

## Artigo

**Metalômica: Metodologias e Aplicações em Estudos Ambientais**

Silva, B. M. S.; Silva, C. R.\*

*Rev. Virtual Quim.*, 2020, 12 (5), 00-00. Data de publicação na Web: 24 de Julho de 2020<http://rvq.sbq.org.br>**Metallomics: Methodologies and Applications in Environmental Studies**

**Abstract:** Metallomics is an interdisciplinary area that has grown in recent years thanks to the development and application of techniques such as electrophoresis, chromatography, and spectrometry. Advances in this area, have allowed studies of functional and structural characterization of proteins linked to metals in different organisms and tissues, and thus, led to the understanding of the complex processes involving metalloproteins, and with this, their application for the realization of environmental monitoring studies. In this article, a review of the main metallomic techniques and their applications in environmental studies was carried out from 2008 to 2018, based on the search for scientific articles in the “Scopus” database.

**Keywords:** Metalloma; analytical methodologies; environmental biomarkers; metalloproteins.

**Resumo**

A metalômica é uma área interdisciplinar que tem crescido nos últimos anos, em virtude ao desenvolvimento e aplicação de técnicas como eletroforese, cromatografia e espectrometria. Avanços nessa área, têm permitido estudos de caracterização funcional e estrutural de proteínas ligadas a metais em diferentes organismos e tecidos, e desta forma, levado à compreensão, dos complexos processos que envolvem as metalloproteínas, e com isto, garantido sua aplicação para a realização de estudos de monitoramento ambiental. No presente artigo, foi realizada uma revisão das principais técnicas metalômicas e de suas aplicações em estudos ambientais no período de 2008 a 2018, a partir da busca de artigos científicos na base de dados “Scopus”.

**Palavras-chave:** Metaloma; metodologias analíticas; biomarcadores ambientais; metalloproteínas.

\* Universidade Federal Fluminense, Programa de Pós-Graduação em Química, Outeiro São João Batista s/n, CEP 24020-141, Niterói-RJ, Brasil.

 [camilae@id.uff.br](mailto:camilae@id.uff.br)

DOI: [10.21577/1984-6835.20200090](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200090)

## Metalômica: Metodologias e Aplicações em Estudos Ambientais

Bruna Mariáh da Silva e Silva, Camila Rodrigues e Silva\* 

Universidade Federal Fluminense, Programa de Pós-Graduação em Química, Outeiro São João Batista s/n,  
CEP 24020-141, Niterói-RJ, Brasil.

\*[camilae@id.uff.br](mailto:camilae@id.uff.br)

*Recebido em 11 de Novembro de 2019. Aceito para publicação em 8 de Julho de 2020.*

### 1. Introdução

### 2. Metodologias Metalômicas

- 2.1. Métodos cromatográficos
- 2.2. Eletroforese capilar
- 2.3. Cromatografia por exclusão de tamanhos
- 2.4. Eletroforese em gel
- 2.5. Ablação por laser
- 2.6. Espectrometria de massa

### 3. Considerações Finais

## 1. Introdução

A metalômica é uma ciência que pertence à família dos “ômicas” - genômica, proteômica, lipidiômica, transcriptômica, metabolômica - cujo objetivo é entender as relações do metaloma com ácidos nucleicos, proteínas e metabólitos. Essas interações podem ser internamente restritas ao organismo, dentro de uma célula, de um tecido ou podem se inter-relacionar com o ecossistema. A metalômica é, portanto, uma área transdisciplinar, com grande relação com genômica e proteômica.<sup>1,2</sup>

De acordo com a IUPAC, essa área pode ser definida como o estudo do metaloma, das interações e conexões funcionais de íons metálicos e outras espécies metálicas com genes, proteínas, metabólitos e outras biomoléculas em sistemas biológicos.<sup>3,4</sup> Os estudos metalômicos, com abordagem sistemática ou abrangente, devem ser focados nos metais ou metaloides em um sistema

biológico e/ou na associação, seja estatística, estrutural ou funcional, da concentração ou especiação de elementos com o genoma.<sup>3</sup>

A caracterização das espécies contendo metais nos organismos vivos e de suas interações com o genoma, transcriptoma, proteoma e metaboloma requer abordagens analíticas dedicadas à detecção, localização, identificação e quantificação *in vivo*, análise funcional *in vitro* e predição *in silico* usando bioinformática.<sup>1,3</sup> Nesse trabalho serão abordadas as principais metodologias analíticas de detecção, separação e caracterização utilizadas nessa área de estudo.

A metalômica aborda a totalidade dos íons metálicos em um sistema e não apenas biomoléculas individuais, o que exige atenção para o significado geral dos íons metálicos na biologia e enfatiza sua importância, através da integração de campos e metodologias de pesquisa. É uma área de pesquisa multidisciplinar emergente e, quando aplicada adequadamente,

tem implicações de longo alcance e potencial futuro. Um objetivo da metalômica é estabelecer a distribuição e as concentrações normais de íons metálicos nos tecidos e células. Esses valores de referência podem então servir para entender as mudanças que causam doenças ou são resultado da doença.<sup>4</sup>

Essa concepção global e ordenada das diversas funções de compostos metálicos e metaloides em sistemas biológicos, combinada com respostas às mudanças ambientais, torna a metalômica fundamental em áreas como biologia clínica, farmacologia, nutrição, geoquímica, entre outras. Os estudos metalômicos podem contribuir para a identificação de espécies metálicas (análise qualitativa), bem como para a determinação de sua concentração (análise quantitativa), para a compreensão dos mecanismos de atuação das espécies metálicas nos sistemas biológicos e a caracterização de biomarcadores.<sup>1,2,5-7</sup>

Os estudos em metalômica não se restringem apenas às espécies químicas, incluem a identificação de seus estados de valência e ambientes de coordenação, a saber, análise de especiação em termos qualitativos e quantitativos, que podem ser abordados ao se combinar espectrometria de massa elementar e molecular com técnicas hífenizadas.<sup>5,6</sup> Os trabalhos, portanto, abordam a presença de íons metálicos em diferentes estados de oxidação, bem como a ligação destes à macromoléculas, em que as interações com proteínas dominam (metaloproteínas) e a interação com compostos de baixo peso molecular.

Os metais desempenham um papel importante nos organismos vivos, uma vez que diversas proteínas requerem um cofator de metal (Cu, Fe, Zn, Mo e outros) para desempenhar suas funções, o que pode afetar a regulação negativa da expressão de proteínas. É importante salientar a diferença entre as metaloproteínas e as proteínas ligadas a metais. As primeiras constituem um grupo que contém um cofator metálico, incorporado por meio de ligações específicas e de alta afinidade. Por outro lado, as proteínas ligadas a metais se referem a um grupo de substâncias que incorporam em sua estrutura íons metálicos por meio de ligações inespecíficas e de baixa afinidade, o que torna esse tipo de ligação facilmente quebrável, dentre as quais se pode citar as metalotioneínas.<sup>3,8-11</sup> Estas proteínas são essenciais nos processos de homeostase e desintoxicação, além disso, é crítico

o conhecimento sobre o tráfego de metais e as interações nas células e tecidos, considerando seu transporte por fluidos biológicos e a passagem por barreiras biológicas.<sup>12-14</sup>

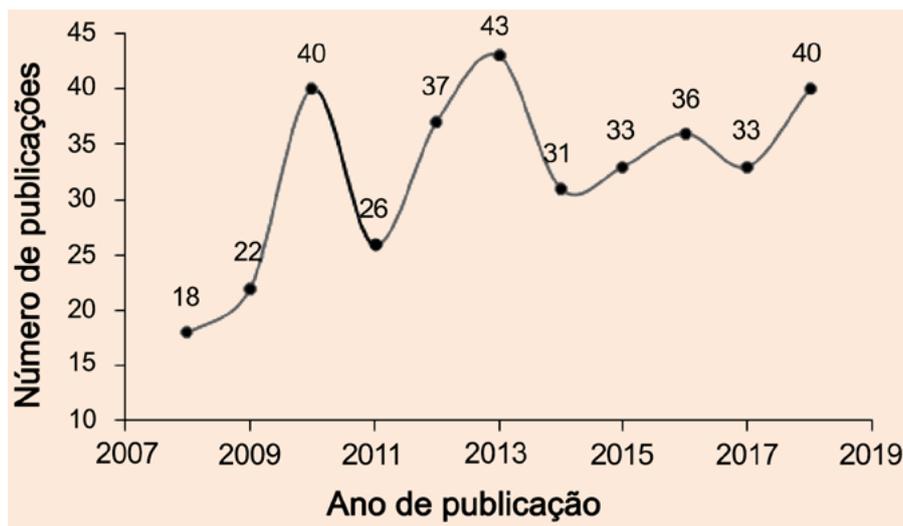
Essa classe de proteínas de baixo peso molecular é produzida por espécimes do reino animal e vegetal (plantas superiores), capazes de interagir com metais bivalentes e produzir complexos metal-tiol, devido à presença de ligantes metálicos em suas estruturas.<sup>15,16</sup> No organismo, as metalotioneínas são importantes para o transporte de íons metálicos, a manutenção das condições de redução oxidativa, bem como, a regulação de radicais livres.<sup>17</sup>

A metalômica representa, portanto, um importante campo interdisciplinar mesmo que ainda em consolidação que tem permitido a integração de estudos bioquímicos e inorgânicos com os analíticos, expandindo a compreensão das questões biológicas e ambientais, por exemplo, relacionadas a espécies metálicas. As Figuras 1 e 2 ilustram a produção científica relacionada à metalômica e sua distribuição nas diferentes áreas da ciência, respectivamente, e na Tabela 1 têm-se exemplos de artigos publicados no período de 2008 e 2018 em que as principais técnicas analíticas são empregadas nos estudos de metalômica.

