**Tema 5:Fracionamento de biomoléculas e monitoramento por espectrometria de massas**

A espectrometria de massas é uma ferramenta analítica utilizada para medir a razão massa-carga (m/z) de uma ou mais moléculas presentes em uma amostra em fase gasosa. Normalmente, a espectrometria de massas é usada ​​para identificar compostos desconhecidos através da determinação do peso molecular, para quantificar compostos conhecidos e para determinar a estrutura e as propriedades químicas das moléculas. De um modo geral um espectrômetro de massa consiste de pelo menos três componentes:

Fonte de Ionização

Analisador de Massa

Sistema de detecção de íons

Na fonte de ionização, as moléculas são convertidas em íons em fase gasosa para que possam ser movidas e manipuladas por campos elétricos e magnéticos externos. A ionização por electrospray (ESI) pode ser acoplada diretamente a saída de uma coluna de cromatografia o que facilita a inserção da amostra no espectrômetro de massa.

Uma vez ionizados, os íons são classificados e separados de acordo com a razão massa-carga (m/z) no analisador de massa. Existem vários analisadores de massa disponíveis atualmente, cada um dos quais tem vantagens e desvantagens relacionadas à velocidade de operação, resolução de separação, dentre outras. O analisador de massa geralmente funciona em conjunto com o sistema de detecção de íons, que registra a intensidade de cada m/z detectada, gerando um espectro de massa.

A espectrometria de massas tem sido amplamente utilizada na caracterização e quantificação de biomoléculas como proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, lipideos, glicanos e metabólitos oriundos de diversas amostras como células, tecidos e fluídos biológicos. Geralmente na descoberta por novos compostos, bem como no mapeamento de um sistema ou condição biológica, é feita uma análise untarget, conhecida como shotgun, na qual a biomolécula de interesse é extraída e diretamente inserida na fonte de ionização do espectrômetro geralmente via cromatografia líquida ou infusão direta usando uma seringa.

No entanto, injetar a amostra como um todo apresenta várias desvantagens que incluem: 1)grande quantidade de dados a serem processados ​​e corretamente interpretados pelo espectrômetro de massa, 2) baixo sinal de analitos pouco abundantes ou pobremente ionizados e 3) limitada cobertura da análise

Essas limitações podem ser contornadas com a obtenção de frações que são analisadas separadamente no MS, a complexidade da amostra é dividida entre as frações,resultando em um melhor poder de resolução da técnica. Isso faz com que a detecção de biomoléculas seja possível mesmo se houver algumas em alta abundância que poderiam mascarar o espectro das menos abundantes com m/z semelhantes. Além disso, ao analisar a amostra separada em frações, é menos provável que seja atingido o limite das capacidades analíticas do instrumento como eficiência de ionização, faixa de massa, precisão, resolução e processamento, fornecendo informações mais profundas e confiáveis.

De um modo geral as técnicas de pre fracionamento de biomoléculas se dividem em tecnicas eletroforéticas e cromatográficas, que podem ser executadas off line ou em linha com o espectrômetro de massas.

1. Fracionamento de proteínas

Dentre as biomoléculas, as proteínas são as melhor caracterizadas por espectrometria de massas. O proteoma, conjunto de proteínas codificadas pelo genoma de um organsimo, tem sido extensivamente acessado por MS em combinação com diferentes técnicas de pre-fracionamento que tem permitido uma análise profunda de proteomas e subproteomas, gerando informações em vários niveis tanto funcional como estruturalmente.

Geralmente proteomas são analisados seguindo duas abordagens: proteômica *top-down* e a proteômica *bottom-up* . A proteômica *top-down* coniste na análise proteínas intactas por espectrometria de massas de alta resolução (HRMS). O protocolo geral consiste em isolar ou enriquecer as proteínas de interesse usando varias técnicas de separação e prefracionamento, seguido de análise por eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massas (CE-MS) ou cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS).

Por outro lado a abordagem *bottom up* é a mais comum para conduzir uma análise proteômica global. Neste caso, proteínas provenientes de uma amostra biológica, são extraídas, lisadas e digeridas mediante incubação com uma enzima proteolítica para gerar peptideos que serão analisados no espectrometro. Esses peptídeos são primeiramente separados e depois injetados ao espectrometro onde sofrem ionização e fragmentação, resultando em espectros que depois de serem processados por diferentes programas permitem a identificação de proteínas.

