH entre 3-5 não são reprodutíveis devido a dissociação parcial dos metais (BEATTIE, 1998).

Um dos primeiros trabalhos de separação das isoformas de MT fígado de coelho e MT rim de cavalo em capilar não recoberto foi utilizado o tampão 10 mM sódio fosfato pH 2,5 com o número máximo de três picos para o coelho. MT cavalo foram separados 3 principais picos em pH 11. O pH influencia a resolução das isoformas, sendo possível otimizar a separação de MTs com as mudanças de pH do tampão (RICHARDS et al., 1993).

Surfactantes iônicos têm sido utilizados para diminuir a condutividade dos eletrólitos para as separações das MTs. O surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS) forma micelas negativamente carregadas quando adicionado ao eletrólito. Como o interior dessas micelas é hidrofóbico e o eletrólito é hidrofílico, a separação das isoformas ocorre pelas diferenças de hidrofobicidade e carga. O princípio dessa separação se dá pela associação dessas micelas com as MTs. A resolução obtida é baixa se comparada a outras metodologias, mas a separação é eficiente e a reprodutibilidade do tempo de migração e áreas dos picos é vantajosa (BEATTIE, 1998).

Para os capilares não recobertos, o uso de SDS e o metanol reduzem a adsorção das proteínas nas paredes do capilar e o EOF, permitindo uma separação de um maior número de isoformas. Melhor separação e resolução das MTs de fígado de galinha foram obtidos com adição de SDS em 10 mM de borato de sódio pH 8,4 (BEATTIE, 1998).

Separações de MTs de fígado de Coelho com 110mm de TRIS-borato pH 6,9 exibiram três picos principais e cinco picos para MT rim de cavalo (VIRTANEN; BORDIN, 1998).

Separações das isoformas de MT coelho detectaram 10 picos para MTI e uma isoforma para MTII com separação com o tampão 150 mM TRIS-tricina pH 7,75 com 30-40% de metanol (VIRTANEN; BORDIN, 1998).

### 2.11.2. Capilares recobertos

Uma outra estratégia bastante utilizada para reduzir a adsorção das proteínas é recobrir as paredes do capilar com nanopartículas de poliestirenos, poliamidas, poliacrilamidas ou outros polímeros que permitem reverter o fluxo eletrosmótico ou suprimir a EOF. As nanopartículas bloqueiam os grupos silanóis, reduzindo a interação das proteínas com as paredes do capilar (HASELBERG et al., 2007).

Os capilares recobertos neutros que eliminam a EOF, como as acrilaminas, são utilizados com eletrólitos de baixo pH ou neutro e são compatíveis com uma série de eletrólitos, sendo o fosfato de sódio comumente utilizado (BEATTIE, 1998). Uma vantagem importante comparado com os capilares não recobertos ou capilares recobertos com as paredes positivamente carregadas é que as separações podem ser feitas em direção ao cátodo ou ao ânodo (WILHELMSEN et al., 1998).

Os capilares recobertos com os polímeros poliaminados deixam as paredes do capilar positivamente carregadas, direcionando a EOF para o ânodo (BEATTIE, 1998). Tal modificação é vantajosa no sentido de que é possível alterar o pH entre 2-12 do eletrólito para maximizar a separação entre as isoformas. Com essa técnica é possível obter maior eficiência na separação de MTs com a mesma carga (RICHARDS, 1994).

Os capilares recobertos com poliamina têm sido reportados como os melhores para a resolução dos picos utilizando o sódio fosfato. No entanto, esses capilares possuem menor durabilidade em comparação aos capilares não recobertos.

O primeiro trabalho de separação de misturas de MTI e MTII de fígado de coelho foi desenvolvido com o uso de um capilar recoberto com poliamina com o tampão fosfato em concentração de 0,1 mol/l com pH 7,0. Seis picos foram separados, sendo quatro para MTI e dois para MTII. Nas mesmas condições foram feitas corridas com capilar não recoberto, sendo separados apenas dois picos (RICHARDS, 1994).

Quando o padrão comercial MTI de fígado de coelho separado em capilar não recoberto e recoberto por poliacrilamida a 25 kV com 50 mM TRIS-HEPES pH 7,4, o espécime mostrou dez ou mais picos no capilar recoberto e três picos no capilar não recoberto. Na mistura de MTI com MTII, sendo o cátodo na injeção da amostra, MTII

que possui carga -3 migrou mais rápido do que MTI com carga -2 nessas condições (MINAMI et al., 2002).

Os capilares recobertos por poliacrilamida permitiram a separação de várias sub-isoformas para as duas principais classes de MTs, MTI e MTII, o que não foi possível nos capilares não recobertos. Com isso foi possível a identificação das isoformas da MTI de cavalo em MT-IA e MT-IB. A sub-isoforma MT-IB é semelhante a MTII de fígado de coelho, pois possui um resíduo de aminoácido ácido na posição 10 ou 11 ao invés de um resíduo neutro, tal como encontrado nas MTs-I. MT-IA assemelha-se a MTI de coelho, pois apresentam mesmo tempo de migração (WILHELMSSEN, 1998).

Os mesmos autores conseguiram ainda separar MTI de cavalo em um maior número de sub-isoformas, sendo 4 para MT-IA e 2 para MT-IB, com adição de complexantes como as ciclodextrinas em 100mM de sódio fosfato pH 7,4 (WILHELMSSEN et al., 2002).

### **2.11.3. Adsorção das proteínas nas paredes do capilar**

A adesão das proteínas na superfície do capilar está relacionada com a composição e pH do eletrólito (RABILLER-BAUDRY; CHAUFER, 2001), temperatura de separação (KURRAT et al., 1997; JACKLER et al., 2002) e da composição das paredes do capilar (NAKANISHI et al., 2001). A estrutura primária, conformação, estabilidade, carga e tamanho das proteínas determinam a sua adsorção (NAKANISHI et al., 2001). Em corridas eletroforéticas deve ser evitada, pois promove ao alargamento dos picos, levando a erros nas determinações das mobilidades eletroforéticas e quantificação dessas espécies (SONKE; SALTERS, 2007).

Eletrólitos com alta força iônica reduzem a adsorção tanto em pH acima como abaixo do ponto isoelétrico devido a competição dos íons do eletrólito com as proteínas pelos sítios de adsorção, permitindo que a proteína se mantenha estável sem se desnover (VAN DER VEEN et al., 2004).

O fosfato de sódio é aplicado freqüentemente na separação de proteínas, pois forma um complexo com os grupos silanóis da parede do capilar a baixo pH, levando a repulsão das proteínas das paredes do capilar (MITSYUK, 1972; MCCORMICK, 1988).

### 3. OBJETIVOS

O objetivo geral desta pesquisa foi o de caracterizar as metalotioneínas da cianobactéria *Synechococcus* em comparação com as metalotioneínas de rim de cavalo e de fígado de coelho utilizando a eletroforese capilar. A caracterização completa das metalotioneínas requer a separação das isoformas presentes. Para a aplicação da eletroforese capilar, os parâmetros pesquisados objetivaram:

- a. conseguir a otimização da separação das MTs;
- b. estudar a possibilidade de separação de isoformas com a variação do comprimento e diâmetro interno do capilar;
- c. identificar efeitos provocados pela composição e pH dos eletrólitos;
- d. investigar os efeitos da voltagem aplicada na preservação das isoformas.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Soluções

Todas as soluções foram preparadas utilizando água com 18,2 MΩ cm purificada em sistema *Milli-Q* (Millipore).

#### 4.1.1. Preparação das soluções eletrolíticas para CE

Soluções 70 mmol L<sup>-1</sup> de TRIS (N-tris (hidroximetil) aminometano) (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>) (Sigma Aldrich) com 5% de metanol preparadas por diluição de 0,848 g do tampão em água destilada em tubo falcon de 50 mL. Adicionou-se 5 mL de metanol como um modificador orgânico. O ajuste do pH para 8,2 foi feito com adição de 1 mol L<sup>-1</sup> de HCl. Os volumes das soluções foram completados para 100 mL em balão volumétrico.

Soluções de 20 mmol L<sup>-1</sup> de tetraborato di-sódio decahidratado (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>.10H<sub>2</sub>O) (Merck) preparadas por diluição de 0,763 g do tampão com água destilada em tubo falcon de 50 mL. O ajuste do pH para 8,2 foi feito com adição de 1 mol L<sup>-1</sup> de HCl. Os volumes das soluções foram completados para 100 mL em balão volumétrico.

Soluções de 30 mmol L<sup>-1</sup> de hidrogênio disódio fosfato de septahidratado (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) (Merck) preparadas por diluição de 0,426 g do tampão com água destilada em tubo falcon de 50 mL. O ajuste do pH para 7,4 foi feito com adição de 1 mol L<sup>-1</sup> de HCl. Os volumes das soluções foram completados para 100 mL em balão volumétrico. As características das soluções-tampão preparadas apresentam-se na tabela 2.

Solução 1 mol L<sup>-1</sup> de hidróxido de sódio (NaOH) preparada por diluição de 10g de NaOH (Merck) em 250 mL de água em balão volumétrico.

Solução de 1 mol L<sup>-1</sup> de ácido clorídrico (HCl), preparado por diluição de HCl concentrado (Merck) (37% m/v  $\delta=1,19$  g/cm<sup>3</sup>).

**Tabela 2** - Valores das concentrações e pH das soluções-tampão

<b>Solução-tampão</b>	<b>Concentração (mM)</b>	<b>pH</b>	<b>pK<sub>a</sub></b>
Fosfato	30	7,4	8,3
Borato	20	8,2	9,24
TRIS-HCl 5% metanol	70	8,2	7,21

#### 4.2. Amostras

As MTs foram obtidas de Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA.

MTII de fígado de coelho contendo 7,8 % de Cd e 1,5 % de Zn (lote 99H7011).

MTIA e MTIB de rim de cavalo contendo 3,0% de Cd e 1,5% de Zn (lote 98H7348).

MT purificada da cianobactéria *Synechococcus* PCC 7942 contendo Cd 0%, Zn 7,2%. Todas as amostras foram estocadas a -4°C.

##### 4.2.1. Amostra da metalotioneína de *Synechococcus* purificada

A amostra purificada da MT da cianobactéria *Synechococcus* PCC 7942 foi concedida pela prof. Claudia Blindauer do Departamento de Química, Universidade de Edimburgo, Reino Unido, através da prof. Marli Fiore do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (CENA/USP).

##### 4.2.2. Preparo das soluções das amostras

A amostra de MT da cianobactéria purificada, com massa desconhecida, foi inicialmente diluída em 200 µL de água miliQ e novamente diluída 10 vezes com água mili-Q produzindo a solução diluída da cianobactéria preparada imediatamente

Os padrões comerciais de MTII de coelho e de MTIA e MTIB de cavalo foram dissolvidas em água mili-Q com concentração final de 0,5 mg/mL. Essas amostras foram novamente diluídas em fator de dez com água mili-Q para as corridas eletroforéticas.

Para a identificação das MTs pelos tempos de migração, foi adicionado 20 µL da solução diluída de MT da cianobactéria na solução diluída de MTII de coelho a cada corrida eletroforética, obtendo-se a diluição final de (1:2) MTII de coelho e MT da cianobactéria. O procedimento para preparar a mistura de MTI A e B de cavalo com MT da cianobactéria, foi efetuado com solução diluída (4+1).

Em todos os experimentos com eletroforese capilar foram utilizadas as seguintes amostras com os percentuais de diluição das soluções indicada:

- MT da cianobactéria (10%)
- MT-IA e -IB de cavalo (10%)
- MT-IA e -IB de cavalo (80%)+ MT da cianobactéria (20%)
- MTII de coelho (10%)
- MTII de coelho + MT da cianobactéria (50% de cada)

#### **4.3. Equipamentos e acessórios**

- Eletroforese capilar construído no Laboratório de Química Analítica com fonte de alta voltagem modelo CZE 1000R (Spellmam, EUA), detector UV/Visível LabAlliance com interface cromatográfica CSW 1.7 (Data Apex Ltda) e programa para aquisição de dados conectada a um computador 486.;

- Unidade controladora de gás (Shimadzu Corporation, Kyoto-Japão) e um cilindro de gás argônio de qualidade analítica (Oxipira, Piracicaba-SP, Brasil) para o controle da injeção hidrodinâmica da amostra;

- Capilares não recobertos de sílica fundida com diâmetro interno de 75 µm e 25 µm (Polymicro Technologies, EUA);

- Tubos Eppendorf de 200 µL e 1,5 mL(MPL materiais para laboratório, Piracicaba-SP, Brasil);

- Eletrodos de platina de 300 µm de diâmetro (Loccus Brasil, São Paulo);

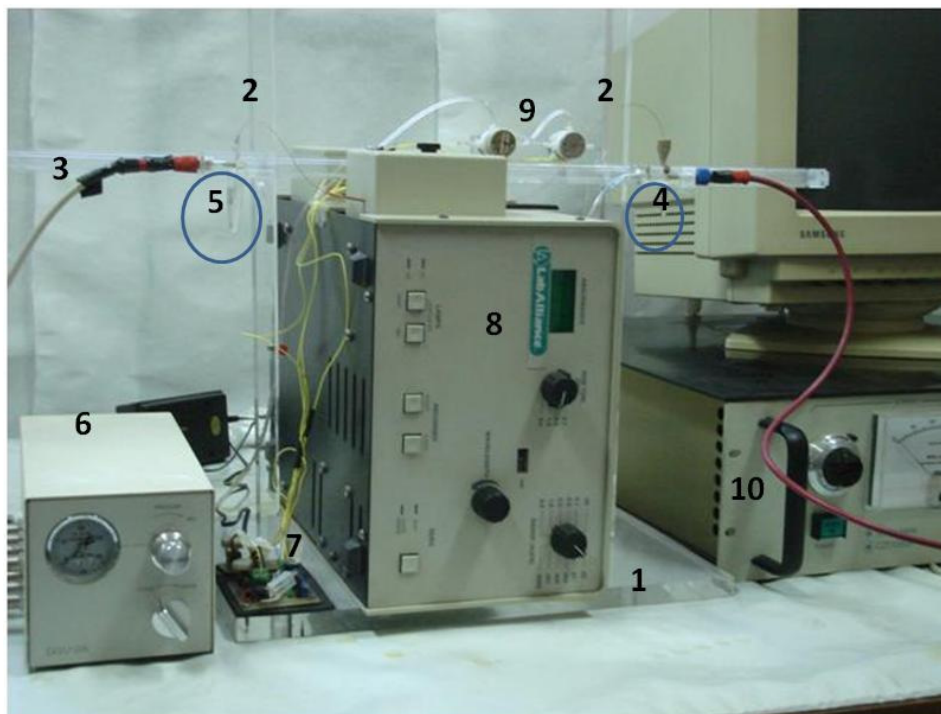
- Válvulas solenóide de três vias NR161T031, (NRResearch and Development Incorporated);

- Balança analítica.

