



Universidade de Brasília
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Microscopia de força atômica associada à
espectrometria de massa na
caracterização de sistemas protéicos**

Daniel Lima Logrado

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Bastos Cunha

Brasília-DF
Junho, 2009



Universidade de Brasília
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Microscopia de força atômica associada à
espectrometria de massa na
caracterização de sistemas protéicos**

Daniel Lima Logrado

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Bastos Cunha

Brasília-DF
Junho, 2009

Aos meus Pais,
que me deram a vida e educação. E aos meus irmãos pelo incentivo e motivação.

À minha namorada Mariana,
pelo incentivo e companheirismo.

Aos meus amigos,
por todos os momentos de descontração.

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador Ricardo Bastos Cunha pela condução dos trabalhos com tranquilidade e paciência, e pela disposição e amplo conhecimento transmitido em diversas áreas.

Ao professor Marcelo Valle de Sousa, coordenador do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, pela confiança e apoio no desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço ao professor Luciano Paulino da Silva pela cordialidade, disposição e colaboração, sem as quais não seria possível a concretização desse trabalho, e também pelos conhecimentos relacionados à microscopia de força atômica transmitidos a mim.

Àqueles que colaboraram diretamente na bancada, nos experimentos e nas trocas de conhecimentos, o funcionário Nuno Manoel Domingues, a colega Aline Guimarães e todos os demais companheiros de laboratório.

Ao colega de laboratório Gabriel Costa Nunes da Cruz pelas amostras cedidas.

Aos professores e funcionários do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas pelo apoio.

Ao Instituto de Química e aos membros da Banca Examinadora pela oportunidade dada a mim para realizar este trabalho.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Resumo

Visando o desenvolvimento de uma metodologia analítica rápida e econômica orientada para estudos de sistemas moleculares formados por proteínas, o presente trabalho teve como objetivo primordial a associação entre duas poderosas técnicas para análise de proteínas, a microscopia de força atômica (AFM) e a espectrometria de massa (MS). Tendo como perspectiva principal para a associação AFM-MS o estudo do interatoma. A microscopia de força atômica é uma importante técnica para análise de sistemas supramoleculares, dentre outras informações, permite à obtenção da topografia desses sistemas possibilitando que as dimensões das estruturas que o compõe sejam mensuradas, sendo assim, essa ferramenta de análise fornece informações importantes no que diz respeito a estruturas quaternárias formadas por proteínas, sugerindo como as subunidades interagem para formação de complexos moleculares. A determinação precisa da massa molecular por espectrometria de massa possibilita a solução de diversos problemas relacionados às questões bioquímicas, como a determinação direta das estruturas primária e quaternária de proteínas, determinação de modificações pós traducionais, identificação de proteínas e etc. Graças a sua versatilidade e sensibilidade, a espectrometria de massa vem se destacando como ferramenta indispensável para a análise de proteínas. O presente trabalho propõe a associação da microscopia de força atômica com a espectrometria de massa objetivando análises rápidas nas quais uma mesma amostra é submetida às duas ferramentas analíticas, identificando, também, em quais aspectos essas duas técnicas se complementam na investigação de sistemas protéicos. Nos experimentos, proteínas adsorvidas em superfície de mica, suporte frequentemente utilizado nas análises por AFM, tiveram sua morfologia estudada por AFM e, em seguida, foram analisadas por MALDI-MS na mesma superfície, adaptada a placa do MALDI por meio de uma fita dupla face. Em outras circunstâncias, a amostra adsorvida em mica foi submetida a reações para caracterização e identificação das proteínas por MALDI-MS.

Abstract

Aiming the development of analytical methodology oriented for rapid analysis of protein supramolecular systems, we present in this work the association between two powerful techniques for protein analysis: atomic force microscopy (AFM) and mass spectrometry (MS). The AFM-MS prospects are mainly directed to the interactome study. Atomic force microscopy is a powerful analytical technique for supramolecular systems. Among other information, it provides the system topography and enables the measurement of subunits dimensions. So, it deals about an analytical tool which provides important information regarding the quaternary protein structure, giving a track about how subunits interact to each other in molecular complexes formation. The precise molecular weight determination by mass spectrometry allows the solution of various problems related to biochemical issues, such as determining proteins primary and quaternary structure, characterization of their post-translational modifications, proteins identification and so on. Thanks to its versatility and sensitivity, mass spectrometry has been highlighting as an indispensable analytical tool for protein analysis. This work suggests the association of atomic force microscope and mass spectrometry for rapid analysis of a single sample. We identified the aspects in which these techniques are complementary for investigation of protein systems. For the first time, proteins adsorbed onto mica surface (support often used in AFM analysis) were identified by MALDI-MS, after having their topography examined by AFM. Samples adsorbed on mica were also subjected to reactions for protein characterization and identification by MALDI-MS.

Índice

Agradecimentos	iv
Resumo	v
Abstract	vi
Índice de figuras	ix
Abreviaturas	xi
1. Capítulo 1 - Introdução	12
1.1 Conceitos básicos de proteínas	16
1.2 Microscopia de Força Atômica (AFM)	17
1.2.1 Princípios de funcionamento	18
1.2.2 Modos de operação	20
1.2.2.1 Modo de operação contato	20
1.2.2.2 Modo de operação contato intermitente	23
1.2.2.3 Modo de operação não contato	24
1.2.3 Microscopia de força atômica e proteínas	25
1.3 Espectrometria de massa para proteínas	28
1.3.1 Fontes de ionização	30
1.3.1.1 Fonte de ionização por eletronebulização (ESI)	31
1.3.1.2 Ionização por dessorção a laser auxiliada por matriz (MALDI)	33
1.3.2 Analisadores de massa	35
1.3.2.1 Analisador de massa do tipo quadrupolo	37
1.3.2.2 Analisador de massa do tipo tempo de voo	39
1.3.3 Detectores	44
1.3.4 Aplicações da espectrometria de massa para proteínas	45
1.3.4.1 Determinação da pureza de amostras	46
1.3.4.2 Confirmação da sequência de aminoácidos	46
1.3.4.3 Identificação de isoformas protéicas	46
1.3.4.4 Confirmação da expressão de proteínas recombinantes	46
1.3.4.5 Quantificação de cisteínas e localização de pontes dissulfeto	46
1.3.4.6 Determinação de modificações pós traducionais	47
1.3.4.7 Identificação e sequenciamento de proteínas	47
1.3.4.8 Interações moleculares não covalentes	48
2. Capítulo 2 - Objetivos	50
2.1 Objetivos gerais	51

2.2	Objetivos específicos	51
2.3	Justificativas	52
3.	Capítulo 3 - Materiais e Métodos	54
3.1	Associação AFM-MS	55
3.1.1	AFM	56
3.1.2	MALDI-TOF	57
3.2	Separação das proteínas por HPLC	57
3.3	Digestão enzimática e identificação de proteínas	57
3.3.1	Digestão em mica	57
3.3.2	Digestão em superfície de mica	58
3.3.3	Identificação das proteínas	60
3.4	Extração do sal por decomposição	61
4.	Capítulo 4 - Resultados e Discussão	62
4.1	Associação AFM-MS	63
4.1.1	Testes de concentração	64
4.2	Extração do sal por decomposição	70
4.3	Digestão e identificação de proteínas em mica	72
4.3.1	RNAse A	72
4.3.2	MRJP1	73
4.4	Influência da mica na exatidão do MALDI-TOF	75
4.5	Aspectos morfológicos	79
4.5.1	MRJP1	79
4.5.2	Apisimina	84
4.5.3	Possíveis carboidratos	87
4.6	Influência da apisimina na oligomerização da MRJP1	90
5.	Capítulo 5 - Conclusões	94
5.1	Conclusões e perspectivas	95
6.	Referências bibliográficas	97

Índice de figuras

Figura 1. Formação da ligação peptídica	16
Figura 2. Representação de uma sonda para microscopia de força atômica.....	18
Figura 3. Componentes básicos de um microscópio de força atômica	19
Figura 4. Ação das forças sobre o cantilever e incidência do laser no detector	21
Figura 5. Princípio de modulação de força por AFM	22
Figura 6. Deflexão do cantilever.....	24
Figura 7. Contaminação na sonda de AFM.....	28
Figura 8. Eventos importantes em análise de proteínas por AFM.....	28
Figura 9. Método de ionização por eletronebulização.	32
Figura 10. Preparação de amostras para MALDI.....	33
Figura 11. Processo de ionização por dessorção a laser auxiliada por matriz	34
Figura 12. Princípio de separação de íons em quadrupolo	37
Figura 13. Princípio de funcionamento do instrumento com triplo quadrupolo.....	38
Figura 14. Princípio de funcionamento do analisador de massa do tipo TOF	40
Figura 15. Formação de íons, no MALDI, com distribuições diferentes	41
Figura 16. Princípio da técnica de delayed íon extraction.	42
Figura 17. Princípio de funcionamento do reflectron	43
Figura 18. Desenho esquemático de um multiplicador de elétrons por canais.....	44
Figura 19. Desenho esquemático de um detector de placa de microcanais	45
Figura 20. Esquema metodológico da associação AFM-MS.....	55
Figura 21. Superfície de mica adaptada à placa do MALDI	56
Figura 22. Esquema metodológico da digestão em mica para PMF	58
Figura 23. Esquema metodológico da digestão em superfície de mica para PMF	59
Figura 24. Resultados de AFM-MS para ribonuclease a bovina	63
Figura 25. Montagem para fixação da mica no AFM.....	63
Figura 26. Espectros de massa de fragmentos trípticos (MRJP-1)	64
Figura 27. Proteína MRJP-1 (3,7 µg/µL) por AFM-MS.	64
Figura 28. Ampliação de seção da imagem anterior (Figura 27).....	65
Figura 29. Imagem topográfica da MRJP-1 diluída 10 vezes (0,37 µg/µL).....	66
Figura 30. Espectro de massa, em mica, da MRJP-1 (0,37 µg/µL).....	66
Figura 31. Imagens topográficas da MRJP-1 (0,037 µg/µL).....	67
Figura 32. Espectro de massa, em mica, da MRJP-1(0,037 µg/µL).....	67
Figura 33. Imagem topográfica da MRJP-1 (3,7 ng/µL).	68
Figura 34. Espectros de massa da apisimina obtidos em mica.....	69

Figura 35. Fotos de zip-tips	70
Figura 36. Espectros de massa da proteína Ribonuclease A.....	71
Figura 37. Espectros dos fragmentos trípticos da MRJP-1 em superfície de mica ...	72
Figura 38. Mapa peptídico da Ribonuclease A (digestão tríptica em mica).....	73
Figura 39. Resultado da busca. Identificação positiva da Ribonuclease A	73
Figura 40. Espectros de massa resultantes da digestão em superfície de mica (frações 6, 7 e 10).	74
Figura 41. Resultados das buscas. Identificações positiva da MRJP-1.	74
Figura 42. Espectros de massa resultantes da digestão tríptica da MRJP-1 em superfície de mica.	76
Figura 43. Espectros de peptídeos em superfície de mica e na placa do MALDI.	77
Figura 44. Espectros de massa , em superfície de mica, com aplicação de TFA	77
Figura 45. Proposição teórica referente à interferência da mica na análise de proteínas por MALDI-TOF	78
Figura 46. Imagens topográficas da MRJP-1 obtidas por AFM.	80
Figura 47. Gráficos com as alturas de partículas reveladas pela imagem 46A.....	80
Figura 48. Ampliações da imagem topográfica (Figura 39).....	81
Figura 49. Imagem topográfica tridimensional (Figura 48)	81
Figura 50. Modelo da MRJP-1 obtido por meio de modelagem por homologia.....	82
Figura 51. Imagem topográfica e altura das partículas.	83
Figura 52. Imagem de contraste de fase da MRJP-1	84
Figura 53. Espectro de massa da apisimina.....	84
Figura 54. Imagens topográficas da apisimina	85
Figura 55. Gráficos com as alturas das partículas, diméricas e monoméricas.....	86
Figura 56. Espectro da apisimina, adquirido em mica	86
Figura 57. Imagens topográficas das estruturas concernentes a fração 7	88
Figura 58. Imagens topográficas das estruturas concernentes a fração 6	88
Figura 59. Gráficos com as alturas de partículas (imagens 57 e 58)	89
Figura 60. Cromatograma da separação das proteínas MRJP1 e apisimina.	90
Figura 61. Espectros de massa de frações colhidas no HPLC (Frações 6 a 11).	91
Figura 62. Espectros de massa das frações 11 e 12 colhidas do HPLC.....	92
Figura 63. Imagens e medidas de altura referentes à MRJP-1 e seus oligômeros ...	92
Figura 64. Imagens topográficas da MRJP-1 na Fração 10.	93
Figura 65. Imagens topográficas da MRJP-1 na fração 7	93

Abreviaturas

AFM	Microscopia de força atômica (<i>atomic force microscopy</i>)
AFM-MS	Microscopia de força atômica associada a espectrometria de massa
CC	Corrente contínua
CID	Ionização induzida por colisão ((Collision-induced dissociation)
ESI	Ionização por eletropulverização (electrospray ionization)
HCCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance (high performance liquid chromatography)
ISD	Deterioração na fonte (in-source decay)
LID	Ionização induzida por laser (laser-induced dissociation)
m/z	Razão massa/carga
MALDI-MS	Espectrometria de massa por desorsão a laser auxiliada por matriz (matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry)
MCP	Placa de microcanais (microchannel plate)
MS	Espectrometria de massa (mass spectrometry)
MS/MS	Espectrometria de massa tandem
PMF	(Peptide mass fingerprinting)
PSD	Deterioração após a fonte (post-source decay)
Q-TOF	Analisador de massa quadrupolo -tempo de vôo
QqQ	Tripla quadrupolo
RF	Radio frequência
RNAse A	Proteína Ribonuclease A
SA	Ácido sinapínico
TFA	Ácido trifluoracético
TOF	Analisador de massa por tempo de vôo
UV	Ultravioleta

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1. Introdução

Visando entender como uma proteína age e influencia um sistema biológico, diversas ferramentas e métodos foram desenvolvidos e são utilizados rotineiramente nos laboratórios de análise de proteínas.

Grande parte dos instrumentos e das metodologias se aplica aos estudos de proteômica. Uma abordagem clássica e rotineira consiste no isolamento, identificação e caracterização de proteínas, em que normalmente as proteínas são separadas por técnicas eletroforéticas ou cromatográficas e identificadas e caracterizadas por espectrometria de massa para proteínas, geralmente com fontes de ionização do tipo MALDI ou ESI. Esses experimentos clássicos de proteômica permitem identificar a expressão diferencial de proteínas relacionadas a determinadas características em um organismo, portanto, são instrumentos importantes para assimilação de alvos para ação de fármacos e para elucidação de mecanismos celulares. Já para o interatoma, ciência que estuda o conjunto de interações moleculares em uma célula, métodos experimentais foram concebidos para identificação de proteínas ligantes, baseados, principalmente, na complementaridade entre a cromatografia de afinidade e a espectrometria de massa. Entretanto, não há, como na proteômica, um recurso metodológico baseado na associação de ferramentas analíticas que forneçam resultados de interações completos, ou seja, que permitam não somente a identificação de proteínas ligantes, mas também, que forneçam uma percepção estrutural e morfológica dos complexos formados e que ao mesmo tempo permita a identificação das unidades protéicas ligantes.

O estudo das interações moleculares biológicas, compreendendo a análise das estruturas protéicas e dos complexos formados, é fundamental para a compreensão dos processos celulares. A análise desse dinamismo tem como objetivo revelar quais são as funções de cada biomolécula e como podem ser ligadas para que o conjunto possa desenvolver novas propriedades ou exercer suas funções, exatamente como uma máquina e suas peças. Essas novas espécies geradas pela ligação de duas ou mais entidades moleculares são denominadas supramoléculas ou sistemas supramoleculares.

