

**PROD. TEC. ITV DS / N002/2020**

**DOI: 10.29223/PROD.TEC.ITV.DS.2020.Fonseca**

## **PRODUÇÃO TÉCNICA ITV DS**

# **METAPROTEÔMICA DE SOLOS DE CAVERNAS DE CARAJÁS**

**Lana Patricia da Silva Fonseca**  
**Rafael Borges da Silva Valadares**  
**Felipe Costa Trindade**  
**Guilherme Corrêa de Oliveira**

**Belém/PA**  
**Fevereiro/2020**

|                                                                                  |                                 |
|----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| <b>Título:</b> Metaproteômica de solos de cavernas de Carajás.                   |                                 |
| <b>PROD. TEC. ITV DS - N002/2020</b>                                             | <b>Revisão</b><br><br><b>00</b> |
| <b>Classificação:</b> ( ) Confidencial ( ) Restrita ( ) Uso Interno ( x) Pública |                                 |

**Informações Confidenciais** - Informações estratégicas para o Instituto e sua Mantenedora. Seu manuseio é restrito a usuários previamente autorizados pelo Gestor da Informação.

**Informações Restritas** - Informação cujo conhecimento, manuseio e controle de acesso devem estar limitados a um grupo restrito de empregados que necessitam utilizá-la para exercer suas atividades profissionais.

**Informações de Uso Interno** - São informações destinadas à utilização interna por empregados e prestadores de serviço

**Informações Públicas** - Informações que podem ser distribuídas ao público externo, o que, usualmente, é feito através dos canais corporativos apropriados

### **Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

F676 Fonseca, Lana Patricia da Silva  
Metaproteômica de solos de cavernas de Carajás. / Lana Patrícia da Silva  
Fonseca, Rafael Borges da Silva Valadares, Felipe Costa Trindade, Guilherme  
Corrêa de Oliveira. – Belém, PA: ITV, 2020.  
22 p.: il.

1. Genômica - Metaproteômica. 2. Solos. 3. Caverna - Carajás, Serra do (PA). I. Oiveira, Guilherme Corrêa de. II. Valadares, Rafael Borges da Silva. III. Título.

CDD.23 ed. 579.3098115

Bibliotecário(a) responsável: Nisa Gonçalves. CRB: 2 - 525

## RESUMO EXECUTIVO

A Floresta Nacional de Carajás representa uma área de preservação ambiental, de grande biodiversidade e produção mineral. As cavernas também estão inseridas como ambientes dotados de riqueza de espécies e características ambientais únicas. As cavernas são consideradas bens da União sendo, portanto, protegidas por Lei de acordo com diferentes graus de relevância. As cavernas possuem zonas fóticas (ZF), semi-fóticas (ZSM) e afóticas (ZAF) de penetração de luz que influenciam diretamente no fluxo de energia e na proliferação da fauna e flora local. A ausência de luz solar nas cavernas impossibilita a ação de organismos fotossintetizantes. Assim grande parte da entrada de energia é regulada pela atividade de microrganismos quimioautotróficos ou pela decomposição de compostos orgânicos. Em outras zonas, a presença de luz solar permite a atividade de microrganismos e plantas fotossintetizantes, incrementando a entrada de energia no ecossistema e possibilitando uma maior gama de metabolismos no ecossistema cavernícola. Este trabalho teve como objetivo identificar os microrganismos presentes no solo de duas cavernas localizadas na Serra da Bocaina (Pará) e verificar os mecanismos moleculares mais abundantes em solos amostrados em zonas com diferentes graus de penetração luminosa. Para isso foram utilizadas metodologias de extração de proteínas do solo, cromatografia líquida e espectrometria de massas de alta resolução. As análises dos proteomas revelaram o filo das cianobactérias como o grupo mais recorrente nas amostras testadas e de maior relevância na ZF. Peptídeos de cianobactérias bem como do gênero de planta *Selaginella* estão relacionadas à fotossíntese. Na ZSF o gênero *Selaginella* também estava presente, mostrando a importância destas plantas como fonte primária de energia nas cavernas. Nesta zona também foram identificadas enzimas envolvidas nos processos de oxidação e redução de compostos inorgânicos, processos característicos de metabolismo microbiano baseado na quimiossíntese. Na ZSF, a enzima cisteína desulfurase teve destaque e na ZAF, as enzimas sulfeto citocromo c redutase (flavocitocromo c), cisteína desulfurase e sulfato adenililtransferase foram detectadas, todas envolvidas na obtenção de energia independente de luz. Portanto, a partir da metaproteômica, foi possível identificar a biota ativa e funções bioquímicas associadas, demonstrando a importância destes organismos para a manutenção do ecossistema cavernícola. Este é o primeiro trabalho envolvendo a análise metaproteômica para avaliação da atividade microbiana em solos de cavernas.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1 -</b> | Mapa de localização geográfica das cavernas SB-0212 e SB0049 da Serra da Bocaina em Carajás no Estado do Pará. ....                                                                                                                                                                                                                                  | 8  |
| <b>Quadro 1 -</b> | Cadastro e zona de intensidade luminosa das amostras coletadas em solo de duas cavernas: SB-0212 e SB-0049. ....                                                                                                                                                                                                                                     | 8  |
| <b>Figura 2 -</b> | Amostras de solo de duas cavernas (SB0212 e SB0049) mostrando a abundância relativa de peptídeos advindos dos filamentos de microrganismos de diferentes zonas de incidência luminosa. ....                                                                                                                                                          | 13 |
| <b>Figura 3 -</b> | Amostras de solo de duas cavernas (SB0212 e SB0049) mostrando a abundância relativa de peptídeos encontrados de diferentes processos biológicos, em função das zonas de incidência luminosa. ....                                                                                                                                                    | 14 |
| <b>Figura 4 -</b> | Amostras de solo de duas cavernas (SB0212 e SB0049) mostrando a abundância relativa de peptídeos encontrados de distintas funções moleculares, em função das zonas de incidência luminosa. ....                                                                                                                                                      | 16 |
| <b>Figura 5 -</b> | Proteomas de solos de amostras de duas cavernas (SB0212 e SB0049) com destaque para o número de processos detectados em cada amostra. Amostras foram coletadas de acordo com o grau de penetração de luz (zona fótica PZ; semi-fótica SP e afótica AZ) e respectivos processos biológicos correlacionados. ....                                      | 17 |
| <b>Figura 6 -</b> | Heatmap baseado na abundância relativa de processos biológicos envolvendo as proteínas detectadas em diferentes amostras de solo de caverna, pela zona de incidência luminosa (zona fótica PZ; semi-fótica SP e afótica AZ). As zonas PZ e SPZ formam um grupo único enquanto as duas amostras coletadas na zona fótica se encontram separadas. .... | 18 |

## SUMÁRIO

|          |                                                  |           |
|----------|--------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                          | <b>6</b>  |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVO .....</b>                            | <b>7</b>  |
| 2.1      | OBJETIVO GERAL .....                             | 7         |
| 2.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                      | 7         |
| <b>3</b> | <b>PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....</b>           | <b>7</b>  |
| 3.1      | LOCAL DE COLETA E AMOSTRAGEM .....               | 7         |
| 3.2      | EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS .....      | 8         |
| 3.3      | DIGESTÃO DE PROTEÍNAS .....                      | 9         |
| 3.4      | 2D-UPLC-MSE .....                                | 9         |
| 3.5      | BIOINFORMÁTICA .....                             | 10        |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>              | <b>10</b> |
| 4.1      | PEPTÍDEOS ASSOCIADOS À ZONA FÓTICA .....         | 11        |
| 4.2      | PEPTÍDEOS ASSOCIADOS À ZONA SEMI-FÓTICA .....    | 11        |
| 4.3      | PEPTÍDEOS ASSOCIADOS À ZONA AFÓTICA .....        | 12        |
| 4.4      | PROCESSOS BIOLÓGICOS E FUNÇÕES MOLECULARES ..... | 13        |
| <b>5</b> | <b>CONCLUSÕES .....</b>                          | <b>19</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS .....</b>                         | <b>20</b> |
|          | <b>ANEXOS .....</b>                              | <b>23</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A Floresta Nacional de Carajás representa uma área de preservação ambiental, grande biodiversidade e produção mineral. Neste sentido, as cavidades também estão inseridas como ambientes dotados de riqueza de espécies e características ambientais únicas, que justificam a importância da conservação das mesmas.

O ambiente cavernícola possui características únicas de penetração de luz. Podemos distinguir diferentes partes das cavernas em zonas onde há incidência de luz plena (zona fótica), incidência parcial (zona semi-fótica) e ausência total de luz (zona afótica). Além disso, há outras particularidades de temperatura e umidade que influenciam diretamente na proliferação da fauna e flora local (HE; ZHANG, 2011). Com isso, no solo destes ambientes há microrganismos envolvidos em processos biogeoquímicos, que contribuem para a estabilidade da dinâmica trófica destes sistemas biológicos (DUARTE et al., 2008).

Os microrganismos do solo possuem metabolismos variados, utilizando desde a luz solar (fotoautotróficos), compostos orgânicos (heterotróficos) ou compostos inorgânicos (quimioautotróficos) para obtenção de energia. Isto reflete na degradação e produção de diversas moléculas no ambiente (FENG, 2011; ZAK et al., 2003; FRIEDRICH et al., 2005). Nas cavernas, a variação de luminosidade representa o fator abiótico mais determinante para a manutenção destes ecossistemas (FERREIRA; CARDOSO; SILVA, 2016). Além disso, os microrganismos também estão associados à mineralização e ciclagem de nutrientes, e interação de diferentes maneiras com a fauna e flora do ambiente cavernícola (BRUSSAARD, 2012).