#### 4.3.1. Sistema de eletroforese capilar

O sistema de eletroforese capilar (figura 4) foi projetado e construído no Laboratório de Química Analítica (CENA/USP). O sistema consiste em uma estrutura de acrílico com uma base plana, com duas colunas inseridas perpendicularmente. Nestas, sustenta-se uma haste na horizontal, onde, em cada extremo se localizam os dois microtubos da solução eletrolítica na qual insere-se o capilar e os eletrodos de platina. Na extremidade direita coloca-se o recipiente de 200  $\mu\text{L}$  para injeção da amostra, e a esquerda o recipiente coletor de 1,5 mL. Ambos os extremos do capilar devem permanecer na mesma altura.

O sistema de injeção hidrodinâmico utilizado foi descrito por Suarez et al.(2009) e consiste em sistema temporizado, com duas válvulas solenóide entre a unidade controladora de gás e o dispositivo de injeção. As válvulas solenóides suportam pressões de até 200 kPa e foram conectadas em série com a finalidade de evitar vazamentos do gás para o recipiente de injeção da amostra durante a separação eletroforética.



**Figura 4**-Sistema de eletroforese capilar do Laboratório de Química Analítica (CENA/USP).  
1. Base, 2. Hastes, 3. Vareta, 4. Injetor, 5. Recipiente coletor, 6. Unidade controladora de gás, 7. Circuito eletrônico, 8. Detector UV/Visível, 9. Válvulas solenóide, 10. Fonte de alta tensão

Esse dispositivo injetor contém o acionador S, que permite a abertura das válvulas solenóide sem controle de tempo, e o acionador PBS que permite o controle temporizado de abertura das válvulas. O tempo de injeção ajusta-se no PBS através do resistor variável até 20 k $\Omega$  (SUAREZ, 2010).

As amostras foram injetadas por injeção hidrodinâmica, a 20 kPa por 5s, com injeção 327 nL (SUAREZ et al., 2009) com detecção a 200 nm. Todas as corridas eletroforéticas foram feitas com a polaridade positiva na injeção da amostra.

#### **4.3.2. Pré-condicionamento e condicionamento do capilar eletroforético**

O pré-condicionamento do capilar foi feito pelas adições em sequência das soluções: 1 mol L<sup>-1</sup> de HCl (10 min), 1 mol L<sup>-1</sup> de NaOH (10 min), água deionizada (10 min) e tampão (5 min). Após a análise de cada amostra o capilar foi recondicionado com 1 mol L<sup>-1</sup> HCl (1 min), NaOH (1min), água deionizada (1min) e tampão (1min).

#### **4.4. Efeito da composição dos tampões na separação das isoformas das MTs**

As corridas eletroforéticas foram feitas em capilar de 60 cm de comprimento a partir da injeção da amostra ao detector, e corrente de 42  $\mu$ A, de forma a avaliar o número de isoformas possíveis para cada tampão (tabela 2).

#### **4.5. Efeito do pH do eletrólito**

O efeito do pH na eficiência na separação das MTs foi estudado para o tampão TRIS-HCl (70 mM, 5% metanol) de pH 7,5 e 8,2, utilizando-se capilar com comprimento de 50 cm medidos a partir da injeção da amostra ao detector e voltagem fixa de 10 kV.

#### **4.6. Influência do comprimento do capilar eletroforético**

O efeito do comprimento do capilar na separação das isoformas das MTs foi realizado em capilares de 40, 50 e 60 cm medidos a partir da injeção da amostra ao

detector. As corridas eletroforéticas foram feitas com TRIS-HCl 5% metanol com corrente de 42  $\mu$ A.

#### **4.7. Influência da diferença de potencial (ddp) aplicada**

Utilizou-se voltagens correspondentes a 10 kV, 15 kV, 20 kV e 25 kV em capilar de 60 cm, com o tampão TRIS-HCl 5% de metanol para avaliar os efeitos desses valores na separação.

#### **4.8. Efeito do diâmetro interno do capilar**

Os diâmetros dos capilares estudados foram de 25 e 75  $\mu$ m, utilizando-se capilares com comprimento de 40 cm medidos da injeção da amostra ao detector. O tampão utilizado foi o TRIS-HCl (70 mM, pH 8,2) com 5% de metanol e voltagem fixa de 10 kV.

#### **4.9. Cálculo do número de pratos teóricos (N)**

Para os estudos de efeitos dos tampões, comprimento dos capilares, voltagens e diâmetro interno foram calculados o número de pratos teóricos (N), dada a seguinte equação:

$$N = 5,54 (t_m/W_h)^2,$$

sendo  $t_m$  o tempo de migração e  $W_h$  a largura do pico medida a partir da metade da altura.

Para as isoformas de MT de cavalo, esse número foi calculado considerando sempre o primeiro pico da esquerda para a direita. Para as demais MTs, esse número foi calculado considerando o único pico presente em cada uma delas.

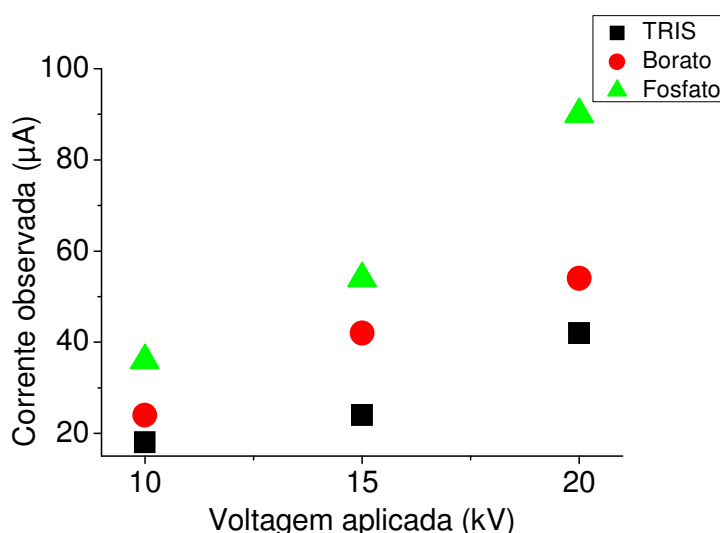
Os valores de  $t_m$  e  $W_h$  foram obtidos através do programa de cálculo de área por diagramação no pico do software OriginPro 8.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Efeito da composição do tampão na separação das isoformas das metalotioneínas

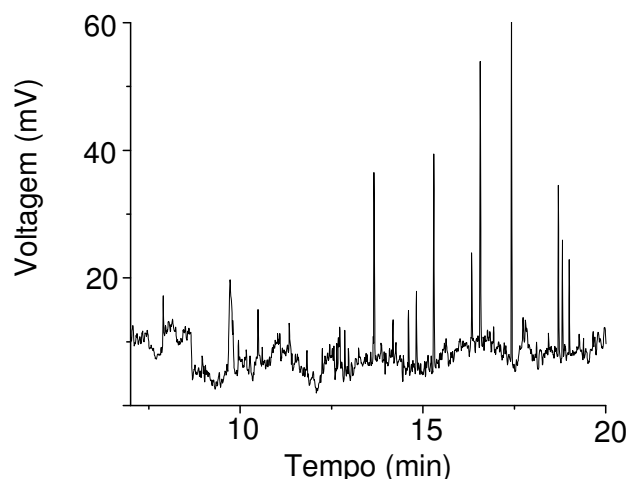
A velocidade de migração do soluto, separação e resolução dos picos são influenciados pelas características eletroforéticas dos tampões. Em termos gerais, o pH, a composição e a força iônica podem afetar consideravelmente a seletividade das separações por eletroforese capilar. Para esse estudo, valores ótimos de concentração e de pH dos tampões (tabela 2) foram aplicados de acordo com a literatura (ALVAREZ-LLAMAS et al., 2001).

A intensidade da corrente gerada pela voltagem aplicada depende da composição do tampão, como pode ser observado na Figura 5.



**Figura 5-** Corrente observada no sistema CE para os tampões 70 mM TRIS-HCl pH 8,2, 20 mM borato pH 8,2 e 30 mM fosfato pH 7,4 para o capilar de 60 cm

Os tampões fosfato e borato possuem alta condutividade, e devem ser usados em baixas concentrações, principalmente devido à resistência no capilar eletroforético. Com a aplicação de uma diferença de potencial da ordem de kV no sistema de eletroforese capilar, pode ocorrer aquecimento devido ao efeito Joule no interior do capilar, o que resulta na degradação das MTs em vários compostos, como mostra a figura 6.

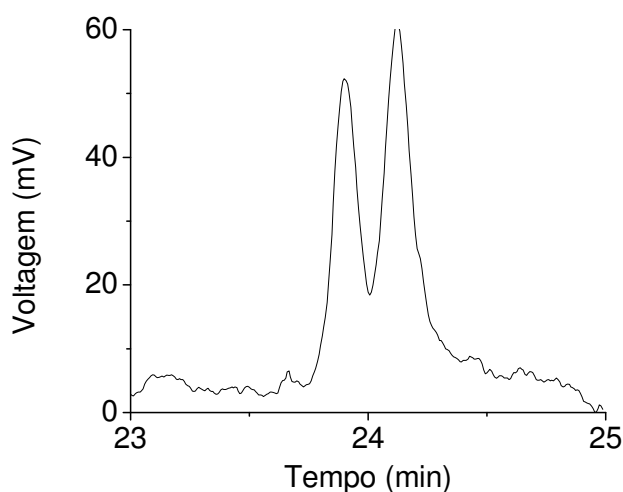


**Figura 6-** Degradação da MT de cavalo provocado pelo aquecimento em CE quando empregou-se tampão borato (20 mM, pH 8,2), voltagem 20 kV, 60  $\mu$ A e capilar de 50 cm

O efeito da composição dos tampões nas misturas de MT de cianobactéria e MTII de coelho foi avaliado fixando-se o comprimento do capilar para 60 cm e a corrente de 42  $\mu$ A, pois as MTs foram degradadas em correntes acima de 42  $\mu$ A.

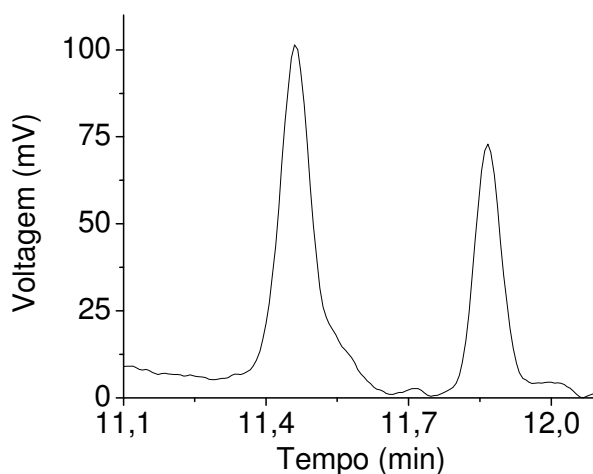
A separação das MTs de cavalo e da cianobactéria apresentaram sinais com maiores tempos de migração, requerendo 25 minutos para cada análise (figura 7). Isso indica que o fosfato proporcionou menor mobilidade para as moléculas do que relatado por ALVARES-LLAMAS, 2001 em um estudo de separação de MTs de coelho no qual obtiveram tempo de migração de 12 minutos. Para nossas condições o número de pratos teóricos atingiu 460 000 para MTII (figura 12), cerca de 10 vezes mais do que o número reportado por ALVARES-LLAMAS, 2001. Entretanto, mesmo o tempo de migração sendo o maior comparado aos outros tampões, foi possível separar as MTs de coelho e da cianobactéria como mostrado na figura 7.





**Figura 7-** Separação das MTs de coelho e da cianobactéria empregando-se o tampão fosfato (30 mM, pH 7,4) 42  $\mu$ A e capilar de 60 cm. Temporalmente observa-se o sinal da MT de coelho seguida do sinal da MT de cianobactéria.

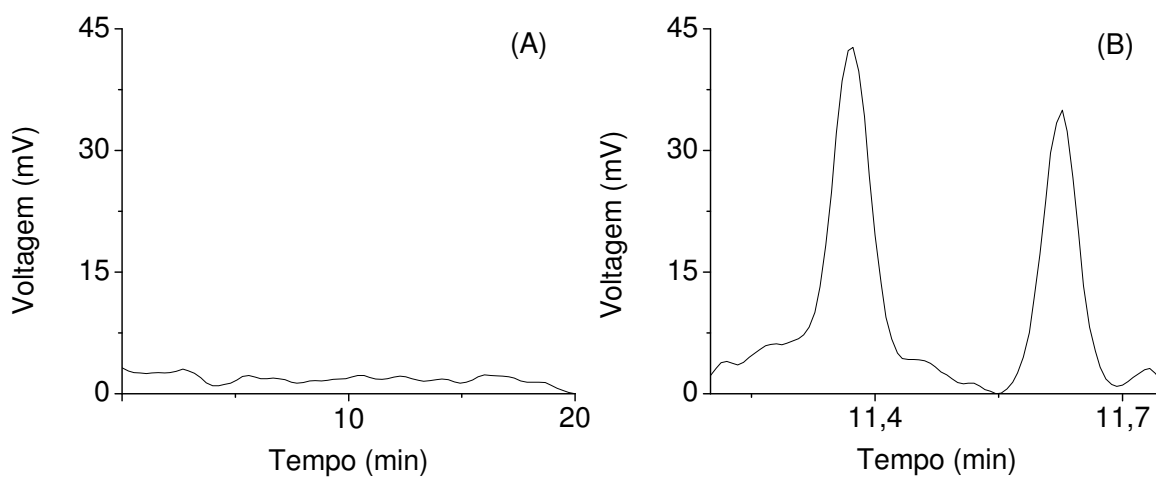
Nas corridas com o tampão borato, as MTs apresentaram menores tempos de migração, entre 11 e 12 minutos, evidenciando da mesma forma os dois picos das MTs na mesma sequência do que no tampão fosfato entretanto com maior resolução (figura 8). Este resultado concorda com o obtido em um estudo realizado por Alvarez-llamas et al. (2001), no qual o tampão borato foi considerado adequado para a separação das isoformas MTI e MTII de fígado de coelho, com o número de pratos teóricos de 40 000 para ambas.



