**Tema 2: Identificação, caracterização e quantificação de carboidratos por espectrometria de massas**

Carboidratos, comumente chamados de glicanos, são os polímeros orgânicos mais abundantes na terra, são essenciais em todos os organismos e cumprem diversos papéis estruturais e funcionais dentro da célula. Estruturalmente falando, carboidratos consistem de unidades monomêricas chamadas de monossacarídeos. Estes monômeros se ligam uns aos outros mediante ligação glicosídica dando origem a oligossacarídeos, estruturas com um alto grau de polimerização, que podem apresentar ou não ramificações.

Oligossacarídeos ramificados são encontrados fazendo parte da glicosilação de proteínas, a modificação pós-traducional mais comum e complexa encontrada em proteínas, mas também podem ser encontrados livres como constituintes do leite por exemplo, ou fazendo parte da matriz extracelular na forma de glicosaminas e proteoglicanos

Considerando que monossacarídeos têm massas únicas, a caracterização e quantificação de glicanos em amostras biológicas pode ser feita por espectrometria de massas, 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: 1)Fonte de Ionização, 2)Analisador de Massa e 3) 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.

Uma das tecnologias mais comumente utilizadas na análise de carboidratos é a espectrometria MALDI (Matrix assisted Laser Dessorption and Ionization) acoplada a um analisador de massas por Tempo de Voo-Time off light (TOF), combinação conhecida como MALDI-TOF

A espectrometria MALDI-TOF tem se mostrado útil na análise de carboidratos, uma vez que permite a determinação de massa intacta de polissacarídeos de alto peso molecular. Adicionalmente, os espectros gerados pelo MALDI-TOF são relativamente simples, predominam íons monocarregados e cuja decomposição em fragmentos pode fornecer informações tipo de ligação e sequência, o que permite a dedução de composições e estruturas de carboidratos

Na análise por MALDI-TOF, os carboidratos precisam ser cristalizados com a matriz que tem a função de absorver e transferir a energia do laser para a amostra causando a ionização do analito. Uma matriz comumente usada na análise de carboidratos é o ácido 2,5-dihidroxibenzóico (DHB), e Super DHB (mistura de DHB e 2-hidroxi-5- o ácido metoxibenzóico).

Assim, a mistura do analito com a matriz acontece numa placa de aço inoxidável polido que será inserida ao equipamento. Uma vez que a amostra é ionizada, os íons gerados do analito passam pelo analisador de massas de Tempo de Voo- Time of flight (TOF) que separa os íons em função da sua m/z e tempo de voo, assim analitos com menor m/z atingem mais rapidamente o detector do equipamento, do que analitos com maior m/z.

Algumas aplicações no uso de MALDI-TOF para a caracterização de carboidratos incluem, identificação de oligossacarídeos em alimentos, elucidação da estrutura de oligossacarídeos provienentes da parede celular de plantas, e análise da variedade de oligossacarídeos derivados de microorganismos usados na indústria alimentar como goma xantan.

Uma vertente do MALDI-TOF no estudo de glicanos, é a espectrometria de imageamento - Imaging mass spectrometry (IMS), que permite estudar a distribuição espaciais de glicanos em tecidos e orgãos, o que pode ser util para entender o papel da glicobiologia por trás de uma condição patológica. Algumas das técnicas de imageamento incluem secondary ion mass spectrometry -SIMS), desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI- MS), and direct analysis in real-time mass spectrometry (DART-MS).