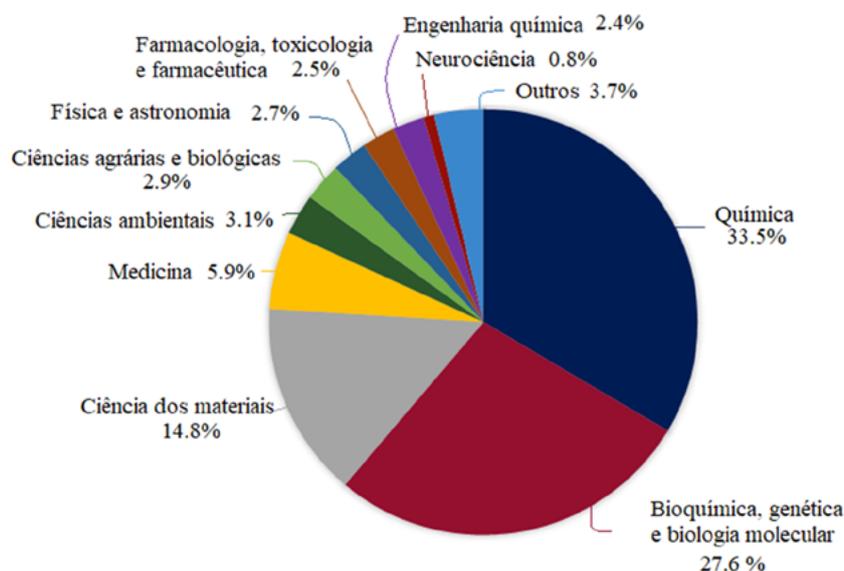
O levantamento bibliográfico foi conduzido pesquisando pelo tópico “Metalomics” no Scopus, o maior banco de dados de resumos e citações da literatura revisada por pares, e analisando os resultados pelas áreas de pesquisa. Os resultados de pesquisa, que incluíram artigos, artigos de revisão e de congressos, livros e editoriais, foram filtrados com o período de publicação entre 2008 e 2018, totalizando um total de 359 documentos, como mostrado na Figura 1.

A técnica de quantificação por ICP-MS é amplamente empregada nos estudos metalômicos, como mostrado na Tabela 1 e apresenta uma série de vantagens, como o baixo limite de detecção, a calibração do equipamento ser direta, ser multielementar, e ter capacidade de fornecer informações isotópicas.<sup>35</sup> Quando acoplada a uma técnica apropriada de separação, a detecção ganha em termos de especificidade (identificação) e sensibilidade (quantificação) de biomoléculas de baixa e alta massa molecular.<sup>1,2,31,36,37</sup>

As técnicas de separação incluem cromatografia líquida (LC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia gasosa



**Figura 1.** Número de artigos relacionados à metalômica publicados entre 2008 e 2018, com base no banco de dados Scopus. Fonte: Elaborado pelas autoras (2020)



**Figura 2.** Produção científica relacionada a metalômica nas diferentes áreas da pesquisa entre os anos 2008 e 2018. Levantamento feito com base no banco de dados Scopus. Fonte: Elaborado pelas autoras (2020)

(GC), cromatografia em fluído supercrítico (SFC), eletroforese capilar (EC), cromatografia de afinidade por metal imobilizado (IMAC), cromatografia de fase reversa, cromatografia de exclusão por tamanho (SEC), eletroforese da zona capilar (CZE) e eletroforese em gel (GE).<sup>6,38-41</sup>

Além disso, o acoplamento HPLC, EC ou GE com ICP-MS é fundamental para a especificação elementar, uma vez que combina o poder separativo da HPLC, EC ou GE com a sensibilidade da detecção do ICP-MS.<sup>31,35</sup>

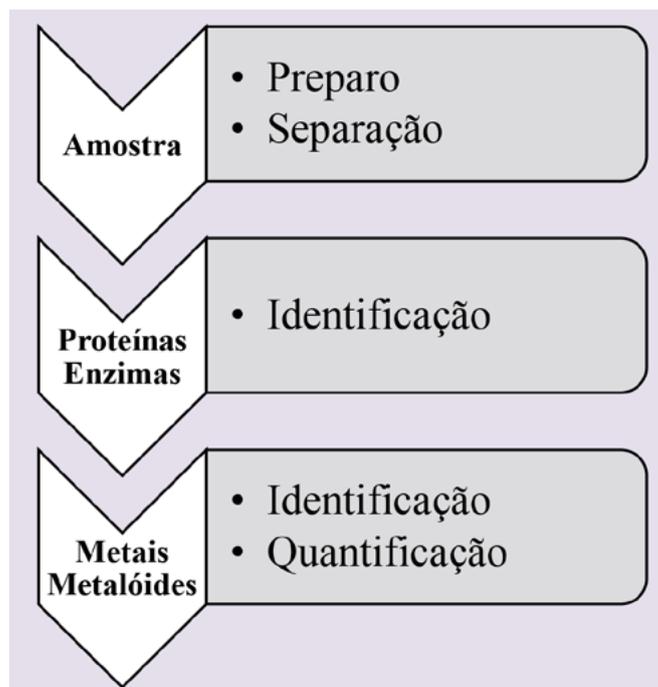
Em relação aos tipos de acoplamento, a literatura mostrou que a combinação de GE com métodos de

detecção, por exemplo, GE-ICP-MS ablação a laser (LA) (GE-LA-ICP-MS) possibilitaram metodologias baseadas em gel para obter informações mais detalhadas sobre a composição elementar de biomoléculas. Para a realização da análise metalômica, os principais procedimentos devem ser realizados, conforme o fluxograma da Figura 3 abaixo.<sup>41-48</sup>

As principais técnicas utilizadas nos estudos metalômicos serão apresentadas e discutidas abaixo, em virtude do desenvolvimento delas, foi alcançada grande versatilidade nos métodos metalométricos.

**Tabela 1.** Principais métodos analíticos utilizados na análise de estudos metalômicos

Metodologia	Publicação	Referência
Técnica de tensiometria baseada em gotículas	Aggregation state of metal-based nanomaterials at the pulmonary surfactant film determines biophysical inhibition	Yang et al. <sup>18</sup>
Espectrometria de massa de ionização por nano-eletropulverização em combinação com espectrometria de mobilidade iônica (IM) (nESI-IM-MS)	Collision-Induced unfolding of partially metalated metallothionein-2A: Tracking unfolding reactions of gas-phase ions	Dong <sup>19</sup>
Método de ensaio imuno-absorvente ligado a enzima (ELISA)	Metallothionein analysis and cell damage levels on the liver and gill of <i>Barbonymus gonionotus</i> in Brantas River, Indonesia	Hayati <sup>20</sup>
Ablação a laser (LA)	Preparation of bionanocomposites and bionanomaterials from agricultural wastes-	Abdellaoui et al. <sup>21</sup>
Espectrometria de massa de plasma indutivamente acoplada (ICP-MS)	Combined proteomic and metallomic analyses in <i>Scrobicularia plana</i> clams to assess environmental pollution of estuarine ecosystems	González-Domínguez et al. <sup>22</sup>
Espectrometria de massa de plasma indutivamente acoplada (ICP-MS) e cromatografia gasosa por tempo de voo acoplada à espectrometria de massas (GC-TOF-MS)	GC-TOF-MS based metabolomics and ICP-MS based metallomics of cucumber ( <i>Cucumis sativus</i> ) fruits reveal alteration of metabolites profile and biological pathway disruption induced by nano copper	Zhao et al. <sup>23</sup>
Espectrometria de massa de plasma indutivamente acoplada e espectrometria óptica (ICP-MS and ICP-OES), espectrometria de absorção atômica e cromatografia iônica	Quest to identify geochemical risk factors associated with chronic kidney disease of unknown etiology (CKDu) in an endemic region of Sri Lanka - a multimedia laboratory analysis of biological, food, and environmental samples	Levine et al. <sup>24</sup>
Microextração magnética em fase sólida on-line acoplada a espectrometria de massa de plasma indutivamente acoplada (MSPME-ICP-MS)	Chip-based array magnetic solid phase microextraction on-line coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of trace heavy metals in cells	Wang et al. <sup>25</sup>
Cromatografia de exclusão por tamanho acoplada à espectrometria de massa plasma indutivamente acoplada (SEC-ICP-MS)	Use of metallomics and metabolomics to assess metal pollution in Doñana National Park (SW Spain)	García-Sevillano et al. <sup>26</sup>
Sistemas cromatográficos ortogonais acoplados a espectrometria de massa de plasma de acoplamento indutivo equipados com sistemas de reação de polvo (ICP-ORS-MS)	Absolute quantification of superoxide dismutase in cytosol and mitochondria of mice hepatic cells exposed to mercury by a novel metallomic approach	García-Sevillano et al. <sup>27</sup>
Cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) com acoplamento on-line por espectrometria de massa de plasma indutivamente acoplada	Analysis of the biological response of mouse liver ( <i>Mus musculus</i> ) exposed to As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> based on integrated – omics approaches	García-Sevillano et al. <sup>28</sup>
Espectrometria de massa de plasma indutivamente acoplada (ICP-MS)	Metalomics for drug development: Serum protein binding and analysis of an anticancer tris (8-quinolinolato) gallium(III) drug using inductively coupled plasma mass spectrometry	Ossipov et al. <sup>29</sup>
Decomposição térmica e amálgama acopladas à absorção atômica (TTA-CAAS)	Metallic study of mercury in fish from Amazon region - Brazil	Moraes et al. <sup>30</sup>
Acoplamento on-line de eletroforese em gel com espectrometria de massa plasma indutivamente acoplada (GE-ICP-MS)	On-line coupling of gel electrophoresis and inductively coupled plasma-mass spectrometry	Haider et al. <sup>31</sup>
Espectrometria Raman	Raman spectroscopy a promising technique for investigations of metallothioneins	Torreggiani <sup>32</sup>
Fluorescência	Fluorescent probes for the structure and function of metallothionein	Maret <sup>33</sup>
Espectrometria de massa	Elemental mass spectrometry for quantitative proteomics	Sanz-Medel <sup>34</sup>



