

Degustação de trechos de livros sugeridos

Espectrometria de massas

Fonte: Wilson & Walker. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology, 7ed. Página 352

Introdução geral

Espectrometria de massas (**MS**, mass spectrometry) é uma técnica analítica extremamente valiosa em que moléculas em uma amostra são convertidas em íons em fase gasosa, que são subsequentemente separados no espectrômetro de massas de acordo com sua razão massa (m) sobre a carga (z), m/z .

O espectro de massa é um gráfico que mostra a abundância (intensidade) relativa de cada íon que aparece como picos com m/z definidos. Note que o equipamento faz uma medida da razão massa sobre a carga (m/z) e não da massa em si. Se por exemplo, uma biomolécula é ionizada pela adição de um ou mais prótons (íons H^+) o instrumento mede o m/z após a adição de 1 Da (Dalton) para cada próton adicionado. *Assim uma molécula com massa de 1000 Da que seja ionizada pela adição de um próton aparecerá no espectro com m/z de 1001 [(1000+1)/1]. Por outro lado se a mesma molécula sofrer adição de dois prótons durante a ionização, essa molécula será detectada com m/z 501 [(1000+2)/2].* Moléculas também podem ser ionizadas perdendo um próton, adquirindo carga negativa. Nesta situação o espectrômetro passa a detectar íons de carga negativa. *Assim uma molécula com massa de 1000 Da que seja ionizada pela perda de um próton aparecerá no espectro com m/z de 999 [(1000-1)/1]. Por outro lado se a mesma molécula sofrer perda de dois prótons durante a ionização, essa molécula será detectada com m/z 499 [(1000-2)/2].*

O desenvolvimento de duas técnicas de ionização, o electrospray (ESI, electrospray ionization) e ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI, matrix-assisted laser desorption/ionization), tornou possível a determinação precisa de massas de compostos de alto peso molecular bem como de moléculas de baixo peso molecular e revolucionou a aplicabilidade da espectrometria de massas para quase todas as moléculas biológicas. As aplicações da técnica incluem a área da Proteômica bem como a de descoberta de drogas (Drug Discovery). Este último inclui química combinatorial onde um vasto número de compostos similares (bibliotecas combinatoriais) são produzidos e analisados para encontrar o composto mais efetivo dentre os vários do mesmo grupo de compostos orgânicos.

Mr é uma abreviatura usada para designar **massa molecular relativa**. Peso molecular (o qual é uma força em não massa) é frequentemente usado de forma incorreta. Mr é uma medida relativa e não possui unidades. No entanto, Mr é numericamente igual a massa, M, o qual tem unidade e Da é o mais usado.

As características fundamentais de um espectrômetro de massas são:

- produção de íons em fase gasosa;
- aceleração dos íons a velocidades específicas em um campo elétrico;
- separação dos íons por um analisador de massas;
- detecção de cada íon em um m/z específico.

O instrumento é calibrado com padrões cujas massas são conhecidas com alta precisão. No espectrômetro de massas utiliza-se uma escala de carbono com $^{12}\text{C}=12,000000$. Este nível de precisão pode ser atingido em equipamentos de alta resolução.

O analisador de massas pode separar os íons pelo uso de campos magnéticos ou elétricos. Alternativamente o tempo que os íons de diferentes massas levam para migrar distâncias definidas pode ser medido precisamente em um analisador de massas por tempo de voo (TOF, time-of-flight).

Qualquer material que possa ser ionizado e cujos íons possam ser transferidos para a fase gasosa pode ser analisado por espectrometria de massas (MS), lembrando que a análise requer pressões extremamente baixas (ex. alto vácuo de aproximadamente 10^{-6} Torr). A maioria das análises de moléculas biológicas como proteínas, oligossacarídeos, e ácidos nucleicos são realizadas em analisadores do tipo quadrupolo, quadrupolo-ion trap e TOF.

Componentes de um espectrômetro de massas

Todos os espectrômetros de massa são basicamente similares. Eles consistem dos seguintes itens:

- Sistema de alto vácuo. Para isso utiliza-se uma série de bombas (ex. bombas turbomoleculares, etc.);
- Sistema de entrada de amostras (amostras líquidas podem entrar por capilares ou amostras sólidas podem ser colocadas em placas específicas);
- Fonte de ionização onde as amostras são convertidos em íons e transferidos para a fase gasosa;
- Analisador de massas. Pode ser de vários tipos TOF, quadrupolo, quadrupolo-ion trap, etc.;
- Detector.

Ionização

Íons podem ser produzidos a partir de uma molécula neutra pela remoção ou adição de um elétron ou próton. As análises nos espectrômetros de massas podem ser feitas no modo de análise de íons positivo ou negativo. Para proteínas as análises são essencialmente feitas no modo de íon positivo.