Com isso, o metabolismo destes microrganismos contribui para o equilíbrio dos processos biogeoquímicos, seja em zonas de intensa luminosidade ou na ausência da mesma (ZHOU et al., 2007; MARQUES et al., 2018; CANDIROGLU; GUNGOR, 2017). Assim, é essencial termos um conhecimento maior a respeito da microbiota normal que ocorre nas cavernas. Este conhecimento deve ser útil como referência a futuros estudos sobre como certos impactos (desmatamentos, queimadas, turismo e mineração), que ocorrem no interior ou nas proximidades das cavernas, podem alterar a atividade microbiana e por consequência a dinâmica biológica do ecossistema cavernícola (FERREIRA et al., 2010).

O presente estudo teve por objetivo analisar e identificar o perfil de proteínas associados aos micro-organismos do solo (metaproteoma) no solo cavernícola da Serra de Canaã do Carajás. Para isso, foram comparados os diferentes grupos de proteínas encontradas e seus organismos associados em cada zona de penetração de luz, com o objetivo de explorar

a diversidade microbiana e os processos bioquímicos predominantes nos microambientes cavernícolas.

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 GERAL**

Identificar mecanismos moleculares microbianos que reflitam a atividade biológica em solos com diferentes graus de penetração de luz nas cavernas de Carajás.

### **2.2 ESPECÍFICOS**

- Isolar e identificar proteínas dos solos amostrados.
- Comparar o proteoma de solo de caverna de diferentes zonas de penetração de luz.

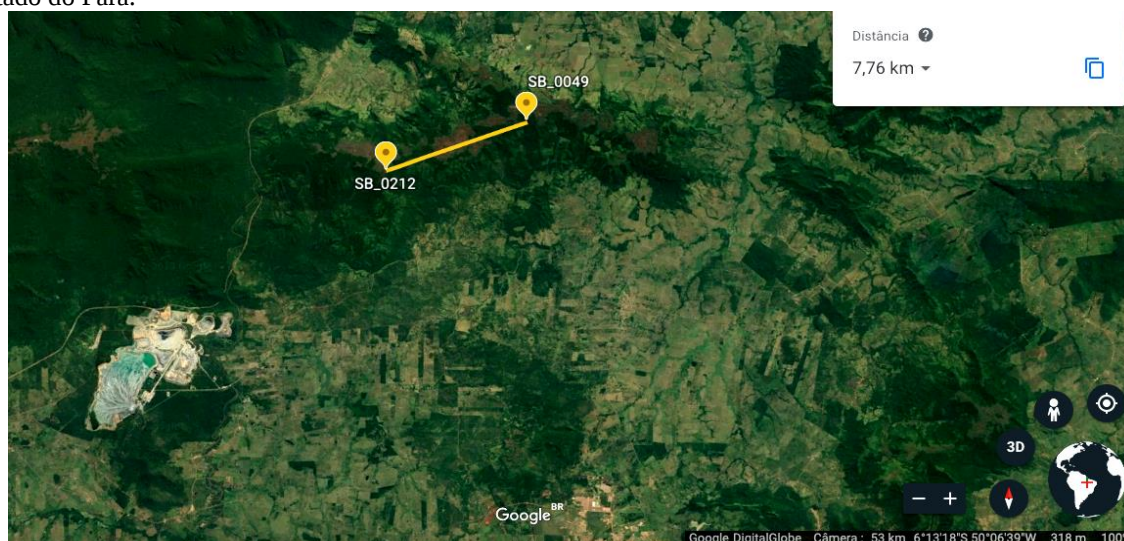
Realizar uma análise de diversidade microbiana baseada nos peptídeos detectados no solo

## **3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

### **3.1 LOCAL DE COLETA E AMOSTRAGEM**

Foram coletadas 24 amostras de solo nas cavernas SB-0212 e SB0049, com duas réplicas por ponto, localizadas na Serra da Bocaina em Carajás, no Estado do Pará, demonstradas no mapa na figura 1. As amostragens foram realizadas na profundidade de 0-20 cm e durante as coletas os materiais foram acondicionados em sacos plásticos, mantidos em gelo, e posteriormente guardados em -80° C até a extração de proteínas.

**Figura 1** - Mapa de localização geográfica das cavernas SB-0212 e SB0049 da Serra da Bocaina em Carajás no Estado do Pará.



**Fonte:** Google Earth, (2020).

### 3.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Foram realizadas com algumas modificações no protocolo de Wang *et al.* (2006) (Anexo D). Para a análise proteômica as réplicas foram combinadas, ou seja, as 24 amostras foram reduzidas a 12 e destas, 10 obtiveram resultados satisfatórios. Como mostra o Quadro 1, podemos analisar o código de cada amostra, localização da caverna de onde foram coletadas e a respectiva zona de incidência luminosa.

**Quadro 1** - Cadastro e zona de intensidade luminosa das amostras coletadas em solo de duas cavernas: SB-0212 e SB-0049.

| Amostra | Localização | Zona de luz |
|---------|-------------|-------------|
| MG0018  | SB-0212     | Semi-fótica |
| MG0019  | SB-0212     | Fótica      |
| MG0020  | SB-0212     | Afótica     |
| MG0021  | SB-0212     | Afótica     |
| MG0024  | SB-0049     | Semi-fótica |
| MG0025  | SB-0049     | Afótica     |
| MG0026  | SB-0049     | Afótica     |
| MG0028  | SB-0049     | Afótica     |
| MG0029  | SB-0049     | Fótica      |
| MG0030  | SB-0049     | Fótica      |

**Fonte:** elaborado pelo autor, (2020).

As amostras coletadas foram mantidas por 10 minutos em temperatura ambiente até serem sonicadas por aproximadamente 5 repetições de 30 segundos. Os extratos foram divididos em oito microtubos cada, e adicionado 700 µL de fenol por microtubo. As amostras foram agitadas no vortex por 15 segundos e centrifugadas por sete minutos a 14.000 rpm, para separação da fase fenólica, que foi transferida, sendo as amostras novamente centrifugadas a 14.000 rpm por sete minutos para eliminar qualquer resíduo da fase aquosa ou de SDS. Foram adicionados 1500 µL de acetato de amônia em metanol para a precipitação das proteínas por aproximadamente 24 horas à -80°C. Uma nova centrifugação foi realizada a 14.000 rpm por 15 minutos, sendo posteriormente descartado o sobrenadante. O precipitado foi transferido para um novo microtubo e lavado por quatro vezes com acetona 80%. Uma última lavagem foi realizada com etanol 70% e o precipitado foi seco à temperatura ambiente por trinta minutos. As quantificações de proteínas foram realizadas no Qubit 2.0 (Invitrogen).

### 3.3 DIGESTÃO DE PROTEÍNAS

Para a realização da digestão foram utilizados 50 µg de proteína por amostra, sendo completadas com Rapigest 0,2% para um volume final de 150 µL cada. O preparo da digestão foi realizado primeiramente com a redução de proteínas com ditioneitol (DTT, 5mM), incubando-as por 25 minutos a 56°C, seguida pela alquilação com iodoacetamida (IAA, 14mM) por 30 minutos em temperatura ambiente. A remoção de IAA residual foi realizada adicionando novamente DTT (5 mM), com incubação de 15 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram diluídas em 1:5 de bicarbonato de amônio (50 mM), seguida pela adição de CaCl (1mM). O tratamento foi realizado com tripsina (20 ng/ µL) por 16 horas à 37°C. Posteriormente foi adicionado ácido trifluoacético (TFA) na concentração final de 0,4% do volume das amostras para interromper a reação enzimática, ficaram incubadas por 37°C por 90 minutos e após isso foram centrifugadas a 14.000 rpm por 30 minutos à 37° e após este período o sobrenadante foi transferido para o tubo.

### 3.4 2D-UPLC-MSE

O cromatógrafo Nano Acquity UPLC (Waters) foi configurado para um fracionamento em duas dimensões; na primeira dimensão, uma coluna analítica de 5 µm XBridge BEH130 C18 (300 µm x 50 mm) em um fluxo de 2 µL por minuto; e na segunda dimensão, com uma coluna trap C18,5 µm (180 µm x 20 mm) acoplada a uma coluna analítica 1.7 µm BEH130 C18 µm (100 µm x 100 mm) em um fluxo de 400nL. min<sup>-1</sup> . As amostras foram separadas em

5 frações a partir de um gradiente de 10.8; 14.0; 16.7; 20.4; e 65.0% de acetonitrila. O cromatógrafo operava acoplado diretamente a um espectrômetro de massas ESI-Q-ToF Synapt G2S (Waters) configurado para operar em modo positivo, e fragmentação contínua ( $MS^E$ ) com a energia de colisão oscilando entre 5 a 40 eV.

### 3.5 BIOINFORMÁTICA

Os dados brutos foram processados com o programa Proteinlynx Global Server (PLGS) 3.0.2, utilizando a base de dados do Uniprot ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) para bactérias, fungos e plantas obtidas no site do NCBI (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A partir dos dados gerados, os arquivos foram analisados pelo mascot, onde foi utilizada uma base de dados baseada em metagenoma para associar os espectros aos contigs (genes) presentes no metagenoma. Os peptídeos foram identificados por meio do software Unipept, onde foi possível obter as informações de ontologia gênica (GO) e de taxonomia.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das amostras de solo das cavernas estudadas, agrupamos as amostras de acordo com a intensidade luminosa, sendo: zona fótica (amostras 19, 29 e 30), zona semi-fótica (amostras 24 e 18) e zona afótica (amostras 20, 21, 25, 26 e 28). A partir disso observamos a quantidade de peptídeos identificados em cada grupo de amostras, sendo 101 peptídeos na zona fótica, 234 peptídeos na zona semi-fótica e 377 peptídeos na zona afótica. Dentro de cada parâmetro do Unipept é possível avaliar quantos e quais peptídeos estão presentes em diferentes processos biológicos, componentes celulares e funções moleculares.