**Figura 3.** Procedimentos necessários para análise metalômica. Fonte: Elaborado pelas autoras (2020)

## 2. Metodologias Metalômicas

### 2.1. Métodos cromatográficos

Dentre os métodos de separação, destacam-se as análises cromatográficas, principalmente no que se refere a matrizes complexas, como fluidos biológicos, produtos naturais, sedimentos de rios, entre outras. O sucesso dessa técnica ocorre principalmente na alta resolução das colunas modernas, o que lhe confere eficiência na capacidade de separação dos componentes presentes nas misturas.

Durante a primeira década do século XX, o russo Mikhail S. Tswett ao conduzir estudos de separação de pigmentos extraídos de plantas usando solventes e uma coluna cheia de partículas definiram a cromatografia como um novo método de separação.<sup>49</sup> A diversidade dos métodos cromatográficos permite escolher entre todos, os mais adequados, para a análise das espécies de interesse. Inicialmente, a cromatografia líquida pode ter abordagens baseadas em retenção, adsorção, partição, exclusão de tamanho, afinidade, troca iônica e eluição de analitos.<sup>50</sup>

Os métodos cromatográficos provaram ser técnicas indispensáveis para a análise de matrizes biológicas complexas, como soro sanguíneo, fígado

e rim. No estudo de MTs, cromatografia de exclusão de tamanho (SEC), troca iônica (IE) e até HPLC bidimensional foram aplicadas com sucesso.<sup>9,51-53</sup>

Nos estudos realizados com mexilhões *Mytilus galloprovincialis*, as isoformas das metalotioneínas foram separadas por IE-HPLC e a detecção foi realizada com ICP-OES. Para separar a isoforma do tecido muscular e das brânquias, foi utilizada a extração líquida pressurizada.<sup>54,55</sup> Na investigação do transporte de zinco entre MTs e anidrase carbônica, SEC e IE HPLC com ICP-MS foram usadas para detecção.<sup>56</sup>

De acordo com as aplicações mencionadas, o LC demonstrou ser uma técnica adequada para a separação de MTs, mas seus altos custos, bem como a necessidade de uma preparação adequada do operador, acabam atuando como fatores limitantes de seu amplo uso.<sup>57</sup>

### 2.2. Eletroforese capilar

Os primeiros registros de eletroforese datam de 1909, quando Michaelis, em seus experimentos, percebeu que, ao submeter proteínas a um campo elétrico, elas se moviam e se separavam em frações diferentes. Mas foi somente em 1937 que Tiselius foi capaz de desenvolver a técnica e aplicá-la à separação de proteínas séricas.<sup>58</sup>

Após quase cinco décadas, a eletroforese capilar (EC) desenvolvida por Lauer e Mc

Manigill consiste na aplicação de uma corrente eletrosmótica em um tubo capilar, interconectada a dois reservatórios com solução tampão, em que um representa o ânodo e o outro o cátodo. Sob a ação da corrente elétrica, ocorre a interação dos íons da solução tampão com as cargas elétricas das proteínas da amostra, o que causa o movimento delas, dentro do tubo.<sup>59</sup>

Esse procedimento promove o fracionamento de proteínas e origina pequenas micelas no interior do tubo, que serão identificadas por um detector específico que registrará a localização e a concentração de cada proteína na forma de gráficos. A EC tem uma ampla gama de aplicações, variando desde moléculas pequenas, como aminoácidos, medicamentos quirais, vitaminas, pesticidas, íons inorgânicos, até os mais volumosos e complexos, como proteínas e ácidos nucléicos.<sup>60-64</sup>

A EC tem sido amplamente utilizada para a separação de proteínas, peptídeos e outras biomoléculas, devido à sua alta resolução e eficiência na separação de espécies químicas iônicas com diferentes razões carga/massa. A combinação de EC com um detector ICP-MS oferece potencialmente uma ferramenta de qualidade única e permite que os analitos carregados e neutros sejam separados em uma única batelada.<sup>31,35,60-62,65-67</sup>

Além disso, tem sido aplicada também na caracterização físico-química de nanopartículas, utilizadas em produtos industriais e de cuidados pessoais, em termos da mobilidade eletroforética, distribuição carga-raio, funcionalidade da superfície, estabilidade coloidal e taxas de enxerto.<sup>61,62,66</sup>

### 2.3. Cromatografia por exclusão de tamanhos

A cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) é um conhecido método de separação, onde o principal mecanismo de retenção é o efeito de exclusão de tamanho. Os componentes da amostra são separados de acordo com seu tamanho e massa molecular e idealmente não há interação entre as moléculas e as partículas da fase estacionária ou as partículas da fase móvel.<sup>63,64</sup>

A separação é governada apenas pela entropia; a retenção depende da penetração relativa das moléculas da amostra nos poros. A fase estacionária de uma coluna SEC é sempre um meio poroso mecanicamente estável que pode ser construído em um suporte rígido como

a sílica ou toda a fase estacionária é feita com esse material poroso. As moléculas que viajam ao longo da coluna na fase móvel podem entrar nos poros se o tamanho do poro for maior que o das dimensões da molécula.<sup>61,62</sup>

A SEC apresenta uma ampla variedade de aplicações. É, frequentemente, usada como o primeiro passo de um esquema de purificação para separar moléculas de interesse das que têm características (de tamanho) radicalmente diferentes. Também pode ser empregada no fracionamento de substâncias húmicas em diferentes sistemas de cultivo e em diferentes matrizes, para determinar parâmetros moleculares como o raio hidrodinâmico e a comum massa molecular, a distribuição do peso molecular de metais nos extratos de biomassa de fungos ou extrair e separar com sucesso diferentes frações de peso molecular de diferentes matrizes.<sup>68-76</sup>

A cromatografia de exclusão por tamanho também pode ser acoplada a um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado, tornando-se uma técnica eficiente de detecção e especificação de metaloproteínas ou metalobiomoléculas.<sup>77</sup> Como pode ser visto no trabalho de Lopes Júnior et al.<sup>77</sup> em que buscaram avaliar a influência do cádmio no metabolismo do girassol, os autores utilizaram a SEC-ICP-MS para detectar a presença de metalobiomoléculas nas sementes de girassol e observaram que esse metal se ligava normalmente a compostos de massas moleculares de 3 a 70 kDa.

Verola Mataveli et al.<sup>78</sup> utilizando um diferente arranjo de técnicas de detecção associada a cromatografia de exclusão por tamanho procuraram explorar novas informações metalômicas relacionadas às sementes de soja transgênicas e não-transgênicas. Por meio da SEC identificaram e separaram três diferentes frações metálicas, posteriormente uma nova separação, agora com uma cromatografia de troca aniônica, foi realizada, e finalmente as proteínas foram caracterizadas com um espectrômetro de massa com ionização por eletropulverização (ESI-MS/MS).

As diferenças de métodos de ionização do espectrômetro de massa serão melhor abordadas na seção 2.6 a seguir.

### 2.4. Eletroforese em gel

A eletroforese em gel é uma técnica de separação usando carga elétrica. É usado para separar misturas de estruturas de RNA, DNA

e proteínas de acordo com o tamanho e a carga molecular, envolve a passagem de uma corrente através de um gel (por exemplo, ágar ou poliacrilamida) contendo as moléculas de interesse. Uma importante aplicabilidade desta técnica é a identificação e caracterização de potenciais biomarcadores, como por exemplo, proteínas associadas ao mercúrio e zinco.<sup>79-83</sup>

Em função de seu tamanho e carga, as moléculas vão se mover através do gel em diferentes direções ou em diferentes velocidades, o que permite que sejam separadas umas das outras. As moléculas maiores na amostra se movem mais lentamente que as menores, de modo que moléculas de vários tamanhos moleculares se separam em faixas distintas no meio de gel. Após a separação por eletroforese, as moléculas no gel são coradas com compostos químicos para torná-los visíveis, o composto específico dependendo da natureza do analito.<sup>82,83</sup>