Ionização por electrospray (ESI)

Esta ionização envolve a produção de íons através da formação de um spray da solução contendo o analito em um campo elétrico. É uma técnica de ionização considerada branda que possibilita a análise de biomoléculas grandes na sua forma intacta, como proteínas e DNA. O eletrospray cria gotículas carregadas através de um processo de nebulização. O solvente (em geral uma mistura de água e solvente orgânico 50:50) é removido a medida que as gotículas entram no espectrômetro de massas. O processo de ionização no ESI ocorre devido à aplicação de um forte campo elétrico que age sobre a superfície da gotícula. À medida que o solvente evapora na região de alto vácuo, o tamanho da gotícula diminui gradativamente até que sobre somente os íons livres do solvente.

Moléculas pequenas em geral produzem íons monocarregados (com uma carga). Porém moléculas grandes como as proteínas adquirem múltiplas cargas no processo de

ionização. Essa característica possibilita que moléculas grandes possam ser analisadas pelos espectrômetros de massas que em geral trabalham na faixa de massa máxima de 2000 a 3000 Da. Por exemplo, proteínas são analisadas no modo de ionização positivo pela adição de prótons. O número de resíduos básicos na proteína (principalmente lisina e arginina) determina o número máximo de prótons que a molécula adquire. A distribuição de resíduos básicos nas proteínas é tal que os múltiplos picos dos íons de uma proteína [cada uma com $(M+nH)^{n+}$] em geral são centrados em torno de m/z 1000. Na Figura 9.6 uma proteína grande com massa de 100 000 Da aparece como múltiplos íons com m/z centrado em torno de 1020 Da. No exemplo, a proteína com m/z de 1027.6 aparece com 100 prótons e, portanto sua massa M é determinada resolvendo a seguinte conta $(M+100)/100 = 1027.6$, onde $M=102\ 760-100=102\ 660$. Esses íons com múltiplas cargas podem ser processadas pelo computador resultando ao final em um único pico indicando a massa molecular da proteína.

MALDI

A ionização/desorção a laser assistida por matriz (MALDI) produz íons protonados em fase gasosa pela excitação do analito que recebe energia proveniente da absorção da energia do laser pelo componente presente na matriz. A matriz é constituída por um composto orgânico que absorve energia na região do comprimento de onda do laser (337 nm para laser de nitrogênio e 355 nm para laser de Nd-YAG). Esta matriz é misturada junto com a amostra. Existem vários tipos de matriz e alguns estão mostrados na Tabela 9.1.

A amostra é co-cristalizada junto com a matriz adicionada em excesso. Pulsos de laser de alguns nano-segundos de duração incidem sobre a amostra causando uma rápida excitação e vaporização da matriz cristalina que é acompanhada da ejeção simultânea do analito para a fase gasosa. Esses íons na fase gasosa entram no analisador de massas do tipo TOF e são detectados.

A vantagem do MALDI é a habilidade de produzir íons de moléculas grandes na forma intacta carregadas na sua grande maioria com uma ou duas cargas.

O TOF é o melhor analisador a ser utilizado com o MALDI pois possui uma faixa de detecção de massas ilimitada. Proteínas de massas de até 400000 Da já foram precisamente determinadas.

Informações estruturais utilizando espectrometria de massas em tandem

Informações estruturais são obtidas através da fragmentação da molécula no interior do espectrômetro de massas. Isso requer a habilidade do equipamento em selecionar um íon de m/z específico em um primeiro analisador, fragmentar a molécula através da colisão de um gás neutro (ex. argônio), e analisar os fragmentos gerados em um segundo analisador. Para essa finalidade utilizam-se instrumentos do tipo triplo-quadrupolo e quadrupolo-TOF (Q-TOF). No triplo quadrupolo, o íon é selecionado no primeiro quadrupolo, fragmentado no segundo quadrupolo que serve como câmara de colisão e analisado no terceiro quadrupolo. No Q-TOF, o íon é selecionado no quadrupolo, enviado para uma câmara de colisão e os fragmentos analisados pelo TOF.

Sequenciamento de proteínas e peptídeos por espectrometria de massas (página 381)

A identificação de proteínas envolve clivagem de proteínas com proteases, na maioria dos casos com tripsina. Devido à especificidade desta protease, os peptídeos gerados normalmente possuem grupos básicos nas extremidades carboxi- ou amino-terminal. A tripsina cliva após resíduos de lisina e arginina, ambos os quais possuem cadeias laterais básicas (grupo amino e guanidino, respectivamente). Esta clivagem resulta em uma grande proporção de íons duplamente carregados positivamente que são mais facilmente fragmentados.