Os dados de metaproteômica gerados pelo Unipept possibilitaram a identificação de diferentes microrganismos, processos biológicos, componentes celulares, funções moleculares e enzimas. Além disso, estes dados permitem observar a relação de certas enzimas com processos biogeoquímicos de transformação de nutrientes. Já a classificação do gene ontology (GO) é importante para descrever os diferentes processos metabólicos (THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2019), os quais sofrem a influência de cada ambiente testado. As informações de peptídeos associados a categorias do GO possibilitam a análise dos processos biológicos e funções moleculares que estão mais ativos nos ambientes estudados (MCQUILTON et al., 2016).

#### 4.1 PEPTÍDEOS ASSOCIADOS À ZONA FÓTICA

Na zona fótica, a penetração assídua de luz solar permite a ocorrência da fotossíntese. Em nossa análise isto é evidenciado através da detecção de 3% dos peptídeos relacionados ao processo biológico de fotossíntese (GO:0015979). Na zona fótica, dentre os 86 peptídeos relacionados à microrganismos, 6% são associados ao filo das cianobactérias, sendo o mais abundante e de maior relevância, mostrando o aproveitamento da luz solar por estes microrganismos na incorporação de carbono no solo. Além disso, peptídeos associados ao gênero de plantas *Selaginella* (VIANA et al., 2016) também foram detectados, mostrando a importância deste gênero como fonte primária de energia (via fotossíntese) dentro das cavernas. Desta forma, é possível visualizar a organização hierárquica dos mesmos por meio da árvore filogenética, disponível no anexo A como material suplementar.

Ademais, foram detectados 2% de peptídeos envolvidos no catabolismo da celulose (GO:0030245), provavelmente produto da decomposição de plantas neste ambiente. Entretanto, pelas adversidades que a alta temperatura e escassez de nutrientes no solo acarretam, também ocorrem 2% de peptídeos relacionados ao estresse metabólico (GO:0006979). É interessante notar que enzimas relacionadas a processos de transformações bioquímicas do nitrogênio também foram detectadas neste ambiente (GO:0006807 e GO:0006808). Nesta zona foram identificadas diversas funções moleculares como: 6% de peptídeos relacionados à ligação à ácido nucléico (GO:0003676), 1% de peptídeos à atividade de nuclease (GO:0004518), 2% à atividade de tRNA ligase (GO:0004813), 14% à ligação à íons de zinco (GO:0008270) e 30% à ligação ao ATP (GO:0005524).

Na zona fótica também foi identificado o processo de biossíntese (GO:0009058), com 2% de peptídeos identificados. Este processo agrupa todas funções moleculares relacionadas a produção de moléculas orgânicas complexas produzidos a partir de compostos mais simples (ALKORTA et al., 2003). Os microrganismos que produzem estes compostos, por meio das enzimas, são de suma importância nas rotas ecológicas, como via de aquisição de nutrientes para o meio em que estão presentes (SHARRAR et al., 2019).

#### 4.2 PEPTÍDEOS ASSOCIADOS À ZONA SEMI-FÓTICA

Na zona semi-fótica há incidência de luz solar, mas com menor intensidade. Na zona semi-fótica, 1% dos peptídeos está associado ao processo biológico de fotossíntese (GO:0015979), também foi identificado 1% dos peptídeos associado ao gênero da planta *Selaginella*. A enzima cisteína desulfurase foi identificada nesta zona, e destaca-se por

realizar processos de oxidação e redução de compostos inorgânicos, como o enxofre, caracterizando o processo de quimiossíntese necessário à dinâmica do fluxo energético nas áreas com menor incidência luminosa (BANERJEE; CHAKRAVARTY; BALLAL, 2017).

No meio cavernícola ocorrem diferentes processos biológicos, como via de manutenção da cadeia trófica dos organismos e do próprio ambiente (KOVÁČ, 2018). A enzima identificada, cisteína desulfurase, tem a capacidade de degradar compostos de aminoácidos sulfurados, presentes nas estruturas das cavernas, e por meio do contato da água com as rochas, juntamente com a atividade das enzimas, possibilitam a disponibilidade de compostos inorgânicos, como o enxofre, para serem utilizados como fonte energética por microrganismos quimiossintetizantes (MENDOZA et al., 2016).

As enzimas encontradas possuem a capacidade de utilizar diversos compostos inorgânicos, como o enxofre, para adquirir a energia necessária a partir da redução do composto utilizado (FRIEDRICH et al., 2005; RABUS; HANSEN; WIDDEL, 2013). Desta forma, estes microrganismos, mesmo na presença parcial de luz solar, tendem a ser adaptados a realizarem diferentes mecanismos de obtenção de energia, a partir de diferentes compostos (MUYZER; STAMS, 2008). A organização destes filós pode ser verificada na árvore filogenética, disponível no anexo B.

#### 4.3 PEPTÍDEOS ASSOCIADOS À ZONA AFÓTICA

As cavernas são ambientes prioritariamente de estado oligotrófico, ou seja, são ambientes que possuem pouco acesso à nutrientes externos, sendo necessário a utilização de mecanismos diferenciados, por meio de microrganismos, para a manutenção da vida local e acesso a nutrientes, especialmente nas zonas isentas de luz (GALLÃO; BICHUETTE, 2018). Na zona afótica, 1% dos peptídeos estão associados ao processo biológico de fotossíntese (GO:0015979), também foi identificado 1% dos peptídeos associados ao gênero da planta *Selaginella*. Mesmo neste meio isento de luz, ainda que pareça controverso, há estudos que postulam a influência de insetos bioluminescentes como influenciadores deste processo de fotoalimentação em zonas isentas de luz (STREHLER, 1953; ANDO et al., 2008).

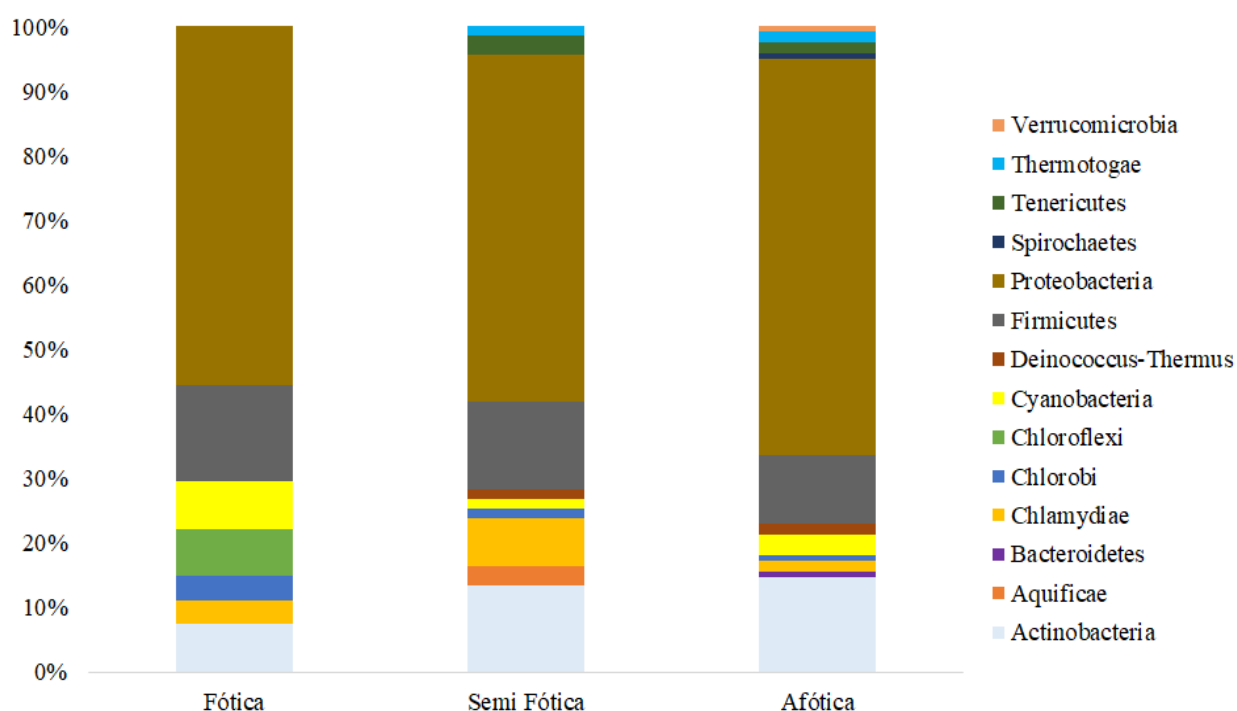
Além disso, há cavernas que possuem aberturas no teto, o que pode permitir a entrada de luz solar em pequenos momentos durante o dia (MERRITT; CLARKE, 2011). A organização dos organismos identificados na ZAF pode ser verificada na árvore filogenética, disponível no anexo C.

O metabolismo quimiossintético microbiano é uma fonte de energia independente de luz e deve ser importante para o fluxo de energia no interior das cavernas. A partir de elétrons obtidos de elementos inorgânicos, microrganismos quimiossintéticos produzem biomassa e contribuem com a entrada de energia no ecossistema cavernícola. Nas amostras, na ZAF foram identificadas enzimas que são envolvidas nos processos de oxidação e redução de compostos inorgânicos, como o enxofre, a partir da dissolução deste minério das rochas das cavernas (RAJAN, 2002). Também foram identificadas as enzimas sulfeto citocromo c redutase (flavocitocromo c); cisteína desulfurase e sulfato adenililtransferase, em maior abundância nas amostras desta zona (MIHARA; ESAKI, 2002; GRIESBECK; HAUSKA; SCHUTZ, 2000; SUN; LEYH, 2006).