A microscopia de força atômica (AFM) tem sido usada, com sucesso, na obtenção de imagens de sistemas biológicos, incluindo sistemas protéicos supramoleculares. A topografia de sistemas protéicos com resolução de nanômetros permite caracterizar superfícies de amostras heterogêneas em diversas condições.

Já a espectrometria de massa (MS) permite a determinação precisa da massa molecular de proteínas, o que desencadeia em uma infinidade de aplicações, sendo hoje uma técnica essencial à análise de proteínas.

Neste trabalho, as proteínas analisadas por AFM foram posteriormente analisadas por MS. A complementaridade entre os resultados obtidos a partir das duas técnicas foi avaliada. A melhor forma de se fazer essa associação foi estudada, buscando o desenvolvimento de metodologias rápidas, nas quais, uma única alíquota fosse submetida a ambas as técnicas.

Neste trabalho, foi empregada como modelo para os testes metodológicos a proteína ribonuclease A bovina. Essa proteína foi utilizada nos testes direcionados a identificação de proteínas adsorvida em mica, a metodologia utilizada para a identificação foi a “impressão digital do mapa peptídico” (peptide-mass-fingerprint – PMF), na qual as proteínas passam por um procedimento de digestão enzimática e os fragmentos peptídicos são analisados por espectrometria de massa, o perfil do espectro obtido é comparado com as massas dos fragmentos teóricos disponíveis em bancos de dados. Entretanto, neste trabalho, as proteínas de interesse estavam adsorvidas, anteriormente à reação de digestão enzimática, à superfície utilizada como suporte para o AFM, a mica. A introdução da superfície de mica, suporte frequentemente utilizado nas análises por AFM, aos experimentos de espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF suscitou a necessidade de criação de novos protocolos experimentais. Uma das principais novidades utilizada nos procedimentos experimentais de digestão enzimática diz respeito à extração do sal utilizado no preparo da solução tampão. Esses sais são supressores de sinal nas análises por MS e, portanto, devem ser retirados da amostra, o procedimento proposto neste trabalho é rápido, simples e não dispendioso, diferentemente dos procedimentos rotineiros, nos quais geralmente usam-se colunas para dessalinização de custo relativamente elevado em procedimentos demorados e trabalhosos.

A união AFM-MS também foi aplicada a proteínas (MRJP-1 e apisimina) do proteoma de abelhas *Apis mellifera*, organismo modelo para estudos comportamentais utilizado em projeto desenvolvido pelo Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas da Universidade de Brasília. Em princípio, o objetivo seria determinar a aplicabilidade do método e as concentrações ideais para essa associação, analisando a morfologia da proteína MRJP-1 (major royal jelly protein) por microscopia de força atômica e posteriormente determinando sua massa e fazendo sua identificação por espectrometria de massa. Os experimentos foram realizados em diversas concentrações visando determinar se há compatibilidade de concentração entre as duas ferramentas analíticas. Logo a associação se mostrou eficaz ao indicar a presença da proteína apisimina na amostra, possível ligante da MRJP-1. Com os experimentos verificou-se, por meio dos espectros obtidos, a presença de um pico de alta intensidade indicando a presença da apisimina com aproximadamente 5,5 kDa, inicialmente as imagens obtidas por AFM não revelaram a presença dessa proteína, pois as estruturas maiores (MRJP-1) possivelmente encobriam e ocultavam a apisimina. Nesse caso, a espectrometria de massa surge como uma importante técnica complementar, indicando a presença da proteína. A mistura foi separada por cromatografia líquida de alta performance e as frações colhidas foram submetidas a análises por AFM-MS. As análises das frações revelaram novas estruturas. Nesse caso, a microscopia de força atômica indicou a presença de contaminantes que dificilmente seriam percebidos unicamente por espectrometria de massa.

Para dispor de forma organizada a base teórica e experimental deste trabalho, esta dissertação é composta por cinco partes. Este primeiro capítulo, introdutório, fornece uma visão geral sobre o princípio de funcionamento e demais características importantes de ambas as técnicas. Na segunda etapa, constarão os objetivos da dissertação. Em seguida, apresenta-se a parte experimental, onde são expostos os materiais e os procedimentos utilizados, bem como as metodologias adotadas para a associação entre AFM e MALDI-TOF. Os resultados obtidos e as discussões a respeito dos mesmos são abordados posteriormente. Por último, são apresentadas as conclusões finais deste trabalho e, também, sugeridos possíveis direcionamentos para estudos posteriores.

1.1 Conceitos básicos de proteínas

As proteínas são as biomoléculas mais diversificadas quanto à forma e quanto às propriedades funcionais, formando elementos estruturais de células e tecidos, hormônios, veículos de transporte biológico, anticorpos, enzimas, e muitos outros elementos essenciais à vida. Todas essas propriedades estão diretamente relacionadas às estruturas tridimensionais das proteínas [1].

As proteínas ou polipeptídios são polímeros de aminoácidos, podendo ser compostas por até 20 tipos de aminoácidos diferentes que são ligados covalentemente pela formação de ligações peptídicas. A formação da ligação peptídica, representada pela Figura 1, consiste em uma ligação carbononitrogênio formada entre o grupo carboxila de um aminoácido e o grupo amina de outro.

A sequência de resíduos de aminoácidos constitui a estrutura primária das proteínas, da qual deriva o arranjo espacial da molécula, guiado por forças de van der Waals, ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e pontes dissulfeto. A estrutura primária irá determinar os tipos de interação possíveis entre as diferentes regiões da estrutura polipeptídica, e conseqüentemente, definirá a configuração tridimensional do peptídeo ou proteína.

A organização estrutural de uma proteína é classificada desde a sequência de aminoácidos (estrutura primária), passando pela formação de estruturas regulares bidimensionais (estrutura secundária), pelo dobramento final da cadeia polipeptídica (estrutura terciária) até a associação de duas ou mais cadeias (estruturas quaternárias).

Uma cadeia protéica pode sofrer modificações químicas depois de sua tradução, denominadas modificações pós-traducionais. As modificações pós-traducionais podem alterar a estrutura e conseqüentemente a atividade de uma determinada proteína. Além disso, as interações não covalentes proteína-proteína ou entre proteínas e moléculas menores, orgânicas ou inorgânicas, também podem determinar a atividade de um peptídeo ou proteína.

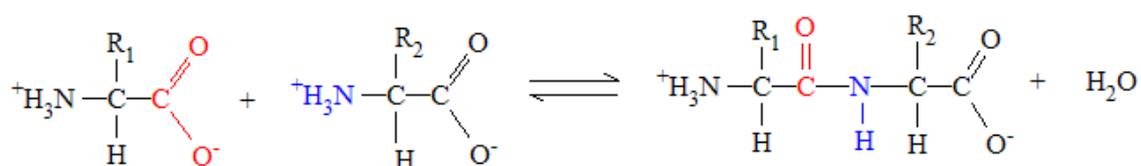


Figura 1. Formação de uma ligação peptídica gerando um dipeptídeo e uma molécula de água.

Portanto, a estrutura primária das proteínas ou peptídeos, as interações covalentes geradas por modificações pós traducionais, por exemplo, glicosilações e fosforilações e as interações não covalentes são informações importantes no que diz respeito às atividades essenciais à manutenção dos organismos vivos e correspondem também aos alvos de ação de grande parte dos fármacos.

1.2 Microscopia de Força Atômica (AFM)

A microscopia de força atômica permite a aquisição de imagens topográficas em superfícies diversas, sob condições variadas, em uma escala de angstroms [2]. Além da topografia, outras características físicas dos materiais, como elasticidade e atrito, podem ser examinadas [3]. Assim, o AFM possibilita interpretações concernentes à morfologia e funcionamento dos sistemas analisados.

Nanopartículas depositadas sobre superfícies extremamente lisas podem ser analisadas por AFM. Essa ferramenta permite, portanto, a obtenção de imagens que representam adequadamente a morfologia de sistemas formados por biomoléculas [3].

Na microscopia de força atômica, em oposição a outros tipos de microscopias, o preparo da amostra é relativamente simples, basta que as amostras estejam bem presas na superfície de um substrato sólido para não serem sacadas durante a análise, já que a imagem é gerada pela varredura da amostra com uma ponta ultrafina que compõe a sonda de AFM representada na Figura 2. Sendo assim, o material biológico não precisa ser processado, evitando possíveis modificações estruturais.

Por meio dessa técnica, é possível a aquisição de imagens topográficas de sistemas biológicos sob variadas condições, a visualização dessas imagens por si só já fornece muitas informações de natureza morfológica, porém, a possibilidade de operar o equipamento em diferentes modos de operação, onde cada um avalia de forma diferente a interação sonda-amostra, permite a obtenção de uma variedade maior de informações, assim como, adesão, rigidez e elasticidade, o que aumenta a possibilidade de informações fornecidas pelo método.

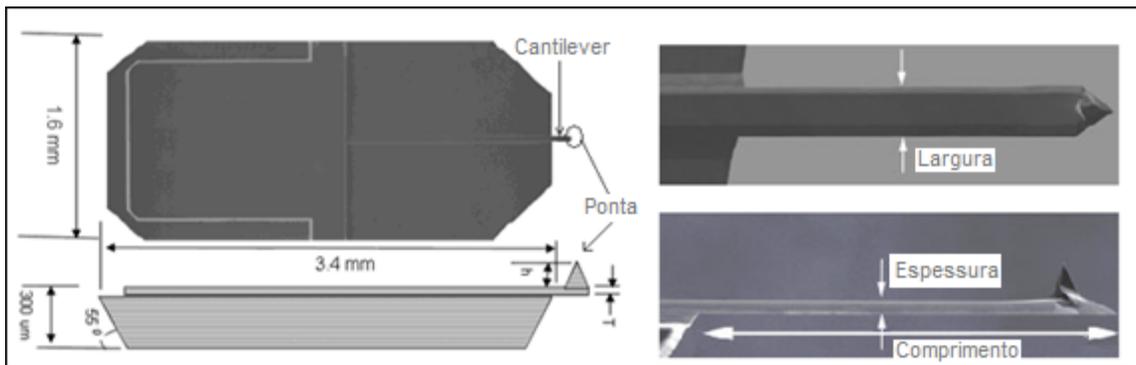


Figura 2. Representação esquemática de uma sonda para microscopia de força atômica. Na figura à esquerda, a sonda indicada pelas setas (sistema *cantilever* - ponta) localiza-se na extremidade do apoio (estrutura maior) que é a parte fixada ao equipamento. À direita, evidenciam-se os parâmetros de largura, espessura e comprimento do *cantilever* [4].

1.2.1 Princípios de funcionamento

O funcionamento do AFM consiste na medida das deflexões da sonda do microscópio enquanto uma ponta, componente desta sonda, varre a superfície da amostra. Essas deflexões são consequência da interação ponta-amostra. As sondas, fabricadas normalmente com Si ou Si₃N₄, são constituídas por uma ponta de dimensões micrométricas e por um braço de suporte denominado *cantilever*, onde se apóia a ponta. As deflexões do *cantilever* indicam a força de interação entre a ponta e a amostra.

Visto como uma mola, o *cantilever* sofre deflexões provocadas pela força (F) que a amostra exerce sobre a ponta, dada por, $F = -k x$, sendo que x é o deslocamento e k é a constante de força elástica.

Diversos tipos de sondas são fabricados com variações em parâmetros como frequência de ressonância e constante de força elástica, esses parâmetros são determinados pelas dimensões e pelo material de fabricação da sonda, também estão relacionados com a escolha do modo de operação do equipamento, descritos à frente neste trabalho.

A microscopia de força atômica baseia-se na varredura da superfície da amostra pela ponta, sendo assim, a sonda é posicionada próximo ou em contato com a amostra de acordo com o modo de operação do equipamento utilizado. A interação entre a ponta e a superfície da amostra gera a deflexão do *cantilever* proporcional à força de interação. Na parte superior do *cantilever* um feixe de *laser* é incidido e refletido, passando por um espelho e alcançando o fotodetector de quatro quadrantes. À medida que a ponta varre a amostra, as

variações topográficas e composicionais na superfície da amostra fazem com que as interações se modifiquem, provocando diferentes deflexões no *cantilever*. Essas diferenças são captadas no detector por meio dos desvios do *laser* que incide de forma diferente em cada um dos quadrantes. Essas informações são armazenadas e processadas por um computador, que as transformam em imagens topográficas. A varredura é realizada por um scanner de cerâmica piezelétrica capaz de realizar movimentos nas três direções (X, Y e Z) com precisão nanométrica. Os materiais piezelétricos sofrem deformações quando provocados por variações de voltagem, permitindo o controle da varredura. Este sistema pode direcionar o movimento da sonda ou da amostra, dependendo do equipamento. Todo esse processo está ilustrado na Figura 3.

Para alcançar resolução nanométrica, a ponta deve terminar em um grupo pequeno de átomos, este pequeno conjunto de átomos percorrerá a amostra interagindo durante a varredura por meio de forças de van der Waals, eletrostáticas, tensão superficial e outras. Para manter o contato estável com a amostra, a posição do cantilever é reajustada por um sistema de realimentação e controle que recebe informações de desvio do laser pelo sensor de quatro quadrantes, o que permite o ajuste da posição por meio do scanner de cerâmica piezelétrica. A intensidade dessas interações depende da topografia da amostra, da natureza da ponta, do meio no qual se encontra a amostra e do modo de operação do equipamento. Diferentes modos de operação podem fornecer diferentes informações, ampliando a aplicabilidade da técnica.

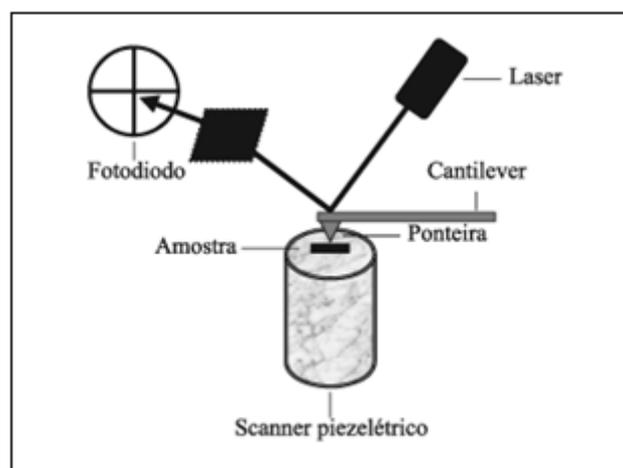


Figura 3. Esquema dos componentes básicos de um microscópio de força atômica [5].

1.2.2 Modos de operação

Existem diferentes formas de se obter imagens com um microscópio de força atômica, conhecer os modos de operação é fundamental para compreender as potencialidades do método. Os modos de operação variam em função de vários fatores, a escolha do modo a ser usado depende, também, das peculiaridades das amostras, por exemplo, amostras biológicas ou filmes poliméricos finos são sensíveis, portanto, propensas a danos causados por contato. Outras amostras, incluído as biológicas, nem sempre poderão estar adequadamente aderidas à superfície dos substratos, podendo ser deslocadas em caso de contato. A sonda também pode ser danificada quando em contato com determinadas amostras.

1.2.2.1 Modo de operação contato

No modo contato, a ponta estabelece contato físico com a amostra. Nesse caso, a força repulsiva predomina na interação entre a ponta e a amostra. Apesar da alta resolução, as forças originadas podem causar danos à amostra e a ponta da sonda ou mover moléculas que não estejam adequadamente adsorvidas no substrato; esses fatores são especialmente lesivos em caso de amostras biológicas. Sendo assim, o modo contato é indicado principalmente para amostras rígidas que não sejam facilmente danificadas e que possam ser fortemente aderidas ao substrato. O acúmulo de água na amostra pode impedir a varredura no modo contato, assim, deve-se atentar especialmente para hidrofiliabilidade das amostras.

Nesse modo de operação é utilizado um cantilever com baixa constante de mola, na faixa de 0,02 N/m a 0,05 N/m. São as chamadas sondas moles, produzidas normalmente com Si_3N_4 ou SiO_2 . Sondas moles são usadas para que haja uma boa deflexão sem danificação da amostra. A força exercida pela sonda sobre a amostra é mantida constante pelo sistema de realimentação e controle.