De modo geral as técnicas de pre-fracionamento da fração protéica de uma amostra, incluem métodoseletroforéticos e cromatográficos. Os métodos eletroforéticos, tem como princípio a separação de moléculas baseada nas diferentes taxas de migração dos analitos em

um campo elétrico aplicado de acordo com a relação carga/tamanho do analito. Os métodos eletroforéticos mais comuns são a SDS-PAGE na qual é possivel separar proteínas em função ao seu pesso molecular e a 2D-PAGE na qual as proteínas são resolvidas usando dua propriedades independentes (pI e peso molecular). Uma vez que as proteínas são separadas as mesmas são digeridas *in gel* e os peptídeos gerados são extraídos do gel para serem analisados por MS. Outro método usado especialmente para analisar proteínas intactas é a eletroforese capilar (CE), na qual acontece a separação de proteínas em função da carga, tamanho e forma da molécula, o que permite que mesmo pequenas diferenças no tamanho ou carga das proteínas sejam suficientes para a sua separação. Além disso, analisar proteínas intactas por CE-MS pode inclusive fornecer informações sobre a forma como as proteínas são enoveladas, uma vez que mudanças na conformação da proteína podem induzir mudanças na mobilidade e no caráter eletroforético.

Contudo, apesar do sucesso dos métodos eletroforéticos, atualmente o pre-fracionamento de peptideos e proteínas para análise por MS se baseia em métodos cromatográficos (LC-MS). A cromatografia líquida representa várias vantagens como fácil operação dos equipamentos, diversidade de colunas e fases móveis que se adaptam a todos os tipos de amostra, execussão em linha com o espectrometro de massa o que garante menor perda de amostra, maior rendimento e boa resolução tanto de pequenos peptídeos como de proteínas intactas.

Adicionalmente, é possível usar duas ou mais colunas (2D-LC) com métodos de separação diferentes o que aumenta a cobertura da análise. Alguns dos mecanismos de separação mais comumente utilizados para fracionar peptideos incluem cromatografia de exclusão molecular (SEC), cromatografia de fase reversa (RPLC) em pHs básicos ou ácidos (high, low pH) ,cromatografia de troca catiônica fraca (WCX), cromatografia de troca aniônica forte (SCX) interação hidrofílica (HILIC), cromatografia de afinidade metálica (IMAC), dentre outras.

O modo de separação mais comum para analisar peptideos e proteínas intactas é a cromatografia de fase reversa (RPLC) a baixo pH, realizada em uma coluna C18 e fase móvel ACN/água. Neste modo acontece uma separação analítica das proteína e/ou peptídeos que são separados em função de sua hidrofobicidade e são injetados ao espectrômetro. Uma vantagem deste tipo de separação é o uso de uma fase móvel compatível com a MS, que é a acetonitrila (ACN), um solvente orgânico ideal devido a sua hidrofobicidade, viscosidade e volatilidade que auxiliam na formação do spray no método de ionização *Electrospray Ionization -ESI*, mecanismo de ionização da amostra em fase líquida mais amplamente utilizada na análise por LC-MS.

1. Fracionamento de glicanos

Os glicanos podem ser separados cromatograficamente e analisados por espectrometria de massas tanto para caracterizar o perfil estrutural do glicano quanto para avaliar a sua abundância. A análise por espectrometria se fundamenta no fato de que glicanos são compostos de unidades monossacarídicas que possuem massas diferentes. Assim, a composição monossacarídica de um glicano pode ser calculada usando a massa calculada por detecção MS. No entanto, isômeros estruturais não podem ser totalmente diferenciados por espectrometria de massa. Para caracterizar o heterogeneidade estrutural dos glicanos e reduzir a supressão de íônica, são necessárias técnicas de separação e fracionamento da amostra.

A cromatografia líquida é atualmente a técnica mais utilizada na separação de glicanos devido a que existem vários métodos que permitem análises de amostras nativas ou derivatizada, sendo possível adicionalmente, fazer uma separação isomérica eficiente sem o uso de sais não voláteis, tornando-a compatível a MS. Algumas das técnicas de separação de glicanos incluem RPLC, HILIC e cromatografia de carbono grafitado poroso (PGC).

A cromatografia de fase reversa (RPLC) utiliza materiais hidrofóbicos como como sílicas ligadas a C18 ou C8 como fase estacionária para reter os compostos, porém glicanos nativos são hidrofílicos e não são bem retidos em RPLC. Portanto, a separação RPLC é aplicada apenas a glicanos que são permetilados ou derivatizados com um marcador hidrofóbico na extremidade redutora (como 2- aminobenzamida (2-AB), acido aminobenzoico (2-AA), aminopridina (PA), ANTS, e APTS) Assim, a força de interação entre o glicano e a fase estacionária hidrofóbica é governada principalmente pelo agente de marcação.

Adicionalmente, glicanos contêm vários grupos hidroxila que podem interagir com fases estacionárias usadas na HILIC, como amina, amida ou sílica através de pontes de hidrogênio, interação dipolo-dipolo ou íon-dipolo. Quando acoplada a RPLC (RP-HILIC) é possível separar peptideos, glicopeptideos e glicanos em uma única injeção.