#### 4.4 PROCESSOS BIOLÓGICOS E FUNÇÕES MOLECULARES

Em suma, há diversas funções moleculares que ocorrem nos diferentes meios de incidência de luz, sendo os microrganismos os mediadores das reações necessárias para a aquisição de energia, por meio de distintos modos, sejam pela fotossíntese ou quimiossíntese. Dessa forma, agrupamos os filos mais abundantes em cada zona de penetração luminosa, de maneira a apresentar os microrganismos em comum e os exclusivos nas três zonas (figura 1).

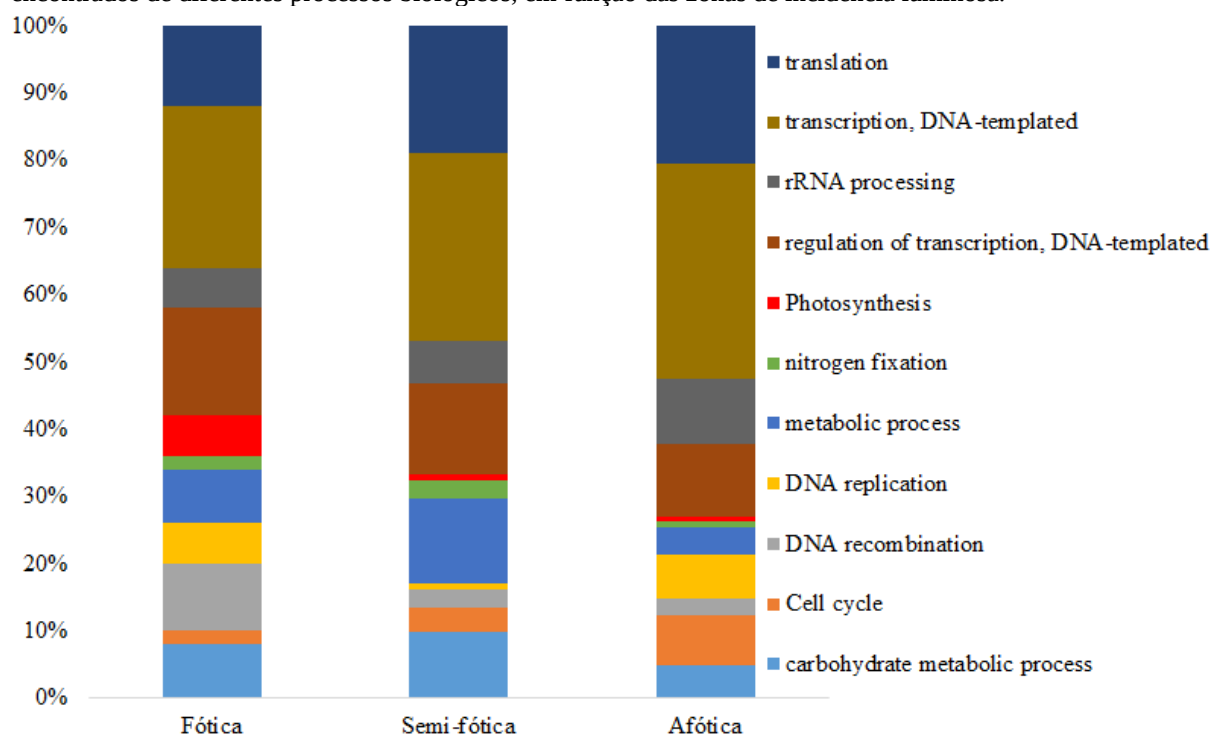
**Figura 2** - Amostras de solo de duas cavernas (SB0212 e SB0049) mostrando a abundância relativa de peptídeos advindos dos filos de microrganismos de diferentes zonas de incidência luminosa.



**Fonte:** elaborado pelo autor, (2020).

Foi possível agrupar distintos processos biológicos que ocorrem nas três zonas de penetração luminosa, conforme demonstrado na figura 2. Pode-se observar que o mecanismo de fotossíntese (GO:0015979) está presente em todas as áreas, mas em maior abundância na zona fótica e há ativo o processo de metabolismo de carboidratos (GO:0005975) e fixação de nitrogênio (GO:0006807) em todas as áreas.

**Figura 3** - Amostras de solo de duas cavernas (SB0212 e SB0049) mostrando a abundância relativa de peptídeos encontrados de diferentes processos biológicos, em função das zonas de incidência luminosa.



**Fonte:** elaborado pelo autor, (2020).

As distintas funções moleculares de cada zona de penetração luminosa, refletem a atividade dos microrganismos existentes no ambiente. Na figura 3 é possível observar a relação das funções moleculares com os microrganismos identificados, demonstrando os possíveis processos de produção energética e de expressão gênica que podem estar ocorrendo em cada zona de penetração luminosa. Assim, sendo de importante visualização a atividade das oxidoredutases e hidrolases, enzimas envolvidas na manutenção da saúde do solo, bem como do ambiente circundante (DAS; VARMA, 2010).

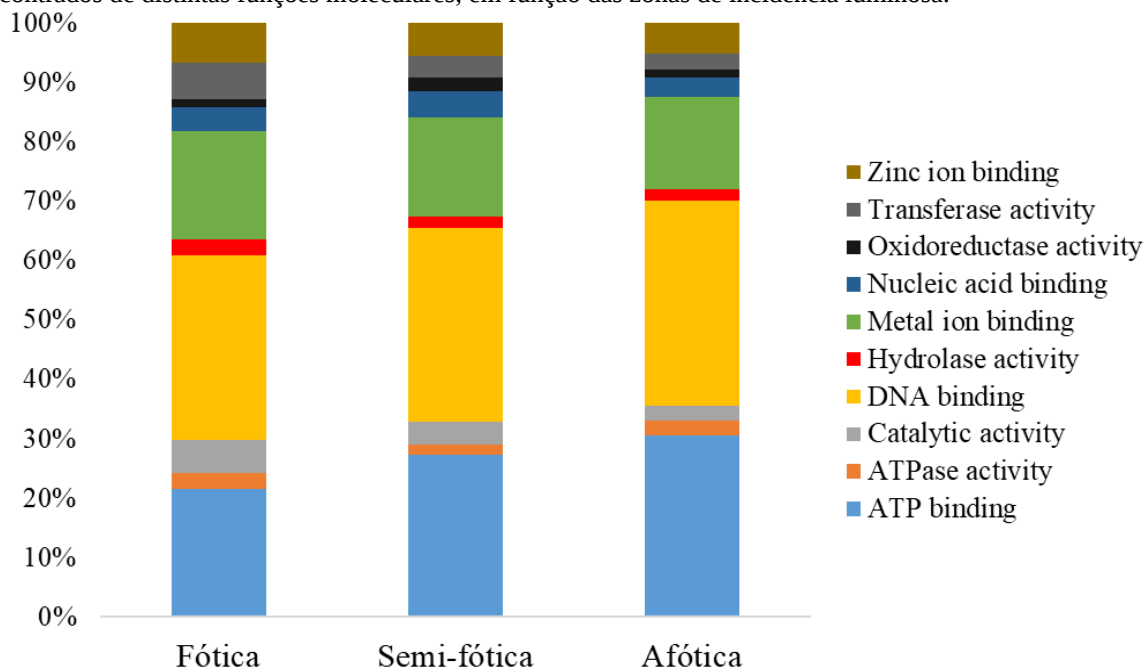
Sabe-se que estas enzimas desempenham distintas funções no solo, como a decomposição e transformação de materiais orgânicos, auxiliam nos processos bioquímicos para o crescimento de plantas, realizam os processos de fixação de nitrogênio (N<sub>2</sub>),

nitrificação e desnitrificação (DICK, 1997; KARACA et al., 2010). Estas enzimas participam na hidrólise de várias ligações químicas na matéria orgânica, permitindo a liberação de formas inorgânicas de fosfatos ou sulfatos, ou hidratos de carbono, componentes que são utilizados pelos microrganismos como fontes de energia (ACOSTA-MARTINEZ; CANO; JOHNSON, 2018).

Analisando as funções mais abundantes, encontradas em cada zona de penetração luminosa, destacam-se as funções “ligação de ATP”, seguida de “ligação de DNA” e “ligação a íons metálicos”. Estas categorias em conjunto, representam a maioria dos peptídeos detectados no experimento, em todas as zonas de penetração luminosa. Há relação destes processos com a produção de energia e expressão gênica, provavelmente relacionada a mudanças que podem estar ocorrendo com frequência neste ambiente. Quanto ao processo “ligação a íons metálicos”, pode-se inferir que ocorram devido as altas concentrações de metais pesados, presentes no solo (SILVA, 1992).

A atividade enzimática é importante para a manutenção da saúde do solo e do ecossistema cavernícola (DAS; VARMA, 2010). Distintas funções do solo são mediadas por enzimas e possibilita a ocorrência de diversos processos, como a decomposição e transformação de matéria orgânica, liberação de nutrientes inorgânicos para o crescimento das plantas, e reações que são importantes nos ciclos biogeoquímicos do solo. Ademais, funções como “ligações a íons de zinco”, “atividades oxido-redutivas”, “atividades catalíticas”, e atividades enzimáticas, como as hidrolases, ATPases e transferases, também foram identificadas.

**Figura 4** - Amostras de solo de duas cavernas (SB0212 e SB0049) mostrando a abundância relativa de peptídeos encontrados de distintas funções moleculares, em função das zonas de incidência luminosa.



**Fonte:** elaborado pelo autor, (2020).

Por isso, como visto neste agrupamento, nas zonas onde há incidência parcial de luz ou a ausência total da mesma, os microrganismos dispõem de mais processos biológicos para obter a produção de material celular, pois se utilizam de mecanismos intrínsecos atrelados à quimiotrofia e em menor proporção, à fotossíntese (CULVER; PIPAN, 2019).