Durante a varredura no modo contato, o equipamento pode fornecer informações sobre variações de atrito na superfície da amostra, por meio da Microscopia de força lateral, LFM (*lateral force microscopy*) [6]. Esses dados são adquiridos por meio da torção do cantilever determinada pela fricção entre a sonda e amostra durante a varredura, como evidenciado na Figura 4.

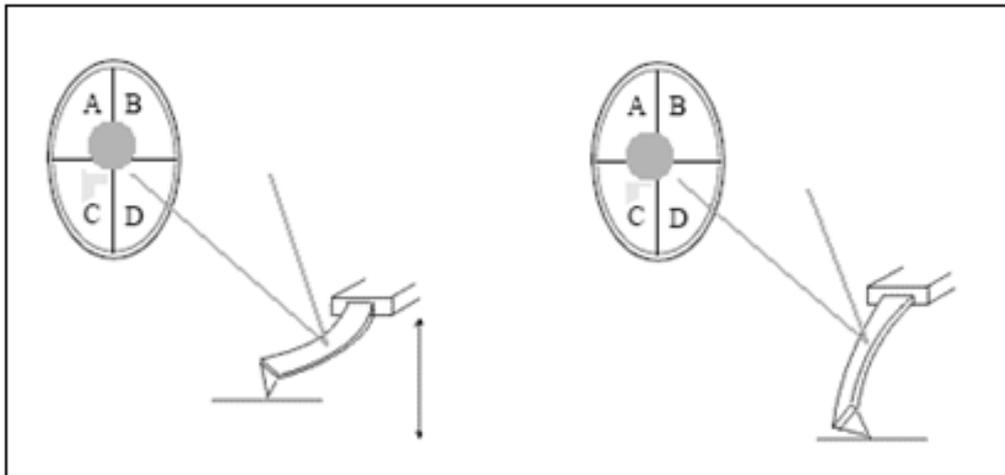


Figura 4. Representação esquemática da ação das forças sobre o *cantilever* e incidência do *laser* no detector. Na figura à esquerda, ocorre o arqueamento do *cantilever* devido à força normal, já a figura à direita representa a torção no eixo do *cantilever*.

Essas informações são especialmente interessantes quando se pretende determinar regiões compostas por diferentes materiais. Como cada material possui coeficiente de atrito único, a heterogeneidade de uma superfície será detectável nesse modo de operação. Como exemplo, pode-se citar a análise de blendas poliméricas. Por outro lado, interações que levam à fricção entre a ponta e a amostra não são adequadas para amostras sensíveis, portanto, indesejável em alguns casos.

Assim como na aquisição de imagens topográficas, as informações de atrito são obtidas por meio de variações na corrente do fotodetector, gerando imagens de força lateral. Porém, na obtenção das informações topográficas, as quantidades relativas de *laser* que incidem nas metades superiores e inferiores do fotodetector se diferem devido a um arqueamento do *cantilever* no sentido vertical, perpendicular ao eixo deste. Já as imagens de força lateral são obtidas quando as quantidades relativas de *laser* que incidem nos lados esquerdo e direito do fotodetector são diferenciada por uma torção no eixo horizontal do *cantilever*.

Já o modo de aquisição por força modulada, FMM (force modulation microscopy), também processado durante o modo de operação contato, identifica variações espaciais na elasticidade superficial local [6]. Essa forma de aquisição é especialmente útil em superfícies heterogêneas, pois possibilita a aquisição de informações relativas a propriedades mecânicas, permitindo a diferenciação dos diversos materiais que compõem uma superfície

heterogênea, a identificação de transições entre diferentes componentes da amostra, a presença de materiais orgânicos em substratos rígidos e a identificação de contaminantes. Essas informações podem ser adquiridas ao mesmo tempo em que a imagem topográfica é obtida pelo modo de operação contato.

Enquanto no modo contato convencional a ponteira é varrida sobre a amostra apenas nos eixos x e y, sentido horizontal, no modo de aquisição por força modulada, a sonda oscila em um sentido vertical sem perder o contato com a amostra, ou seja, consiste na modulação da altura no eixo z. Durante a aplicação desta força oscilante a superfície da amostra fornece resistência de acordo com sua composição e parâmetros de dureza, gerando variações na deflexão do cantilever de acordo com a resistência provida pela superfície. Para uma dada força aplicada, uma parte mole da amostra irá deformar-se mais que uma parte dura, e conseqüentemente, a deflexão do cantilever será menor.

Como ilustrado na Figura 5, o aumento da amplitude de deflexão sugere superfície mais duras e a diminuição da amplitude de deflexão aponta superfícies mais moles.

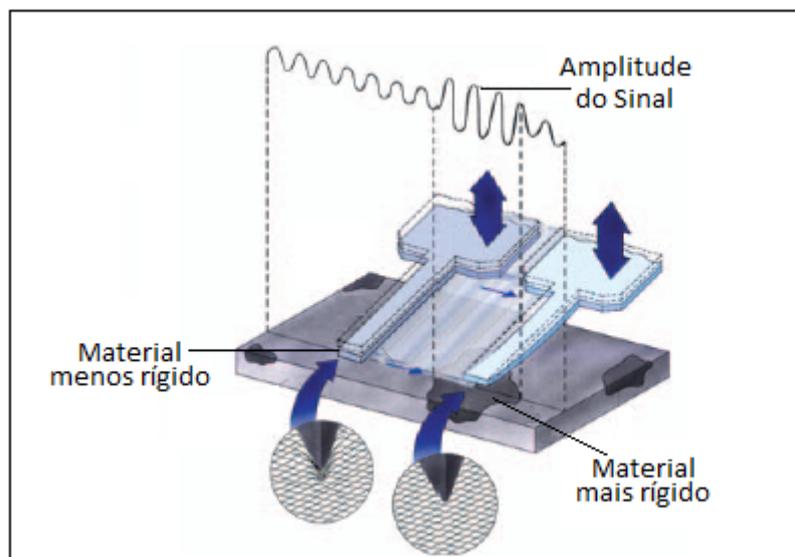


Figura 5. Representação esquemática do princípio de modulação de força. A amplitude de deflexão reflete as características de rigidez da amostra, permitindo a diferenciação dos diversos materiais que compõe uma superfície heterogênea [6].

1.2.2.2 Modo de operação contato intermitente

Nesse modo de operação (*tapping mode*), a ponta do *cantilever* vibra em alta frequência sobre a amostra [6], tocando-a e interagindo tanto de forma atrativa como de forma repulsiva, dependendo da distância entre a ponta e a amostra. Essa oscilação vertical reduz a interação lateral característica do modo contato e conseqüentemente diminui a fricção indesejável em alguns casos. Portanto, é uma técnica que permite obtenção de imagens em alta resolução, mesmo para amostras facilmente danificáveis ou que não estejam suficientemente presas ao substrato para aquisição de imagens no modo contato.

A ponta possui um parâmetro de oscilação constante quando não está interagindo com a amostra. Por outro lado, a interação ponta-amostra acarretará mudanças na amplitude da ressonância do *cantilever*. No momento da interação, a oscilação é necessariamente reduzida devido às perdas de energia causadas pelo contato da ponta com a amostra. As características topográficas são adquiridas por meio da redução na amplitude de oscilação da ponta no momento da interação.

No modo contato intermitente, são utilizados *cantilevers* mais rígidos, produzidos normalmente com Si, sendo assim, para este modo de operação a constante de mola varia aproximadamente entre 20 N/m a 80 N/m. Quanto maior for a constante de mola, mais rígido será o *cantilever* e conseqüentemente maior será a frequência de oscilação deste.

Durante a varredura no modo contato intermitente, o equipamento pode fornecer, além das características topográficas, informações referentes à elasticidade, viscosidade e adesividade da amostra. O contraste de fase em microscopia de força atômica é determinado pela topografia, pela viscoelasticidade e pela adesividade das amostras. Para aquisição dessas informações o equipamento deve detectar, além das alterações na amplitude de oscilação, atrasos nas fases de oscilação, ou seja, retardamentos em um ciclo de ressonância do *cantilever* decorrentes das interações. O retardamento de fase é ocasionado por superfícies mais adesivas ou moles e o progresso rápido da fase é característico de superfícies mais duras. As imagens de contraste de fase são aquisições muito úteis, inclusive para confirmação das imagens topográficas,

1.2.2.3 Modo de operação não contato

Nesse modo de operação a ponta não estabelece contato físico com a amostra (Figura 6). Nesse caso, a força atrativa predomina na interação entre a ponta e a superfície. O *cantilever* é atraído por forças de capilaridade quando há a camada de solvatação ou pelas forças de Van der Waals e eletrostáticas, quando a amostra está seca. Quando se opera no modo contato a ponta atravessa a camada de solvatação. Por outro lado, no modo não contato, com uma distância de 1 nm a 10 nm entre a ponta e a superfície, advém o risco de obter imagens distorcidas, com interferências ocasionadas pela camada de solvatação.

As forças de longo alcance que prevalecem no modo não contato são relativamente fracas, quando comparadas às forças de curto alcance. Sendo assim, o método de obtenção da imagem será diferente da metodologia empregada no modo contato. No modo não contato, o *cantilever* oscila próximo à sua frequência de ressonância (100 kHz a 400 kHz) por meio da cerâmica piezométrica. A amplitude das oscilações deve ser suficientemente grande para que a ponteira entre e saia rapidamente da camada de solvatação. As variações na frequência de ressonância causadas pelas interações ponta-amostra são detectadas para formação da imagem, diferentemente do modo contato no qual se detecta as deflexões quase estáticas do *cantilever*.

Devido às fracas interações, o modo não contato possui resolução limitada e se torna um método importante para obtenção de imagens quando as amostras são macias ou quando elas não se aderem bem ao substrato.

Para que se mantenha controlado durante as grandes variações de amplitude, o *cantilever* utilizado é duro, com constantes elásticas altas (20 N/m a 100 N/m) normalmente feitos de Si.

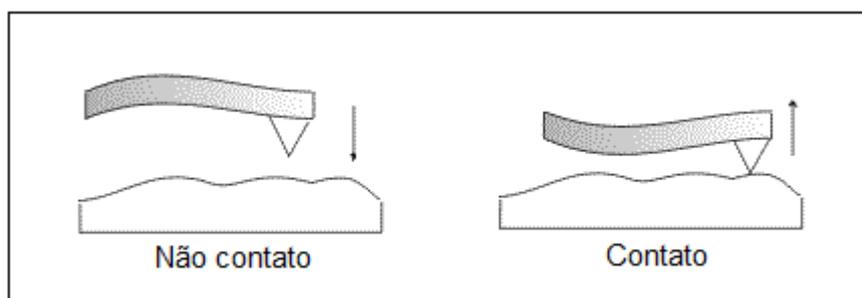


Figura 6. Deflexão do cantilever. À esquerda, o aparelho é operado na região atrativa, o método é o não-contato. À direita, a operação é na região repulsiva, modo contato [5].

1.2.3 Microscopia de força atômica e proteínas

A microscopia de força atômica tem provado ser uma poderosa ferramenta para estudos bioquímicos. As aplicações incluem a aquisição de imagens de tecidos, células e até moléculas biológicas. Comparada a outras técnicas microscópicas, o AFM possui a vantagem de adquirir imagens topográficas de materiais biológicos em três dimensões e sob variadas condições. Além disso, o preparo da amostra é significativamente mais simples, pois estas não precisam ser processadas. A resolução na escala de nanômetros permite a visualização direta de macromoléculas. Imagens de canais iônicos foram obtidas na presença e na ausência de íons com resolução suficiente para observação dos canais abertos e fechados em condições variadas [7]. A microscopia de força atômica permite também o estudo de interações proteína-proteína [8], proteína-ácidos nucleicos [9] e a determinação de outras características como dureza, elasticidade e adesão em diferentes superfícies. Alguns trabalhos recentes mostram imagens de sistemas biológicos supramoleculares com resolução suficiente para observação de uma única molécula protéica componente de um complexo, ou seja, permitem a observação das “peças” que compõem a “maquinaria biológica” [10, 11, 12], possibilitando presumir e compreender o funcionamento desses sistemas. A funcionalização das pontas, a partir do revestimento com moléculas, permite estudos de interações moleculares específicas, por exemplo, quando um anticorpo é fixado à ponta do *cantilever* e interage especificamente com moléculas do antígeno fixadas à mica [13]. Sistemas moleculares formados por proteínas de membrana têm sido estudados por Microscopia de Força Atômica sob condições fisiológicas, permitindo a investigação de fenômenos dinâmicos característicos desses complexos. Em estudos recentes, as proteínas não são extraídas da membrana, mas sim, analisadas ainda aderidas à superfície da membrana nativa ou de membranas reconstruídas, em condições similares as fisiológicas [14]. Em outras experiências, superfícies funcionais foram desenvolvidas e empregadas nas análises por AFM [15, 16].

A adsorção das proteínas em um substrato para análise por AFM é uma etapa de fundamental importância. A adsorção da proteína é resultado de um conjunto complexo de interações intermoleculares, as quais serão influenciadas por todos os componentes presentes na amostra, incluindo as

interações proteína-proteína, proteína-substrato, proteína-solvente etc. Essas interações são conduzidas por forças dipolo-dipolo, dipolo-induzido, ligações de hidrogênio e eletrostáticas.

O substrato mais comumente utilizado em análises de proteína por AFM é a superfície de mica moscovita. A mica moscovita é um mineral do grupo dos filossilicatos, e caracteriza-se pela clivagem basal bem marcada, podendo ser incolor dependendo da pureza. A deposição hexagonal dos seus átomos ao longo de planos sucessivamente paralelos permitem uma divisão, ou clivagem, perfeita, fornecendo uma superfície lisa e regular com rugosidade da ordem de dois angstroms, essas características são essenciais para sua função de suporte na microscopia de força atômica, isso porque a resolução nanométrica dessa técnica exige uma superfície plana em nível atômico, de forma que a influência do substrato na topografia e na imagem seja mínima. A mica moscovita é um aluminossilicato, com fórmula molecular $KAl_2(Si_3Al)O_{10}(OH,F)_2$, portanto, é um mineral hidrofílico. Uma superfície recém-clivada de mica tem um grande número de cargas negativas devido à substituição isomórfica do silício (Si^{4+}) por alumínio (Al^{3+}). A valência menor do alumínio gera uma carga negativa para cada substituição. No cristal, as cargas negativas são compensadas por íons potássio (cátion de compensação), que são livres para se moverem nos canais da rede balanceando as cargas. Porém, quando a mica é imersa em solução aquosa, os íons potássio sobre a superfície se dissociam deixando a superfície negativa.

A adsorção das proteínas no substrato é uma etapa crucial para a análise, pois são amostras facilmente danificáveis e nem sempre serão satisfatoriamente adsorvidas em uma dada superfície. Proteínas que carregam uma carga líquida positiva imobilizam-se eletrostaticamente à mica, já as moléculas carregadas negativamente são imobilizadas em mica por meio de soluções tampão constituídas por cátions bivalentes ou por meio da cobertura da mica com uma fina camada de poli-L-lisina, que modifica a carga líquida da superfície. Se a adsorção da proteína à mica por meio de interações inespecíficas não for suficientemente forte, a ligação covalente pode ser uma alternativa necessária e, nesse caso, as superfícies funcionalizadas são utilizadas.