Glicanos tem também um papel importante na manutenção da homeostasia celular podendo ser encontrados ligados a outras biomoléculas como proteínas (glicoproteínas) e lipídeos (glicolipídeos). A glicosilação de proteínas é uma modificação co e pós-traducional que envolve a ligação covalente de uma cadeia de oligossacarídeo a uma cadeia polipeptídica dando origem a uma glicoproteína. N e O glicosilação são as formas mais comuns de conjugados glicosilados presentes nas células. Normalmente, os N-glicanos consistem de um núcleo comum que consiste em dois resíduos GlcNAc ligado a três manoses. Essa estrutura é adicionada a uma cadeia polipetídica na sequência consenso N-X-S/T, onde X é qualquer aminoácido diferente de prolina. Esta estrutura central pode ser estendida usando múltiplas substituições para formar diferentes padrões de ramificação bem como um grande número de ligações, o que torna muito diversa a variedade de estruturas a serem analisadas por MS. Por outro lado O-glicanos são transferidos à S/T na cadeia de peptídeos.

De um modo geral, a análise de glicoproteínas, pode seguir dois caminhos: 1) o estudo da fração protéica que visa analisar a localização e quantificação de N e O glicosilações em glicopeptídeos (Glicoproteômica) e 2) o estudo da composição e quantificação da fração de glicanos (Glicômica). No fluxo de trabalho da glicômica, o passo inicial é a recuperação dos glicanos da proteína, usando diferentes enzimas como endoglycosidases or glycoamidases. No caso dos N-glicanos, a enzima mais usada é a PNGase F. No caso a recuperação de O-glicanos é mais comum usar Beta eliminação redutiva em condições alcalinas.

Após a liberação do açúcar, a derivatização da extremidade redutora de glicanos é frequentemente necessária para melhorar a estabilidade, eficiência de ionização e precisão de quantificação numa análise glicômica. Neste protocolo, uma amina primária reage com o grupo aldeido do glicano dando origem a uma amina secundária em condições redutoras. Alguns dos reagentes de marcação incluem 2-aminobenzamida (2-AB), ácido 2-aminobenzóico (2-AA), 2- aminopiridina (PA), ácido 2-aminonaftaleno trissulfônico (ANTS) e ácido 1-aminopireno-3,6,8-trissulfônico (APTS). Esses reagentes podem adicionar um cromóforo ou fluoróforo ao glicano, possibilitando a quantificação por UV ou fluorescência, além disso, quando injetado ao espectrômetro, o grupo amina secundária introduzido melhora a eficiência de ionização do glicano na polaridade positiva.

Outra abordagem usada na derivatização de glicanos é a permetilação, que consiste na conversão de hidrogênios nos grupos hidroxila, grupos amina e grupos carboxila, em grupos metila polares. Em comparação com as formas nativas, glicanos permetilados são mais estáveis, eficientemente ionizados e mais facilmente separados por RPLC.

Para caracterizar a heterogeneidade estrutural dos glicanos e reduzir a supressão de sinal, uma técnica de separação eficiente é frequentemente necessária. 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 as 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.

Além de identificar e caracterizar o o perfil de glicanos de uma amostra biológica é possivel também quantificar a abundância relativa de estruturas diferentes, o que pode ser feito com o sem marcação. Esta técnica tem sido amplamente usada para avaliar o perfil de glicanos na detecção de possíveis biomarcadores em diferentes estados patológicos. Para otimizar o resultado da quantificação podem ser usados marcadores isobáricos. Estas estratégias de marcação estão baseadas na permetialçao, aminação redutiva usando aminobenzamida ou incorporação de 18O por PNGaseF.

Finalmente, a elucidação estrutural de glicanos requer a determinação da composição de monossacarídeos, sequência, ramificação e ligações únicas de cada resíduo de monossacarídeo. Existem duas técnicas comumente usadas para análise estrutural de N- e O-glicanos. A primeira baseada em técnicas de MS em tandem, incluindo métodos de dissociação de baixa (CID) e alta energia (UVPD) . A segunda técnica envolve digestão enzimática usando exoglicosidases e detecção por fluorescência ou MS. Exoglicosidades clivam ligações glicosídicas de resíduos de monossacarideos na extremidade não redutora de oligossacarídeos. Assim, estruturas completas de glicanos podem ser elucidadas usando uma serie de digestões com diversas exoglicosidases.