**Figura 8-** Separação das MTs de coelho e da cianobactéria com tampão borato (20 mM, pH 8,2), 42  $\mu$ A, capilar de 60 cm. A sequência dos picos é igual aos da Figura 7.

O número de pratos teóricos calculado para os resultados obtidos nesta pesquisa foi maior, sendo 200 000 para MTII e 400 000 para MT da cianobactéria (figura 13). O borato, portanto, foi considerado adequado para a separação das MTs.

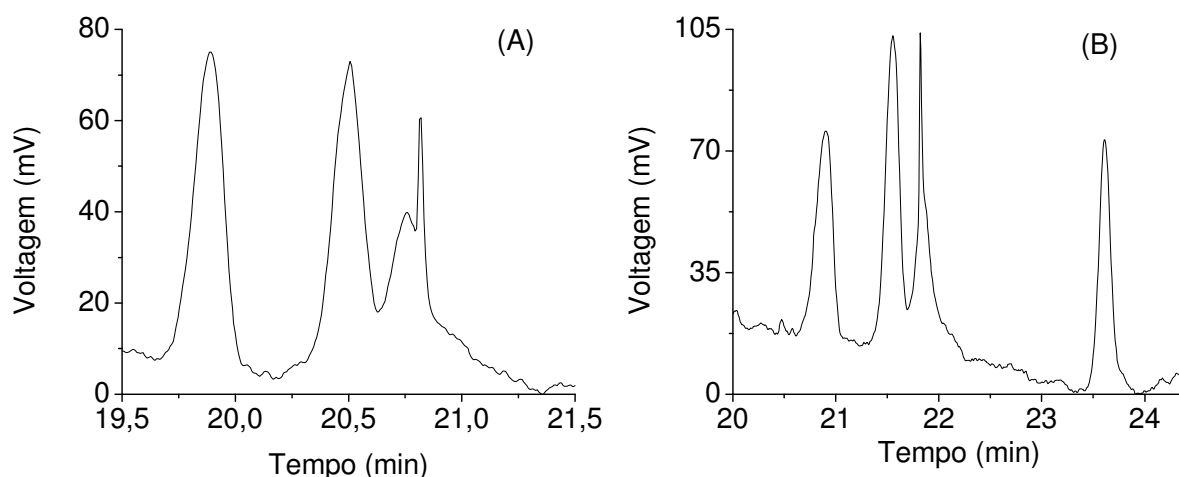
O tampão TRIS-HCl apresentou o perfil eletroforético do branco com linha de base estável e próxima do valor zero, demonstrando que esse tampão é adequado para a separação das MTs (figura 9A). Os tempos de migração para o tampão TRIS-HCl foram de 12 minutos para cada análise (figura 9B). O número de pratos teóricos calculados foi de 470 000 para MTII e 720 000 para a MT da cianobactéria (figura 13). Estes tempos de migração foram os mesmos do que para o borato, mas o número de pratos teóricos foi maior, o que indica que o TRIS-HCl possui uma maior capacidade de separação. Em um estudo realizado por Alvarez-Llamas et al., (2001) verificou-se que dentre os os três tampões testados, o fosfato, borato e TRIS-HCl, este último também apresentou o maior número de pratos teóricos, que foi de 80 000, demonstrando a maior eficiência deste tampão na separação. Portanto, o TRIS-HCl apresentou maior eficiência na separação e o número de pratos teóricos foi maior.



**Figura 9-** Eletroferogramas do tampão TRIS-HCl 5% de metanol (70 mM, pH 8,2), 42  $\mu$ A, capilar de 60 cm (A) e MTs de coelho e da cianobactéria (B).A sequência de picos é a mesma da Figura 7

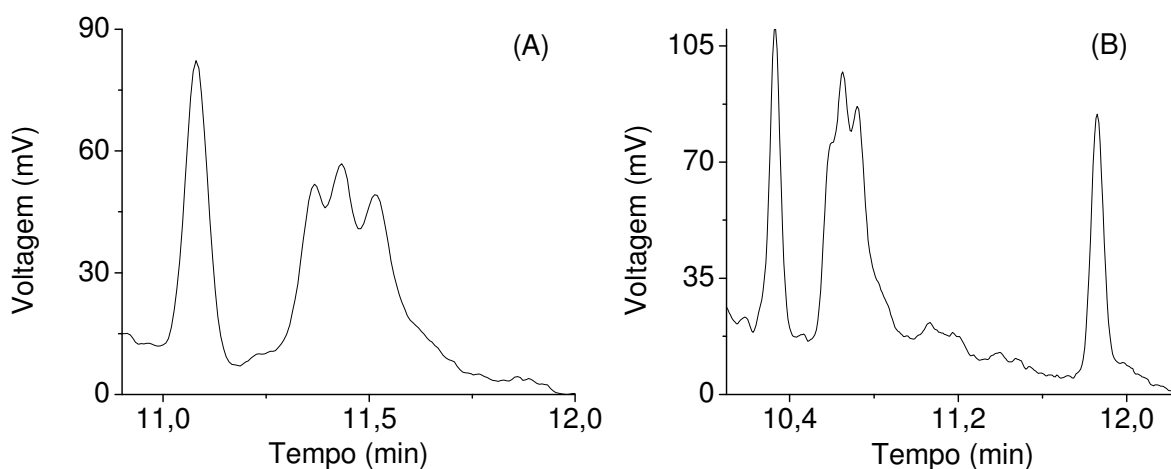
Em continuação, apresentam-se os resultados da separação das MTs de cavalo com várias isoformas e a de cianobactéria. Dentre os três tampões estudados, o fosfato apresentou o maior tempo de migração, com 25 minutos para

cada análise (figura 10B). Três primeiros picos foram detectados para a MT de cavalo e um único pico para MT de cianobactéria. Neste caso, os números de pratos teóricos atingidos de 150 000 e 270 000 para as MTs de cavalo e da cianobactéria, Estes, foram menores do que os obtidos com os outros tampões estudados., (figura 13). Diante do que foi exposto, o tampão fosfato foi o menos adequado para a separação das MTs de cavalo e da cianobactéria. Comparando-se os perfis eletroforéticos da MT de cavalo apresentados nas figuras 10A e 10B, observou-se o mesmo número de isoformas, sugerindo que a mistura de MT de cavalo com MT da cianobactéria não afetou a capacidade de separação das isoformas de MT de cavalo, totalizando três picos.



**Figura 10-** Eletroferograma mostrando o primeiro pico correspondente a MT-IB e os dois picos seguintes correspondente a MT-IA de cavalo (A). Separação das isoformas da MT de cavalo e da MT da cianobactéria. A sequência temporal apresenta três sinais atribuídos a MT cavalo separado do único sinal da MT de cianobactéria. Condições da separação: tampão fosfato (30 mM, pH 7,4), 20 kV, 42  $\mu$ A, capilar de 60 cm

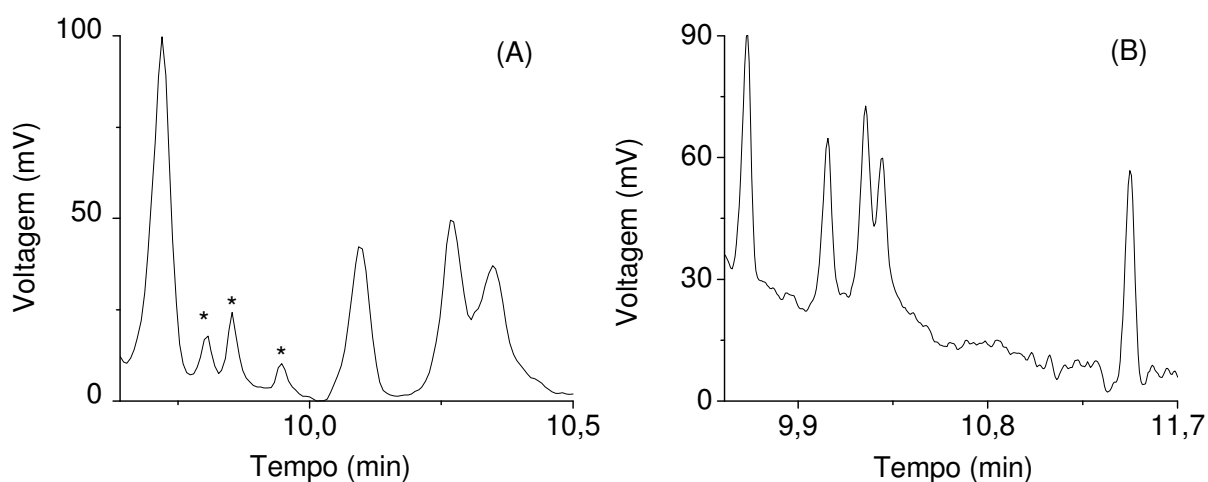
No meio de tampão borato o tempo de migração total para MT de cavalo foi de 12 minutos para cada análise, apresentando em sequência, um primeiro pico e um conjunto de três picos que não foram completamente separados (figura 11A). Na mistura das MTs de cavalo e da cianobactéria (figura 11B), o tempo de migração da MT de cavalo é reduzido e o segundo perfil é constituído por apenas dois picos que não foram completamente separados.



**Figura 11-** Eletroferograma mostrando o primeiro pico correspondente a MT-IB e os três picos seguintes não separados correspondente a MT-IA de cavalo (A). Separação das MTs de cavalo e da cianobactéria (B): à esquerda têm-se os sinais da MT de cavalo e a direita um único sinal para a MT da cianobactéria. Condições de separação: tampão borato (20 mM, pH 8,2), 20 kV, 42  $\mu$ A, capilar de 60 cm

Os resultados acima sugerem que a mistura MTs afetou a capacidade de separação das isoformas de MT de cavalo, reduzindo o número de isoformas. Embora o segundo conjunto de picos de MT de cavalo não foi separado de forma eficiente, foi possível separar as MTs de cavalo e da cianobactéria na mesma corrida eletroforética. O número de pratos teóricos para MT de cavalo foi de 280 000 para o cavalo e 400 000 para a cianobactéria, valores maiores do que os calculados para o tampão fosfato (figura 13).

A separação das isoformas de MT de cavalo com o tampão TRIS-HCl (figura 12A), apresentou maior eficiência na separação, com linha de base mais estável, em comparação com o perfil apresentado na figura 12B. Isso sugere que a mistura das MTs diminuiu a eficiência de separação das isoformas de MT de cavalo.



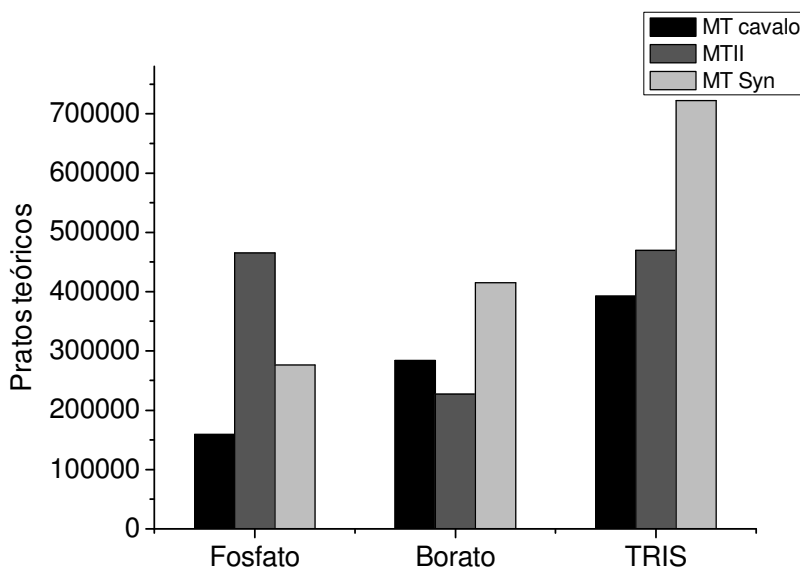
**Figura 12-** Eletroferograma mostrando o primeiro pico correspondente a MT-IB, três picos não identificados (\*) e os três picos seguintes correspondentes a MT-IA de cavalo (A). Separação das MTs de cavalo e da cianobactéria (B). À esquerda têm-se os quatro primeiros sinais das isoformas da MT de cavalo e à direita a MT da cianobactéria. Condições de separação: tampão TRIS-HCl com 5% de metanol (70 mM, pH 8,2), 20 kV, 42  $\mu$ A, capilar de 60 cm

As corridas eletroforéticas com o TRIS-HCl das misturas das MTs de cavalo e da cianobactéria apresentaram o tempo total de migração de 12 minutos e o maior número de picos separados, com o total de cinco picos, sendo os quatro primeiros correspondentes à MT de cavalo e o último, a MT da cianobactéria (figura 12B).

Os números dos pratos teóricos calculados para esse tampão foram os maiores para os três tampões considerados, sendo 390 000 para MT de cavalo e 720 000 para MT da cianobactéria (figura 13). O melhor desempenho do TRIS-HCl se justifica pela adição de 5% de metanol no seu preparo, pois o metanol é um modificador orgânico capaz de modificar a viscosidade e o fluxo eletrosmótico, e conseqüentemente, a mobilidade eletroforética dos analitos presentes na amostra (ALVAREZ-LLAMAS et al., 2001).