A ponta, por si só, possui um ângulo de curvatura que gera imagens falsas, mais largas (Figura 8). No entanto, a ponta não afeta a altura das partículas, portanto, o dimensionamento dessas deve sempre ser baseado na altura. Quanto menor o raio da ponteira menor será esse desvio. Caso a proteína não esteja suficientemente aderida ao substrato de mica, a imagem será comprometida pelo movimento da molécula na superfície, acarretando em perda de resolução, imagens falsas ou até mesmo na impossibilidade de aquisição da imagem. Além de afetar diretamente o experimento, as proteínas “soltas” podem danificar rapidamente a ponta do cantilever (Figura 7), acarretando na contaminação e perda precoce da ponteira, impossibilitando sua aplicação em outros experimentos e elevando os custos do trabalho. Por isso, é importante definir um modo de operação ideal para uma determinada amostra. O contato intermitente, por exemplo, permite uma boa resolução e reduz a força lateral, aumentando a vida útil da ponteira, quando comparado ao modo contato. Por outro lado, proteínas com muitos sítios hidrofílicos podem interagir tão fortemente com a superfície de mica que podem sofrer alterações em sua conformação. Nesses casos, outras superfícies podem ser utilizadas com eficiência, por exemplo, grafite pirolítico altamente ordenado (HOPG) ou superfícies de ouro. A Figura 8 ilustra alguns eventos geradores de imagens falsas.

Além de estar bem presa ao substrato, é essencial que a amostra esteja em uma concentração adequada para a análise, pois uma visualização bem definida das estruturas do analito depende da sua concentração. Para uma determinada amostra ainda não analisada por AFM, não é possível prever a concentração ideal, e normalmente essa amostra é testada em diversas concentrações. As moléculas do analito em concentrações elevadas podem formar aglomerados, o que impede a observação das estruturas moleculares singulares, e, portanto, impossibilita a determinação de suas dimensões. Em concentrações muito baixas, o analito dificilmente surgirá na imagem ou aparecerá em pequenas quantidades. Isso elevará o tempo da análise e fornecerá amostragens muito pequenas. Além disso, a baixa concentração do analito poderá dificultar as interações moleculares. Portanto, a concentração desejada é aquela que permita a aquisição de imagens bem definidas, das quais se possa inferir a maior quantidade possível de informações.

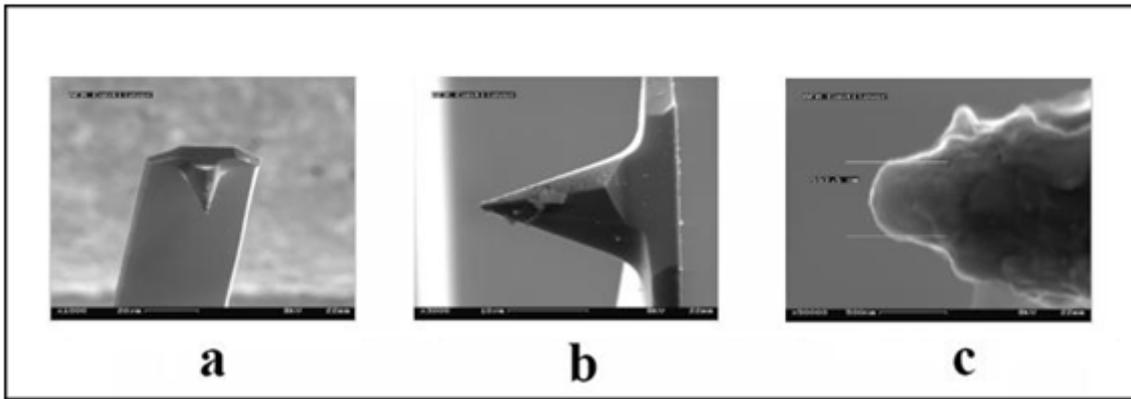


Figura 7. Imagem de microscopia eletrônica revelando contaminação na sonda de AFM. Ampliação de 1000 × (A), 3000 × (B) e 50000 × (C) [17].

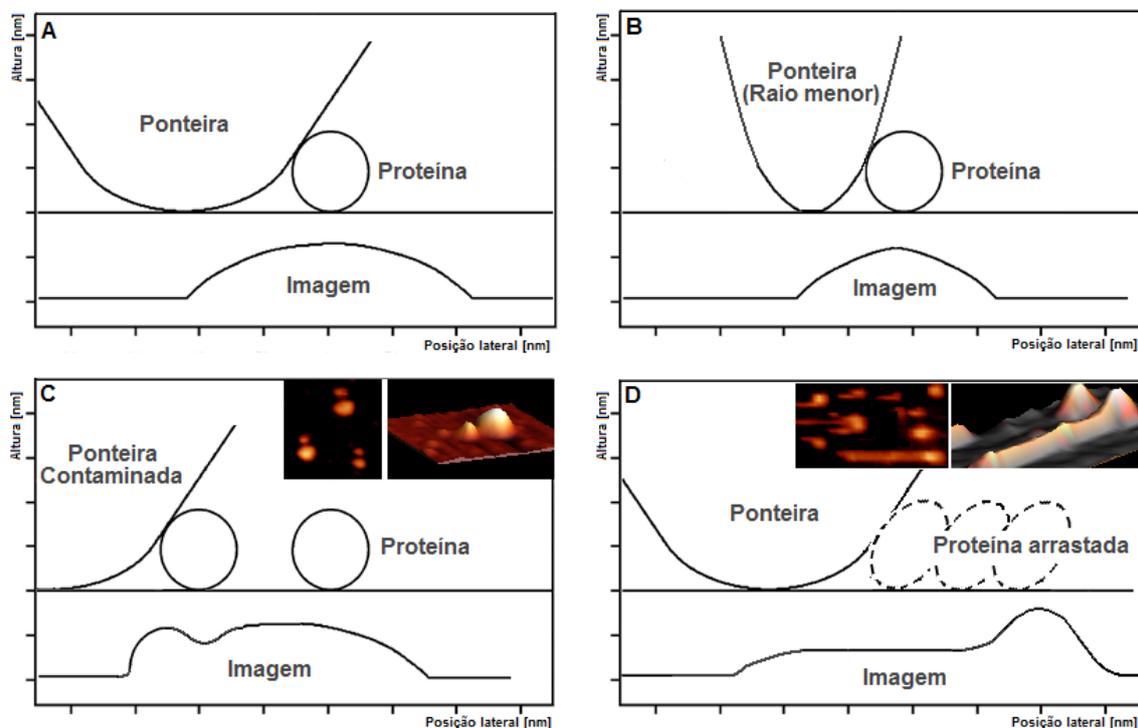


Figura 8. Eventos importantes em análise de proteínas por AFM. Efeito de ponteira dependente do raio e ângulo de curvatura da ponta (A e B), ponta contaminada (C) e proteína não fixada (D), com exemplos de imagens obtidas neste trabalho (C e D)..

1.3 Espectrometria de massa para proteínas

A espectrometria de massa é um método analítico empregado rotineiramente desde a década de 40 do século XX. Primeiramente, a técnica foi aplicada em análises petroquímicas de hidrocarbonetos. O aprimoramento dos instrumentos permitiu o desenvolvimento e a produção comercial de espectrômetros de massas com aplicabilidade na elucidação estrutural de compostos orgânicos voláteis e termicamente estáveis [18]. Porém, foi a partir

da década de 80 do século XX, com o desenvolvimento de novos métodos de ionização, que se observou uma grande expansão na aplicabilidade da espectrometria de massa, principalmente no que diz respeito às análises de biomoléculas de alta massa molecular.

A espectrometria de massa é uma técnica que fornece grande quantidade de informações estruturais a partir da determinação precisa da massa molecular, tanto da molécula intacta quanto de seus fragmentos. Por isso, é uma ferramenta analítica de grande importância na análise de proteínas.

A determinação precisa da massa molecular de proteínas por espectrometria de massa possibilita a solução de diversos problemas relacionados às questões bioquímicas e biológicas, como a identificação de proteínas, a determinação das estruturas primária e quaternária de peptídeos e proteínas, a identificação de modificações pós-traducionais, estudos de interação, além de muitas outras aplicações. O conhecimento da estrutura e da função das proteínas é essencial para a compreensão dos mecanismos celulares. As proteínas são as moléculas mais diversificadas quanto à estrutura, e por sua vez, a estrutura de uma proteína está diretamente relacionada à sua função biológica. Essa grande heterogeneidade de funções caracteriza as proteínas como as “peças” fundamentais da “maquinaria celular” e como moléculas-chaves para a compreensão de organismos vivos. A espectrometria de massa é uma ferramenta analítica sensível, precisa e poderosa para o estudo de proteínas, fornecendo diversas informações que permitem conjecturar acerca das funções biológicas de peptídeos e proteínas.

Um espectrômetro de massa contém uma fonte geradora de íons, um analisador de massa e um detector de íons. O desenvolvimento de novas técnicas de ionização possibilitou a análise de proteínas e peptídeos por meio da espectrometria de massa, a partir da década de 80 do século XX. O desenvolvimento de técnicas brandas de ionização foi especialmente útil para a ionização de macromoléculas propensas a fragmentação quando ionizadas em outras fontes de íons, permitindo inclusive a análise de complexos formados por interações não covalentes. As técnicas de ionização que predominam hoje nos equipamentos desenvolvidos para a análise de proteínas são a eletronebulização (ESI) e a desorção a laser auxiliada por matriz (MALDI). Já os analisadores de massa mais utilizados para análise de proteína são os

analisadores do tipo quadrupolo (Q), geralmente associado à fonte de ionização por eletronebulização e os analisadores do tipo tempo de voo (TOF) associado à fonte de ionização por desorção a *laser*.

1.3.1 Fontes de ionização

Antes que as moléculas de uma determinada amostra tenham sua razão massa/carga (m/z) determinada por um analisador de massas, é necessário que sejam formados os íons gasosos a serem manejados dentro dos analisadores através de campos elétricos ou magnéticos. Existem diversos métodos de ionização, sendo cada um mais adequado a determinado tipo de amostra. Os espectros adquirem características definidas pelo método usado na formação dos íons.

As fontes de íons são classificadas como fontes duras ou fontes moles [19]. As fontes duras são as que fornecem energia suficiente para que ocorra a fragmentação das moléculas do analito, já as fontes moles causam pouca fragmentação. Os espectros gerados por fontes duras possuem maior quantidade de picos e são ricos em informações estruturais; porém, se a fragmentação for exorbitante, pode resultar no desaparecimento do pico do íon molecular e, conseqüentemente, a massa do analito não poderá ser determinada.

As fontes de íons também são divididas em fontes de fase gasosa e fontes de desorção [19]. Nas fontes de fase gasosa, as moléculas do analito são primeiramente vaporizadas e posteriormente ionizadas, sendo assim, os compostos deverão ser voláteis ou termicamente estáveis para que tolere o processo de volatilização. Essas fontes também restringem a aplicabilidade do método aos compostos com ponto de ebulição abaixo de aproximadamente 500 °C e a analitos com massas moleculares menores que 103 daltons (Da). São exemplos de fontes de fase gasosa a ionização por impacto de elétrons e a ionização química. Já as fontes de desorção não requerem volatilização, o analito é simultaneamente ionizado e transferido para a fase gasosa com a introdução de alguma forma de energia. Portanto, se aplicam a amostras não-voláteis, termicamente instáveis e com massas moleculares acima de 100 mil Da [19].

Em decorrência do desenvolvimento de novas fontes de ionização por dessorção, a aplicabilidade da espectrometria de massa alcançou as espécies bioquímicas tipicamente não-voláteis, termolábeis e de alta massa molecular. Com essas fontes, a fragmentação é minimizada ou até mesmo eliminada, gerando espectros simplificados, inclusive com um único pico do íon molecular.

São exemplos de fontes de ionização por dessorção a ionização por termonebulização, a dessorção por plasma, a dessorção por campo, a eletronebulização e a dessorção a laser auxiliada por matriz. Atualmente, as duas últimas dominam a espectrometria de massa para análise de peptídeos e proteínas [19].

Na dessorção a laser auxiliada por matriz, a amostra recebe energia irradiada por um laser, o que ocasiona a ionização e a dessorção do analito. Já nas fontes de eletronebulização a amostra em uma solução ácida é pulverizada e ionizada ao passar por uma agulha mantida sob alta voltagem.

1.3.1.1 Fonte de ionização por eletronebulização (ESI)

Na eletronebulização, a amostra em uma solução acidificada é pulverizada ao passar por uma agulha, eletricamente isolada da solução por um capilar de sílica fundida e mantida sob uma elevada voltagem (4-6 kV) em relação à entrada do espectrômetro de massa. Ao atravessar a agulha, a solução forma um aerossol de gotículas carregadas. Sob a ação de gases inertes os volumes das gotículas diminuem rapidamente, o excesso de carga na superfície das gotículas gera um aumento no campo elétrico, e conseqüentemente, um aumento da instabilidade da gota causado por um aumento contínuo das forças de repulsão coulômbica. Quando as forças de repulsões coulômbicas superam a tensão superficial da gotícula, as partículas ionizadas são expulsas da gota (explosão coulômbica). As partículas ionizadas e em fase gasosa são direcionadas ao analisador de massa por gradiente de pressão. A Figura 9 ilustra e exemplifica todo o processo supracitado.

Os analitos são detectados como íons moleculares multicarregados e, conseqüentemente, o que se tem é um espectro rico em picos, vários dos quais referentes a uma mesma massa, ou seja, a uma mesma espécie com múltiplos estados de protonação. Essa particularidade observada em ESI dificulta, relativamente a outros métodos, a interpretação do espectro.

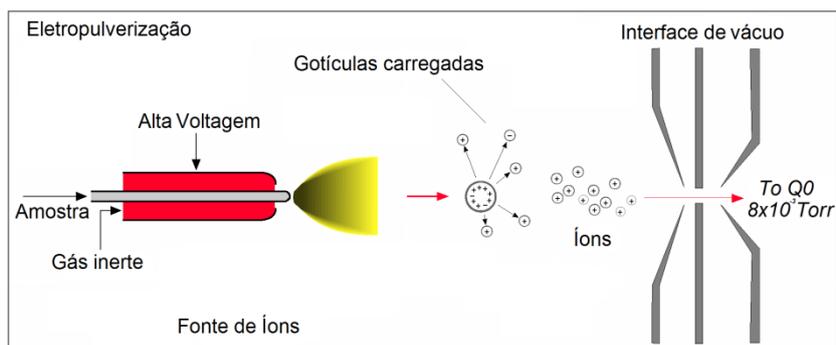


Figura 9. Método de ionização por eletronebulização. A amostra injetada atravessa a agulha mantida sobre alta voltagem. A amostra é pulverizada, formando gotículas carregadas que perdem volume à medida que o solvente evapora. O excesso de carga na superfície das gotículas causa a expulsão das partículas carregadas para fora da gotícula. Os íons gasosos assim produzidos são então dirigidos ao analisador de massa por gradiente de pressão. (*API 100/300 LC/MS & LC/MS/MS Systems Service Manual*, Perkin-Elmer Sciex Instruments, Ontario, 1997) [19].

Por outro lado, a formação de moléculas multicarregadas permite que moléculas com massas elevadas, as quais em princípio estariam fora da faixa de detecção, tenham sua massa determinada, visto que, evidentemente, o analito multiplamente carregado terá uma menor razão m/z que o analito monocarregado, com valores suficientemente pequenos para torná-los detectáveis em instrumentos com faixas de detecção limitadas.

A eletronebulização é uma técnica de ionização branda. Além da aplicabilidade em compostos de baixa massa molecular, ela é capaz de ionizar moléculas de alta massa, como peptídeos, proteínas e outras macromoléculas biológicas. Portanto, é um método de ionização que abrange uma ampla faixa de aplicações. Essa característica é especialmente útil à análise de biomoléculas, pois gera íons moleculares com pouca ou nenhuma fragmentação, mesmo quando o analito é constituído por moléculas grandes e termicamente lábeis. Por isso, tornou-se hoje uma das fontes de ionização mais importantes para a análise de proteínas, permitindo inclusive o estudo de complexos formados por interações fracas, como ligações não-covalentes. A ionização branda por eletronebulização possibilita o estudo das interações proteína-proteína, proteína-DNA, proteína-metal etc.

Outra característica importante da fonte de eletronebulização é que ela pode ser facilmente acoplada a instrumentos de separação.