A cromatografia de carbono grafitado (PGC) é atualmente a fase estacionária mais utilizada para purificação e separação de glicanos não derivatizados, sendo um método mais eficiente para a separação de glicanos isobáricos com vários graus de manosilação e galactosilação. A retenção de um glicano depende do tamanho, número de monossacarídeos e tipo de ligação, assim, tempos de retenção maiores estão associados a altos graus de sialilação e fucosilação ou baixos niveis de manosilação.

1. Fracionamento de ácidos nucléicos

Outro grupo de biomoléculas passiveis de serem monitoradas por espectrometria de massa, são os acidos nucléicos. No caso de misturas de ácidos nucleicos, a separação cromatográfica facilita a aquisição e interpretação de espectros MS e MS/MS de maior qualidade, ao mesmo tempo que é feita uma dessalinização de linha com o espectrômetro o que diminui a supressão de íons durante a ionização por eletrospray. A LC tem se mostrado útil na separação de mono ou dinucleotídeos, DNA de fita simples e dupla e RNA de fita simples. De modo geral, quatro métodos cromatográficos tem sido utilizados para fragmentação antes da analise por MS: cromatografia de fase reversa (RPLC), cromatografia de par iônico (IP-LC), cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC), cromatografia de troca iônica e cromatografia de exclusão molecular (SEC).

Convencionalmente, a separação por LC de ácidos nucleicos tem sido realizada utilizando cromatografia de par iônico acoplada à cromatografia de fase reversa (IP-RP-LC) para posterior análise por MS. Na IP-RP-LC, cátions lipofílicos que fazem par de íonico com a estrutura negativamente carregada dos ácidos nucléicos, são adicionados à fase móvel, melhorando assim a separação hidrofóbica dessas espécies. O número de cargas do ácido nucleico, bem como a estrutura secundária influenciam também a interação com o reagente de par iônico que normalmente permite a separação de ácidos nucleicos com base no seu comprimento. Além disso, a hidrofobicidade das bases (C < G < A < T) é um segundo fator chave que influencia a separação. Os reagentes de pareamento iônico, mais usados são trietilamina (TEA), dibutilamina (DBA) e diisopropiletilamina (DIPEA). No entanto estes reagentes não são compatíveis com a MS causando contaminação e supressão iônica na polaridade positiva. Esta desvantagem foi contornada com a implementação da HILIC a qual usa uma fase estacionária polar da qual os compostos são eluídos em ordem crescente de polaridade usando água como fase móvel.

Outra técnica cromatográfica usada para separar oligonucleotídeos é a cromatografia de troca iônica (IEC). Nesta técnica é aproveitada a carga negativa do grupo fosfato dos ácidos nucleicos que interagem com os grupos catiônicos da fase estacionária. Os analitos são eluídos usando um gradiente de sal em vez do gradiente orgânico usado na RP-LC. Os ácidos nucléicos são separados com base no número de cargas negativas e seu comprimento.

A cromatografia de exclusão molecular (SEC) é outra abordagem para separação de ácidos nucléicos em condições nativas. A separação por SEC é realizada usando colunas com fases estacionárias porosas que são atravessadas pelo analito com base em seu tamanho ou raio hidrodinâmico. Nesta modalidade de separação as moléculas maiores eluem primeiro, enquanto moléculas menores demoram mais para atravessar os poros eluindo por último. A SEC tem sido usada como etapa prévia para a separação de RNAs de alto e baixo peso molecular usando duas colunas em linha com faixas de trabalho diferentes (2D).

1. Fracionamento de lipídeos

A cromatogra líquida em fase normal (NPLC), cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC) e cromatografia LC de fase reversa (RPLC) são as três técnicas mais usados na lipidômica não direcionada. A RPLC é a mais aplicável devido à sua alta eficiência de separação, alta reprodutibilidade e alta robustez. A ordem de eluição dos lipídios na RPLC está relacionada ao comprimento da cadeia de carbono e ao grau de insaturação.

Por outro lado na NPLC e HILIC utilizam fases estacionárias polares que são mais adequadas para a separação de classes lipídicas com diferentes grupos principais. No entanto, a NPLC requer solventes não aquosos como n-hexano e acetato de etila, nos quais é limitada a separação de compostos hidrofílicos, enquanto a HILIC utiliza como fase móvel solventes orgânicos altamente polares com pequena porção de água que permite uma separação eficiente de compostos polares que geralmente apresentam baixa retenção no sistema RPLC.

Além disso, é possível usar LC multidimensional (2D-LC) na qual são usadas propriedades ortogonais de separação o que favorece um aumento da capacidade de pico das colunas e aumenta a cobertura da análise. Por exemplo, a combinação de cromatografia ion-prata com fase reversa (Ag-LCxRPLC) é útil para separar triacilglicerois. A integraçõ da espectrometria de mobilidade iônica (IM) à LC pode ser considerada uma terceira dimensão de separação. Esta técnica consiste na avaliação da mobilidade eletroroferica de íons em fase gasosa, o que permite a separação de espécies isômericas e isobáricas