Na literatura, foram identificadas duas sub-isoformas para MT de cavalo, sendo classificadas em MTIA e MTIB. Cada um desses grupos foram ainda separados por eletroforese capilar em dois conjuntos, sendo o primeiro constituído pela MTIB composta por dois picos, e o segundo conjunto correspondente a MTIA com quatro picos (WILHELMSEN et al., 2002). Essa mesma sequência foi observada na presente pesquisa (figura 12). No entanto, a separação de MT de cavalo por Wilhelmsen et al., (2002) foi feita em capilar recoberto por poliácridamida

de diâmetro interno de 25  $\mu\text{m}$ , permitindo portanto, uma maior separação e picos mais finos. Para a obtenção dos resultados apresentados na figura 12, utilizou-se o capilar sem recobrimento interno, com o diâmetro de 75  $\mu\text{m}$ , o que resultou em um único pico para MT-IB e três picos para MT-IA e bandas mais largas.



**Figura 13-** Comparação de diferentes soluções-tampão na separação das MTs em pratos teóricos

As corridas eletroforéticas com os tampões borato, fosfato e TRIS-HCl permitiram separar as MTs de mamíferos e da cianobactéria. Como o TRIS-HCl apresentou menor tempo de migração e maiores pratos teóricos, este tampão foi escolhido para o estudo do efeito do pH, das voltagens aplicadas, do comprimento do capilar e do diâmetro interno do capilar para a separação das MTs.

## 5.2. Efeito do pH do eletrólito

O pH do eletrólito desempenha um papel importante na separação por eletroforese capilar. O grau de espécies ionizadas depende do pH da solução tampão. Diferenças no número de espécies ionizadas modificam as mobilidades eletroforéticas e eletrosmóticas, afetando a eficiência na separação e o tempo de migração (LI, 1992).

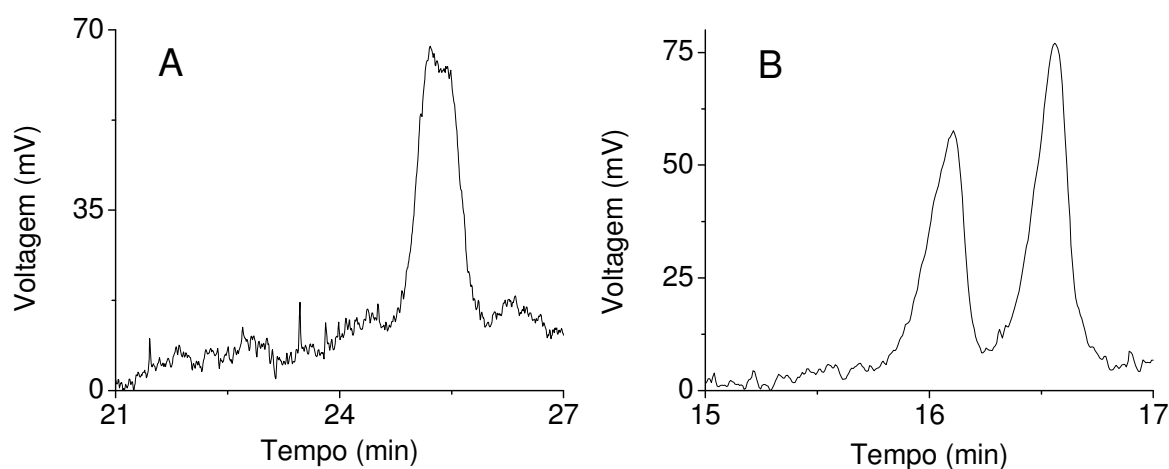
A separação das isoformas das MTs em meio neutro e ligeiramente alcalino permite estudar as suas funções em condições fisiológicas, uma vez que nessas condições, os metais permanecem associados às MTs. Os pHs das soluções

empregadas para as corridas eletroforéticas estão na faixa de 6,75 a 8,5 (VIRTANEN; BORDIN, 1998).

Para avaliar o efeito do pH do eletrólito na separação das MTs, utilizou-se o capilar de 50 cm, voltagem de 10 kV e 70 mM TRIS-HCl com adição de 5% de metanol. A faixa de pH empregada para a separação das MTs com o TRIS-HCl é de 6,9-8,5 (ALVAREZ-LLAMAS, 2001). Dessa forma, para esse estudo, os pHs 7,5 e 8,2 para esse tampão foram utilizados.

As corridas foram feitas com as soluções de MTs da cianobactéria, MT cavalo e MTII de coelho separadamente, bem como as misturas de MTs de cavalo e cianobactéria e MTs de coelho e da cianobactéria. O tempo de migração foi maior para todas as amostras para o pH 7,5. Na mistura das MTs de cavalo e da cianobactéria para ambos os pHs, os perfis foram semelhantes ao da figura 22. Entretanto, na mistura das MTs de coelho e da cianobactéria, houve co-migração das MTs, impossibilitando a separação para o pH 7,5 (figura 14-A). Esse efeito pode ser explicado por mudanças na distribuição das cargas nas MTs (VIRTANEN; BORDIN, 1998). O TRIS-HCl com pH 8,2 possibilitou a separação das MTs de coelho e da cianobactéria (figura 14-B).

Em um estudo feito por Vindevogel (1991), observou-se uma diminuição no tempo de migração das isoformas de MTI e MTII de coelho com o aumento do pH de 7 para 9, com o uso de TRIS-Borato. Isso se deve ao aumento da força iônica do tampão em função do aumento do pH, o que aumenta a mobilidade das moléculas.



**Figura 14-** Misturas de MTs de coelho e da cianobactéria em pH 7,5 (A) e pH 8,2 (B). Condições da separação: tampão 70 mM TRIS-HCl 5% de metanol, 10 kV, capilar de 50 cm

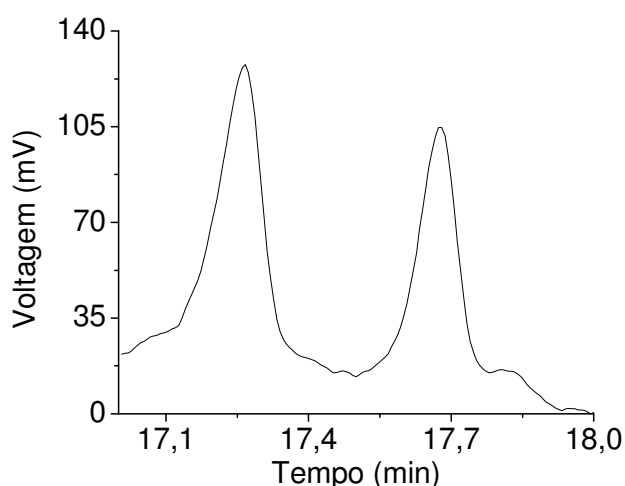
Visto que as condições ótimas de separação foram obtidas para o TRIS-HCl pH 8,2, os experimentos de efeito das variações de voltagem, comprimento do capilar e diâmetro interno do capilar foram feitos com esse tampão com pH 8,2.

### 5.3. Influência da variação das voltagens na separação

As corridas eletroforéticas das misturas de MTII de coelho e MT da cianobactéria foram feitas com o TRIS-HCl (70 mM, pH 8,2) com 5% de metanol em voltagens de 10 kV a 25 kV para estudar o efeito desse parâmetro na separação.

Aplicações de altas voltagens no sistema de eletroforese capilar provoca um aumento acentuado na corrente observada, o que leva ao aquecimento interno do capilar, levando a irreprodutibilidade dos resultados e à degradação das MTs. Na variação das voltagens aplicadas entre 10 a 25 kV, observou-se o valor máximo de 78  $\mu$ A.

Para cada voltagem, observou-se efeitos diferenciados na separação das MTs. Na voltagem de 10 kV com corrente observada de 18  $\mu$ A, as corridas apresentaram tempos muito longos, com resultados irreprodutíveis e perfis desconhecidos. Sendo assim, a menor voltagem considerada para a detecção da separação das MTs foi 15 kV.



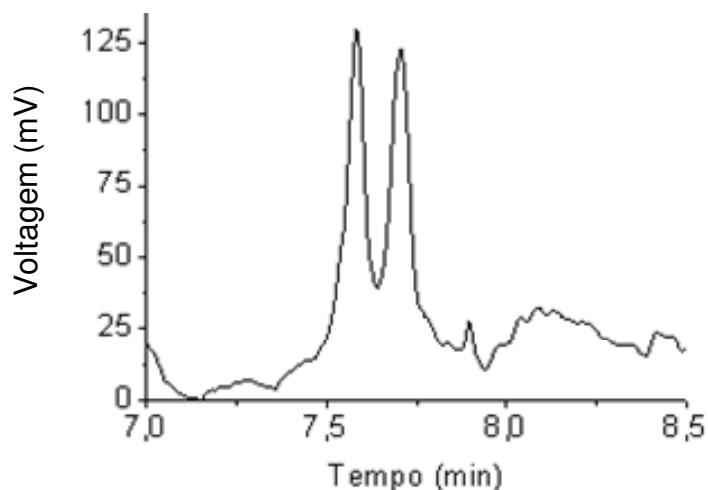
**Figura 15-** Eletroferograma da Separação das MTs, sendo o primeiro sinal correspondente a MTII de coelho e o segundo, MT da cianobactéria. Condições de separação: tampão TRIS-HCl (70 mM, pH 8,2), 15 kV, 24  $\mu$ A, capilar de 60 cm



Na voltagem aplicada de 15 kV observou-se um maior tempo de migração e menor corrente observada de 24  $\mu\text{A}$ , observando-se dois picos, sendo o primeiro correspondente à MTII de coelho e o último, a MT da cianobactéria (figura 15). O número de pratos teóricos foi de 200 000 para MTII e 400 000 para MT da cianobactéria (figura 19). Em um estudo da variação das voltagens aplicadas na separação de MTI e MTII com o TRIS-HCl, obteve-se um valor de 50 000 para MTII (ALVAREZ-LLAMAS et al., 2002), demonstrando portanto que boas condições de separação foram obtidas com a aplicação dessa voltagem.

Na voltagem aplicada de 20 kV, observou-se que o tempo de migração diminuiu para 12 minutos, já que o aumento da voltagem aumentou a corrente para 42  $\mu\text{A}$  (figura 9). O aumento da voltagem permitiu a separação das MTs com o tempo de migração menor. A eficiência foi maior nessas condições, pois houve o aumento no número de pratos teóricos de MTII de coelho para 470 000 e de 720 000 para MT da cianobactéria (figura 19). O aumento do número de pratos teóricos também foi visto por Alvares-Llamas et al., (2001) na separação das MTs de coelho, atingindo um valor de 90 000. Diante do que foi exposto, a separação das MTs com voltagem de 20 kV foi adequada.

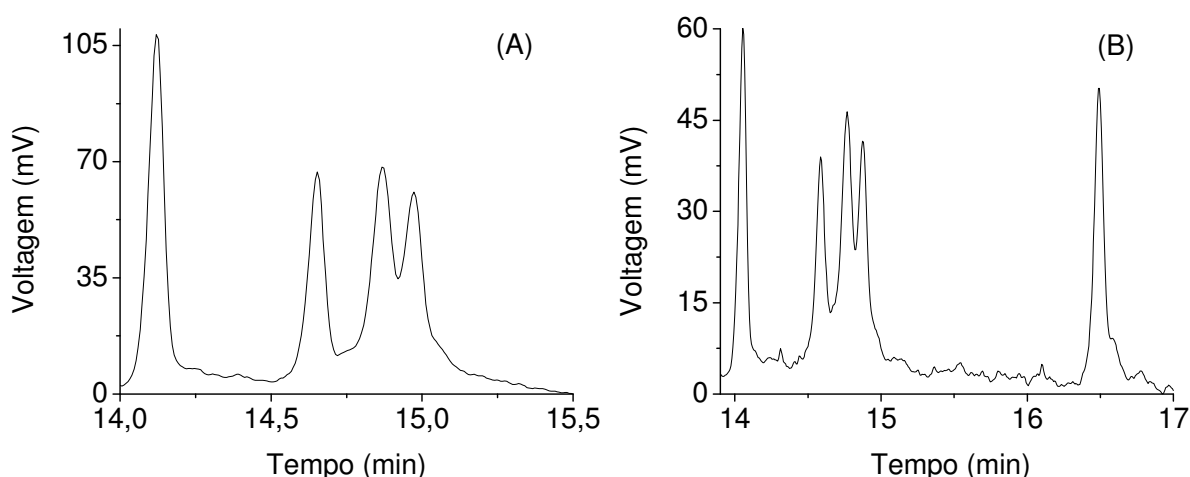
Na voltagem aplicada de 25 kV, observou-se o menor tempo de migração, que foi de 8 minutos, já que a corrente aumentou para 78  $\mu\text{A}$ . Nessas condições foi possível separar as MTs (figura 16). Entretanto, uma menor eficiência da separação foi verificada pela diminuição do número de pratos teóricos para 200 000 para MTII e MT da cianobactéria (figura 19). A diminuição do número de pratos teóricos foi observada para essa voltagem com o mesmo tampão para 30 000 para MTII (ALVAREZ-LLAMAS et al., 2001).



**Figura 16-** Eletroforograma correspondente à separação das MTs de coelho e da cianobactéria. A sequência dos sinais é a mesma da Figura 15. Condições da separação: tampão TRIS-HCl (70 mM, pH 8,2), 25 kV, 78  $\mu$ A, capilar de 60 cm

O estudo da variação das voltagens aplicadas demonstrou que a melhor eficiência na separação das MTs de coelho e da cianobactéria foi obtida para 20 kV, que apresentou maiores números de pratos teóricos para ambas as MTs.

Não foram observados picos registrados para a voltagem aplicada de 10 kV, com corrente observada de 18  $\mu$ A, indicando que essa corrente não foi adequada para a separação das MTs em capilar de 60 cm de comprimento. Dessa forma a corrente mínima adotada para esse estudo foi de 24  $\mu$ A, correspondendo a voltagem aplicada de 15 kV (figura 17).