1.3.1.2 Ionização por dessorção a laser auxiliada por matriz (MALDI)

Na ionização por dessorção a *laser* auxiliada por matriz, primeiramente a amostra é solubilizada em uma solução contendo um composto orgânico denominado matriz. A mistura de amostra e composto orgânico obtida é colocada sobre uma placa, na qual co-cristalizam à medida que o solvente evapora. A Figura 10 esquematiza o preparo da amostra para o MALDI.

A dessorção e a ionização ocorrem quando a rede cristalina formada absorve energia fornecida por pulsos de *laser* com comprimentos de onda no ultravioleta ou no infravermelho, conforme explicitado na Figura 11, sendo que a matriz escolhida deve ser um composto orgânico com grupos cromóforos que absorvam no comprimento de onda determinado pelo *laser*. O rápido aquecimento do cristal provoca a dessorção das moléculas do analito e da matriz, fazendo com que elas entrem na fase gasosa. A fotoionização e reações fotoquímicas secundárias formam os íons do analito.

O processo de dessorção ainda não é inteiramente conhecido. Acredita-se que a ionização das moléculas do analito ocorra por meio de transferência de prótons da matriz para o analito (ionização secundária). Isso ocorre após a ionização da matriz causada por reações fotoquímicas iniciadas com a incidência do *laser* (ionização primária).

A matriz, além de provocar a ionização do analito e de fornecer a energia necessária para sua dessorção, também impede a formação de grandes agregados protéicos difíceis de serem ionizados e protege o analito contra a fragmentação, pois absorve parte da energia irradiada pelo *laser*.

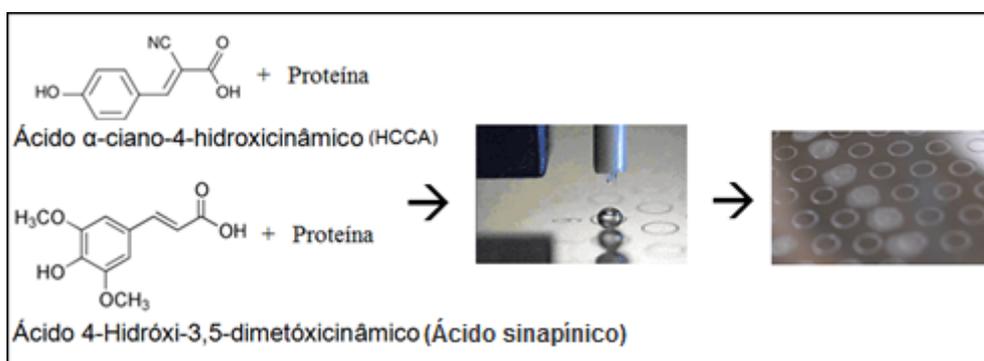


Figura 10. Preparação de amostras para MALDI. A amostra (proteína) misturada a um composto orgânico (matriz), com grupos cromóforos, em solução, é aplicada sobre a placa de MALDI onde co-cristalizam. A figura acima apresenta a estrutura do HCCA e do SA, duas matrizes rotineiramente utilizadas, a primeira para peptídeos ou proteínas de baixa massa e a segunda para proteínas de alta massa.

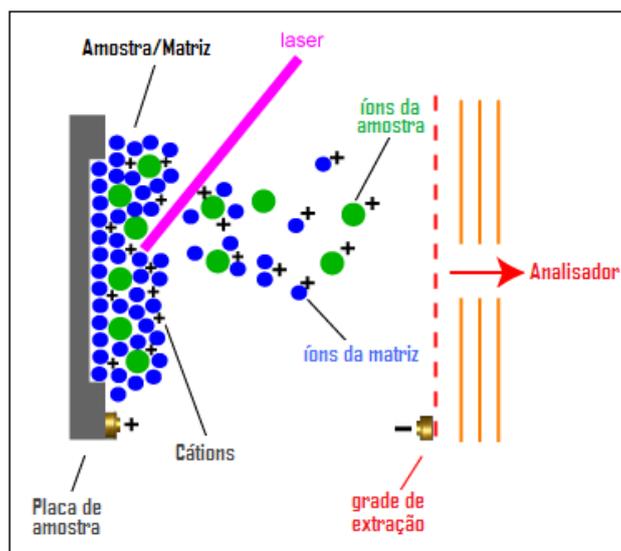


Figura 11. Processo de ionização por dessorção a *laser* auxiliada por matriz [20]. A mistura amostra/matriz co-cristalizada é irradiada por um *laser*. O *laser* fornece energia para a dessorção da matriz e do analito e desencadeia o processo de fotoionização da matriz. O analito é ionizado, após a dessorção, por transferência de carga da matriz, e finalmente atraído para o analisador de massa.

As matrizes mais utilizadas são derivadas do ácido benzóico, como ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA), comumente usados para análise de peptídeos e proteínas de baixa massa e o ácido sinapínico (SA) usado para proteínas de alta massa.

Ao contrário do que se observa na ionização por ESI, no MALDI os íons monocarregados prevalecem nos espectros, facilitando largamente a interpretação dos resultados, o que é especialmente útil quando se analisa mistura de peptídeos e proteínas. Além disso, a dessorção a laser é uma técnica de ionização habitualmente mais rápida que a eletronebulização. Por outro lado, a eletronebulização normalmente é uma técnica mais sensível. Em análises com MALDI na faixa de alta massa molar a sensibilidade é comprometida. Nesse caso, aparatos empregados em analisadores de massa que garantem boa resolução deixam de ser utilizados para aumentar a sensibilidade. Isso implica em espectros de baixa resolução, com picos largos, que comprometem a eficiência do método. Portanto, cada técnica possui suas vantagens e desvantagens, não existe regra para antecipar qual seria a fonte de ionização mais apropriada para uma determinada análise. Alguns peptídeos

e proteínas ionizam melhor por MALDI que por ESI, e vice-versa; assim sendo, são técnicas que se complementam.

Outro problema constante em qualquer técnica analítica são os contaminantes. Os sais são fortes supressores de sinal na espectrometria de massa, mas são frequentemente utilizados nos procedimentos experimentais para a preparação das soluções tampões, essenciais na manutenção da estrutura e da função de peptídeos e proteínas. Apesar da ionização por MALDI possuir maior tolerância a sais que a ionização por ESI, ainda assim, esses contaminantes podem provocar dano à resolução dos espectros de MALDI ou até mesmo bloquear inteiramente o sinal, uma vez que contaminantes salinos interferem no processo de dessorção/ionização. Para evitar esses problemas, normalmente as amostras são previamente dessalinizadas por meio de microcolunas.

1.3.2 Analisadores de massa

Após a passagem da amostra pela fonte de íons, o resultado é um feixe de íons que são acelerados para dentro dos analisadores de massa. A função dos analisadores de massa é separar os íons formados nas fontes de acordo com suas razões massa/carga.

Os primeiros espectrômetros de massa foram produzidos com analisadores do tipo setor magnético, os quais empregam campo magnético para que o feixe de íons assumam uma trajetória circular. A trajetória dos íons com base na razão m/z pode ser regulada, neste analisador, por três variáveis, $m/z = (B^2 r^2)/(2V)$, a intensidade do campo magnético aplicado (B), a diferença de potencial (V) que acelera os íons na entrada do analisador e o raio de curvatura (r) do setor magnético. De acordo com os ajustes dessas variáveis, é possível determinar os íons que alcançarão o detector de acordo com suas razões m/z . Na maioria dos espectrômetros de massa de setor magnético, os íons são selecionados mantendo-se V e r constantes, enquanto se varia a intensidade do campo magnético (B) para o direcionamento dos íons. Esses instrumentos foram amplamente aplicados às análises de compostos orgânicos.

Outros analisadores foram posteriormente desenvolvidos, entre eles, os que dominam a espectrometria de massa para proteínas, os analisadores do

tipo quadrupolo e os analisadores do tipo tempo de voo, que associados às fontes de ionização por eletronebulização e por dessorção a *laser* formam os espectrômetros de massa para proteínas. Instrumentos como o MALDI-TOF, o ESI-QqQ e MALDI-TOF/TOF possuem ampla aplicação na proteômica.

Os analisadores de massa podem ser associados em série (*tandem* MS), o que permite a realização dos experimentos denominados MS/MS. A espectrometria de massa *in tandem* envolve etapas subsequentes de separação de íons, por meio de analisadores de massa arranjados em sequência. Com algum mecanismo de fragmentação entre os analisadores, esses espectrômetros permitem a aquisição de espectros dos fragmentos de um determinado peptídeo precursor, portanto ricos em informações estruturais, possibilitando inclusive o sequenciamento de peptídeos e proteínas. É importante frisar que um instrumento equipado para *tandem* MS permanece apto a executar experimentos MS.

A fragmentação dos íons é essencial para a espectrometria de massa *in tandem* e ocorre entre as diferentes fases de análise de massa. Existem diversos métodos usados para fragmentar os íons, resultando em diferentes tipos de fragmentação, o que, portanto, se desdobra em um leque de informações estruturais distintas.

Muitas vezes, o processo de ionização é suficientemente violento para elevar a energia interna dos íons de tal forma que acarrete na fragmentação destes ainda na fonte de ionização (*in-source decay* ou *in-source dissociation* - ISD), como exemplo, há o fenômeno de dissociação induzida por laser (*laser-induced dissociation* – LID). O ISD não é fundamentalmente uma técnica *in tandem*, pois não existe a necessidade de se associar dois analisadores de massa, já que os fragmentos são gerados na fonte, antes de adentrarem o primeiro analisador, porém, o ISD é frequentemente utilizado como uma etapa adicional de fragmentação na espectrometria *in tandem*.

A fragmentação característica da espectrometria de massa *in tandem* ocorre após a extração dos íons da fonte (*post-source decay* - PSD), entre os analisadores de massa, por exemplo, por meio de colisão com moléculas neutras (*Collision-induced dissociation*- CID). O método de fragmentação por CID advém de colisões compelidas aos íons contra átomos ou moléculas neutras em fase gasosa (Figura 13).

1.3.2.1 Analisador de massa do tipo quadrupolo

Como o próprio nome indica, os analisadores do tipo quadrupolo são formados por quatro eletrodos paralelos em forma de haste. Como mostra a Figura 12, o feixe de íons gerado na fonte de ionização passa por entre as hastes. Nessa passagem, os íons são separados, conforme a estabilidade de suas trajetórias, dentro de um campo elétrico oscilante que é aplicado aos eletrodos. Nesses analisadores de massa, cada par de hastes opostas estão conectadas eletricamente. Um dos pares apresenta um potencial elétrico aplicado de $(U + V \cos(\omega t))$ e o outro par apresenta um potencial elétrico de, $-(U + V \cos(\omega t))$, em que $V \cos(\omega t)$ é um potencial de radiofrequência (rf) aplicado aos pares e U é um potencial de corrente contínua (cc) sobreposto ao potencial de radiofrequência oscilante. Apenas íons com uma determinada razão massa/carga conseguem atravessar o analisador de massa e chegar ao detector para uma determinada razão cc/rf de potenciais aplicados, funcionando, portanto, como um filtro de massas.

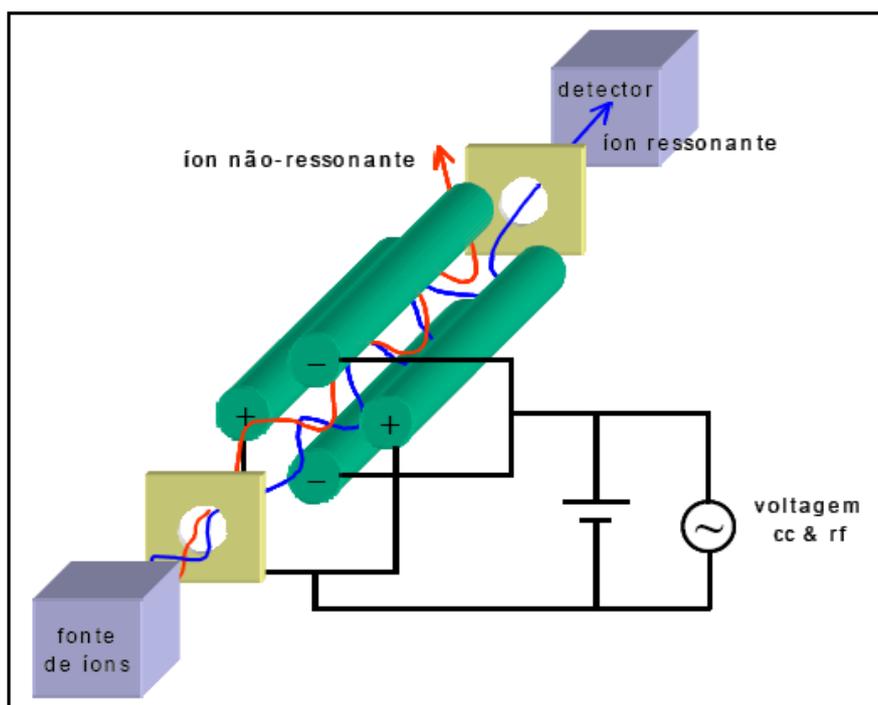


Figura 12. Princípio da separação de íons em quadrupolo [19]. Na passagem pelo quadrupolo os íons são separados conforme a estabilidade de suas trajetórias dentro de um campo elétrico aplicado aos eletrodos. A estabilidade na trajetória de cada íon depende da sua razão m/z para uma dada razão cc/rf , assim sendo, em se fazendo variar estas voltagens, somente íons com determinada razão m/z irão atravessar o quadrupolo, enquanto os outros íons serão desviados da trajetória central.

Os equipamentos do tipo quadrupolo com fonte de ionização por eletronebulização possuem uma importante particularidade: a facilidade de associação com instrumentos de separação, como a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e a eletroforese capilar (CZE). A eletronebulização foi a primeira fonte de ionização utilizada no acoplamento entre a cromatografia líquida e a espectrometria de massa (LC-MS), pois é uma fonte de interface líquido/gás, o que torna possível tal associação. Já o analisador de massa possibilita que um íon de interesse seja estudado em particular, pois o quadrupolo pode ser ajustado para uma única razão m/z por longos períodos de tempo, essa característica é especialmente útil na associação com instrumentos de separação, nos quais o analisador poderá funcionar como um detector altamente específico, fornecendo informações adicionais referentes à massa molecular e à estrutura do analito.

Instrumentos com uma série linear de três quadrupolos, ou triplo quadrupolo, são notadamente proveitosos, essa é uma configuração que veio a ampliar vastamente a aplicabilidade em elucidações estruturais. A Figura 13 ilustra e sintetiza a metodologia de funcionamento de um instrumento com triplo quadrupolo em experimentos MS/MS.

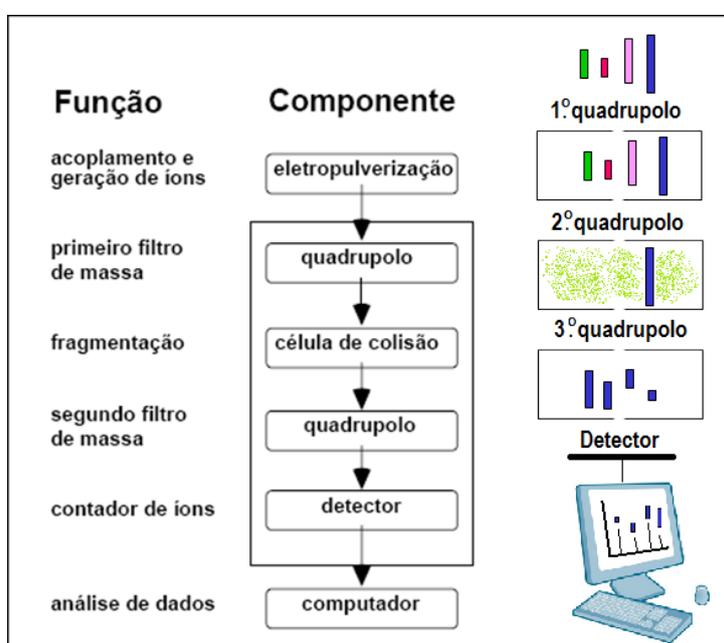


Figura 13. Princípio de funcionamento do instrumento com triplo quadrupolo. O primeiro (Q_1) e o terceiro (Q_3) quadrupolos funcionam como um filtro de massa, já o segundo quadrupolo (Q_2) é empregado como célula de colisão, no qual a fragmentação é induzida por colisão com um gás inerte.