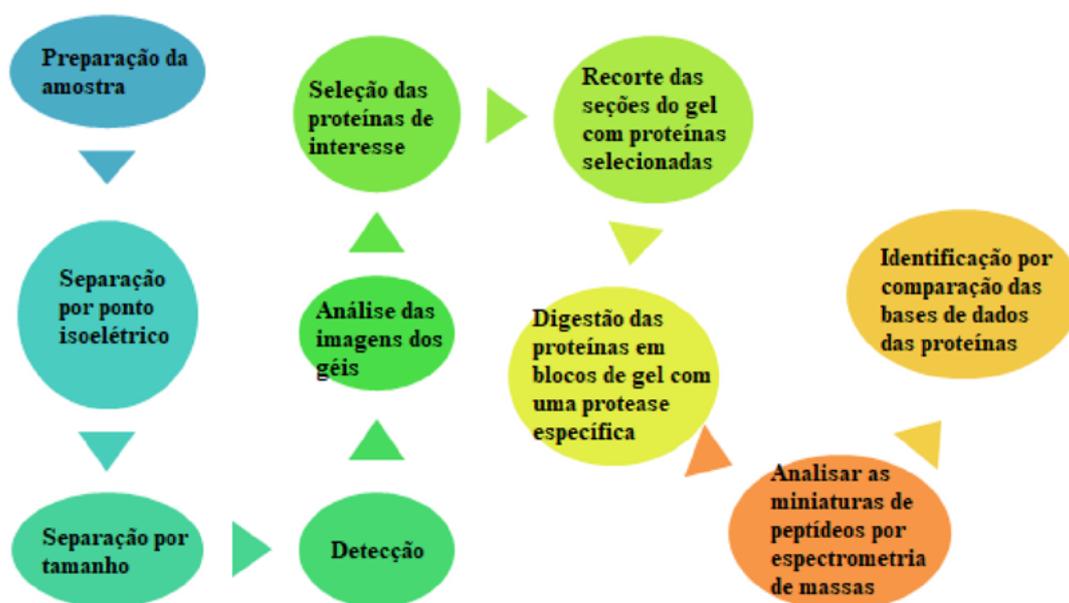
As etapas de análise de expressão de proteínas, segundo Vispo (2004),<sup>84</sup> são apresentadas na Figura 4 abaixo.

O preparo das amostras é uma etapa fundamental, uma vez que o grande número de proteínas e diversidade de matrizes exigem procedimentos particulares, para que se garanta a separação adequada e obtenção de uma boa

resolução.<sup>85</sup> Para isto as proteínas precisam ser desnaturadas, desagregadas, reduzidas e solubilizadas para que as interações moleculares sejam rompidas, e com isto, se possa certificar que cada “mancha” presente no gel, represente de fato, moléculas de uma mesma proteína.<sup>86,87</sup>

O rompimento das células, para a análise das proteínas constitui uma etapa crítica, tendo em vista que ao serem retiradas de seus ambientes naturais, elas ficam expostas a agentes que podem afetá-las de forma irreversível. Assim, se faz imprescindível, que o rompimento celular seja realizado ligeiramente e em baixas temperaturas.<sup>86,87</sup> A quebra celular, pode ser realizada de duas formas: mecânica (maceração ou sonicação) e química (com a utilização de detergentes), sendo que pode haver a combinação desses métodos, como ocorre quando há lise osmótica após o tratamento enzimático, ou quando há ciclo de gelo-degelo na presença de detergentes.<sup>85</sup>

Durante a extração das proteínas, alguns compostos devem ser removidos ou inativados, tendo em vista que algumas espécies podem atuar como interferentes, e com isto, afetar a solubilização ou mesmo o processo eletroforético.<sup>87</sup> Dentre as possíveis espécies interferentes, destacam-se as proteases, sais, lipídios, ácidos



**Figura 4.** Representação esquemática das etapas de análise de expressão de proteínas. Fonte: Elaborado pelas autoras (2020)

nucléicos, polissacarídeos, pigmentos fenólicos e/ou proteínas em abundância.<sup>86,87</sup>

A fim de que se evite a proteólise, isto é, a deterioração de proteínas, o que pode comprometer a separação, são utilizados inibidores de protease, como o fluoreto de fenilmetilsulfonil (PSMF) e o fluoreto de 4-(2-amino-etil)-benzenossulfonato (AEBSF).<sup>85,86</sup> Para impedir a interferência de surfactantes e lipídios, pode-se precipitar as proteínas com a utilização de solução de sulfato de amônia em metanol, acetato de amônia em metanol seguido de extração com fenol, com acetona pura ou com solução de ácido tricloroacético (TCA) em acetona.<sup>85</sup>

Assim, as proteínas devem ser solubilizadas em meio adequado, e para isto devem ser utilizados os componentes do tampão de acordo com a necessidade de cada proteína. As soluções-tampão podem ser compostas por surfactantes, como o Triton X-100 e CHAPS, agentes redutores, como o ditiotreitól (DTT) e β-mercaptoetanol, inibidores de protease, como o PMSF, pepstatina e leupeptina, e agentes caotrópicos, como a ureia e tiourea.<sup>86</sup>

#### 2.4.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) é um método acessível, que separa proteínas pequenas, de variados tamanhos, com a utilização de enzimas de restrição. Esta técnica baseia-se na migração de partículas carregadas, submetidas a um campo elétrico contínuo, em pH neutro, em que a poliacrilamida é usada como meio de separação. A carga recebida por estas partículas pode resultar da ionização, dissociação ou pela associação com outras moléculas carregadas. Pode ser empregada em sistemas unidimensional (1D) ou bidimensional (2D).<sup>31,87,88</sup>

Durante a separação das proteínas, deve-se considerar fatores como massa molar, carga e conformação, pois atuam diretamente na velocidade de migração ao longo da corrida eletroforética. O sistema de 2D-PAGE tem se mostrado eficiente, e separa as proteínas em duas dimensões: de acordo com a carga (focalização isoeletrica); e com a massa molar, em condição desnaturante, ou seja, na presença do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS). Cada mancha resultante no gel 2D-PAGE corresponde a um grupo de espécies proteicas presentes na amostra.<sup>88</sup>

Para compreender como ocorre a separação das proteínas por 2D-PAGE, faz-se necessário

esclarecer que na eletroforese com focalização isoeletrica (IEF PAGE) o objetivo é separar as proteínas de acordo com seus pontos isoeletricos (pI), sendo que o pI é o pH no qual a molécula apresenta carga de rede igual a zero, ou seja, um gradiente de pH é formado durante a focalização isoeletrica e as partículas carregadas, sob a influência de um campo elétrico, movem-se através do gel até atingirem seus pI, quando não mais migraram.<sup>87,89</sup>

Na eletroforese em condições desnaturantes (SDS PAGE), o surfactante (SDS) atua de modo a normalizar a carga e a forma das proteínas, de modo que o elemento de distinção entre elas passa a ser sua massa molar (MM). Esta normalização se dá pelo aumento das cargas negativas nas proteínas, provenientes da transferência do SDS e pela presença de agentes redutores (DTT), os quais rompem ligações de sulfeto na estrutura proteica facilitando o acesso do SDS e conferindo forma similar ao conjunto de proteínas. Portanto, a 2D-PAGE é a combinação da eletroforese IEF PAGE e SDS PAGE.<sup>86,88</sup>

A poliacrilamida é formada a partir da copolimerização entre acrilamida e a N,N'-metilenobisacrilamida (MBAA), na presença de persulfato de amônio e tetrametiletlenodiamina (TEMED). É quimicamente inerte, transparente, com estabilidade em uma variedade de valores de pH, temperatura e força iônica, características que a tornam um bom gel de separação.<sup>88</sup>

Lima et al.<sup>10</sup> realizaram um estudo da presença de alguns metais e não-metais, ferro, zinco e cálcio, em manchas de proteínas em amostras de tecido hepático da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Para isso as proteínas foram separadas através da 2D-PAGE e a avaliação qualitativa e quantitativa foi realizada por *fluorescência de raios X* produzida por *radiação síncrotron* e espectrometria de absorção atômica com chama. Com os resultados obtidos concluíram que os procedimentos de extração das proteínas foram eficientes, com a preservação das estruturas metal-proteína, o que permitiu o posterior mapeamento do cálcio, ferro e zinco.<sup>10</sup>

De forma semelhante, Braga et al.<sup>90</sup> utilizaram a 2D-PAGE para realizar o fracionamento de proteínas em amostras de tecido muscular em espécies de dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*). No entanto, a detecção da presença de mercúrio nas manchas das proteínas foi determinada por espectrometria de absorção

atômica em forno de grafite e a caracterização se deu por espectrometria de massa em tandem por ionização por electropulverização (ESI-MS/MS).<sup>90</sup>

Em estudos ambientais envolvendo os biomarcadores essa técnica de separação é aplicada sobretudo em tecidos e músculos de peixes. Moraes et al.<sup>79</sup> concluíram que o uso de 2D-PAGE o estágio inicial do trabalho foi eficiente na extração de proteínas e na preservação da estrutura metaloproteica, o que possibilitou a identificação de mercúrio em três pontos de proteína por meio da espectrometria de fluorescência de raios X.

De forma semelhante, Vieira et al.<sup>80</sup>, também trabalhando com potenciais candidatos a biomarcadores de exposição ao mercúrio em peixes, aplicaram a 2D-PAGE como método de separação, obtendo manchas claras e intensas que facilitaram a análise do metal por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite e a caracterização de proteínas por ESI-MS/MS, esta última será abordada nas próximas seções.