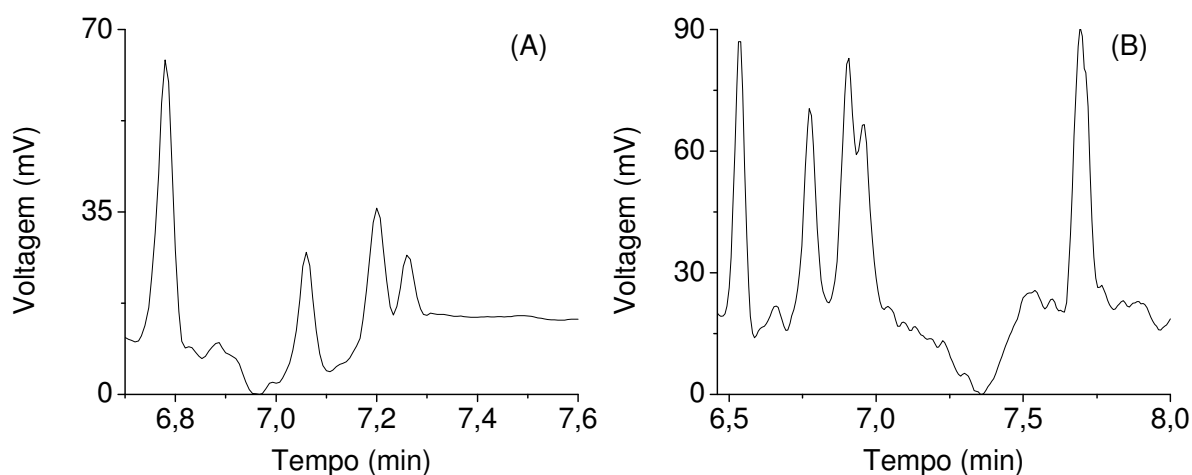


**Figura 17-** Eletroferograma mostrando o primeiro pico correspondente a MT-IB e os três picos seguintes correspondentes a MT-IA de cavalo (A). Separação das MTs de cavalo e da cianobactéria (B). À esquerda têm-se os quatro primeiros sinais das isoformas da MT de cavalo e à direita a MT da cianobactéria. Condições de separação: tampão TRIS-HCl com 5% de metanol (70 mM, pH 8,2), 15 kV, 24  $\mu$ A, capilar de 60 cm

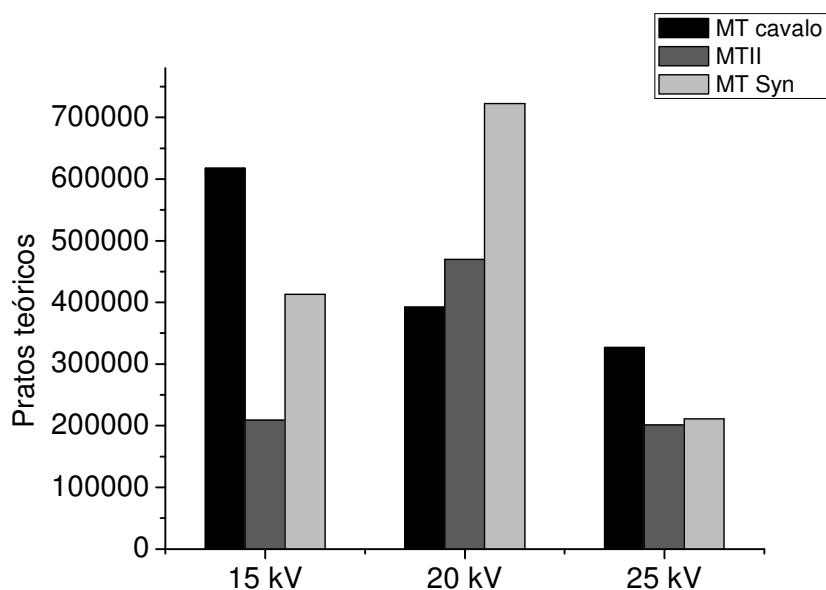
A figura 17A apresenta o perfil eletroforético de MT-IB, correspondente ao primeiro pico e o conjunto de três picos seguidos, correspondentes a MT-IA de cavalo. A separação foi eficiente, com picos bem definidos e linha de base sem ruídos. A figura 17B apresenta o mesmo perfil também com boa resolução, porém com ruídos na linha de base. Nessa condição, a separação das MTs de cavalo e da cianobactéria foi eficiente, obtendo-se maior número de pratos teóricos para MT de cavalo que foi de 600 000. Para a MT da cianobactéria, o número de pratos teóricos atingidos foi intermediário, correspondendo a 400 000 (figura 19).

Na voltagem aplicada de 20 kV, observou-se a corrente de 42  $\mu$ A, com tempo de migração de 12 minutos (figura 12). Boas condições de separação foram alcançadas, obtendo-se o maior número de pratos teóricos para MT da cianobactéria, correspondendo a 720 000. Para MT cavalo, observou-se um valor intermediário de 400 000 (figura 19). Esses dados indicam que a melhor condição para a separação das isoformas da MT de cavalo é a corrente de 24  $\mu$ A, o que corresponde a voltagem aplicada de 15 kV. Essa diferença se deve à presença de vários picos para MT de cavalo, sendo necessária a aplicação de correntes mais baixas para possibilitar a separação.

Na voltagem de 25 kV, obteve-se a corrente de 78  $\mu$ A e o menor tempo de migração de 8 minutos. Nessa condição, foi possível separar as MTs de cavalo e da cianobactéria (figura 18). Entretanto, obteve-se uma menor eficiência na separação, considerando que o número de pratos teóricos da MT de cavalo foi o menor, 320 000, bem como para a MT de cianobactéria, 200 000 (figura 18).



**Figura 18-** Eletroferogramas das isoformas MT-IB e MT-IA de cavalo (A) e da separação das MTs de cavalo e da cianobactéria (B). A sequência de sinais correspondentes às MTs é a mesma da Figura 17. Condições da separação: tampão TRIS-HCl 5% de metanol (70 mM, pH 8,2), 25 kV, 78  $\mu$ A, capilar de 60 cm



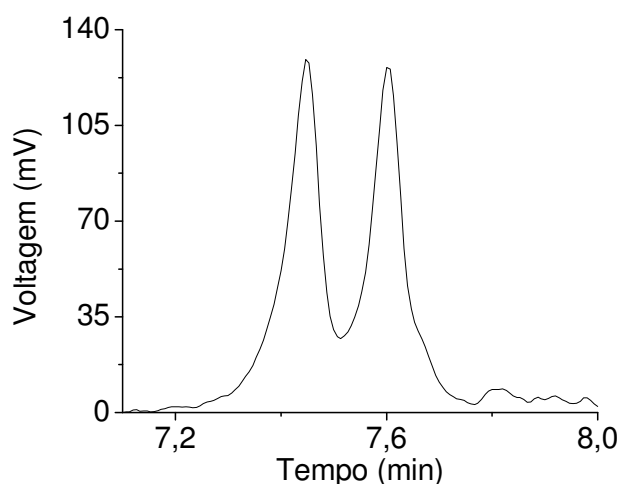
**Figura 19-** Pratos teóricos da variação das voltagens aplicadas

O estudo da variação da voltagem na separação das MTs demonstrou que a maior eficiência para MT de cavalo foi com a voltagem de 15 kV, com a corrente observada de 24  $\mu$ A, enquanto que para MTII de coelho e MT da cianobactéria foi de 20 kV, com corrente observada de 42  $\mu$ A.

#### 5.4. Influência da variação dos comprimentos do capilar na separação

O efeito do comprimento do capilar de 40, 50 e 60 cm na separação das MTs foi avaliado com o TRIS-HCl (70 mM, pH 8,2) 5% de metanol, com voltagem aplicada de 15 kV para todos os comprimentos considerados. A voltagem de 10 kV, com corrente observada de 18  $\mu$ A, não foi escolhida para esse estudo, pois não foram detectados picos correspondentes às MTs no capilar de 60 cm.

Na separação das MTs de coelho e da cianobactéria no capilar de comprimento de 40 cm (figura 20), obteve-se a corrente de 42  $\mu$ A, com número de pratos teóricos de 100 000 para as MTs de coelho e da cianobactéria (figura 22). Nesse comprimento, a corrente máxima observada levou a diminuição no tempo de migração, que foi de 8 minutos.



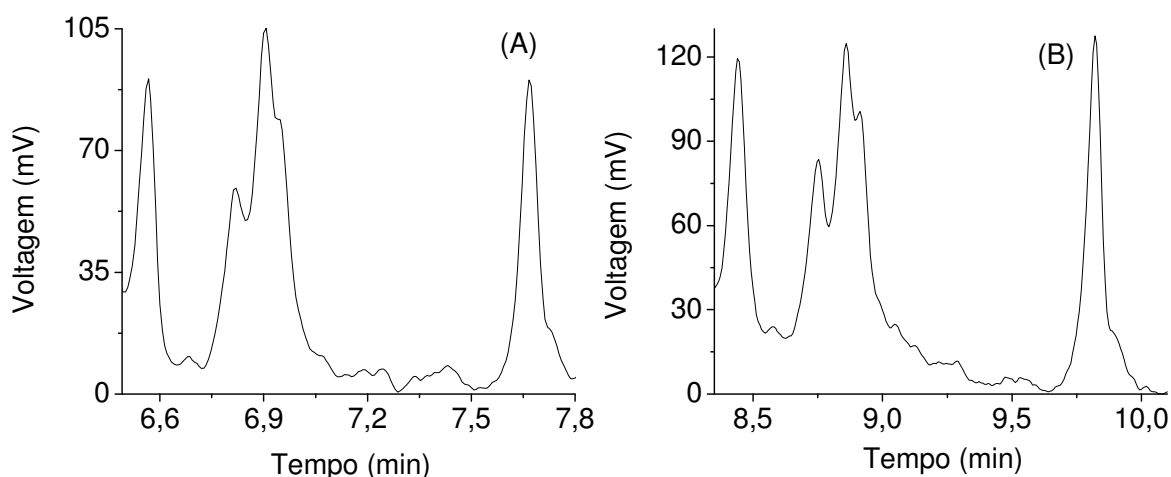
**Figura 20-** Eletroferograma da mistura das MTs de coelho e da cianobactéria com a mesma sequência de sinais da Figura 15. Condições da separação: tampão TRIS-HCl 5% de metanol (70 mM, pH 8,2), 42  $\mu$ A, capilar de 40 cm

Na separação das MTs de coelho e da cianobactéria no capilar de 50 cm de comprimento, obteve-se o valor da corrente de 30  $\mu$ A, o que levou ao aumento do tempo de migração para 12 minutos, com perfil semelhante ao da figura 20. A eficiência da separação foi demonstrada pelo aumento do número de pratos teóricos, que foi de 150 000 para MT de coelho e 200 000 para MT da cianobactéria (figura 22).

Na separação das mesmas MTs com o capilar de 60 cm de comprimento, obteve-se o maior tempo de migração, devido a diminuição da corrente para 24  $\mu$ A (figura 15). Nessa condição, obteve-se maior eficiência na separação, comprovada pelo aumento no número de pratos teóricos, que foi de 200 000 para MT de coelho e 400 000 para MT da cianobactéria (figura 22).

A variação do comprimento do capilar com a aplicação da mesma voltagem levou a diminuição da corrente observada. Conseqüentemente, um maior tempo de migração foi observado para as MTs, aumentando a eficiência de separação. Em todos os comprimentos estudados, foi possível separar as MTs de coelho e da cianobactéria.

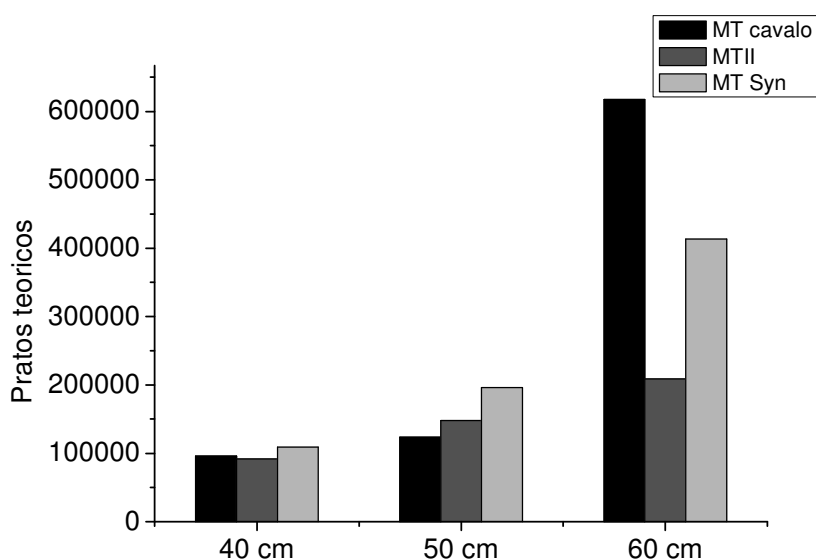
Na separação das MTs de cavalo e da cianobactéria com o capilar de comprimento de 40 cm, observou-se a corrente de 42  $\mu$ A (figura 21A). Para a MT de cavalo, essas condições não foram satisfatórias para a separação das isoformas, como demonstrado por um menor número de pratos teóricos, que foi de 100 000 para ambas as MTs (figura 22).



**Figura 21-** Eletroferogramas das misturas de MTs de cavalo e da cianobactéria. Em sequência, o primeiro sinal corresponde a MT-IB de cavalo, o segundo conjunto de picos não separados de MT-IA e o último sinal correspondente a MT da cianobactéria obtidos em capilares de 40 cm (A) e 50 cm (B) de comprimento. Condições de separação: tampão TRIS-HCl com 5% de metanol (70 mM, pH 8,2)

Para o comprimento de 50 cm, observou-se que a corrente diminuiu para 30  $\mu\text{A}$ , aumentando o tempo de migração para 10 minutos (figura 21B). Essa condição foi satisfatória para a separação das MTs. Para MT de cavalo, o número de pratos teóricos foi de 120 000 e para MT da cianobactéria, o número foi de 200 000 (figura 22).

Para o comprimento de 60 cm, observou-se uma corrente de 24  $\mu\text{A}$ , levando ao aumento do tempo de migração para 17 minutos (figura 17). O aumento do comprimento do capilar levou ao aumento na eficiência de separação das MTs e foi satisfatório na separação das isoformas das MTs de cavalo. Nessas condições, o número de pratos teóricos aumentou para 600 000 para MT de cavalo e 400 000 para MT da cianobactéria (figura 22).