1.3.2.2 Analisador de massa do tipo tempo de voo

Em um analisador de massa por tempo de voo, os íons gerados pela fonte de ionização são acelerados em um campo elétrico (E) antes de entrarem no analisador de massa. Ao entrarem na região livre de campo, dentro do analisador de massa, os íons viajam a uma velocidade constante inversamente proporcional a razão massa/carga, ou seja, íons com menor razão massa/carga alcançam primeiro o detector.

Os íons de carga q ($q=ze$, sendo e a carga de um elétron e z o número de cargas), acelerados em um campo elétrico E , por uma determinada distância s , adentram o analisador com uma dada energia cinética K , onde,

$$K = sEq \text{ ou } K = sEze .$$

Sabendo que a energia cinética é dada pela equação,

$$K = \frac{mV^2}{2} \text{ e, portanto, } V = \sqrt{\frac{2K}{m}} ,$$

temos que a velocidade (V) dos íons na região livre de campo é dependente de suas massas (m).

Sendo assim, o tempo que um íon de massa M e energia cinética K leva para percorrer um determinado espaço d na região livre de campo é

$$t = \frac{d}{\sqrt{\frac{2K}{m}}} \text{ ou } t = \frac{d}{\sqrt{\frac{2sEze}{m}}} .$$

Como $E = U/s$,

$$t = \frac{d}{\sqrt{\frac{2Uze}{m}}} \text{ ou } t = \sqrt{m/z} (d / \sqrt{2Ue})$$

Assim sendo,

$$V = (\sqrt{2Ue} / \sqrt{m/z}) .$$

As equações [19] admitem que o tempo de voo de um íon é diretamente proporcional a raiz quadrada da razão m/z , portanto, sugere que quanto maior for a razão m/z do íon, menor será sua velocidade e maior será o tempo para percorrer o espaço da região livre de campo até o detector. Esse princípio é ilustrado na Figura 14.

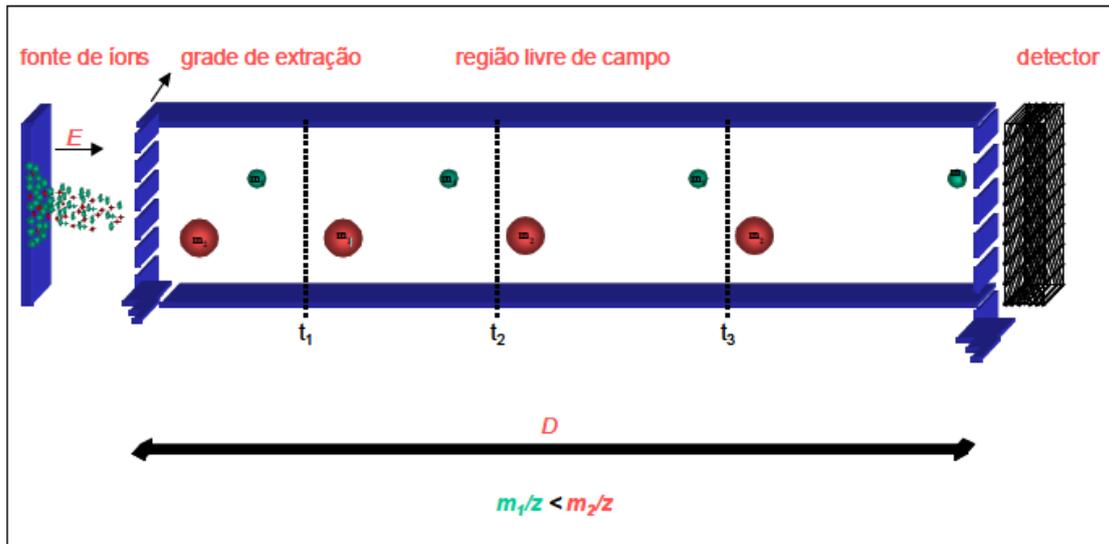


Figura 14. Princípio de funcionamento do analisador de massa do tipo tempo de voo [19]. Observam-se na figura dois modelos representativos de íons, o vermelho, de maior razão m/z , e o verde, de menor razão m/z . Como o tempo de voo é diretamente proporcional a raiz quadrada de m/z , o íon representado pelo modelo vermelho, de maior razão m/z , terá um maior tempo de voo e, portanto, alcançará o detector posteriormente ao outro íon, como exemplificado na figura.

Alguns aperfeiçoamentos nos analisadores TOF inicialmente desenvolvidos foram necessários, visto que inicialmente era um equipamento caracterizado pela baixa resolução e precisão. Os melhoramentos introduzidos ao TOF foram imprescindíveis para que esse analisador fosse hoje um dos mais utilizados em todo o mundo.

Uma das características dos analisadores TOF que contribuía para a baixa resolução era a formação dos íons com diferentes distribuições espaciais e temporais e diferentes energias cinéticas. Se os íons são formados em diferentes tempos, essa diferença permanecerá ao longo da região livre de campo até o detector. Quando formados ao mesmo tempo, mas extraídos em diferentes posições, a ação desigual do campo elétrico gera íons com diferentes energias cinéticas. Existe ainda a possibilidade de formação dos íons com as mesmas distribuições espaciais e temporais, porém, com energia cinética diferentes, portanto com velocidades distintas. Essas distribuições distintas na procedência dos íons, ilustradas na Figura 15, impedem que aqueles com idêntica razão m/z alcancem o detector em tempos suficientemente próximos para que haja alta resolução.

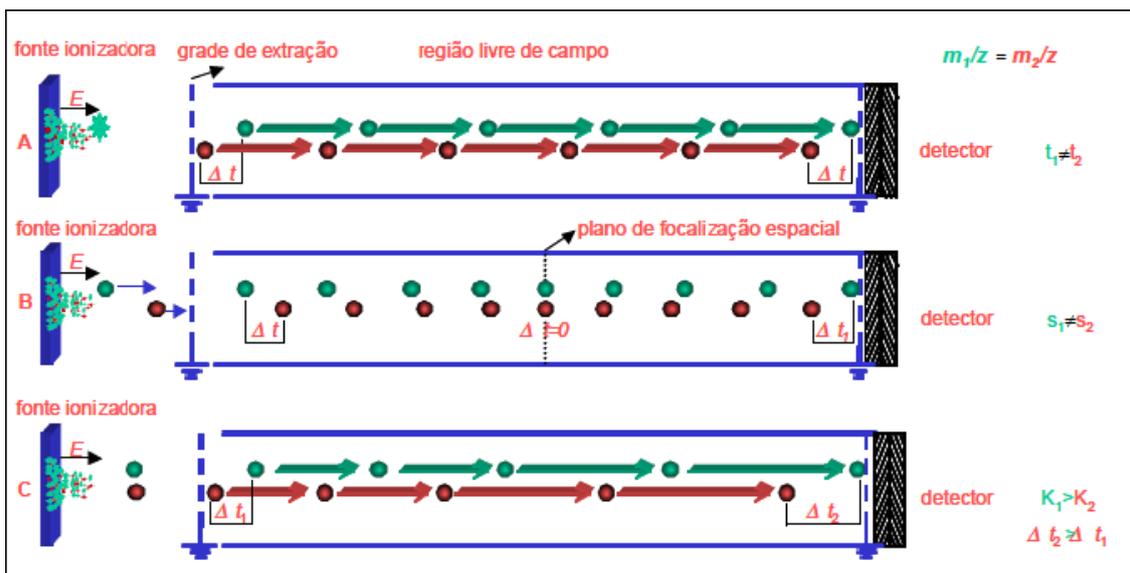


Figura 15. Formação de íons com distribuições temporal (A), espacial(B) e cinética (C) diferentes [19]. As distribuições desiguais na origem dos íons provocam a perda de resolução, pois íons com a mesma relação m/z alcançarão o detector em tempos ligeiramente diferentes.

A introdução da técnica de *delayed ion extraction* reduziu os efeitos descritos acima, aumentando o poder de resolução dos equipamentos do tipo TOF. A técnica de *delayed ion extraction*, ilustrada na Figura 16, consiste na aplicação de um campo elétrico pulsátil aplicado com um pequeno tempo de atraso em relação ao pulso do *laser*, antes que os íons atinjam a região de aceleração para a região livre de campo. Assim sendo, após a desorção, os íons posicionados distintamente contrairão diferentes energias cinéticas dentro da região do *delayed ion extraction*, corrigindo as diferenças nas distribuições espacial e cinética das moléculas do analito, contrabalanceando o retardamento original de alguns íons, dessa forma, à medida que os íons voam na região livre de campo o íon inicialmente atrasado alcançará o íon de mesma razão m/z que está adiantado, pois o primeiro terá recebido mais energia cinética adicional que o segundo na região do *delayed ion extraction*. O local onde ocorre esse encontro denomina-se plano de focalização. Ajustando-se a diferença de potencial aplicada pode-se definir o plano de focalização no detector, o que caracterizará um aumentando no poder de resolução do aparelho. A principal restrição dessa técnica é o fato do plano de focalização ser dependente da massa. Sendo assim, não é possível estabelecer uma focalização ideal ao longo de toda a escala de massa.

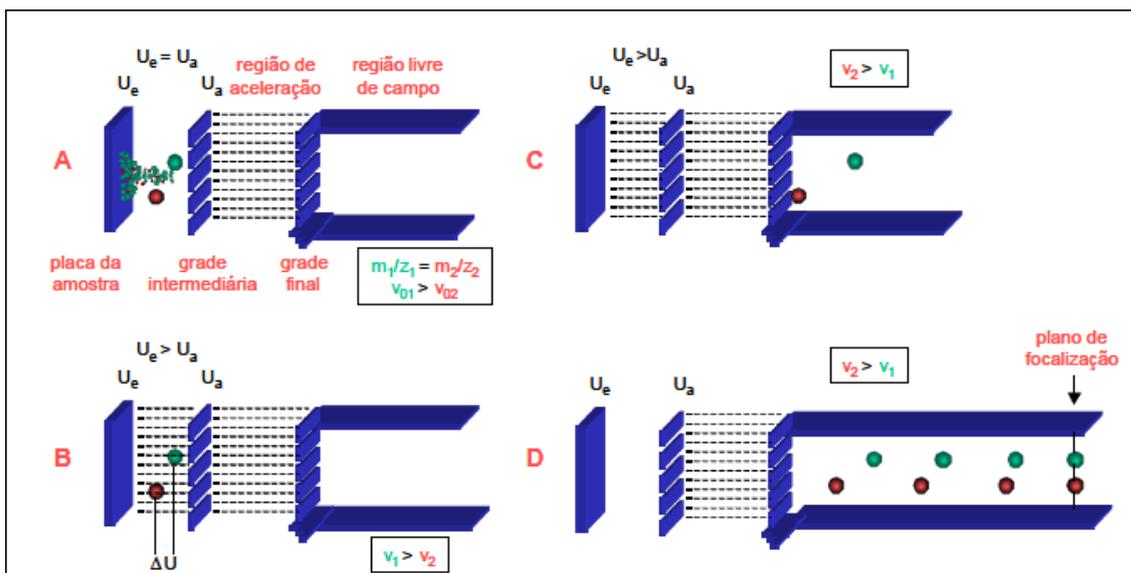


Figura 16. Princípio da técnica de delayed ion extraction [19]. As esferas verdes e vermelhas representam íons de mesma razão m/z , que em um primeiro momento (A) são originados com diferentes velocidades, e, portanto, se separam nessa região. Após um pequeno tempo de retardo referente à aplicação do *laser*, é aplicada uma diferença de potencial entre a placa da amostra e a grade intermediária, nesse caso, devido as suas diferentes posições os íons receberão energias cinéticas diferentes (B). O íon vermelho de velocidade inicial menor receberá uma maior quantidade de energia cinética e alcançará o íon verde de maior velocidade inicial (D). Se o plano de focalização for ajustado para coincidir com o detector, os íons alcançarão o detector ao mesmo tempo.

Além da técnica de *delayed ion extraction*, outra técnica direcionada para o aprimoramento da resolução dos analisadores TOF foi desenvolvida, o *reflectron*. Agindo como um “espelho iônico” o *reflectron* é colocado no extremo da região livre de campo, ampliando o espaço percorrido pelos íons e ao mesmo tempo aumentando o poder de resolução. O *reflectron* é constituído por anéis dispostos frente a frente, nos quais é aplicado um potencial elétrico crescente. Os íons de maior energia cinética adentrarão mais profundamente o interior dos anéis até que o campo elétrico redirecione-o para o detector, percorrendo uma distância maior que os íons de menor energia cinética, assim, a diferença de energia cinética inicial é equilibrada ao final da trajetória, isso porque, a diferença de velocidade, determinada pela energia cinética, é compensada pela diferença de trajetória imposta pelo *reflectron*. O campo elétrico aplicado pode ser regulado para que os íons de mesma razão m/z e originados com diferentes energias cinéticas alcancem juntos o detector. A Figura 17 ilustra o princípio de funcionamento do *reflectron*.

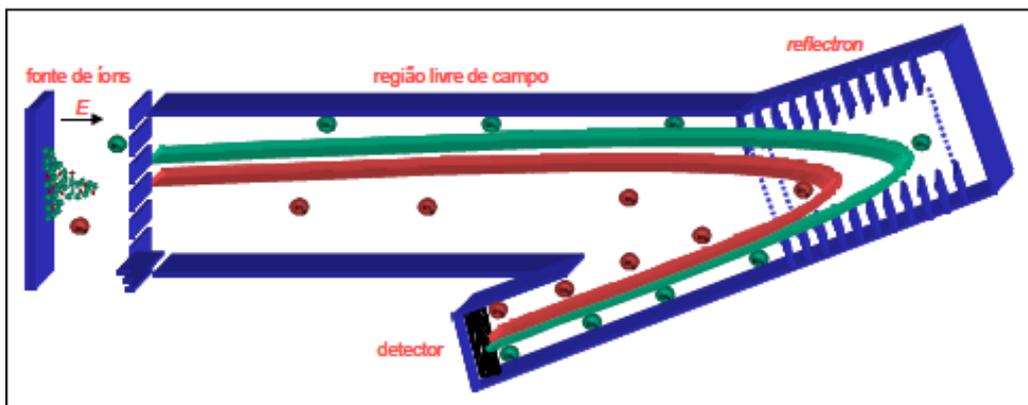


Figura 17. Princípio de funcionamento do *reflectron*. Os íons com diferentes energias cinéticas separados após a desorção e durante o vôo chegam ao detector ao mesmo tempo, devido à alteração na trajetória estabelecida pelo *reflectron* que compensa a separação inicial.

Os aprimoramentos citados, *delayed ion extraction* e *reflectron*, permitem um alto poder de resolução nos analisadores de massa do tipo TOF.

As vantagens dos espectrômetros de massa do tipo MALDI-TOF incluem sua alta velocidade de análise, maior tolerância a sais e outros componentes de tampões, a detecção de todos os íons em um único evento de desorção. Porém, para medidas de massa na faixa de alta massa molar, entretanto, a sensibilidade é comprometida. Portanto, para a análise de proteínas de alta massa, os dispositivos que aumentam o poder de resolução, *reflectron* e *delayed ion extraction*, podem ser resguardados para aumentar a sensibilidade. Em decorrência disso é comum que espectros de MALDI de proteínas de alta massa molar sejam pobres em resolução, diferentemente dos espectros obtidos de peptídeos e proteínas de baixa massa.