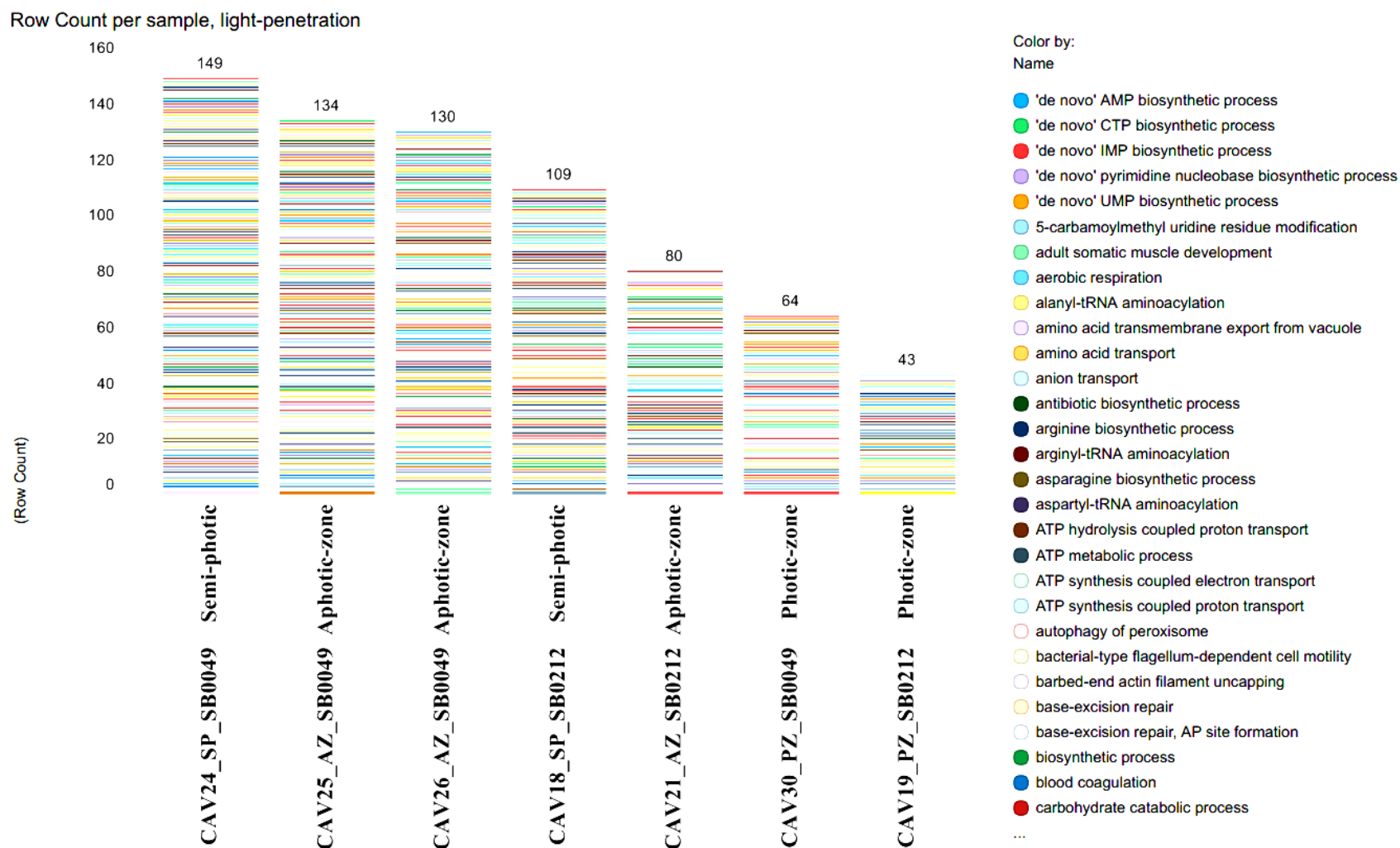
Outro ponto importante é a atividade de enzimas em relação à ligação à íons metálicos (GO:0046872), e atividades de redução e oxidação de compostos inorgânicos. A atividade dos microrganismos nesse ambiente cavernícola, corrobora com funções importantes para a manutenção da vida no interior da caverna, especialmente na ZSF e AF, onde boa parte destes processos de quimiossíntese tendem a ser estimulados com maior frequência, como meio de equilibrar a ausência parcial ou total de luz solar (PACTON et al., 2013; LÉVEILLÉ; FYFE; LONGSTAFFE, 2000).

Curiosamente, como demonstrado na figura 4, pode-se observar que dentre as amostras analisadas das duas cavernas, aquelas que são referentes à ZF possuem menos categorias funcionais, em relação aos processos biológicos que ocorrem neste meio pela ação dos microrganismos. Pode-se observar que nas zonas onde a incidência de luz é ausente ou limitada, estes processos representam mais categorias e com isso é possível inferir que os microrganismos destas zonas dispõem de mecanismos distintos, para realizar os ciclos biogeoquímicos necessários à manutenção o ambiente circundante (MARQUES et al., 2019).

Os microrganismos presentes no solo e nas rochas das cavernas possuem funções biológicas de grande importância, haja vista que eles são os mediadores primordiais da reciclagem de elementos essenciais à sobrevivência do meio ambiente como um todo (MARQUES et al., 2019). Os microrganismos estão inseridos nos processos de ciclagem de nitrogênio, carbono e oxigênio, onde por meio da fotossíntese e da quimiossíntese conseguem utilizar os compostos orgânicos e inorgânicos para a síntese do material celular (GUPTA; GUPTA; SINGH, 2017). Dessa forma, nas zonas onde há incidência parcial ou total de luz, os microrganismos dispõem de processos biológicos diferenciados daqueles encontrados na zona fótica, para obter a produção de material celular, pois se utilizam de mecanismos intrínsecos atrelados à quimiotrofia (CULVER; PIPAN, 2019).

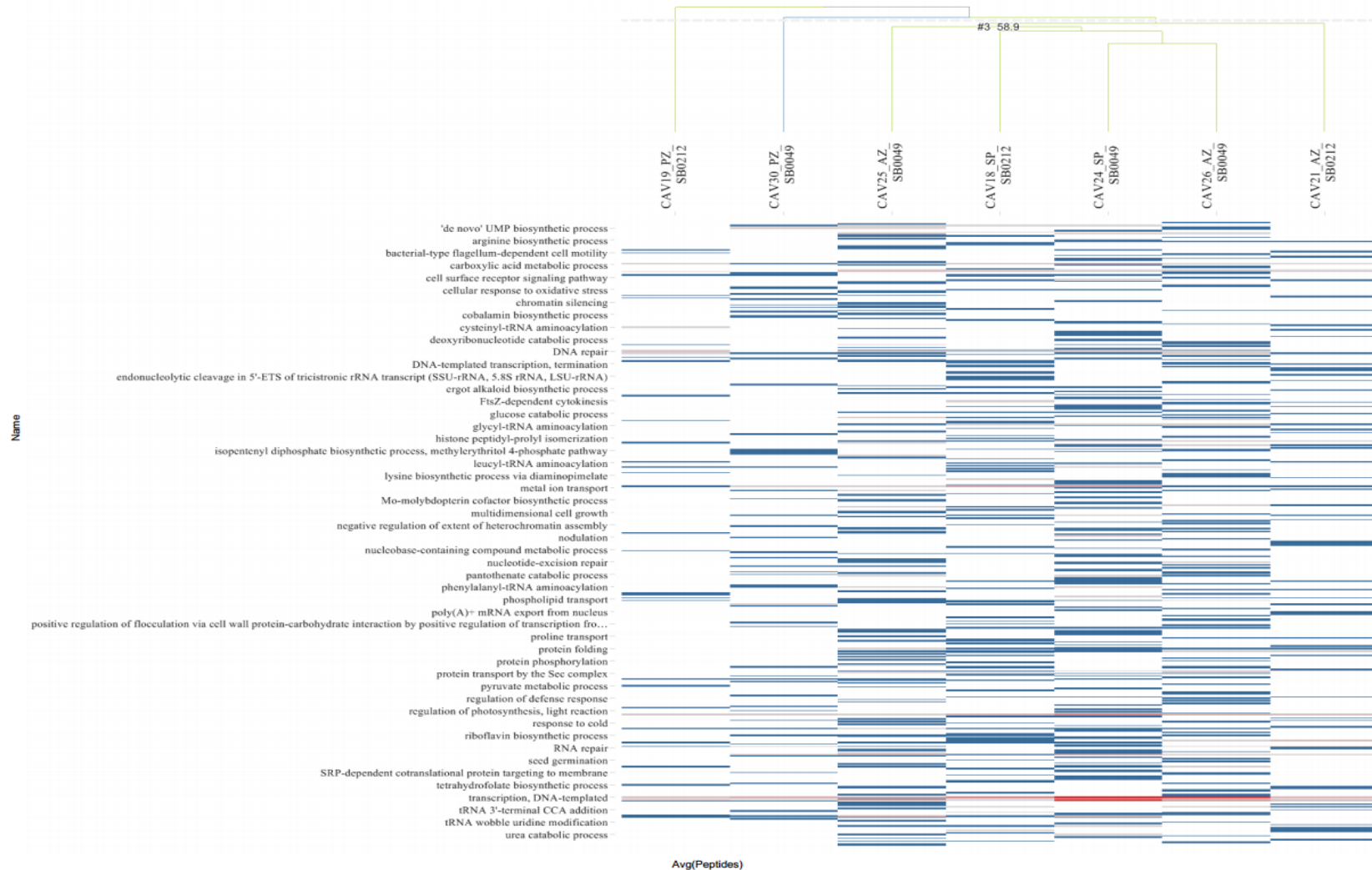
A figura 5 representa a abundância relativa dos processos biológicos que foram detectados nas diferentes amostras de cavernas analisadas. As amostras de caverna das zonas com incidência luminosa limitada e na ausência da mesma formam um único grupo, demonstrando que estes processos realizados por microrganismos têm características em comum. Diferentemente destas, as amostras coletadas na ZF, com alta incidência luminosa, aparecem separadas das demais áreas, o que indica mecanismos distintos realizados pelo metabolismo microbiano nas zonas de luz solar em detrimento das zonas que não recebem luz, ou recebem parcialmente (MIHARA; ESAKI, 2002; OLLAGNIER-DE-CHOUDENS et al., 2003). Ainda assim, é possível observar que independente da zona analisada, os processos biológicos estão presentes e ativos, o que nos remete à atividade dos microrganismos do ambiente na manutenção do fluxo energético do ecossistema cavernícola.