**Figura 22-** Pratos teóricos da variação do comprimento do capilar.

Em todos os comprimentos considerados, foi possível separar as MTs de cavalo e da cianobactéria. No entanto, a eficiência na separação das isoformas de MT de cavalo foi obtida em capilar de 60 cm de comprimento, com corrente de 24  $\mu\text{A}$ .

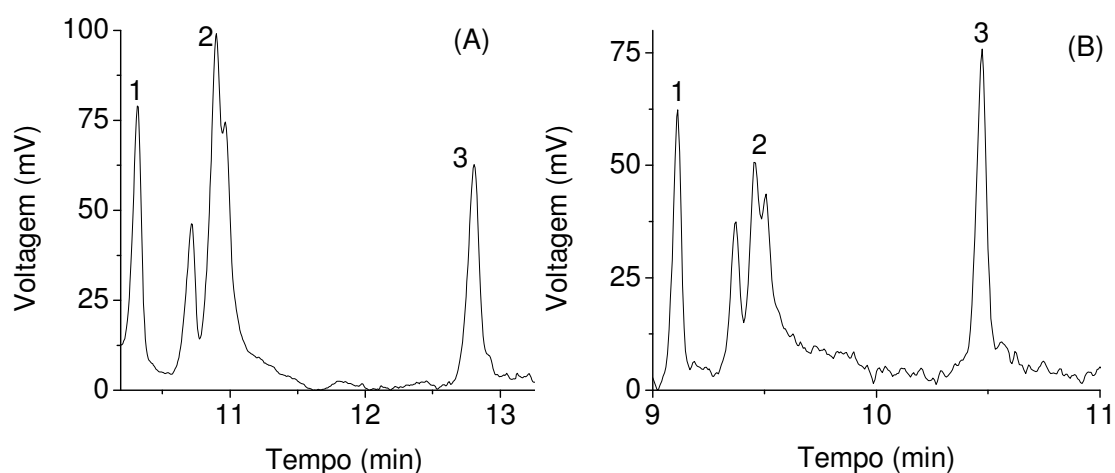
Um estudo de separação de proteínas contendo resíduos de histidinas em eletroforese capilar em pH 7, com 15 kV, a variação do comprimento do capilar de 40 cm para 70 cm também resultou no aumento no número de pratos teóricos, com maiores tempos de migração para as moléculas (STOVER et al.; 1989). O mesmo efeito foi observado na separação de proteínas em capilares de 20 a 80 cm (TSUJI, 1994). O aumento do comprimento do capilar é uma estratégia utilizada para minimizar o efeito Joule em sistemas sem refrigeração, pois dissipa o calor gerado, evitando a degradação das MTs.

### 5.5. Efeito do diâmetro interno do capilar

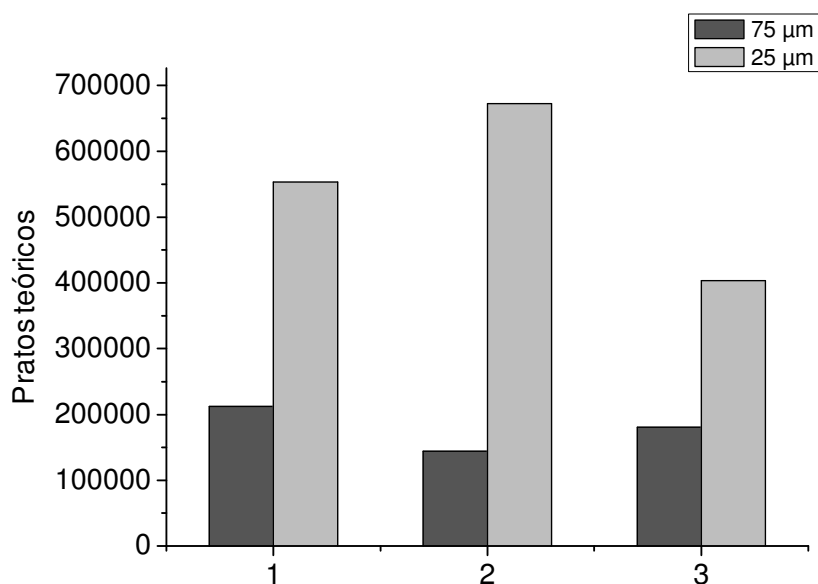
O aumento do comprimento ou a diminuição do diâmetro interno do capilar são estratégias utilizadas para dissipar o superaquecimento gerado pelas voltagens aplicadas e aumentar a eficiência na separação (BEATTIE, 1998). A mistura de MTs de fígado de cavalo e de cianobactéria foram injetadas em capilares de 40 cm medidos a partir da injeção da amostra ao detector, com diâmetros de 25 e 75  $\mu\text{m}$ ,



para avaliar o efeito desse parâmetro na separação (figura 23). A eficiência foi demonstrada pelo número de pratos teóricos a partir dos dados gerados pelas medidas das larguras e dos tempos de migração dos picos numerados de 1 a 3 (figura 24).



**Figura 23-** Eletroferogramas da separação das MTs de cavalo e da cianobactéria: (A) 75  $\mu\text{m}$ , injeção 20 kPa por 5s e (B) 25  $\mu\text{m}$ , injeção 20 kPa por 10 s. Condições de separação: tampão TRIS-HCl com 5% de metanol (70 mM, pH 8,2), 10 kV, capilar de 40 cm de comprimento.



**Figura 25**

**Figura 24-** Pratos teóricos da variação do diâmetro interno do capilar

A eficiência na separação diminui com o aumento do diâmetro interno do capilar. Liu et al. (1992) estudaram os efeitos do diâmetro do capilar (10-100  $\mu\text{m}$ ) e voltagem aplicada na separação de aminoácidos. Os efeitos térmicos foram pouco pronunciados na dispersão da zona de amostra em capilares com diâmetro interno  $<50 \mu\text{m}$  e significativos para capilares com diâmetro  $> 75 \mu\text{m}$ .

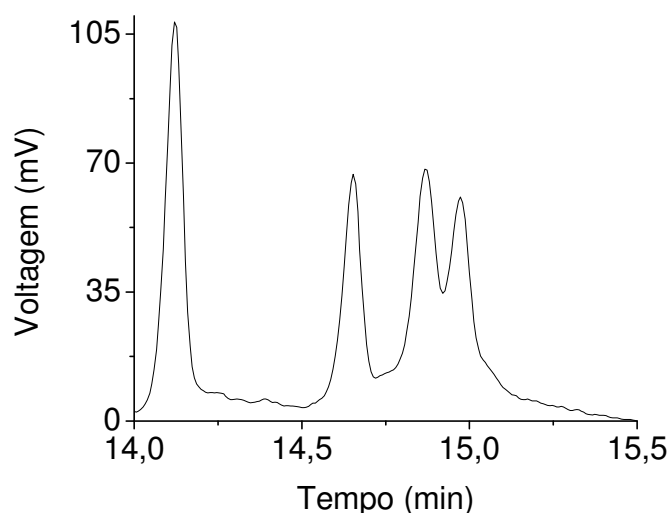
No entanto, quando esse efeito é estudado em função da força iônica do tampão, é preciso salientar que a adesão das proteínas com a superfície de sílica do capilar promove o alargamento dos picos. Para aumentar a sensibilidade do sinal analítico, o recobrimento da parede interna do capilar é frequentemente utilizado, aumentando a capacidade de separação.

O estudo realizado por (MOHABBATI; WESTERLUND, 2006) comparou o desempenho de separação entre os capilares de 25  $\mu\text{m}$  e 50  $\mu\text{m}$  em função do número de pratos teóricos para as proteínas quimotripsinogênio, citocromo C, lisosima e ribonuclease. O número de pratos teóricos foi maior para o capilar de 25  $\mu\text{m}$ , pois o recobrimento interno do capilar foi mais estável nesse diâmetro, reduzindo a interação das proteínas com a parede interna do capilar, proporcionando maior sensibilidade nos eletroferogramas.

Nesse estudo, os capilares não foram recobertos. No entanto, a adição de 5% de metanol no tampão TRIS-HCl proporcionou um efeito semelhante, impedindo a adesão das MTs nas paredes internas dos capilares. O número de pratos teóricos e melhor definição dos picos indicam que a capacidade de separação é mais pronunciada no capilar com o diâmetro menor, tal como reportado por Mohabbati e Westerlund (2006).

## **5.6. Separação das isoformas das MTs**

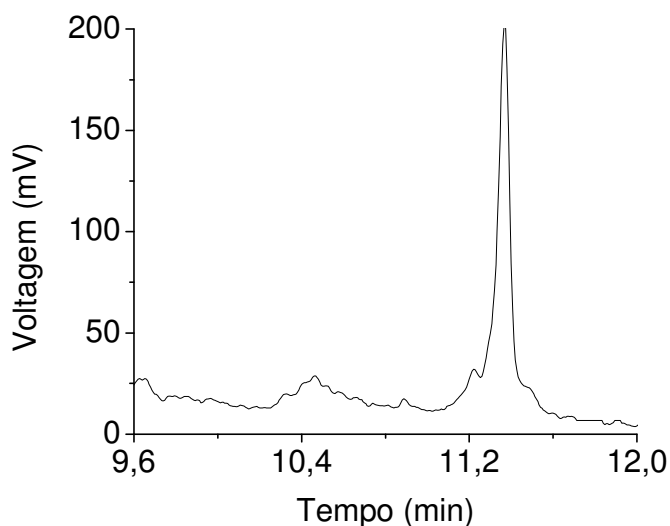
O comprimento do capilar, a corrente, o diâmetro interno do capilar e a composição do tampão foram definidos de acordo com os estudos realizados. Para a separação das isoformas da MT de cavalo, obteve-se a melhor eficiência na separação utilizando-se o capilar de 60 cm de comprimento, com diâmetro interno de 75  $\mu\text{m}$ , com corrente aplicada de 24  $\mu\text{A}$  e 70 mM de TRIS-HCl com adição de 5% de metanol, pH 8,2 (figura 25)



**Figura 25-** Eletroferograma de MT de rim de cavalo, mostrando o primeiro pico correspondente a MT-IB e os três picos seguintes correspondentes a MT-IA de cavalo. Condições de separação: tampão TRIS-HCl com 5% de metanol (70 mM, pH 8,2), 15 kV, 24  $\mu$ A, capilar de 60 cm

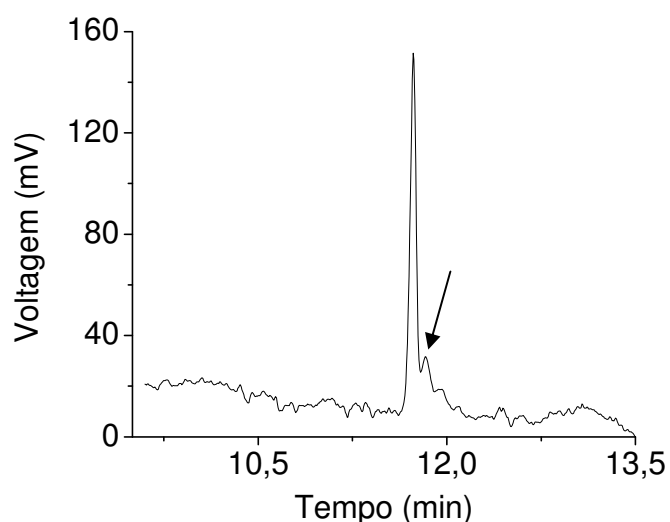
Os resultados obtidos foram congruentes com a literatura, sendo cinco picos detectados com TRIS-borato pH 6,9 em capilar sem recobrimento interno (VIRTANEN; BORDIN, 1996). Seis metaloformas para MT de cavalo foram separadas com o tampão fosfato de sódio pH 7,5 em capilar recoberto por poliacrilamida (WILHELMSEN, 2002).

Os maiores valores de pratos teóricos na separação da MT de *Synechococcus* e MTII de coelho foram encontrados nas mesmas condições, entretanto, a melhor corrente encontrada foi de 42  $\mu$ A. Os eletroferogramas de MTII de coelho (figura 26) mostraram uma única isoforma o que é congruente com os resultados obtidos na literatura (VIRTANEN; BORDIN, 1998).



**Figura 26-** Eletroferograma da única isoforma de MTII de fígado de coelho com o tampão TRIS-HCl 5% de metanol (70 mM, pH 8,2), 20 kV, 42  $\mu$ A, capilar de 60 cm

A MT de *Synechococcus* é composta por um pico dominante e um pico com menor intensidade (figura 27). Em um estudo de caracterização da complexação de Zn-MTs por eletroforese capilar obteve-se perfil semelhante em MT de rato com alto teor de zinco em tampão TRIS-Tricina pH 8. Este perfil não foi observado em MT contendo cádmio, sugerindo que o zinco induz a síntese da forma menos abundante nos organismos (DABRIO et al., 2000).



**Figura 27-** Eletroferograma da MT da cianobactéria *Synechococcus* com o tampão 70 mM de TRIS-HCl 5% de metanol, 20 kV, 42  $\mu$ A, capilar de 60 cm. A seta mostra o pico de menor intensidade

Embora em condições fisiológicas em que o pH do organismo é neutro, a MT de cavalo possui carga -2 e duas isoformas MT-IA e MT-IB, MTII de coelho possui carga -3 e uma isoforma e a MT de cianobactéria possui carga de -1 e estrutura diferenciada. Considerando a polaridade utilizada nos experimentos de CE, que foi positiva na injeção das amostras, se a migração dependesse somente da carga, a ordem sequencial da detecção das espécies seria MT de cianobactéria, MT de cavalo e MT de coelho. Entretanto, os resultados mostram ordem reversa devido ao tamanho e formato das moléculas envolvidas. De acordo com a literatura, as MTs dos mamíferos possuem a estrutura molecular em forma de haltere (NIELSON, 1984; MASON et al., 2007), em que cada anilha é composta pelos domínios  $\alpha$  ( $M_4Cys_{11}$ ) e  $\beta$  ( $M_3Cys_9$ ). A MT de cianobactéria assemelha-se ao  $\alpha$ -domínio de MTs dos mamíferos, apresentando portanto um tamanho menor. Essas diferenças permitem que as MTs de mamíferos e da cianobactéria sejam eficientemente separadas pelas diferenças carga/tamanho por eletroforese capilar.