A digestão da proteína é seguida da detecção de peptídeos segundo a sua relação massa carga (m/z) seja na sua forma intacta, gerando íons com um ou mais cargas, ou na forma de fragmentos através da fragmentação do peptídeo na câmara de colisão.

Embora ocorram vários tipos de fragmentações no peptídeo há uma predominância de fragmentações na ligação peptídica que resultam em picos no espectro de massa que diferem sequencialmente de um resíduo de aminoácido. A diferença de massa entre os picos é usada para reconstruir a sequência de aminoácidos (estrutura primária) do peptídeo.

Diferentes séries de íons, *a*, *b*, *c* e *x*, *y*, *z*, podem ser reconhecidos, dependendo em qual fragmento encontra-se a carga. Íons *x*, *y*, *z* retêm a carga no fragmento C-terminal do peptídeo e os íons *a*, *b*, *c* retêm a carga no N-terminal.

Figura 9.22 a (ver no livro, pág. 333) mostra um peptídeo modelo submetido à fragmentação no espectrômetro de massas. Os íons da série *b* e *y* são os predominantes e entre os dois os íons da série *y* aparecem mais intensamente. Pode-se deduzir a sequência começando-se pelo menor fragmento, aquele que contém apenas um aminoácido. No exemplo é a lisina com m/z de 147.11 (*y*₁, o primeiro resíduo do C-terminal). O fragmento subsequente é aquele que contém a lisina mais um outro aminoácido, no exemplo a diferença de massa entre *y*₁ e *y*₂ é de 128.131 o que corresponde à massa de uma glutamina (147.11+128.131=275.24, o *y*₂ no espectro aparece com m/z de 275.17 um erro de 0.08Da que é aceitável). Esse mesmo raciocínio é aplicado para os íons da série *y* subsequentes.

Análise Computacional: Identificação de proteínas através da busca em banco de dados (página 395)

Buscas em banco de dados para a identificação de proteínas analisadas por espectrometria de massas é particularmente importante. Esta seção dá uma visão geral dos websites utilizados para identificação proteômica.

Identificação de proteínas pode ser feita usando ferramentas de busca gratuitas, por exemplo, o Mascot da Matrix Science e Protein Prospector. A busca pode ser limitada pesquisando-se apenas em algumas espécies ou táxons (ex. somente em mamíferos), aumentando a velocidade da busca. A modificação de cisteínas, se houver, deve ser incluída na busca, ao contrário o número de peptídeos com match será menor/diminuído, produzindo um hit errôneo. Se nenhuma modificação em cisteína foi realizada, e se a proteína foi retirada de um gel, então grande parte deste resíduo certamente foi convertido em Cys modificado com acrilamida.

Massas que não tiveram match devem ser colocadas novamente na busca, pois algumas vezes duas ou mais proteínas podem se localizar na banda do gel de eletroforese. Note que o delta p.p.m. (a diferença entre a massa teórica e a experimental de um peptídeo em particular) deve ser pequeno e consistente. Este dado dá uma indicação do

quão o resultado é genuíno e confiável. Se uma calibração interna do espectrômetro de massa foi realizado a precisão de massa tem que ser de 20 p.p.m. Para uma calibração externa esse valor tem que ser de 50 p.p.m. Se um hit não é encontrado com primeiro valor aumenta-se esse valor.

A busca pode ser feita em diferentes bancos de dados para proteínas:

MSDB

NCBIInr

Swiss-Prot

dbEST

NCBIInr é o maior banco de dados enquanto o SwissProt é o menor. No entanto, o SwissProt fornece mais informações com hit de proteínas.

Se é sabido que a proteína tem tamanho menor que 100 kDa, então a faixa de massa deve ser limitada para prevenir falso-positivos. Fazendo-se um gel 2D é possível ter uma ideia do pI da proteína e esse dado pode ser inserido na busca, porém isso deve ser feito com cautela.

Se o espectro de massa mostra massas de peptídeos muito grandes, deve-se aumentar o número de sítios de clivagem perdidas (missed cleavages). Normalmente coloca-se valores entre 1 e 2.

Se a possibilidade de modificações pós-traducionais ou outras modificações é incerta então as primeiras três opções devem ser selecionadas, p. ex., acetilação de N-terminal, oxidação de Met, e conversão de Glu para pyro-Glu. Se fosforilação de S, T ou Y é selecionado e este não é o caso isto pode resultar em hits falsos.

A lista de massas de peptídeos deve ser colocada com 4 casas decimais após a vírgula quando possível.

Uma vez identificada a proteína pode-se visualizar um resumo completo da proteína contendo as sequências identificadas e a cobertura.