**Figura 5** - Proteomas de solos de amostras de duas cavernas (SB0212 e SB0049) com destaque para o número de processos detectados em cada amostra. Amostras foram coletadas de acordo com o grau de penetração de luz (zona fótica PZ; semi-fótica SP e afótica AZ) e respectivos processos biológicos correlacionados.



Fonte: elaborado pelo autor, (2020).

**Figura 6** - Heatmap baseado na abundância relativa de processos biológicos envolvendo as proteínas detectadas em diferentes amostras de solo de caverna, pela zona de incidência luminosa (zona fótica PZ; semi-fótica SP e afótica AZ). As zonas PZ e SPZ formam um grupo único enquanto as duas amostras coletadas na zona fótica se encontram separadas.



**Fonte:** elaborado pelo autor, (2020).

## 5 CONCLUSÕES

Foi possível identificar que dentre as zonas de incidência luminosa das duas cavernas de Carajás, as zonas semi-fóticas e afóticas apresentam maior similaridade entre si, e maior diversidade de peptídeos e processos metabólicos. Com base no heatmap, a zona fótica aparece separada das demais zonas e com processos biológicos em menor ocorrência.

Na zona fótica foram detectados peptídeos relacionados à fotossíntese, associados a cianobactérias e plantas do gênero *Selaginella*. Na zona semi-fótica também foi identificado o gênero *Selaginella* associada à fotossíntese, além da enzima cisteína desulfurase, envolvida na obtenção de energia a partir de enxofre, em um processo independente de luz. Por fim, na zona afótica foram detectadas as enzimas sulfeto citocromo c redutase (flavocitocromo c), cisteína desulfurase e sulfato adenililtransferase, todas também típicas do metabolismo quimiossintético. Curiosamente 1 peptídeo de *Selaginella* também foi detectado nestas amostras, associado ao processo de fotossíntese.

Os peptídeos identificados refletem a atividade dos microrganismos nos diferentes ambientes cavernícolas e sua importância na manutenção do fluxo de energia nas cavernas de Carajás. Sobretudo esta análise demonstra o potencial da metaproteômica no estudo do microbioma que habita os ecossistemas cavernícolas, sendo importante para os estudos da funcionalidade dos microrganismos de solo envolvidos em processos biogeoquímicos, útil para a estabilidade da dinâmica trófica cavernícola.

## REFERÊNCIAS

- ACOSTA-MARTINEZ, V.; CANO, A.; JOHNSON, J. Simultaneous determination of multiple soil enzyme activities for soil health-biogeochemical indices. **Applied Soil Ecology**, v. 126, p. 121–128, maio, 2018.
- ALKORTA, Itziar *et al.* Soil enzyme activities as biological indicators of soil health. **Reviews on Environmental Health**, v. 18, n. 1, p. 65-73, 2003.
- ANDO, Yoriko *et al.* Firefly bioluminescence quantum yield and colour change by pH-sensitive green emission. **Nature Photonics**, v. 2, n. 1, p. 44, 2008.
- BANERJEE, Manisha; CHAKRAVARTY, Dhiman; BALLAL, Anand. Molecular basis of function and the unusual antioxidant activity of a cyanobacterial cysteine desulfurase. **Biochemical Journal**, v. 474, n. 14, p. 2435-2447, 2017.
- BRUSSAARD, Lijbert. Ecosystem services provided by the soil biota. **Soil Ecology and Ecosystem Services**, p. 45-58, 2012.
- CANDIROGLU, Begum; GUNGOR, Nihal Dogruoz. Cave Ecosystems: Microbiological View. **European Journal of Biology**, v. 76, n. 1, p. 36-42, 2017.
- CULVER, David C.; PIPAN, Tanja. **The Biology of Caves and Other Subterranean Habitats**. Oxford University Press, 2019.
- DAS, S. K.; VARMA, A. Role of Enzymes in Maintaining Soil Health. In: SHUKLA, G.; VARMA, A. (eds). Soil enzymology. soil biology. Berlin; Heidelberg: **Springer**, p. 25– 42. (Volume 22). 2010.
- DICK, R. P. Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. [s.l.: s.n.], 1997.
- DUARTE, Anamaria S. et al. Efeitos da aplicação de efluente tratado no solo: pH, matéria orgânica, fósforo e potássio. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 12, n. 3, p. 302-310, 2008.
- FENG, Youzhi *et al.* A phototrophy-driven microbial food web in a rice soil. **Journal of Soils and Sediments**, v. 11, n. 2, p. 301-311, 2011.
- FERREIRA, Rodrigo Lopes *et al.* Fauna subterrânea do Estado do Rio Grande do Norte: caracterização e impactos. **Revista Brasileira de Espeleologia**, v. 1, n. 1, p. 25-51, 2010.
- FERREIRA, Rodrigo Lopes; CARDOSO, Rafael Costa; SILVA, Marconi Souza. Composição, riqueza e diversidade de invertebrados em cavernas de Dianópolis (TO). **Revista Brasileira de Espeleologia**, v. 2, n. 7, p. 01-18, 2016.
- FRIEDRICH, Cornelius G. *et al.* Prokaryotic sulfur oxidation. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 253-259, 2005.

GALLÃO, Jonas Eduardo; BICHUETTE, Maria Elina. Brazilian obligatory subterranean fauna and threats to the hypogean environment. **ZooKeys**, n. 746, p. 1, 2018.

GRIESBECK, Christoph; HAUSKA, Günter; SCHUTZ, Michael. Biological sulfide oxidation: sulfide-quinone reductase (SQR), the primary reaction. **Recent Research Developments in Microbiology**, v. 4, p. 179-203, 2000.

GUPTA, Ankit; GUPTA, Rasna; SINGH, Ram Lakhan. Microbes and environment. In: Principles and Applications of Environmental Biotechnology for a Sustainable Future. **Springer**, Singapore, 2017. p. 43-84.

HE, Hai; ZHANG, Li-Bing. *Polystichum cavernicola*, sp. nov. (sect. *Haplopolystichum*, Dryopteridaceae) from a karst cave in Guizhou, China and its phylogenetic affinities. **Botanical Studies**, v. 52, n. 1, 2011.

KARACA, A. *et al.* Soil Enzymes as Indication of Soil Quality. In: [s.l.] **Springer**, Berlin, Heidelberg, p. 119–148. 2010.

KOVÁČ, Ľubomír. Caves as Oligotrophic Ecosystems. In: **Cave Ecology**. Springer, Cham, p. 297-307, 2018.

LÉVEILLÉ, Richard J.; FYFE, William S.; LONGSTAFFE, Fred J. Geomicrobiology of carbonate–silicate microbialites from Hawaiian basaltic sea caves. **Chemical Geology**, v. 169, n. 3-4, p. 339-355, 2000.

MARQUES, Eric de L. S. *et al.* Purple Sulfur Bacteria Dominate Microbial Community in Brazilian Limestone Cave. **Microorganisms**, v. 7, n. 2, p. 29, 2019.

MARQUES, Eric de L. S. *et al.* Ammonia oxidation (*amoA*) and nitrogen fixation (*nifH*) genes along metasandstone and limestone caves of Brazil. **Geomicrobiology Journal**, p. 1-10, 2018.

MCQUILTON, P. *et al.* Expansion of the Gene Ontology knowledgebase and resources. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, 2016.

MENDOZA, Marie Lisandra Zepeda *et al.* Metagenomic analysis from the interior of a speleothem in Tjuv-Ante's Cave, Northern, Sweden. **PloS One**, v.11, n.3, p.1-23, 2016.

MERRITT, David J.; CLARKE, Arthur K. Synchronized circadian bioluminescence in cave-dwelling *Arachnocampa tasmaniensis* (glowworms). **Journal of Biological Rhythms**, v. 26, n. 1, p. 34-43, 2011.

MIHARA, H.; ESAKI, N. Bacterial cysteine desulfurases: their function and mechanisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 1-2, p. 12-23, 2002.

MUYZER, Gerard; STAMS, Alfons JM. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 6, p. 441, 2008.

PACTON, Muriel *et al.* The role of microorganisms in the formation of a stalactite in Botovskaya Cave, Siberia: paleoenvironmental implications. **Biogeosciences**, v. 10, n. 9, p. 6115-6130, 2013.

RABUS, Ralf; HANSEN, Theo A.; WIDDEL, Friedrich. Dissimilatory sulfate-and sulfur-reducing prokaryotes. **The Prokaryotes: Prokaryotic Physiology and Biochemistry**, p. 309-404, 2013.

RAJAN, S. S. S. Comparison of phosphate fertilizers for pasture and their effect on soil solution phosphate. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 33, n. 13-14, p. 2227-2245, 2002.

SHARRAR, Allison *et al.* Bacterial secondary metabolite biosynthetic potential in soil varies with phylum, depth, and vegetation type. **BioRxiv**, p. 818815, 2019.

SILVA, M. F. F. da. Distribuição de metais pesados na vegetação metalófica de Carajás. **Acta Botanica Brasilica**, v. 6, n. 1, p. 107–122, jul. 1992.