#### 2.4.2. Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose (AGE) é um método empregado na separação de moléculas grandes (acima de 1 milhão de Da), como por exemplo as moléculas de DNA e RNA, em que a acrilamida não pode ser utilizada, uma vez que ela permanece líquida na concentração necessária para a separação apropriada de analitos de alto peso molecular.<sup>31,91</sup> Além disso, pode também ser utilizada na caracterização de nano materiais puros ou de misturas e no rastreamento de anormalidades proteicas em fluidos biológicos, como soro, urina e líquido cefalorraquidiano.<sup>48,92,93</sup>

A agarose é um polissacarídeo extraído das algas marinhas e seu gel consiste de poros microscópicos que atuam como uma peneira molecular que separa moléculas com base na carga, tamanho e forma.<sup>94</sup> O movimento das moléculas através desse tipo de gel depende do tamanho e da carga das partículas separadas, bem como do tamanho dos poros presentes e a concentração do gel. Comumente se utiliza concentrações de 0,8% para separação de fragmentos de DNA ou corantes, mas em alguns estudos porcentagens mais altas, entre 1 a 1,5% podem ser utilizadas, tal valor varia de acordo com o tamanho das estruturas que se deseja separar claramente.<sup>31,91,93,94</sup>

A separação de DNA usando a AGE pode ser aprimorada utilizando, por exemplo, a técnica de dopagem com óxido de grafeno. Li et al.<sup>95</sup> observaram que com o emprego do gel dopado houve um aumento significativo das distâncias de deslocamento do fragmento de DNA único e dos fragmentos de DNA adjacentes o que sugere que o grafeno e seus derivados tem um potencial promissor em técnicas e eletroforese para separação e detecção de fragmentos de DNA e outras biomoléculas.<sup>95</sup>

#### 2.5. Ablação por laser

A ablação a laser (LA) é um processo no qual um feixe de laser é focado na superfície de uma amostra para remover o material da zona irradiada. O mecanismo de ablação é altamente dependente do material com o qual os fótons estão interagindo, do comprimento do pulso e do comprimento de onda do laser. A ablação a laser é ideal para materiais que não são facilmente evaporados termicamente ou compostos metálicos que possuem constituintes com propriedades diferentes, pois a estequiometria é mantida na fase de vapor.<sup>96-98</sup>

Foi considerada e usada para muitas aplicações técnicas, incluindo: produção de nano materiais, como nanotubos de carbono, metais, ligas e fulerenos, deposição de filmes finos metálicos e dielétricos, fabricação de materiais supercondutores, soldagem e colagem rotineira de peças, além de ser uma técnica utilizada para a introdução de amostras em sistemas de plasma induzido por micro-ondas. Recentemente, a ablação a laser ganhou popularidade como um processo de fabricação para isolamento de bordas de células solares.<sup>96-103</sup>

#### 2.6. Espectrometria de massa

Um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) quando acoplado a uma técnica apropriada de separação e detecção se torna um detector seletivo e muito sensível para identificar e quantificar biomoléculas de baixo e alto peso molecular. No entanto, as principais desvantagens dessa técnica são as interferências dos íons poliatômicos formados a partir dos gases atmosféricos e do argônio no plasma.<sup>31</sup>

A espectrometria de massa pode ter uma variedade de métodos de ionização, como ionização por dessorção a laser assistida por

matriz (MALDI), ionização por eletropulverização (ESI) e, mais recentemente, espectrometria de massa por ionização por nanoeletropulverização em combinação com íons mobilidade (nESI-IM-MS) e forneceu informações importantes sobre identidade e estrutura de metalotioneínas.<sup>57,104</sup>

Entre os aspectos positivos estão a capacidade de acoplar-se a várias técnicas de separação, especialmente cromatografia líquida e eletroforese capilar. O acoplamento também pode ser realizado em linha (ESI, ICP) ou no modo offline (MALDI). Dadas as baixas vazões das técnicas de separação, a detecção por EC, ESI e MALDI são quase exclusivas a estas.<sup>57</sup>

O desenvolvimento de técnicas de ionização, como MALDI e ESI, permitiu identificar uma grande variedade de espécies químicas, como proteínas e peptídeos, íons em solução, complexos organometálicos e polímeros, entre outros. Essas novas formas de ionização potenciaram a capacidade de detecção de metais e concentrações ao nível sub-traço e provaram ser adequadas para a análise de metaloproteínas e metalotioneínas.

Vários estudos foram realizados com o uso de MALDI, ESI e ICP. Shen et al.<sup>105</sup> e Ngu et al.<sup>106</sup> investigaram metalotioneínas associadas ao Cu e Cd por ESI-MS, o uso de ICP-MS em combinação com a técnica de separação mostrou-se eficiente na análise de ferramentas das isoformas de MTs.<sup>9,52</sup> Dong et al.<sup>19</sup> utilizando uma combinação de mobilidade iônica com nESI-MS, foram capazes de determinar diretamente as várias conformações que a população iônica pode apresentar, bem como as informações de tamanho de íons que podem estar relacionadas à estrutura e conformação.

A espectrometria de massa de plasma indutivamente acoplada à ablação a laser (LA-ICP-MS) foi estabelecida como uma técnica analítica multielementar poderosa, sensível e promissora para a determinação quantitativa de elementos traço em diferentes tipos de amostras, seja biológica, médica, geológica ou materiais de alta pureza.<sup>47,107,108-115</sup>

A LA-ICP-MS começa com um feixe de laser focado na superfície da amostra para gerar partículas finas - um processo conhecido como Ablação a Laser. As partículas ablatadas são então transportadas para a fonte de excitação secundária do instrumento ICP-MS para digestão e ionização da massa amostrada. Os íons excitados na tocha de plasma são posteriormente introduzidos em

um detector de espectrômetro de massa para análise elementar e isotópica.<sup>112,115</sup> Técnicas analíticas baseadas em ablação a laser oferecem a capacidade de realizar análises químicas rápidas diretamente de amostras sólidas sem uma complexa preparação de amostra.<sup>98</sup>

Exemplos de aplicação da LA-ICP-MS associadas com outras técnicas de separação podem ser encontradas na literatura, como por exemplo, nos estudos de da Silva e Arruda que relataram a identificação de proteínas contendo selênio em um extrato de folhas de girassol. A separação das proteínas foi realizada por 2D-PAGE, seguida pela detecção de selênio por ablação a laser por espectrometria de massa plasmática indutivamente acoplada. Os autores concluíram que tal método se mostrou uma ferramenta útil para a análise de proteínas contendo selênio, além de permitir a identificação desse elemento em um único ponto de proteína após o fracionamento da amostra por eletroforese em gel.<sup>47</sup>

A eletroforese em gel de agarose (AGE) associada com a LA-ICP-MS tem-se mostrado um método alternativo de confirmação da formação de proteínas corona, ou seja, biomoléculas associadas com nano partículas inorgânicas, sem que haja a dissociação entre eles.<sup>48</sup>

### 3. Considerações Finais

A metalômica é uma área interdisciplinar que têm crescido nos últimos anos, devido ao desenvolvimento e aplicação de técnicas como eletroforese, cromatografia e espectrometria. Com os trabalhos metalômicos têm-se obtido uma integração de estudos bioquímicos e inorgânicos com os analíticos, expandindo a compreensão dos complexos processos que envolvem as metaloproteínas. E isso foi possível em razão dos aprimoramentos das técnicas analíticas utilizadas, tornando os processos de separação, isolamento, quantificação e caracterização dos compostos mais eficientes.

### Agradecimentos

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001.