## 6. CONCLUSÕES

As diferenças estruturais entre as MTs de mamíferos e da cianobactéria *Synechococcus* foram comprovadas eficientemente com o uso da eletroforese capilar. A comparação da separação de MTs individuais ou em misturas por CE, permite concluir que tanto as cargas quanto os formatos das moléculas participam da discriminação eficiente em meio de eletrólitos com pHs alcalinos.

A sequência experimental para evidenciar a separação das MTs de diferentes organismos e analisar o comportamento das misturas de MTs de mamíferos e de cianobactéria, o sistema de eletroforese capilar mostrou-se eficiente. A separação relativa das misturas de MTs permitiram analisar. As variações na voltagem, composição dos tampões, pH, comprimento e diâmetro do capilar aumentaram a eficiência na separação das misturas das MTs. As condições ótimas de separação das MT de mamíferos ou da cianobactéria foram conseguidas para o capilar com comprimento de 60 cm, corrente de 42  $\mu$ A e eletrólito TRIS-HCl (70 mM, pH 8,2) com adição de 5% de metanol. O sistema possibilitou a comparação dos polimorfismos existentes entre MT de cavalo, MT de cianobactéria e MTII de coelho.

Em todos os parâmetros estudados, a separação da mistura das MTs de coelho e da cianobactéria resultou em dois únicos picos, sendo o primeiro pico observado correspondente a MTII de coelho e o segundo, a MT da cianobactéria. Na mistura das MTs de cavalo e da cianobactéria, foram observados um primeiro conjunto correspondente a quatro picos para MT de cavalo, e o segundo conjunto, um único pico para MT da cianobactéria.

## REFERÊNCIAS

- ALBERTS, I. L.; NADASSY, K.; WODAK, S. J. Analysis of zinc binding sites in protein crystal structures. **Protein Science**, New York, v. 7, n. 8, p. 1700-1716, 1998.
- ALVAREZ-LLAMAS, G.; DE LA CAMPA, M. R. F.; SANZ-MEDEL, A. Metallothionein isoforms separation and cadmium speciation by capillary ophoresis with ultraviolet and quadrupole-inductively coupled plasma mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 448, n. 1-2, p. 105-119, 2001.
- ALVAREZ-LLAMAS, G.; RODRÍGUEZ-CEA, A.; FERNÁNDEZ DE LA CAMPA, M. R.; SANZ-MEDEL, A. Large volume sample stacking capillary electrophoresis for metallothioneins analysis in eel liver. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 486, n. 2, p. 183-190, 2003.
- BASAK, S. K.; LADISCH, M. R. Correlation of electrophoretic mobilities of proteins and peptides with their physicochemical properties. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 226, n. 1, p. 51-58, 1995.
- BEATTIE, J. M. Strategies for the qualitative and quantitative analysis of metallothionein isoforms by capillary electrophoresis. **Talanta**, London, v. 46, n. 2, p. 255-270, 1998.
- BEATTIE, J. H.; RICHARDS, M. P.; SELF, R. Separation of metallothionein isoforms by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 632, n. 1-2, p. 127-135, 1993.
- BERG, J. M.; SHI, Y. G. The galvanization of biology: A growing appreciation for the roles of zinc. **Science**, Washington, DC, v. 271, n. 5252, p. 1081-1085, 1996.
- BERG, J. M.; GODWIN, H. A. Lessons from zinc-binding peptides. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, Palo Alto, v. 26, p. 357-371, 1997.
- BIRD, A. J.; TURNER-CAVET, J. S.; LAKEY, J. H.; ROBINSON, N. J. A carboxyl-terminal Cys/His(2)-type zinc-finger motif in DNA primase influences DNA content in *Synechococcus* PCC 7942. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, n. 33, p. 21246-21252, 1998.
- BLINDAUER, C. A.; HARRISON, M. D.; PARKINSON, J. A.; ROBINSON, A. K.; CAVET, J. S.; ROBINSON, N. J.; SADLER, P. J. A metallothionein containing a zinc finger within a four-metal cluster protects a bacterium from zinc toxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 98, n. 17, p. 9593-9598, 2001.
- BLINDAUER, C. A.; POLFER, N. C.; KEIPER, S. E.; HARRISON, M. D.; ROBINSON, N. J.; LANGRIDGE-SMITH, P. R. R.; SADLER, P. J. Inert Site in a Protein Zinc Cluster: Isotope exchange by high resolution mass spectrometry. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 125, n. 11, p. 3226-3227, 2003a.

BLINDAUER, C. A.; SADLER, P. J. How to hide zinc in a small protein. **Accounts of Chemical Research**, Washington, DC, v. 38, n. 1, p. 62-69, 2005.

BLINDAUER, C. A.; RAZI, M. T.; CAMPOPIANO, D. J.; SADL, P. J. Histidine ligands in bacterial metallothionein enhance cluster stability. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, Berlin, v. 12, n. 3, p. 393-405, 2007.

BLINDAUER, C. A. Zinc-Handling in Cyanobacteria: An Update. **Chemistry & Biodiversity**, Zurich, v. 5, n. 10, p. 1990-2013, 2008.

BUSENLEHNER, L. S.; PENNELLA, M. A.; GIEDROC, D. P. The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: structural insights into prokaryotic metal resistance. **Fems Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 27, n. 2-3, p. 131-143, 2003.

CODY, C. W.; HUANG, P. C. Replacement of all alpha-domain lysines with glutamates reduces metallothionein detoxification function. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 202, n. 2, p. 954-959, 1994.

COLE, R. B. **Electrospray ionization mass spectrometry: fundamentals, instrumentation and applications**. New York: Wiley, 1997, 567p.

COLEMAN, J. E. Zinc proteins - enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 61, p. 897-946, 1992.

DABRIO, M.; VIRTANEN, V.; BORDIN, G.; RODRIGUEZ, A. R. Contribution to the study of complexing properties of Zn-metallothioneins by CZE-DAD. **Talanta**, London, v. 53, n. 3, p. 587-598, 2000.

DALTON, T.; FU, K.; PALMITER, R. D.; ANDREWS, G. K. Transgenic mice that overexpress metallothionein-I resist dietary zinc deficiency. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 126, n. 4, p. 825-833, 1996.

EJNIK, J.; ROBINSON, J.; ZHU, J.; FÖRSTERLING, H.; SHAW, C. F.; PETERING, D.H. Folding pathway of apo-metallothionein induced by Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup>. **Journal of Inorganic Biochemistry**, Honolulu, v. 88, n. 2, p. 144-152, 2002.

ENDO, T.; KIMURA, O.; SAKATA, M. Effects of zinc and copper on uptake of cadmium by LLC-PK1 cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v.19, n. 7, p. 944-948, 1996.

ENDO, T.; KIMURA, O.; HATAKEYAMA, M.; TAKADA, M.; SAKATA, M. Effects of zinc and copper on cadmium uptake by brush border membrane vesicles. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 91, n. 2, p. 111-120, 1997.

EVENHUIS, C. J.; HADDAD, P. R. Joule heating effects and the experimental determination of temperature during CE. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 30, n. 5, p. 897-909, 2009.



GACHOT, B.; POUJEOL, P. Effects of cadmium and copper on zinc transport kinetics by isolated renal proximal cells. **Biological Trace Element Research**, Heidelberg, v. 35, n. 2, p. 93–103, 1992.

GERVASIO, A. P. G.; LAVORANTE, A. F.; MORAES, M. C. B. GINE, M. F. G.; MIRANDA, C. E. S.; CARRILHO, E. Eletroforese capilar acoplada à espectrometria com plasma: uma ferramenta eficiente para a especificação. **Química Nova**, Piracicaba., v. 26, n.1, p. 65-74, 2003.

GRISHIN, N. V. Treble clef finger - a functionally diverse zinc-binding structural motif. **Nucleic Acids Research**, London, v. 29, n. 8, p. 1703-1714, 2001.

GOBIE, W. A.; IVORY, C. F. Thermal-model of capillary electrophoresis and a method for counteracting thermal band broadening. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 516, n. 1, p. 191-210, 1990.

HASELBERG, R.; DE JONG, G. J.; SOMSEN, G. W. Capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of intact proteins. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1159, n. 1-2, p. 81-109, 2007.

HARRISON, S. C. A structural taxonomy of DNA-binding domains. **Nature**, London, v. 353, n. 6346, p. 715-719, 1991.

HISPARD, F.; SCHULER, D.; DE VAUFLEURY, A.; SCHEIFLER, R.; BADOT, P. M.; DALLINGER, R. Metal distribution and metallothionein induction after cadmium exposure in the terrestrial snail *helix aspersa* (gastropoda, pulmonata). **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 27, n. 7, p. 1533-1542, 2008.

HJERTEN, S. Zone broadening in electrophoresis with special reference to high-performance electrophoresis in capillaries - an interplay between theory and practice. **Electrophoresis**, New York, v. 11, n. 9, p. 665-690, Sep 1990.

IKUTA, N. YAMADA, Y.; HIROKAWA, T. Electropherogram of capillary zone electrophoresis with effective mobility axis as a transverse axis and its analytical utility - I. Transformation applying the hypothetical electroosmotic flow. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 21, n. 2, p. 360-366, 2000.

JACKLER, G.; STEITZ, R.; CZESLIK, C. Effect of temperature on the adsorption of lysozyme at the silica/water interface studied by optical and neutron reflectometry. **Langmuir**, Washington, DC, v. 18, n. 17, p. 6565-6570, 2002.

JACOB, C.; MARET, W.; VALLEE, B. L. Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 95, n. 7, p. 3489-3494, 1998.

JACOBSON, K. B.; TURNER, J. E. The interaction of cadmium and certain other metal-ions with proteins and nucleic-acids. **Toxicology**, Amsterdam, v. 16, n. 1, p. 1-37, 1980.

JONES, M. M.; CHERIAN, M. G. The search for chelate antagonists for chronic cadmium intoxication. **Toxicology**, Amsterdam, v. 62, n. 1, p. 1–25, 1990.

KAGI, J. H. R. Overview of metallothionein. **Methods in Enzymology**, New York, v. 205, p. 613-626, 1991.

KLAASSEN, C. D.; LIU, J.; CHOUDHURI, S. Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 39, p. 267-294, 1999.

KLUG, A.; RHODES, D. “Zinc Fingers”: A Novel Protein Motif for Nucleic Acid Recognition. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 12, n. 12, p. 464-469, 1987.

KNOX, J. H.; MCCORMACK, K. A. Volume expansion and loss of sample due to initial self-heating in capillary electroseparation (ces) systems. **Chromatographia**, New York, v. 38, n. 5-6, p. 279-282, 1994.

KNUDSEN, C. B.; BEATTIE, J. H. On-line solid-phase extraction capillary electrophoresis for enhanced detection sensitivity and selectivity: application to the analysis of metallothionein isoforms in sheep fetal liver. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 792, n. 1-2, p. 463-473, 1997.

KONTAXIS, G.; KONRAT, R.; KRAUTLER, B.; WEISKIRCHEN, R.; BISTER, K. Structure and intramodular dynamics of the Amino-Terminal LIM Domain from Quail Cysteine- and Glycine-Rich Protein CRP2. **Biochemistry**, Washington, DC, v.37, n. 20, p. 7127-7134, 1998.

KRISHNA, S. S.; MAJUMDAR, I.; GRISHIN, N. V. Structural Classification of Zinc Fingers. **Nucleic Acids Research**, London, v. 31, n. 2, p. 532-550, 2003.

KRIZEK, B. A.; MERKLE, D. L.; BERG, J. M. Ligand variation and metal ion binding specificity in zinc finger peptides. **Inorganic Chemistry**, Easton, v. 32, n. 6, p. 937–940, 1993.

KUBO, K.; SAKITA, Y.; OKAZAKI, Y.; OTAKI, N.; KIMURA, M.; MINAMI, T. Identification of metallothionein isoforms on capillary zone electrophoresis by adding anti-metallothionein antibody. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 736, n. 1-2, p. 185-190, 1999.

KURRAT, R.; PRENOSIL, J. E.; RAMSDEN, J. J. Kinetics of human and bovine serum albumin adsorption at silica-titania surfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 185, n. 1, p. 1-8, 1997.

KUBOTA, H.; SATO, K.; YAMADA, T.; MAITANI, T. Separation of respective species of phytochelatins and their desglycyl peptides (class III metallothioneins) and the precursors glutathione and gamma-glutamylcysteine with capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 803, n. 1-2, p. 315-320, 1998.

LAVORANTE, A. F.; GINE, M. F.; GERVASIO, A. P. G.; MIRANDA, C. E. S.; FIORE, M. F.; BELLATO, C. M.; CARRILHO, E. Identification of a metallothionein in *Synechococcus* by capillary electrophoresis hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry. **Analytical Sciences**, Tokyo, v. 19, n. 12, p. 1611-1616, 2003.

LANDER, E. S.; LINTON, L. M.; BIRREN, B. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, London, v. 409, n. 6822, p. 860-921, 2001.

LESZCZYSZYN, O. I.; EVANS, C. D.; KEIPER, S. E.; WARREN, G. Z. L.; BLINDAUER, C. A. Differential reactivity of individual zinc ions in clusters from bacterial metallothioneins. **Inorganica Chimica Acta**, Lausanne, v. 360, n. 1, p. 3-13, 2007.

LI, S. F. Y. Electrolyte systems. In: \_\_\_\_\_. **Capillary electrophoresis: principles, practice and applications**. Amsterdam: Elsevier, 1992. cap. 5, p. 215–216.

LI, Y.; LIU, J.M.; XIA, Y.L.; JIANG, Y.; YAN, X. P. CE with on-line detection by ICP-MS for studying the competitive binding of zinc against cadmium for glutathione. **Electrophoresis**, Wehiweim, v. 29, n. 22, p. 4568–4574, 2008b.

LIU, J. P.; DOLNIK, V.; HSIEH, Y. Z.; NOVOTNY, M. Experimental evaluation of the separation efficiency in capillary electrophoresis using open tubular and gel-filled columns. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 64, n. 13, p. 1328-1336, 1992.