STREHLER, Bernard L. Firefly luminescence in the study of energy transfer mechanisms. II. Adenosine triphosphate and photosynthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 43, n. 1, p. 67-79, 1953.

SUN, Meihao; LEYH, Thomas S. Channeling in sulfate activating complexes. **Biochemistry**, v. 45, n. 38, p. 11304-11311, 2006.

THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM. The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. **Nucleic Acids Res.** Jan 2019;47(D1):D330-D338. doi: 10.1093/nar/gky1055

VIANA, Pedro Lage *et al.* Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: história, área de estudos e metodologia. **Rodriguésia**, v. 67, n. 5, 2016.

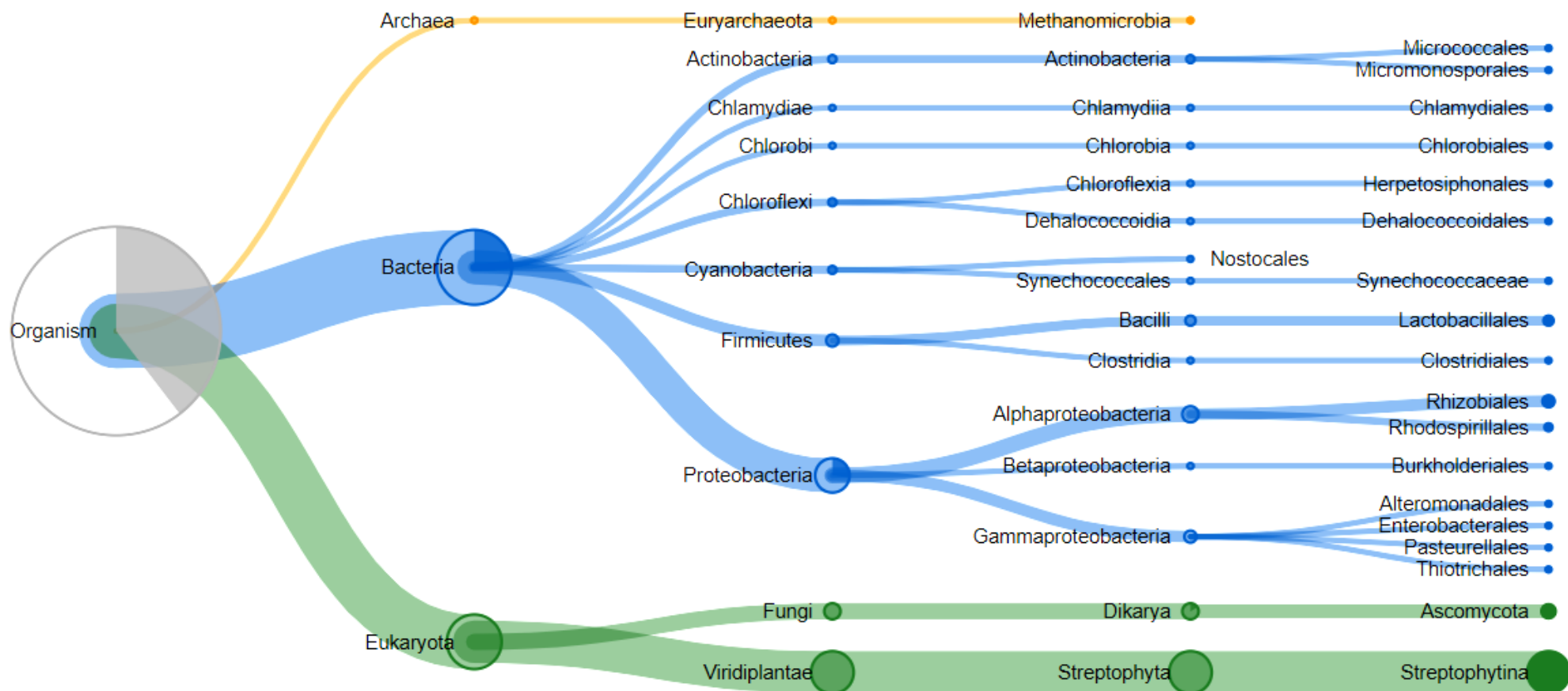
WANG, Wei *et al.* A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. **Electrophoresis**, v. 27, n. 13, p. 2782-2786, 2006.

ZAK, Donald R. *et al.* Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: are there any links?. **Ecology**, v. 84, n. 8, p. 2042-2050, 2003.

ZHOU, Jun Pei *et al.* Phylogenetic diversity of bacteria in an earth-cave in Guizhou Province, Southwest of China. **The Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 105-112, 2007.

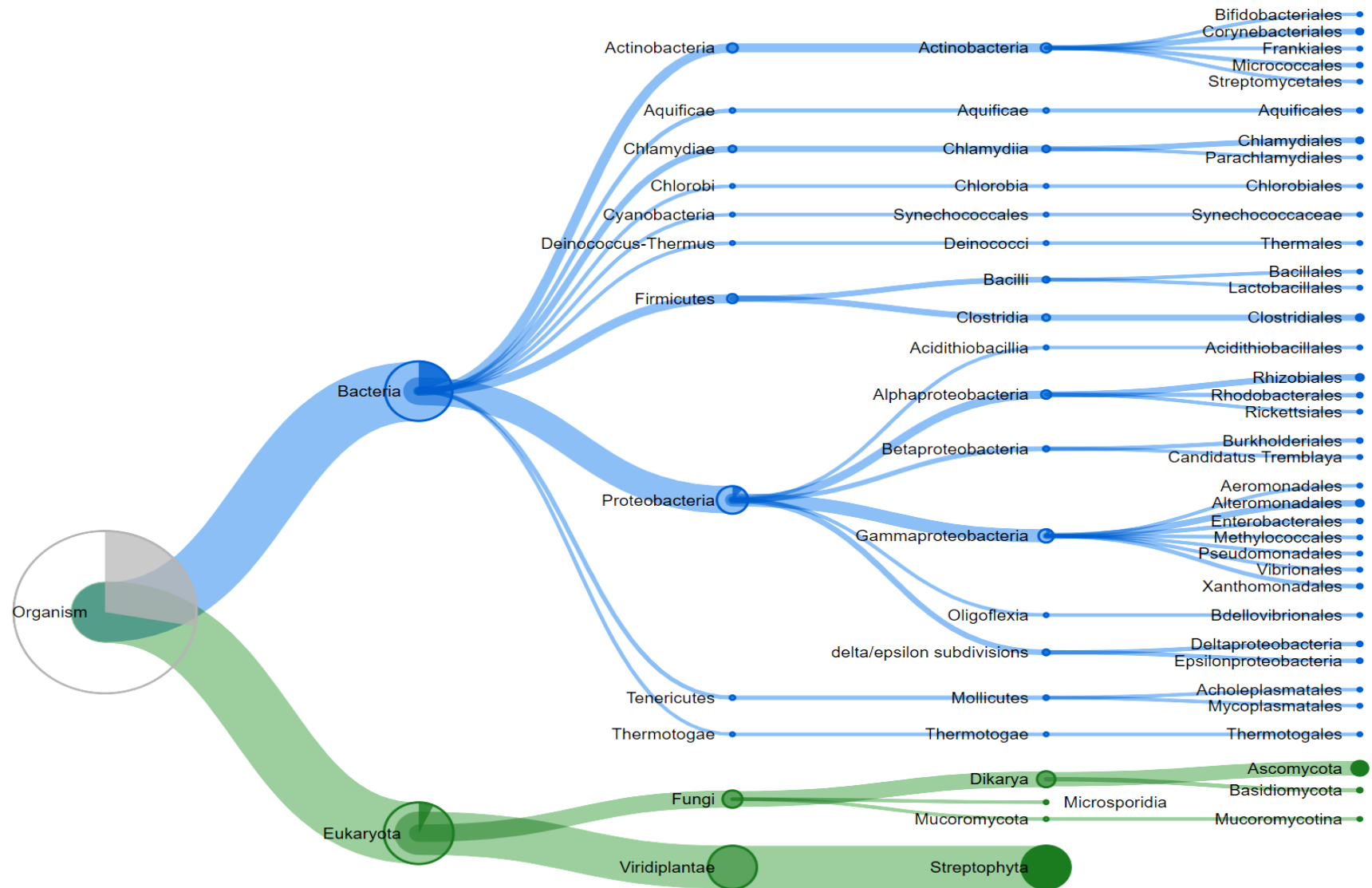
## **ANEXOS**

ANEXO A - Organização dos microrganismos identificados no solo da zona fótica, segundo a hierarquia demonstrada pela árvore filogenética.