## Referências Bibliográficas

- <sup>1</sup> Mounicou, S.; Szpunar, J.; Lobinski, R.; Metallomics: the concept and methodology. *Chemical Society Reviews* **2009**, *38*, 1119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>2</sup> Schaumlöffel, D.; *Metallomics: Analytical Techniques and Speciation Methods*, 1a. ed., Wiley: Nova Iorque, 2016.
- <sup>3</sup> Lobinski, R.; Becker, J.S.; Haraguchi, H.; Sarkar, B.; Metallomics: guidelines for terminology and critical evaluation of analytical chemistry approaches (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* **2010**, *82*, 493. [[CrossRef](#)]
- <sup>4</sup> Maret, W. Em *Metallomics: The Science of Biometals*; Arruda, M.A.Z., ed.; Springer International Publishing: Nova Iorque, 2018, cap 1.
- <sup>5</sup> Szpunar, J.; Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques. *Analyst* **2000**, *125*, 963. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>6</sup> Szpunar, J.; Metallomics: a new frontier in analytical chemistry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2004**, *378*, 54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>7</sup> Lima, P. M.; Vieira, J. C. S.; Cavecci-Mendonça, B.; Fleuri, L. F.; Leite, A. L.; Buzalaf, M. A. R.; Pezzato, L. E.; Braga, C. P.; Padilha, P. M.; Identification of Zinc Absorption Biomarkers in Muscle Tissue of Nile Tilapia Fed with Organic and Inorganic Sources of Zinc Using Metallomics Analysis. *Biological Trace Element Research* **2020**, *194*, 259. [[CrossRef](#)]
- <sup>8</sup> Fenton, D. E.; *Biocoordination Chemistry*, Oxford Chemistry Primers: Oxford, 1995.
- <sup>9</sup> Garcia, J. S.; de Magalhaes, C. S.; Arruda, M. A. Z.; Trends in metalbinding and metalloprotein analysis. *Talanta* **2006**, *69*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>10</sup> Lima, P. M.; Neves, R. D. C. F.; Dos Santos, F. A.; Pérez, C. A.; Da Silva, M. O. A.; Arruda, M. A. Z.; De Castro, G. R.; Padilha, P. M.; Analytical approach to the metallomic of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver tissue by SRXRF and FAAS after 2D-PAGE separation: Preliminary results. *Talanta* **2010**, *82*, 1052. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>11</sup> Voet, D.; Voet, J.G.; Pratt, C.W.; *Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular*, 5th ed, Wiley Global Education: Nova Iorque, 2016.
- <sup>12</sup> Tainer, J. A.; Roberts, V. A.; Getzoff, E. D.; Designed metalloproteins. *Current Opinion Biotechnology* **1991**, *2*, 582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>13</sup> Maret, W.; Exploring the zinc proteome. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2004**, *19*, 15. [[CrossRef](#)]
- <sup>14</sup> Gómez-Ariza J. L.; Jahromi, E. Z.; González-Fernández, M.; García-Barrera T.; Gailer, J.; Liquid chromatography-inductively coupled plasma-based metallomic approaches top robe health-relevant interactions between xenobiotics and mammalian organisms. *Metallomics* **2011**, *3*, 566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>15</sup> Bondoux, G.; Jandik, P.; Jones, W. R.; New approach to the analysis of low levels of anions in water. *Journal of Chromatography A* **1992**, *602*, 79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>16</sup> Kaegi, J. H. R.; Schaffer, A.; Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry* **1988**, *27*, 8509. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>17</sup> Murray, R.K.; Granner, D.K.; Mayes, P.A.; Rodwell, V.W.; *Harper's Illustrated Biochemistry*, 26th ed., McGraw- Hill Medical Publishing Division: New York, 2003.
- <sup>18</sup> Yang, Y.; Dekkers, S.; Zhang, L. G.; Cassee, F. R.; Zuo, Y. Y.; Aggregation state of metal-based nanomaterials at the pulmonary surfactant film determines biophysical inhibition. *Environmental Science & Technology* **2018**, *52*, 8920. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>19</sup> Dong, S.; Wagner, N. D.; Russel, D. H.; Collision-Induced unfolding of partially metalated metallothionein- 2A: Tracking unfolding reactions of gas-phase ions. *Analytical Chemistry* **2018**, *90*, 11856. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>20</sup> Hayati, A.; Yuliarini, N.; Soegianto, A.; Widyana, H.; Rindaputri, I.; Ika, P.A.; Metallothionein analysis and cell damage levels on the liver and gill of *Barbonymus gonionotus* in Brantas River, Indonesia. *Journal of Biological Research* **2017**, *23*, 20. [[CrossRef](#)]
- <sup>21</sup> Abdellaoui, H.; Bouhfid, R.; Qaiss, A. K. Em *Cellulose- Reinforced Nanofibre Composites*; Jawaid, M.; Boufi, S.; Abdul Khalil, H. P. S., eds.; Woodhead Publishing: Londres, 2017, cap. 15. [[CrossRef](#)]
- <sup>22</sup> González-Domínguez, R.; Santos, H. M.; Bebianno, M. J.; García-Barrera, T.; Gómez-Ariza, J. L.; Capelo, J. L.; Combined proteomic and metallomic analyses in *Scrobucularia plana* clams to assess environmental pollution of estuarine ecosystems. *Marine Pollution Bulletin* **2016**, *13*, 117. [[CrossRef](#)]
- <sup>23</sup> Zhao, L.; Huang, Y.; Zhou, H.; Adeleye, A. S.; Wang, H.; Ortiz, C.; Mazer, S. J.; Keller, A. A.; GC-TOF-MS based metabolomics and ICP-MS based metallomics of cucumber (*Cucumis sativus*) fruits reveal alteration of metabolites profile and biological pathway disruption induced by nano copper. *Environmental Science: Nano* **2016**, *3*, 1114. [[CrossRef](#)]

- <sup>24</sup> Levine, K. E.; Redmon, J. H.; Elledge, M. F.; Wanigasuriya, K. P.; Smith, K.; Munoz, B.; Waduge, V. A.; Periris-John, R.J.; Sathiakumar, N.; Harrington, J. M.; Womack, D. S.; Wickremasinghe, R.; Quest to identify geochemical risk factors associated with chronic kidney disease of unknown etiology (CKDu) in an endemic region of Sri Lanka- a multimedia laboratory analysis of biological, food, and environmental samples. *Environmental Monitoring and Assessment* **2016**, *188*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>25</sup> Wang, H.; Wu, Z.; Chen, B.; He, M.; Hu, B.; Chip-based array magnetic solid phase microextraction on-line coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of trace heavy metals in cells. *Analyst* **2015**, *140*, 5619. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>26</sup> García-Sevillano, M. A.; García-Barrera, T.; Navarro, F.; Abril, N.; Pueyo, C.; López-Barea, J.; Gómez-Ariza, J.L.; Use of metallomics and metabolomics to assess metal pollution in Doñana National Park (SW Spain). *Environmental Science & Technology* **2014**, *48*, 7747. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>27</sup> García-Sevillano, M. A.; García-Barrera, T.; Navarro, F.; Gómez-Ariza, J. L.; Absolute quantification of superoxide dismutase in cytosol and mitochondria of mice hepatic cells exposed to mercury by a novel metallomic approach. *Analytica Chimica Acta* **2014**, *842*, 42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>28</sup> García-Sevillano, M. A.; García-Barrera, T.; Navarro, F.; Gómez-Ariza, J. L.; Analysis of the biological response of mouse liver (*Mus musculus*) exposed to As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> on integrated -omics approaches. *Metallomics* **2013**, *5*, 1644. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>29</sup> Ossipov, K.; Foteeva, L. S.; Seregina, I. F.; Perevalov, S. A.; Timerbaev, A. R.; Bolshov, M. A.; Metallomics for drug development: Serum protein binding and analysis of an anticancer tris(8-quinolinolato)gallium(III) drug using inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **2013**, *785*, 22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>30</sup> Moraes, P. M.; Santos, F. A.; Padilha, C. F.; Castro, G. R.; Zara, L. F.; Padilha, P. M.; Metallomic study of mercury in fish from Amazon region- Brazil. *E3S Web of Conferences* **2013**, *1*, 26007. [[CrossRef](#)]
- <sup>31</sup> Haider, S. R.; Sharp, B. L.; Reid, H. J.; On-line coupling of gel electrophoresis and inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry* **2011**, *30*, 1793. [[CrossRef](#)]
- <sup>32</sup> Torreggiani, A.; Tinti, A.; Raman spectroscopy a promising technique for investigations of metallothioneins. *Metallomics* **2010**, *2*, 246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>33</sup> Maret, W.; Fluorescent probes for the structure and function of metallothionein. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2009**, *877*, 3378. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>34</sup> Sanz-Medel, A.; Montes-Bayón, M.; del Rosario, F. de la C. M.; Encinar, J. R.; Bettmer, J.; Elemental mass spectrometry for quantitative proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, *390*, 3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>35</sup> Gervasio, A. P. G.; Lavorante, A. F.; Moraes, M. C. B.; Giné, M. F.; Eletroforese capilar acoplada à espectrometria com plasma: uma ferramenta eficiente para a especiação. *Química Nova* **2003**, *26*, 65. [[CrossRef](#)]
- <sup>36</sup> Geffard, A.; Quéau, H.; Dedourge, O.; Biagianti-Risboug, S.; Geffard, O.; Influence of biotic and abiotic factors on metallothionein level in *Gammarus pulex*. *Comparative Biochemistry and Physiology C* **2007**, *145*, 632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>37</sup> Ghasemian, S.; Katayoon, K.; Asgar, Z.; Metallothionein levels and heavy metals in Caspian Sea gammarid, *Pontogammarus maeoticus* (Crustacea, Amphipoda, Pontogammaridae). *Bioflux* **2016**, *9*, 1. [[Link](#)]
- <sup>38</sup> Posewitz, M.C.; Tempst, P.; Immobilized Gallium(III) Affinity Chromatography of Phosphopeptides. *Analytical Chemistry* **1999**, *71*, 2883. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>39</sup> Moore, J. C.; Gel permeation chromatography. I. A new method for molecular weight distribution of high polymers. *Journal of Polymer Science Part A: General Papers* **1964**, *2*, 835. [[CrossRef](#)]
- <sup>40</sup> Andrews, A. T.; *Electrophoresis. Theory, Techniques, and Biochemical and Clinical Applications*, Oxford University Press: New York, 1988.
- <sup>41</sup> Elliot, V. L.; McLeod, C. W.; Marshall, P. S.; Combination of gel electrophoresis and ICP-mass spectrometry-novel strategies for phosphoprotein measurement. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2005**, *383*, 416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>42</sup> Marshall, P.; Heudi, O.; Bains, S.; Freeman, H. N.; Abou-Shakra, F.; Reardon, K.; The determination of protein phosphorylation on electrophoresis gel blots by laser ablation inductively coupled plasma spectrometry. *The Analyst* **2002**, *127*, 459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>43</sup> Wind, M.; Feldmann, I.; Jakubowski, N.; Lehmann, W.D.; Spotting and quantification of phosphoproteins purified by gel electrophoresis and laser ablation-element mass spectrometry with phosphorus-31 detection. *Electrophoresis* **2003**, *24*, 1276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- <sup>44</sup> Raab, A.; Pioselli, B.; Munro, C.; Thomas-Oates, J.; Feldmann, J.; Evaluation of gel electrophoresis conditions for the separation of metal-tagged proteins with subsequent laser ablation ICP-MS detection. *Electrophoresis* **2009**, *30*, 303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>45</sup> Ballihaut, G.; Claverie, F.; Pécheyran, C.; Mounicou, S.; Grimaud, R.; Lobinski, R.; Sensitive detection of selenoproteins in gel electrophoresis by high repetition rate femtosecond laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 6874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>46</sup> Ballihaut, G.; Pécheyran, C.; Mounicou, S.; Preud'homme, H.; Grimaud, R.; Lobinski, R.; Multimode detection (LA-ICP-MS, MALDI-MS and nanoHPLC-ESI-MS2) in 1D and 2D gel electrophoresis for selenium-containing proteins. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2007**, *26*, 183. [[CrossRef](#)]
- <sup>47</sup> da Silva, M. A. O.; Arruda, M. A. Z.; Identification of selenium in the leaf protein of sunflowers by a combination of 2D-PAGE and laser ablation ICP-MS. *Microchimica Acta* **2012**, *176*, 131. [[CrossRef](#)]
- <sup>48</sup> Jimenez, M. S.; Luque-Alled, J. M.; Gomez, T.; Castillo, J. R.; Evaluation of agarose gel electrophoresis for characterization of silver nanoparticles in industrial products. *Electrophoresis* **2016**, *37*, 1376. [[CrossRef](#)]
- <sup>49</sup> Lanças, F. M.; A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente "compatíveis"? *Scientia Chromatographica* **2009**, *1*, 35. [[Link](#)]
- <sup>50</sup> Collins, C.H.; Químicos redescobrem cromatografia líquido-sólido. *Scientia Chromatographica* **2009**, *1*, 7. [[Link](#)]
- <sup>51</sup> Van Campenhout, K.; Infante, H. G.; Goemans, G.; Belpaire, C.; Adams, F.; Blust, R.; Bervoets, L.; A field survey of metal binding to metallothionein and other cytosolic ligands in liver of eels using an on-line isotope dilution method in combination with size exclusion (SE) high pressure liquid chromatography (HPLC) coupled to Inductively Coupled Plasma time-of-flight Mass Spectrometry (ICP-TOFMS). *Science of the Total Environment* **2008**, *394*, 379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>52</sup> Wolf, C.; Strenziok, R.; Kyriakopoulos, A.; Elevated metallothionein-bound cadmium concentrations in urine from bladder carcinoma patients, investigated by size exclusion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **2009**, *631*, 218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>53</sup> Infante, H. G.; Van Campenhout, K.; Blust, R.; Adams, F.C.; Anion-exchange high performance liquid chromatography hyphenated to inductively coupled plasma-isotope dilution-time-of-flight mass spectrometry for speciation analysis of metal complexes with metallothionein isoforms in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) exposed to environmental metal pollution. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1121*, 184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>54</sup> Miyayama, T.; Ogra, Y.; Suzuki, K. T.; Separation of metallothionein isoforms extracted from isoform-specific knockdown cells on two-dimensional micro high-performance liquid chromatography hyphenated with inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2007**, *22*, 179. [[CrossRef](#)]
- <sup>55</sup> Santiago-Rivas, S.; Moreda-Pineiro, A.; Bermejo-Barrera, P.; Moreda-Pineiro, J.; Alonso-Rodríguez, E.; Muniategui-Lorenzo, S.; Lopez-Mahia, P.; Prada-Rodríguez, D.; Pressurized liquid extraction- assisted mussel cytosol preparation for the determination of metals bound to metallothionein-like proteins. *Analytica Chimica Acta* **2007**, *603*, 36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>56</sup> Santiago-Rivas, S.; Moreda-Pineiro, A.; Bermejo-Barrera, A.; Bermejo-Barrera, P.; Fractionation metallothionein-like proteins in mussels with on line metal detection by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. *Talanta* **2007**, *4*, 1580. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>57</sup> Ryvolova, M.; Krizkova, S.; Adam, V.; Beklova, M.; Trnkova, L.; Hubalek, J.; Kizek, R.; Analytical methods for metallothionein detection. *Current Analytical Chemistry* **2011**, *700*, 243. [[CrossRef](#)]
- <sup>58</sup> Burtis, C. A.; Ashwood, E. R.; *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, 5a ed, Saunders Elsevier: St. Louis, 2001.
- <sup>59</sup> Spudeit, D. A.; Dolzan, M. D.; Micke, G. A.; Conceitos básicos em Eletroforese Capilar. *Scientia Chromatographica* **2012**, *4*, 287. [[CrossRef](#)]
- <sup>60</sup> Olesik, J. W.; Kinzer, J.A.; Olesik, S.; Capillary electrophoresis inductively coupled plasma spectrometry for rapid elemental speciation. *Analytical Chemistry* **1995**, *67*, 1. [[CrossRef](#)]
- <sup>61</sup> Pyell, U.; Characterization of nanoparticles by capillary electromigration separation techniques. *Electrophoresis* **2010**, *31*, 814. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>62</sup> López-Lorente, A. I.; Simonet, B. M.; Valcárcel, M.; Electrophoretic methods for the analysis of nanoparticles. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2011**, *30*, 58. [[CrossRef](#)]