MASON, A. Z.; MOELLER, R.; THRIFFLETON, K. A.; LLOYD, D. Use of stable isotopically enriched proteins and directly coupled high-performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry for quantitatively monitoring the transfer of metals between proteins. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 369, n. 1, p. 87-104, 2007.

MCCORMICK, R. M. Capillary zone electrophoretic separation of peptides and proteins using low pH buffers in modified silica capillaries. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 60, n. 21, p. 2322-2328, 1988.

MINAMI, T.; YOSHITA, C.; TANAKA, M.; KUBO, K.; OKABE, N.; OKAZAKI, Y. Separation of metallothionein isoforms of mouse liver cytosol by capillary zone electrophoresis. **Talanta**, London, v. 46, n. 2, p. 347-354, 1998.

MINAMI, T.; ICHIDA, S.; KUBO, K. Study of metallothionein using capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 781, n. 1-2, p. 303-311, 2002.

MITSYUK, B. M. Mechanism of silica reaction with phosphoric-acid in aqueous-solutions. **Zhurnal Neorganicheskoi Khimii. Russian Journal of Inorganic Chemistry**, London, v. 17, n. 4, p. 903, 1972.

MOHABBATI, S.; WESTERLUND, D. Improved properties of the non-covalent coating with N,N-didodecyl-N, N-dimethylammonium bromide for the separation of

basic proteins by capillary electrophoresis with acidic buffers in 25  $\mu$ m capillaries. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1121, n. 1, p. 32-39, 2006.

MORBY, A. P.; TURNER, J. S.; HUCKLE, J. W.; ROBINSON, N. J. Smtb is a metal-dependent repressor of the cyanobacterial metallothionein gene smta - identification of a Zn inhibited DNA-protein complex. **Nucleic Acids Research**, London, v. 21, n. 4, p. 921-925, 1993.

MORRISON, I. D.; TARNAWSKYJ, C. J. Toward self-consistent characterizations of low conductivity dispersions. **Langmuir**, Washington, DC, v. 7, n. 10, p. 2358-2361, 1991.

NAKANISHI, K.; SAKIYAMA, T.; IMAMURA, K. On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 91, n. 3, p. 233-244, 2001.

NIELSON, K. B.; WINGE, D. R. Preferential binding of copper to the beta-domain of metallothionein. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 259, n. 8, p. 4941-4946, 1984.

NORDBERG, G. F. Historical perspectives on cadmium toxicology. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 238, n. 3, p. 192-200, 2009.

OLAFSON, R. W.; ABEL, K.; SIM, R. G. Prokaryotic metallothionein - preliminary characterization of a blue-green-alga heavy metal-binding protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 89, n. 1, p. 36-43, 1979.

OLAFSON, R. W.; MCCUBBIN, W. D.; KAY, C. M. Primary-structural and secondary-structural analysis of a unique prokaryotic metallothionein from a synechococcus sp cyanobacterium. **Biochemical Journal**, Colchester, v. 251, n. 3, p. 691-699, 1988.

OMICHIANSKI, J. G.; CLORE, G. M.; SCHAAD, O.; FELSENFELD, G.; TRAINOR, C.; APPELLA, E.; STAHL, S. J.; GRONENBORN, A. M. NMR Structure of a Specific DNA Complex of Zn-Containing DNA Binding Domain of GATA-1. **Science**, Washington, DC, v. 261, n. 5120, p. 438-446, 1993.

OUTTEN, C. E.; O'HALLORAN, T. V. Femtomolar sensitivity of metalleregulatory proteins controlling zinc homeostasis. **Science**, Washington, DC, v. 292, n. 5526, p. 2488-2492, 2001.

PARK, H.; AHN, I. Y.; CHOI, H. J.; JI, J. Y. Isolation and spectral characterization of cadmium binding metallothionein. **Antarctic Science**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 33-37, 2008.

PERALES-VELA, H. V.; PEÑA-CASTRO, J. M.; CAÑIZARES-VILLANUEVA, R.O. Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. **Chemosphere**, Oxford, v. 64, n. 1, p. 1-10, 2006.

PEREZ-RAMA, M.; LOPEZ, C. H.; ALONSO, J. A.; VAAMONDE, E. T. Class III metallothioneins in response to cadmium toxicity in the marine microalga *Tetraselmis*

suecica (Kylin) Butch. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 20, n. 9, p. 2061-2066, 2001.

PISCATOR, M. On cadmium in normal human kidneys together with a report on the isolation of metallothionein from livers of cadmium exposed rabbits. **Nordisk Hygienisk Tidsskrift**, Oslo, v. 45, p. 76-82, 1964.

PISCATOR, M. Proteinuria in chronic cadmium poisoning .4. Gel filtration and ion exchange chromatography of urinary proteins from cadmium workers. **Archives of Environmental Health** Oslo, v. 12, n. 3, p. 345-&, 1966.

PRANGE, A.; SCHAUMLOFFEL, D. Hyphenated techniques for the characterization and quantification of metallothionein isoforms. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** Heidelberg, v. 373, n. 6, p. 441-453, 2002.

PRANGE, A.; PROFROCK, D. Application of CE-ICP-MS and CE-ESI-MS in metalloproteomics: challenges, developments, and limitations. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 383, n. 3, p. 372-389, 2005.

RAAIJMAKERS, H.; VIX, O.; TORO, I.; GOLZ, S.; KEMPER, B.; SUCK, D. X-ray structure of T4 endonuclease VII: a DNA junction resolvase with a novel fold and unusual domain-swapped dimer architecture. **Embo Journal**, Oxford, v. 18, n. 6, p. 1447-1458, 1999.

RABILLER-BAUDRY, M.; CHAUFER, B. Specific adsorption of phosphate ions on proteins evidenced by capillary electrophoresis and reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 753, n. 1, p. 67-77, 2001.

RICHARDS, M. P.; BEATTIE, J. H.; SELF, R. Application of capillary zone electrophoresis to the separation of metallothionein isoforms. **Journal of Liquid Chromatography**, Frederick, v. 16, n. 9-10, p. 2113-2128, 1993.

RICHARDS, M. P. Application of a polyamine-coated capillary to the separation of metallothionein isoforms by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 657, n. 2, p. 345-355, 1994.

RICHARDS, M. P.; ANDREWS, G. K.; WINGE, D. R.; BEATTIE, J. H. Separation of three mouse metallothionein isoforms by free-solution capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 675, n. 2, p. 327-331, 1996.

ROBINSON, N. J.; GUPTA, A.; FORDHAMSKELTON, A. P.; CROY, R. R. D.; WHITTON, B. A.; HUCKLE, J. W. Prokaryotic metallothionein gene characterization and expression - chromosome crawling by ligation-mediated PCR. **Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, London, v. 242, n. 1305, p. 241-247, 1990.

ROBINSON, R. J.; RUTHERFORD, J. C.; POCOCK, M. R.; CAVET, J. S. Metal metabolism and toxicity: repetitive DNA. In: WHITTON, B. A.; POTTS, M. **The**

**ecology of cyanobacteria:** their diversity in time a space. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 443-463.

ROBINSON, N. J.; WHITEHALL, S. K.; CAVET, J. S. Microbial metallothioneins. **Advances in Microbial Physiology**, London, v. 44, p. 183-213, 2001.

ROMERO-ISART, N.; VASAK, M. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 88, n. 3-4, p. 388-396, 2002a.

ROMERO-ISART, N.; JENSEN, L. T.; ZERBE, O.; WINGE, D. R.; VASAK, M. Engineering of metallothionein-3 neuroinhibitory activity into the inactive isoform metallothionein-1. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, n. 40, p. 37023-37028, 2002b.

SHI, J. G.; LINDSAY, W. P.; HUCKLE, J. W.; MORBY, A. P.; ROBINSON, N. J. Cyanobacterial metallothionein gene expressed in escherichia-coli - metal-binding properties of the expressed protein. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 303, n. 2-3, p. 159-163, 1992.

SONKE, J. E.; SALTERS, V. J. M. Capillary electrophoresis-high resolution sector field inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1159, n. 1-2, p. 63-74, 2007.

STANIER, R. Y. Position of cyanobacteria in world of phototrophs. **Carlsberg Research Communications**, Copenhagen, v. 42, n. 2, p. 77-98, 1977.

STOTE, R. H.; KELLENBERGER, E.; MULLER, H.; BOMBARDA, E.; ROQUES, B. P.; KIEFFER, B.; MELY, Y. Structure of the His44 -> ala single point mutant of the distal finger motif of HIV-1 nucleocapsid protein: A combined NMR, molecular dynamics simulation, and fluorescence study. **Biochemistry**, Washington, DC, v. 43, n. 24, p. 7687-7697, 2004.

STOVER, F. S.; HAYMORE, B. L.; MCBEATH, R. J. Capillary zone electrophoresis of histidine-containing compounds. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 470, n. 1, p. 241-250, 1989.

SUAREZ, C. A. ARAUJO, G. C. L.; GINE, M. F.; KAKAZU, M. H.; SARKIS, J. E. S. Sequential Injection Analysis (SIA) for Arsenic Speciation by Capillary Electrophoresis Hyphenated to Inductively Coupled Plasma Sector Field Mass Spectrometry (CE-ICP-SFMS). **Spectroscopy Letters**, Valencia, v. 42, n. 6-7, p. 376-382, 2009.

SUAREZ, C. A. **Estabilidade de espécies de arsênio em amostras biológicas acoplado cromatografia líquida ou eletroforese capilar com detectores atômicos**. 2010. 147 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

SUNDERMAN, F. W.; BARBER, A. M. Finger-loops, oncogenes, and metals - brown, claude, passmore memorial lecture. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, Stanford, v. 18, n. 4, p. 267-288, 1988.

TAVARES, M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, São Paulo, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.

TSUJI, K. Factors affecting the performance of sodium dodecyl-sulfate gel-filled capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, Hamburg, v. 661, n. 1-2, p. 257-264, 1994.

TURNER, J. S.; MORBY, A. P.; WHITTON, B. A.; GUPTA, A.; ROBINSON, N. J. Construction of Zn<sup>2+</sup>/Cd<sup>2+</sup> hypersensitive cyanobacterial mutants lacking a functional metallothionein locus. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 268, n. 6, p. 4494-4498, 1993.

TURNER, J. S.; ROBINSON, N. J. Cyanobacterial metallothioneins - biochemistry and molecular-genetics. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 14, n. 2, p. 119-125, 1995.

VAN DER VEEN, M.; NORDE, W.; STUART, M. C. Electrostatic interactions in protein adsorption probed by comparing lysozyme and succinylated lysozyme. **Colloids and Surfaces B - Biointerfaces**, Amsterdam, v. 35, n. 1, p. 33-40, 2004.

VALLEE, B. L.; AULD, D. S. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. **Biochemistry**, Washington, DC, v. 29, n. 24, p. 5647-5659, 1990.

VINDEVOGEL, J.; SANDRA, P. Simultaneous pH and ionic-strength effects and buffer selection in capillary electrophoretic techniques. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 541, n. 1-2, p. 483-488, 1991.

VIRTANEN, V.; BORDIN, G.; RODRIGUEZ, A. R. Separation of metallothionein isoforms with capillary zone electrophoresis using an uncoated capillary column - Effects of pH, temperature, voltage, buffer concentration and buffer composition. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 734, n. 2, p. 391-400, 1996.

VIRTANEN, V.; BORDIN, G. Isoform separation of metallothioneins by capillary zone electrophoresis with tris-tricine buffer in the presence or absence of methanol. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 372, n. 1-2, p. 231-239, 1998.

WILHELMSSEN, T. W.; OLSVIK, P. A.; TEIGEN, S. W.; ANDERSEN, R. A. Metallothionein isoforms from horse, rabbit and rat separated by capillary zone electrophoresis at low pH. **Talanta**, London, v. 46, n. 2, p. 291-300, 1998.

WILHELMSSEN, T. W.; OLSVIK, P. A.; TEIGEN, S. W.; ANDERSEN, R. A. Evidence for oligomerization of metallothioneins in their functional state. **Journal of Chromatography A**, Geel, v. 979, n. 1-2, p. 249-254, 2002.

WILHELMSEN, T. W.; OLSVIK, P. A.; ANDERSEN, R. A. Metallothioneins from horse kidney studied by separation with capillary zone electrophoresis below and above the isoelectric points. **Talanta**, London, v. 57, n. 4, p. 707-720, 2002.

WILHELMSEN, T. W.; HANSEN, B. H.; HOLTEN, V.; OLSVIK, P. A.; ANDERSEN, R. A. Improved separation of metallothionein isoforms by the presence of cyclodextrin in capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1051, n. 1-2, p. 237-245, 2004.

WINGE, D. R.; MIKLOSSY, K. A. Domain nature of metallothionein. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 257, n. 7, p. 3471-3476, 1982.

WITTRISCH, H.; CONRADI, S.; ROHDE, E.; VOGT, J.; VOGT, C. Characterization of metal complexes of pharmaceutical interest by capillary electrophoresis with element sensitive detection. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 781, n. 1-2, p. 407-416, 1997.

WUTHRICH, K. Determination of the 3-dimensional structure of metallothioneins by nuclear-magnetic-resonance spectroscopy in solution. **Methods in Enzymology** [S.I.], v. 205, p. 502-520, 1991.

XUAN, X. C.; XU, B.; SINTON, D.; LI, D. Q. Electroosmotic flow with Joule heating effects. **Lab on a Chip**, London, v. 4, n. 3, p. 230-236, 2004.

ZHOU, Y. J.; ZHANG, N.; LI, L. Y.; RU, B. G.. The cysteine-to-histidine substitution in beta domain of metallothionein enhances its zinc binding ability. **Protein and Peptide Letters**, Oak Park, v. 7, n. 1, p. 9-16, 2000.

ZWIRGLMAIER, K.; JARDILLIER, L.; OSTROWSKI, M. S.; GARCZAREK, L.; VAULOT, D.; NOT, F.; MASSANA, R.; ULLOA O.; SCANLAN, D. Global phylogeography of marine *Synechococcus* and *Prochlorococcus* reveals a distinct partitioning of lineages among oceanic biomes. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 10, n. 1, p. 147-161, 2008.