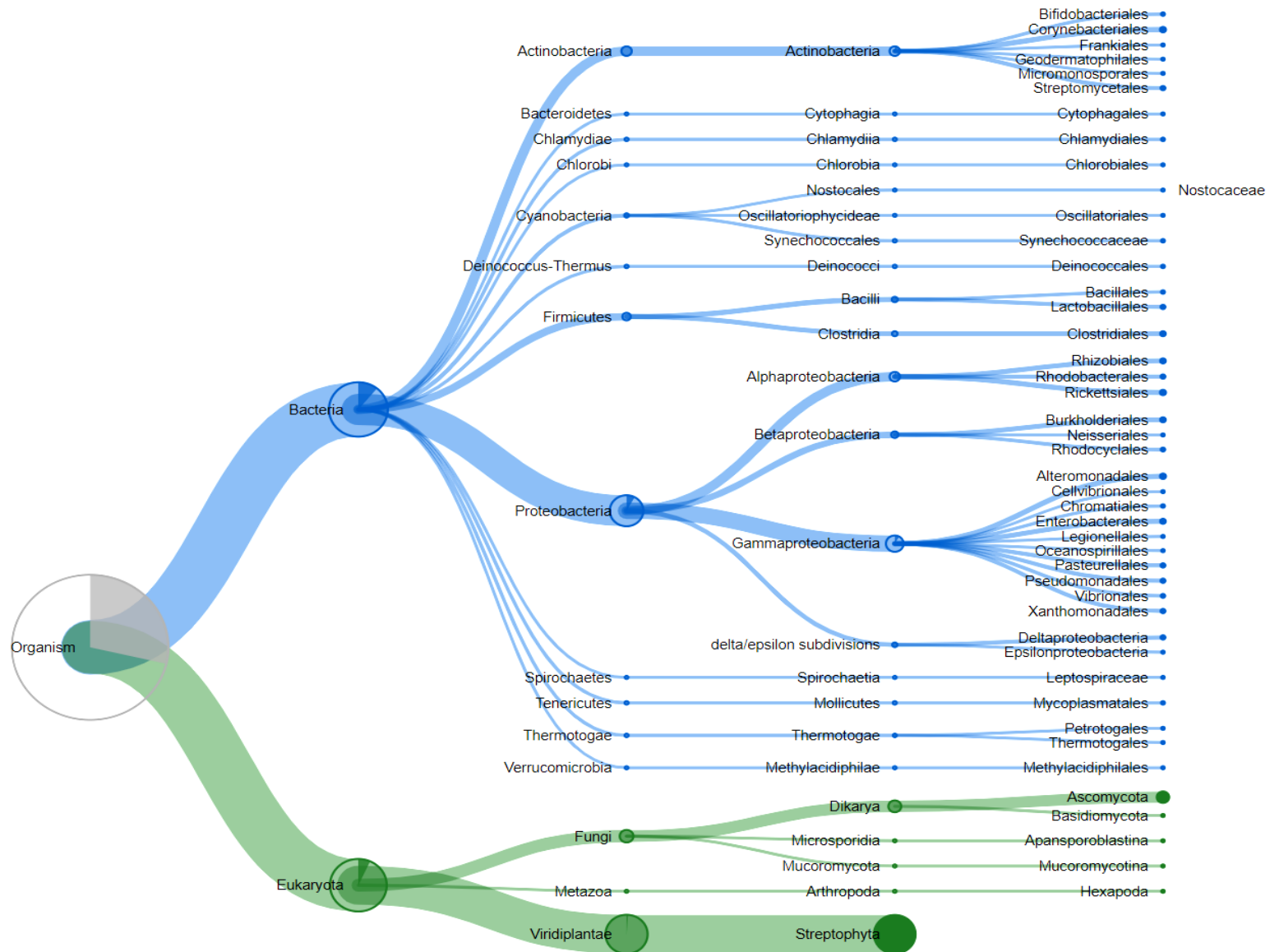
Fonte: UNIPePT, (2020).

**ANEXO B** - Organização dos microrganismos identificados no solo da zona semi-fótica, segundo a hierarquia demonstrada pela árvore filogenética.



Fonte: UNIPePT, (2020).

**ANEXO C** - Organização dos microrganismos identificados no solo da zona afótica, segundo a hierarquia demonstrada pela árvore filogenética.



Fonte: UNIPePT, (2020).

## **Anexo D** - Protocolo de Extração de proteínas, adaptado de Wang *et al.*, (2006).

- 1) Prepara-se o tampão SDS denso (tabela 1), mantendo-o no gelo;
- 2) Pesa-se as amostras (~3g) para cada tubo falcon de 15ml;
- 3) Adiciona-se 10µl do inibidor de protease em cada falcon;
- 4) Adiciona-se 630µl de DTT (70mM final) em cada falcon com 9ml de tampão, deixando-os 10min à temperatura ambiente;
- 5) Sonicar 6x de 30 segundos (potência ~80), com intervalos de 30-60s no gelo;
- 6) Dividir a amostra do falcon em 8 eppendorfs (epp) – ziplock 2ml, adicionando 1ml da solução em cada;
- 7) Adicionar 700µl de fenol em cada epp;
- 8) Vortexar por 15min todos os epp;
- 9) Por a centrífuga no pré-cooling;
- 10) Centrifugar os epp a 14000rpm por 7min à 4°C;
- 11) Transferir o sobrenadante (parte fenólica) para epp limpos, juntando 2 em 1;
- 12) Centrifuga novamente a 14000rpm por 7min à 4°C;
- 13) Transfere 700µl do sobrenadante para um epp limpo;
- 14) Adiciona 700µl de acetato de amônia em metanol;
- 15) Vortexar para misturar e guardar no -80°C.

## **REAGENTES NECESSÁRIOS**

**Quadro 1** - Tampão SDS denso.

| <b>Componentes</b>        | <b>Conc. Estoque</b> | <b>Conc. Final</b> | <b>Vol. Final (10 ml)</b> |
|---------------------------|----------------------|--------------------|---------------------------|
| 1. Sacarose               | 1,5M                 | 0,85 M             | 5,7 ml                    |
| 2. Tris-HCl pH 8,0        | 1 M                  | 0,1 M              | 1 ml                      |
| 3. SDS                    | 10%                  | 2% (v/v)           | 2 ml                      |
| 5. PMSF                   | 100 mM               | 1 mM               | 0,1 ml                    |
| 7. PVPP**                 | -                    | 2%                 | 0,2 g                     |
| 8. H <sub>2</sub> O miliQ | -                    | -                  | 0,2 mL                    |

**Fonte:** adaptado d W ang, (2003)

**Quadro 2** - Solução de precipitação (Wang, 2003)

| <b>Componentes</b>           | <b>Conc. final</b> | <b>Quantidade (g)</b> | <b>Metanol</b> |
|------------------------------|--------------------|-----------------------|----------------|
| Acetato de amônia em metanol | 0,1 M              | 0,77                  | 100 ml         |

**Fonte:** adaptado d W ang, (2003)

Dissolver o acetato de amônia em metanol e manter a -20°C

## **Limpeza das amostras**

- 1) Retirar as amostras do -80°C;
- 2) Por a centrífuga no pré-cooling;
- 3) Centrifugar as amostras de 15 a 20 minutos 14000 rpm, 4°C;
- 4) Descartar todo o líquido (em recipiente apropriado);
- 5) Adicionar 1500µl de acetona 80% gelada (dividir essa quantidade nos epp, dissolver o pellet e juntar todos em um só, pipetar bastante para dissolver bem o pellet e vortexar um pouco);
- 6) Centrifugar por 7 min, 14000 rpm, 4°C;
- 7) Descartar todo o líquido;
- 8) Repete-se as etapas 5, 6 e 7 por mais 2 ou 3x;
- 9) Adicionar 1500 µl de etanol 70% gelado;
- 10) Centrifugar por 7 min, 14000 rpm, 4°C;
- 11) Descartar todo o líquido;
- 12) Secar as amostras por 30 min;
- 13) Adicionar 50 µl de rapigest 0,2 % em cada amostra, vortexar e/ou pipetar até dissolver bem o pellet;
- 14) Quantificar;
- 15) Guardar no -80°C;

## **Digestão**

### **Reagentes**

1. Bicarbonato de amônio 50 mM: 50 mM de bicarbonato de amônio em água purificada (massa molar 79,06 g/mol; 79 mg em 20 mL de água purificada).
2. Ditiotreitól (DTT) 0.5M: 0.5M de DTT em bicarbonato de amônio 50 mM (massa molar 154.25g/mol; 77,12mg em 1 mL de bicarbonato de amônio 50 mM).
5. Cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) 0.1M: 0.15mg em 1 ml de água purificada (massa molar: 147.02g/mol).
6. Iodoacetamida (IAA) 0.5M: 0.5M de IAA em bicarbonato de amônio 50 mM (massa molar 184.96g/mol; 92,5 mg em bicarbonato de amônio 50 mM).
7. Solução de Tripsina: 20 ng/µL (Sequencing grade): solubilizar em bicarbonato de amônio 50 mM, aliquotar e armazenar a -20°C.

### **Procedimento**

1. Padronizar o volume das amostras completando com rapigest 0,1% \*. O cálculo do volume é baseado na quantidade total de proteínas que será utilizada (geralmente 30 ou 50µg) e na concentração de proteínas em cada amostra.
2. Redução: adicionar solução de DTT 5 mM final. Incubar durante 25 minutos a 56°C.

3. Alquilação: adicionar solução de IAA 14 mM final. Incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente protegido da luz.

4. *Quench* da IAA livre: adicionar solução de DTT 5 mM final. Incubar durante 15 minutos à temperatura ambiente protegido da luz.

5. Adicionar solução de  $\text{CaCl}_2$  1mM final.

6. Preparo da tripsina: 20  $\mu\text{g}$  de tripsina em 1000  $\mu\text{L}$  de bicarbonato de amônio 50 mM gelado. Concentração final da tripsina 20 ng/ $\mu\text{L}$ .

7. Adicionar solução de tripsina (sugestão usar na proporção de 1:50 de enzima:substrato). Incubar de 16 a 20h a 37°C, com shake de 200 rpm, cobrir a bandeja do thermo shake com papel alumínio.

\*Rapigest a 0,2% é preparado ao ser solubilizado em 500  $\mu\text{L}$  de bicarbonato de amônio 50 mM.

### **Dia seguinte**

1. Adicionar TFA a 0,4% do volume total das amostras para parar a reação da tripsina. Verificar se o pH está aproximadamente 2, adicionar moderadamente mais TFA caso não esteja. Vortexar.

2. Incubar as amostras a 37°C por 90 minutos.

3. Centrifugar as amostras a 14000 rpm, 6°C por 30 minutos.

4. Transferir o sobrenadante para o vial.

5. Aumentar o pH adicionando 5  $\mu\text{L}$  de 1 N  $\text{NH}_4\text{OH}$  para elevar o pH até 10, adicionar moderadamente mais deste reagente caso o pH não esteja em 10.