- <sup>63</sup> Sewell, P. A.; Clarke, B. A.; Kealey, D.; *Chromatographic separations*, Wiley: New York, 1987.
- <sup>64</sup> Sepsey, A.; Bacskay, I.; Felinger, A.; Molecular theory of size exclusion chromatography for wide pore size distributions. *Journal of Chromatography A* **2014**, *1331*, 52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>65</sup> Nguyen, T. T. N.; Østergaard, J.; Stürup, S.; Gammelgaard, B.; Metallomics in drug development: characterization of a liposomal cisplatin drug formulation in human plasma by CE-ICP-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2013**, *405*, 1845. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>66</sup> Trapiella-Alfonso, L.; d'Orlyé, F.; Varenne, A.; Recent advances in the development of capillary electrophoresis methodologies for optimizing, controlling, and characterizing the synthesis, functionalization, and physicochemical, properties of nanoparticles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2016**, *408*, 2669. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>67</sup> Footeva, L.; Matczuk, M.; Pawlak, K.; Aleksenko, S. S.; Nosenki, S. V.; Karandashev, V. K.; Jarosz, M.; Timerbaev, A. R.; Combination of ICP-MS, capillary electrophoresis, and their hyphenation for probing Ru(III) metallodryg-DNA interactions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2017**, *409*, 2421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>68</sup> Silva, C. A.; Anderson, S. J.; Guilherme, L. R. G.; Uso da cromatografia de exclusão por tamanho na caracterização de substâncias húmicas de Latossolo Vermelho-Escuro sob efeito de calagem. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* **2000**, *24*, 495. [[CrossRef](#)]
- <sup>69</sup> Huber, C. G.; *Biopolymer chromatography. Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*, Wiley Online Library: Nova Iorque, 2006. [[CrossRef](#)]
- <sup>70</sup> Cortez, S. M. R.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade do Minho, Portugal, 2005. [[Link](#)]
- <sup>71</sup> Muñoz, A. H. S.; Kubachka, K.; Wrobel, K.; Corona, F. G.; Yathavakilla, S. K. V.; Caruso, J. A.; Wrobel, K.; Metallomics approach to trace element analysis in *Ustilago maydis* using cellular fractionation, atomic absorption spectrometry, and size exclusion chromatography with ICP-MS detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 5138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>72</sup> Bucciarelli, S.; Midtgaard, S. R.; Pedersen, M. N.; Skou, S.; Arleth, L.; Vestergaard, B.; Size-exclusion chromatography small-angle X-ray scattering of water soluble proteins on a laboratory instrument. *Journal of Applied Crystallography* **2018**, *51*, 1623. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>73</sup> Chen, Q. P.; Schure, M. R.; Siepmann, J. I.; Using molecular simulations to probe pore structures and polymer partitioning in size exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A* **2018**, *1573*, 78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>74</sup> Fisher, O. S.; Kenney, G. E.; Ross, M. O.; Ro, S. Y.; Lemma, B. E.; Batelu, S.; Thomas, P. M.; Sosnowski, V. C.; DeHart, C. J.; Kelleher, N. L.; Stemmler, T. L.; Hoffman, B. M.; Rosenzweig, A. C.; Characterization of a long overlooked copper protein from methane- and ammonia-oxidizing bacteria. *Nature Communications* **2018**, *9*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>75</sup> Huang, T.-Y.; Chi, L.-M.; Chien, K.-Y.; Size-exclusion chromatography using reverse-phase columns for protein separation. *Journal of Chromatography A* **2018**, *1571*, 201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>76</sup> Zheng, Z.; Huang, Q.; Ling, C.; Water-soluble yeast  $\beta$ -glucan fractions with different molecular weights: Extraction and separation by acidolysis assisted-size exclusion chromatography and their association with proliferative activity. *International Journal of Biological Macromolecules* **2019**, *123*, 269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>77</sup> Júnior, C. A. L.; Oliveira, S. R.; Mazzafera, P.; Arruda, M. A. Z.; Expanding the information about the influence of cadmium on the metabolism of sunflowers: Evaluation of total, bioavailable, and bioaccessible content and metallobiomolecules in sunflower seeds. *Environmental and Experimental Botany* **2016**, *125*, 87. [[CrossRef](#)]
- <sup>78</sup> Verola Mataveli, L. R.; Fioramonte, M.; Gozzo, F. C.; Zezzi Arruda, M. A.; Improving metallomics information related to transgenic and non-transgenic soybean seeds using 2D-HPLC-ICP-MS and ESI-MS/MS. *Metallomics* **2012**, *4*, 373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>79</sup> Moraes, P. M.; Santos, F. A.; Padilha, C. C. F.; Vieira, J. C. S.; Zara, L. F.; Padilha, P. M.; A Preliminary and Qualitative Metallomics Study of Mercury in the Muscle of Fish from Amazonas, Brazil. *Biological Trace Element Research* **2012**, *150*, 195. [[CrossRef](#)]
- <sup>80</sup> Vieira, J. C. S.; Cavecci, B.; Queiroz, J. V.; Braga, C. P.; Padilha, C. C. F.; Leite, A. L.; Figueiredo, W. S.; Buzalaf, M. A. R.; Zara, L. F.; Padilha, P. M. *Archives of environmental contamination and toxicology* **2015**, *69*, 422. [[CrossRef](#)]
- <sup>81</sup> Vieira, J. C. S.; Braga, C. P.; de Oliveira, G.; Padilha, C. C. F.; de Moraes, P. M.; Zara, L. F.; Leite, A. L.; Buzalaf, M. A. R.; Padilha, P. M. Mercury exposure: Protein biomarkers of mercury in Jaraqui fish from the Amazon Region. *Biological Trace Element Research* **2018**, *183*, 164 [[CrossRef](#)]