Os analisadores do tipo TOF podem ser associados em série, assim como na montagem MALDI-TOF-TOF, que pode ser utilizado tanto no modo MS quanto no modo MS/MS. Assim como no equipamento com triplo quadrupolo, nos experimentos MS/MS os peptídeos precursores são separados, fragmentados e o espectro dos fragmentos, rico em informações estruturais, permite a identificação ou o sequenciamento de peptídeos. Os fragmentos são originados por LID e CID, sendo que alguns equipamentos podem excluir os fragmentos de LID.

A técnica de ionização por MALDI e o analisador do tipo TOF são considerados o par perfeito, sendo o tipo de equipamento mais difundido em todo o mundo.

1.3.3 Detectores

O detector é o último artefato componente de um espectrômetro de massa. Ele tem por função evidenciar a chegada do íon ao final do analisador de massa, produzindo sinais elétricos quando os íons incidem em sua superfície. O registro dos íons em função da razão m/z , definida pelo analisador, fornece o espectro de massa.

Os detectores multiplicadores de elétrons são os mais utilizados na espectrometria de massa. Como o próprio nome indica, esses detectores multiplicam uma corrente eletrônica iniciada pela colisão dos íons contra o detector, esta incidência libera uma quantidade de elétrons secundários, que por sua vez, são acelerados e incidem novamente no detector liberando elétrons sucessores em quantidade maior que os incidentes, e assim por diante, resultando em uma amplificação do sinal. Os detectores de medida direta também são utilizados, esses registram o sinal por indução de corrente gerada pelo movimento dos próprios íons.

Os multiplicadores de elétrons por canais (*channel electron multiplier – CEM*), esquematizado na Figura 18, são tubos condutores emissores de elétrons em forma de corneta no qual um potencial elétrico elevado é apostado entre suas extremidades. Quando os íons incidem na parede do CEM, eles produzem um feixe de elétron, o impacto desses elétrons contra a parede interna do multiplicador provoca a emissão de vários outros elétrons, as colisões ocorrem sucessivamente no interior do detector, e a cada impacto os elétrons são emitidos em maior quantidade, são multiplicados. O sinal eletrônico amplificado é convertido em um sinal digital.

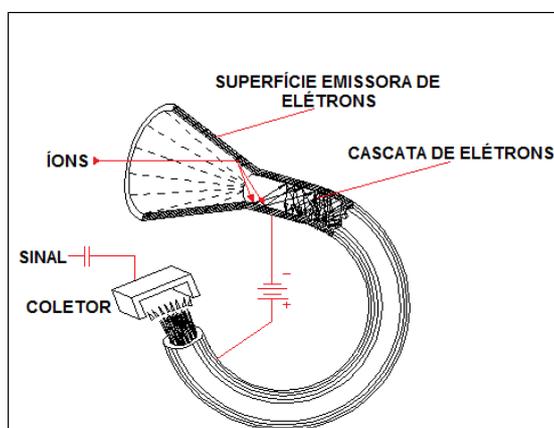


Figura 18. Desenho esquemático de um multiplicador de elétrons por canais. A incidência do íon gera uma cascata de elétron, amplificando o sinal e garantindo maior sensibilidade.

Outro tipo de detector é o de placa de microcanais (*microchannel plate detector* – MCP), esquematizado na Figura 19. Consiste em um arranjo de capilares de vidro revestidos internamente por material condutor, sob alta voltagem, que emite elétrons quando colidido por partículas carregadas. O íon que colide na parede interna dos capilares cria uma “avalanche de elétrons” secundários ou “cascata de elétrons”. Múltiplos MCP podem ser montados em paralelo, ampliando o poder de amplificação do sinal.

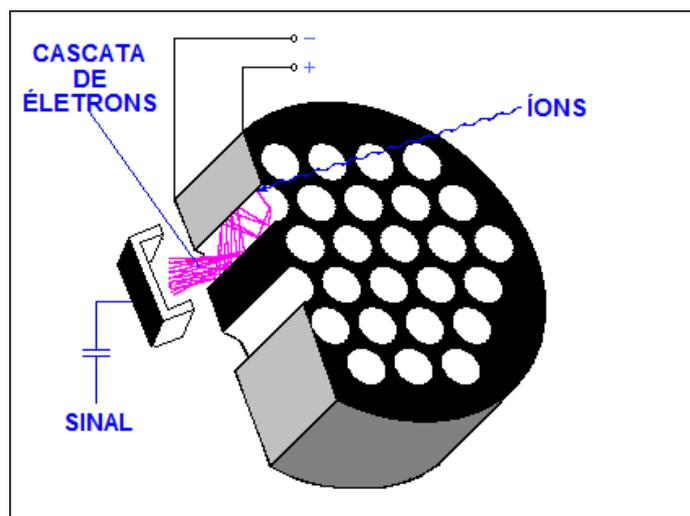


Figura 19. Desenho esquemático de um detector de placa de microcanais. O campo elétrico aplicado acelera os elétrons no interior dos microcanais, provocando emissões sucessivas e crescentes, “avalanche de elétrons”.

O ganho de sinal dependerá do rendimento das emissões secundárias, que por sua vez, é proporcional à velocidade dos íons incidentes. Sendo a velocidade dos íons inversamente proporcional à razão m/z , há uma perda de sensibilidade na medida em que se aumenta a massa do analito para uma determinada carga. Este percalço pode ser solucionado com o emprego de detectores de pós-aceleração, que aceleram os íons antes que esses alcancem o detector.

1.3.4 Aplicações da espectrometria de massa para proteínas

A espectrometria de massa é basicamente um método para determinação precisa de massas moleculares. Diversas metodologias foram desenvolvidas possibilitando que essa função básica se estendesse em uma ampla cadeia de aplicações essenciais á bioquímica e a química de proteínas.

1.3.4.1 Determinação da pureza de amostras

A espectrometria de massa pode ser utilizada para checagem da pureza de uma determinada amostra. A presença de picos inesperados sugere a presença de contaminantes.

1.3.4.2 Confirmação da sequência de aminoácidos

Um sequenciamento, por exemplo, realizado por degradação de Edman, pode ser confirmado quando a massa calculada a partir da sequência obtida for igual àquela determinada por espectrometria de massa.

1.3.4.3 Identificação de isoformas protéicas

As isoformas Protéicas são proteínas muito similares, com diferenças discretas na sequência primária, difíceis de serem separadas pelos métodos de separação convencionais como por HPLC e eletroforese. Já a espectrometria de massa possui a precisão suficiente para detectar uma pequena diferença na massa molecular das isoformas gerada por essa discreta diferença na sequência de aminoácidos.

1.3.4.4 Confirmação da expressão de proteínas recombinantes

Nesse caso a espectrometria de massa funciona como um método para o controle de qualidade em trabalhos de biotecnologia. Confirmando através da massa a expressão de proteínas recombinantes.

1.3.4.5 Quantificação de cisteínas e localização de pontes dissulfeto

A cisteína é um aminoácido que possui um grupo tiol em sua cadeia lateral, um grupo análogo sulfurado de um álcool (—SH). O grupo tiol é um bom nucleófilo, caracterizando a cisteína como um aminoácido reativo e importante, frequentemente encontrado em centros ativos de proteína. Além disso, as cisteínas podem ser essenciais na manutenção da estrutura tridimensional de proteínas quando interagem entre si formando pontes dissulfeto. Reações químicas específicas para as cisteínas que geram uma alteração na massa da proteína indicam o número de cisteínas. As posições das pontes de sulfeto podem ser determinadas com a digestão da proteína a partir de enzimas proteolíticas específicas, conhecendo-se a sequência de aminoácidos, concluem-se quais fragmentos e, portanto, quais cisteínas estão ligadas.

1.3.4.6 Determinação de modificações pós traducionais

Um processo comum de modificação pós traducional e determinante para a função de diversas proteínas é a glicosilação. A quantificação e localização de carboidratos podem ser determinadas com a utilização da espectrometria de massa. A diferença na massa da proteína glicosilada e não glicosilada permite determinar o tipo de glicosilação e também a localização dessas modificações quando se conhece a sequência de aminoácidos.

Outra modificação comum, a fosforilação, altera a atividade de diversas enzimas através da ação das proteínas quinases, que transferem um grupo fosfato do ATP para resíduos de serina (S), treonina (T) ou de tirosina (Y). Por isso é uma importante forma de regulação em diversos processos celulares e constitui grande parte das respostas desencadeadas pela ação de hormônios. A espectrometria de massa permite a identificação de sítios de fosforilação, abrindo caminho para o entendimento das vias de regulação de organismos.

A amidação na extremidade C-terminal de peptídeos é uma modificação pós traducional comum em peptídeos antimicrobianos com ação na membrana das bactérias. A amidação bloqueia reações de esterificação no C-terminal evitando uma variação na massa do peptídeo detectável por espectrometria de massa.

1.3.4.7 Identificação e sequenciamento de proteínas

Proteínas e peptídeos podem ser identificados rapidamente através de bancos de sequências. Nessa metodologia, as proteínas passam por um procedimento de digestão enzimática, os fragmentos peptídicos são analisados por espectrometria de massa, o perfil do espectro obtido é comparado com massas dos fragmentos teóricos disponíveis em bancos de dados. Esse procedimento é denominado “impressão digital do mapa peptídico” (*peptide-mass-fingerprint – PMF*).

A sequência de determinados peptídeos não pode ser obtida diretamente por sequenciamento de Edman. Os peptídeos que possuem o Piroglutamato no N-terminal não podem ser diretamente sequenciados pelo método de Edman, pois a formação do Piroglutamato (pE), a partir do resíduo de glutamato N-terminal, bloqueia a primeira etapa do sequenciamento

automático N-terminal. Portanto, a espectrometria de massa surge como uma importante alternativa para o sequenciamento de peptídeos e proteínas.

Os espectros obtidos em experimentos MS/MS por diferentes metodologias geram espectros de fragmentos peptídicos ricos em informações estruturais, possibilitando o sequenciamento de proteínas e peptídeos e também a identificação em bancos de dados. O sequenciamento por MS/MS possui a vantagem de ter experimentos menos dispendiosos e mais rápido que os sequenciamentos químicos, por outro lado, a interpretação de um espectro MS/MS é muito mais complexa e demorada.

Outra metodologia utilizada para o sequenciamento de peptídeos consiste em um procedimento de fragmentação parcial por meios de métodos químicos, por exemplo, a hidrólise ácida com HCl diluído, através do qual pretende-se obter um espectro com todos os fragmentos, espaçados por um único aminoácido e dessa forma determinar a sequência do peptídeo. Os aminoácidos em sequência são identificados registrando-se a diferença de massa entre os sucessivos picos. Esse método alternativo para o sequenciamento é o chamado “sequenciamento escada” (*ladder sequencing*).

1.3.4.8 Interações moleculares não covalentes

A maioria dos processos biológicos envolve interações moleculares não covalentes. Os processos de regulação do metabolismo, transporte e localização de biomoléculas e reconhecimento e respostas à sinais biológicos são causas, em grande parte, de interações não covalentes. A espectrometria de massa permite estudar também os processos dinâmicos, desencadeados por interações não covalentes, permitindo a compreensão de diversos mecanismos celulares. Diferentemente dos equipamentos com fonte de ionização do tipo eletronebulização, para uma observação direta do complexo por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF são necessárias alterações nos procedimentos de rotina que minimizem o rompimento das interações não covalente. As condições ácidas e os solventes orgânicos utilizados rotineiramente na preparação das amostras para MALDI-TOF, associados ao poder de dissociação do *laser*, dificultam esse tipo de estudo. A matriz mais corriqueiramente utilizada na análise de proteínas é o ácido sinapínico diluído em solução de 30-50 % de acetonitrila (solvente orgânico) e 0,1% ácido

trifluoracético (TFA, pH < 2), as condições descritas são extremamente adversas à manutenção das interações não covalentes, além disso, a própria energia do *laser* pode ocasionar a dissociação dos complexos. Contudo, em condições diversas daquelas usadas habitualmente, como as descritas por Fenhong Song [21], os complexos foram estudados em equipamentos com fonte de ionização do tipo MALDI.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2.1 Objetivos específicos

A associação da espectrometria de massa com outra técnica utilizando o mesmo suporte já foi demonstrada, quando uma amostra de proteína contida em suporte de Teflon foi analisada por espectroscopia Raman e MALDI-MS [22].

O grupo do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas da Universidade de Brasília realizou um estudo usando AFM e MS separadamente, como técnicas complementares, por meio das quais se comprovou a existência de uma forma dimérica em solução da enterolobina, uma proteína citolítica encontrada em sementes da árvore *Enterolobium contortisiliquum* [23].

A experiência com a enterolobina motivou o grupo a seguir com o desenvolvimento de métodos que possibilitassem que uma única amostra fosse submetida às duas técnicas. Os experimentos seguintes demonstraram que essa associação é possível. Nesses experimentos, proteínas adsorvidas em superfície de mica tiveram sua topografia estudada por AFM e, em seguida, na mesma superfície, foram ionizadas e analisadas por MALDI-TOF. O grupo mantém essa linha de pesquisa metodológica, na qual se insere esta dissertação, visando desenvolver ao máximo essa associação e identificar em quais aspectos as duas técnicas se complementam.

2.2 Objetivos específicos

Dando continuidade ao desenvolvimento dessa metodologia, este trabalho tem como objetivos específicos:

- Aperfeiçoar o método de associação entre as técnicas de microscopia de força atômica e espectrometria de massa (AFM-MS).
- Implementar e otimizar experimentos de digestão proteolítica sobre a superfície de mica, com o objetivo de identificar proteínas, participantes ou não de complexos protéicos, cuja topografia tenha sido previamente analisada por AFM.

- Otimizar as condições de concentração da amostra para obtenção de resultados satisfatórios por ambas as técnicas, ou seja, determinar a faixa de concentração de proteína que permita a visualização de estruturas bem definidas por AFM e que, ao mesmo tempo, seja compatível com as análises por MS.

2.3 Justificativas

Como AFM e MS são duas técnicas importantes para a investigação de estruturas, interações e funções de macromoléculas biológicas, a junção bem sucedida dessas duas técnicas provê um método conveniente para o estudo de estruturas de sistemas biomoleculares e suas interações.

A metodologia AFM-MS atenua possíveis variáveis experimentais características dos experimentos realizados de forma não associada, uma vez que é possível a ionização da amostra diretamente no suporte de mica. Quando são realizados experimentos sob condições variadas, como, por exemplo, temperatura, pH e concentrações de íons variadas, para observação progressiva das alterações estruturais nas condições diversas, esta vantagem analítica é especialmente evidenciada, pois a reprodução das condições experimentais em solução, nos experimentos não associados, seria improvável.

Um único experimento baseado na microscopia de força atômica, normalmente, fornece dados insuficientes para que sejam ostentadas conclusões categóricas, normalmente, muitas amostras são testadas até que se encontre a concentração ideal para as análises, somada ainda às possíveis variações e ajustes nas amostras para aquisição de informações adicionais. Com a metodologia AFM-MS, amostras que ordinariamente seriam descartadas após a análise por AFM podem fornecer informações suplementares por meio da espectrometria de massa, sendo assim, o método constitui vantagem analítica, principalmente no que diz respeito a amostras escassas ou raras.

Superfícies funcionalizadas vêm sendo desenvolvidas e largamente empregadas à microscopia de força atômica como reforço aos estudos de interações. Atualmente, a principal função das superfícies funcionais incide em aumentar a capacidade de adsorção das macromoléculas, estabelecendo uma imobilização mais eficiente, inclusive através de interações covalentes

específicas. Esta forte ligação entre o substrato e a superfície é uma etapa essencial para a aplicação da técnica de reconhecimento molecular por microscopia de força atômica, na qual, a ponta da sonda, também funcionalizada, varre a amostra. Esta técnica envolve a detecção da interação entre o ligante aderido à ponta e o receptor aderido à superfície.