- <sup>82</sup> Valentin, K.; John, U.; Medlin, L.; Nucleic acid isolation from environmental aqueous samples. *Methods in Enzymology* **2005**, *395*, 15. [CrossRef]
- <sup>83</sup> Hackney, A. C. Em *Doping, performance-enhancing drugs, and hormones in sport*, Elsevier: Amsterdã, 2018, cap. 10. [CrossRef]
- <sup>84</sup> Vispo, N. S.; *Combinatoria Molecular*, Elfos Scientiae: La Habana, 2004.
- <sup>85</sup> Berklman, T.; Stenstedt, T.; *2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients: principles and methods*, Amersham Biosciences: Uppsala, 1998.
- <sup>86</sup> Gorg, A.; Weiss, W.; Dunn, M. J.; Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* **2004**, *4*, 3665. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>87</sup> Magalhães, C. S.; Garcia, J. S.; Lopes, A. S.; Figueiredo, E. C.; Arruda, M. A. Z. Em *Trends in sample preparation*; Arruda, M.A.Z., ed.; Nova Science Publishers: Nova Iorque, 2007, cap. 9.
- <sup>88</sup> Silva, J. G.; *Eletroforese de proteínas: guia teórico-prático*, 1a. ed., Interciência: Rio de Janeiro, 2001.
- <sup>89</sup> Copeland, R. A.; *Methods for Protein Analysis*, Chapman e Hall: Nova Iorque, 1994.
- <sup>90</sup> Braga, C. P.; Bittarello, A. C.; Padilha, C. C. F.; Leite, A. L.; Moraes, P. M.; Buzalaf, M.A.R.; Zara, L.F.; Padilha, P.M.; Mercury fractionation in dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) of the Madeira River in Brazil using metalloproteomic strategies. *Talanta* **2015**, *132*, 239. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>91</sup> Drabik, A.; Bodzoń-Kuśkoska, A.; Silberring, J. Em *Proteomic profiling and Analytical Chemistry*; Ciborowski, P., Silberring, J., eds.; Elsevier: Amsterdã, 2016, cap. 7. [CrossRef]
- <sup>92</sup> Giot, J.-F. Agarose Gel Electrophoresis – Applications in Clinical Chemistry. *Journal of Medical Biochemistry* **2010**, *29*, 9. [CrossRef]
- <sup>93</sup> Armstrong, J. A.; Schulz, J. R.; Agarose Gel Electrophoresis. *Current Protocols – Essential Laboratory Techniques* **2008**, *10*, 7.2.1 [CrossRef]
- <sup>94</sup> Tankeshar, A. Agarose gel electrophoresis: Principle, Procedure and Results. 2019. Disponível em: <<https://microbeonline.com/agarose-gel-electrophoresis/>>. Acesso em: 10 maio 2020. [Link]
- <sup>95</sup> Li, J.; Yang, Y.; Mao, Z.; Huang, W.; Qiu, T.; Wu, Q.; Enhanced Resolution of DNA Separation Using Agarose Gel Electrophoresis Doped with Graphene Oxide. *Nanoscale Research Letters* **2016**, *11*, 404. [CrossRef]
- <sup>96</sup> Dowding, C. Em *Advances in Laser Materials Processing*, Lawrence, J., Pou, J., Low, D. K. Y., Toyserkani, E., eds.; Woodhead Publishing: Loughborough, 2010, cap. 19.
- <sup>97</sup> Virji, M. A.; Stefaniak, A. B.; Em *Comprehensive Materials Processing, Health Safety and Environmental Issues*; Hashmi, S., Batalha, G.F., Tyne, C. J. V., Yilbas, B., eds.; Elsevier, 2016, cap. 6.
- <sup>98</sup> SPI Lasers, 2019, What is laser ablation? Disponível em: <<https://www.spilasers.com/application-ablation/what-is-laser-ablation/>>. Acesso em: 5 setembro 2019. [Link]
- <sup>99</sup> Greenway, G. M.; *Atomic emission spectrometry/ Microwave-induced plasma. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, Elsevier: Amsterdã, 2013. [CrossRef]
- <sup>100</sup> Yang, N.; Chen, X.; Ren, T.; Zhang, P.; Yang, D.; Carbon nanotube based biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2015**, *2017*, 690. [CrossRef]
- <sup>101</sup> Yang, R.; One-dimensional nanostructures by pulsed laser ablation. *Science Advances* **2012**, *4*, 401. [CrossRef]
- <sup>102</sup> Sadrolhosseini, A. R.; Mahdi, M. A.; Alizadeh, F.; Rashid, S. A. Em *Laser Technology and Its Applications*; Yufei, M., ed.; IntechOpen, 2018, cap. 4. [CrossRef]
- <sup>103</sup> Di Pietrantonio, F.; Cannatà, D.; Benetti, M. Em *Micro and Nano Technologies, Functional Nanostructured Interfaces for Environmental and Biomedical Applications*; Dinca, C.; Suche, M.P., eds.; Elsevier: Amsterdã, 2019, cap. 8.
- <sup>104</sup> Ryvolova, M.; Adam, V.; Kizek, R. J.; Analysis of metallothionein by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **2012**, *1226*, 31. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>105</sup> Shen, H.; Qin, H. H.; Guo, J. S.; Cooperation of metallothionein and zinc transporters for regulating zinc homeostasis in human intestinal Caco-2 cells. *Nutrition Research* **2008**, *28*, 406. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>106</sup> Ngu, T. T.; Sturzenbaum, S. R.; Stillman, M. J.; Cadmium binding studies to the earthworm *Lumbricus rubellus* metallothionein by electrospray mass spectrometry and circular dichroism spectroscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2006**, *351*, 229. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>107</sup> Günther, D.; Heinrich, C.; Enhanced sensitivity in laser ablation-ICP mass spectrometry using helium-argon mixtures as aerosol carrier. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **1999**, *14*, 1363. [CrossRef]
- <sup>108</sup> Durrant, S. F.; Ward, N. I.; Recent biological and environmental applications of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2005**, *20*, 821. [CrossRef]

- <sup>109</sup> Becker, J. S.; Zority, M. V.; Pickhardt, C.; Palomero-Gallagher, N.; Zilles, K.; Imaging of Copper, Zinc and Other Elements in Thin Section of Human Brain Samples (Hippocampus) by Laser Ablation ICP-MS. *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, 5851. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>110</sup> Becker, J. S.; Gorbunoff, A.; Zoriy, M.; Izmer, A.; Kayser, M.; Evidence of near-field laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (NF-LA-ICP-MS) at nanometer scale for elemental and isotopic analysis on gels and biological samples. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2006**, *21*, 19. [[CrossRef](#)]
- <sup>111</sup> Becker, J. S.; Zoriy, M.; Matusch, A.; Wu, B.; Salber, D.; Palm, C.; Becker, J. S.; Bioimaging of metals by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Mass Spectrometry Reviews* **2010**, *29*, 156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>112</sup> Diwakar, P. K.; Gonzalez, L. J.; Harilal, S. S.; Russo, R. E.; Hassanein, A.; Ultrafast laser ablation ICP-MS: role of spot size, laser fluence, and repetition rate in signal intensity and elemental fractionation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2014**, *29*, 339. [[CrossRef](#)]
- <sup>113</sup> Becker, J. S.; Mounicou, S.; Zoriy, M. V.; Becker, J. S.; Lobinski, R.; Analysis of metal-binding proteins separated by non-denaturing gel electrophoresis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Talanta* **2008**, *76*, 1183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>114</sup> Limbeck, A.; Galler, P.; Bonta, M.; Bauer, G.; Nischkauer, W.; Vanhaecke, F.; Recent advances in quantitative LA-ICP-MS analysis: challenges and solutions in the life sciences and environmental chemistry. *Analytical and bioanalytical* **2015**, *407*, 6593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>115</sup> Matusch, A.; Depboylu, C.; Palm, C.; Wu, B.; Höglinger, G. U.; Schäfer, M. K.-H.; Becker, J. S.; Cerebral Bioimaging of Cu, Fe, Zn, and Mn in the MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease Using Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (LA-ICP-MS). *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2010**, *21*, 161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>116</sup> Stauber, J.; Legouffe, R.; Fontaine, E.; Imaging of elements and metals in biological tissues, Application Note #MSI-14, Imabiotech, 2005. Disponível em: <<https://www.imabiotech.com/imaging-of-elements-and-metals-in-biological-tissues/>> Acesso em: 22 setembro 2019.