Diversos procedimentos de funcionalização de superfícies utilizadas na microscopia de força atômica já foram descritos. Superfícies de ouro podem ser funcionalizadas empregando-se tióis [24]. Já a ligação covalente de proteínas à mica, frequentemente envolve a esterificação da superfície [25] ou a criação de grupos amina livres acoplados a silanóis na superfície [26]. Outras formas de superfícies funcionais são comumente analisadas, por exemplo, proteínas de membrana aderidas a membranas lipídicas nativas ou reconstituídas [27]. Proteínas que se apresentam na forma de monocamada sobre a superfície de mica são frequentemente relatadas [28 e 29] e possivelmente funcionalizam a superfície. Considerando tais possibilidades, poderemos no futuro empregar superfícies funcionais conexas à metodologia AFM-MS em estudos completos de interatoma, isso pode ser feito incubando extrato bruto sobre as superfícies funcionalizadas, com posterior análise por AFM-MS.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Associação AFM-MS

Para a associação AFM-MS foi desenvolvida uma metodologia pelo grupo do laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas que submetesse a mesma amostra às duas técnicas [30]. A Figura 20 esquematiza as etapas da associação AFM-MS, na qual, uma vez determinadas suas características morfológicas por AFM, as estruturas protéicas aderidas à superfície de mica são analisadas por espectrometria de massa, ainda sobre o mesmo suporte.

A primeira etapa dessa estratégia consiste em análises morfológicas das proteínas, a partir da aquisição de imagens topográficas da amostra, por meio da microscopia de força atômica. Para isso, primeiramente prepara-se o substrato de mica e aplica-se a solução de proteína. Após a adsorção da amostra à superfície e secagem da solução, a mica é aderida ao microscópio de força atômica por meio de uma fita adesiva dupla-face e a amostra é submetida à análise.

Após a aquisição das imagens microscópicas, a superfície de mica contendo as proteínas adsorvidas é removida do microscópio e aderida, com fita adesiva dupla-face, na placa de amostras de MALDI (Figura 21). Posteriormente à adaptação da mica à placa, a solução de matriz é aplicada sobre a amostra e então se processa a análise por MALDI-TOF.

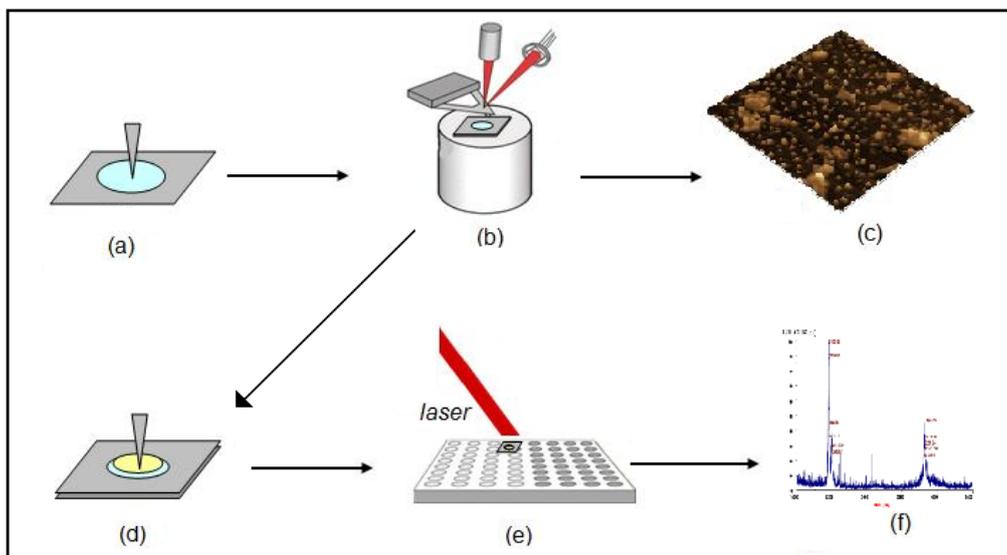


Figura 20. Esquema metodológico da associação AFM-MS. Após a aplicação da amostra na superfície de mica (a), a análise por AFM é realizada (b). Obtida a imagem por AFM (c), a mica é retirada e a matriz é aplicada sobre a sua superfície (d). A mica é adaptada a placa de MALDI, na qual se processa a ionização (e), por fim, a análise por MALDI-TOF fornece o espectro de massa (f).



Figura 21. Superfície de mica adaptada à placa do MALDI (esquerda). Amostra aplicada diretamente à placa do MALDI (direita).

Para os estudos metodológicos e análises por AFM-MS foram utilizadas as proteínas, MRJP-1 e apisimina, extraídas da geléia real de abelhas *Apis mellifera* e a ribonuclease A bovina (Sigma, St. Louis, USA). A MRJP-1 foi avaliada em quatro concentrações distintas, inicialmente em 3,7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, e posteriormente diluída e testada sucessivamente em 1/10, 1/100 e 1/1000. Após a separação por HPLC (item 3.2), a apisimina foi analisada isoladamente, a fração colhida foi diluída 100 vezes para as análises por AFM-MS. A ribonuclease A foi analisada em uma concentração de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. As proteínas foram solubilizadas em água deionizada milli-Q (Millipore, Billerica, EUA), e, para as análises, foram depositadas sobre superfície de mica recém clivada em quantidade suficiente para cobrir a maior parte da mica, sem que, no entanto, extravasasse para fora da superfície. Após a adsorção das proteínas à superfície de mica, as amostras foram submetida à análise por AFM-MS.

3.1.1 AFM

As imagens foram adquiridas em um microscópio de força atômica SPM-9600 (Shimadzu, Kyoto, Japan). O equipamento foi operado em modo contato intermitente. Além das topografias, as imagens foram adquiridas, também, em modo de fase simultaneamente. A sonda empregada foi a Tap190Al-G (Budget sensors, Sofia, Bulgária), com aplicabilidade em contato intermitente, é fabricada com silício, revestida com alumínio e caracterizada por um cantilever longo. Os resultados obtidos foram analisados através dos programas Shimadzu SPM-9600 e o WSxM versão 4.0. As amostras, solubilizadas em água milli-Q, foram depositadas sobre a superfície de mica moscovita recém clivada. A mica contendo o substrato foi fixada ao suporte de amostras do AFM por meio de fita adesiva dupla face (3M, St. Paul, U.S.A).

3.1.2 MALDI-TOF

Os espectros foram obtidos por meio de um espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF Autoflex II (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). O equipamento foi operado em modo linear e a calibração do espectrômetro de massa foi realizada com o pico m/z do padrão citocromo C (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). A matriz utilizada foi o SA (ácido sinapínico) (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ em 50% de acetonitrila (Sigma, St. Louis, USA). A análise foi realizada com a intensidade do *laser* variando entre 10 % e 20 % da intensidade máxima. A mica foi adaptada a placa de MALDI por meio de fita adesiva dupla face (3M, St. Paul, U.S.A).

3.2 Separação das proteínas por HPLC

A separação das proteínas, MRJP-1 e apisimina, foi feita por HPLC (LKB BROMMA 2150) em coluna de fase reversa Vydac C4. Como fase móvel, dois solventes foram utilizados, o TFA 0,1 % e a acetonitrila, com fluxo ajustado para 0,5 mL/min. A coluna foi equilibrada nos primeiros 5 minutos com o TFA 0,1 %, a partir daí, a eluição foi realizada com gradiente de acetonitrila, em 1% por minuto durante um período de 60 minutos, atingindo uma concentração de 60% ao fim desse período. Por último, a eluição prosseguiu atingindo, em 5 minutos, a concentração de 100% de acetonitrila, mantida constante por um período de 10 minutos. As frações foram detectadas por absorção no UV, em um comprimento de onda de 216 nm. As doze frações colhidas foram secas em concentradora a vácuo Eppendorf 5301 (Savant Instruments; Holbrook, NY) e ressuspendidas em 100 μL de água Milli-Q (Millipore, Billerica, EUA).

3.3 Digestão enzimática e identificação de proteínas

3.3.1 Digestão em mica

Nessa metodologia, exemplificada pela Figura 22, a mica com a amostra ainda adsorvida em sua superfície é depositada em um tubo eppendorf e encoberta com solução tampão de bicarbonato de amônio, na qual, se adiciona a enzima proteolítica. Após a incubação e digestão, os fragmentos proteolíticos são extraídos e aplicados diretamente sobre placa do MALDI para análise.

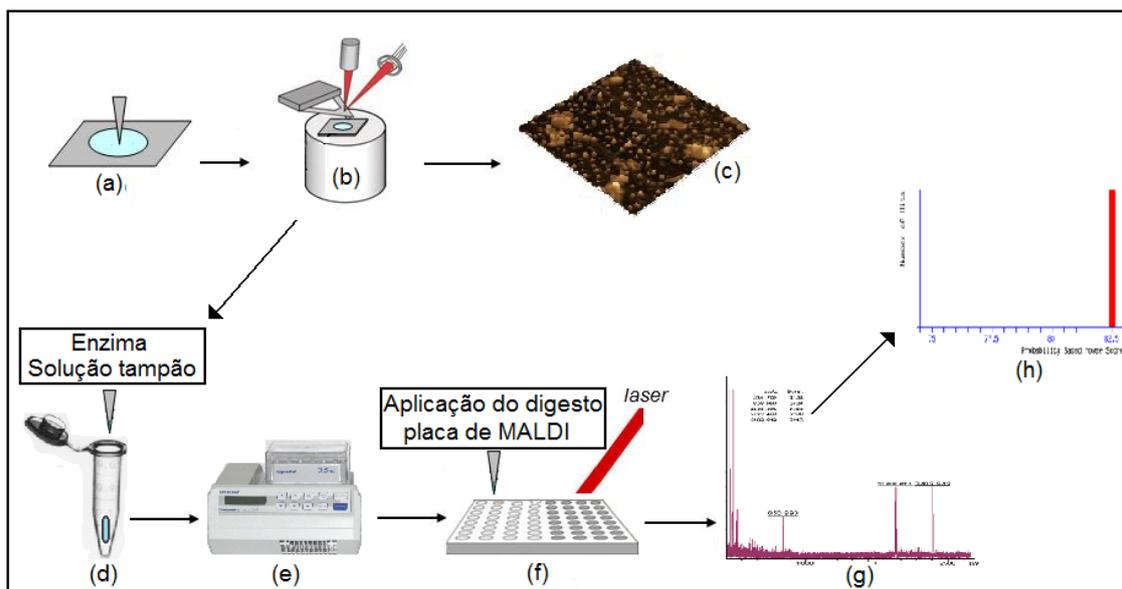


Figura 22. Esquema metodológico da digestão em mica para PMF. Após a aplicação da amostra na superfície de mica (a), a análise por AFM é realizada (b). Obtida a imagem por AFM (c), a mica é assentada em um *ependorf*, no qual se processará a digestão enzimática (d, e). Os fragmentos peptídicos obtidos são aplicados na placa do MALDI junto à solução de matriz (f) e analisados, o espectro obtido é utilizado na identificação da proteína de interesse (g, h).

Uma solução $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ribonuclease A (Sigma, St. Louis, USA) foi preparada em água Milli-Q (Millipore, Billerica, EUA) e $10 \mu\text{L}$ dessa solução foram depositados sobre superfície de mica recém clivada. Após a adsorção das proteínas à superfície e secagem da solução, a mica foi depositada dentro de um tubo eppendorf. A mica foi encoberta por $10 \mu\text{L}$ de solução tampão de bicarbonato de amônio, NH_4HCO_3 (Sigma, St. Louis, USA) 100 mmol/L ($\text{pH} \sim 8$), com $1 \mu\text{L}$ da enzima tripsina (Promega, Madison, EUA) $0,2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. A amostra, no tubo selado, foi submetida a aquecimento de $65 \text{ }^\circ\text{C}$ (Thermomixer comfort, eppendorf), por um período de 4 horas. Após a incubação, o tubo foi aberto e o aquecimento mantido por 5 minutos. Posteriormente, $1 \mu\text{L}$ de TFA 2 % em água milli-Q foi aplicado à solução. Por último, $1 \mu\text{L}$ do digesto misturado a $1 \mu\text{L}$ de matriz, HCCA $20 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ em 50% de acetonitrila, foi submetido à análise por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF para identificação da proteína conforme o item 3.4.3.

3.3.2 Digestão em superfície de mica

A Figura 23 esquematiza a metodologia de associação AFM-MS para digestão em superfície de mica seguida da identificação da proteína por PMF.

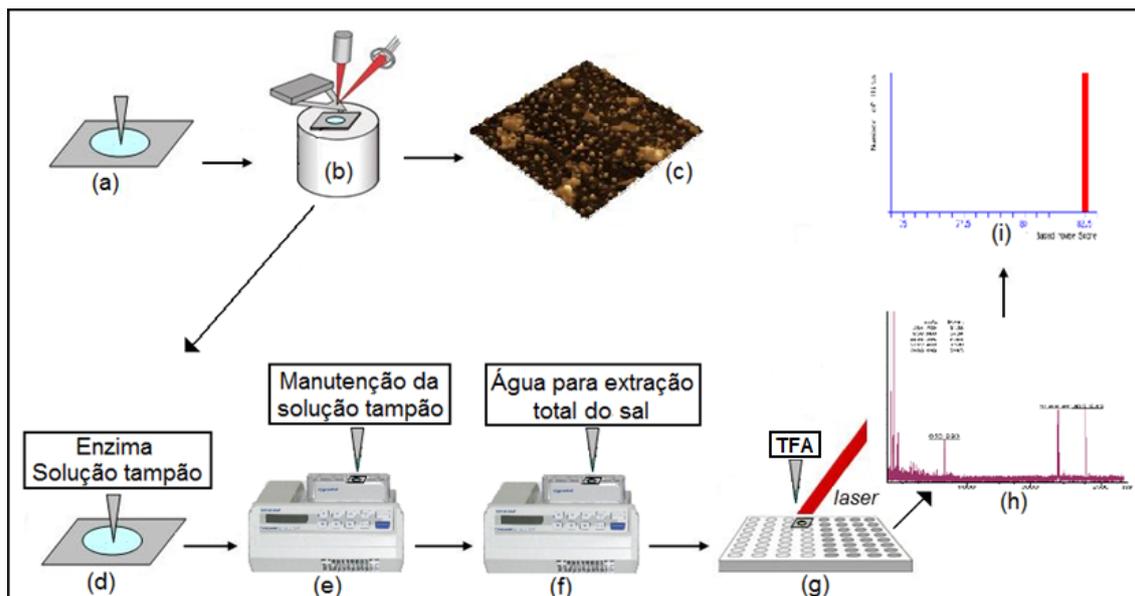


Figura 23. Esquema metodológico da digestão em superfície de mica para PMF. Após a aplicação da amostra na superfície de mica (a), a análise por AFM é realizada (b). Obtida a imagem por AFM (c), a enzima é aplicada sobre a superfície de mica (d), após a sua adsorção, adiciona-se sobre a superfície a solução tampão de bicarbonato de amônio, que deve ser reposta sempre que vir a secar (e), a última etapa consiste em aplicar água deionizada (f), após a última secagem, para garantir a extração completa do sal volátil. Após a digestão, a mica é aderida a placa do MALDI, com posterior aplicação da matriz e de solução de TFA (g) para análise e identificação da proteína (h, i)

Para a digestão em superfície de mica, 1 μ L da solução de enzima tripsina (Promega, Madison, U.S.A) foi depositado sobre a superfície de mica com as amostras adsorvidas. As frações 6, 7 e 10 colhidas no processo de separação por HPLC e diluídas em 1/100 foram analisadas. Após a adsorção da enzima e secagem da solução, adicionou-se sobre a superfície a solução tampão de bicarbonato de amônio, NH_4HCO_3 (Sigma, St. Louis, USA) 100 mmol/L em quantidade suficiente para cobrir a maior parte da mica, sem que, no entanto, extravasasse para fora da superfície. A mica foi mantida sobre um termostato (78HM-1, Biomixer) a 37°C por um período de 8 horas. O tampão foi repostado sucessivas vezes, sempre que viesse a secar. Por último, foi aplicada água deionizada, ao invés de solução tampão, após a última secagem. Após a digestão, a superfície de mica foi fixada à placa de amostras do espectrômetro de massa MALDI-TOF, por meio de uma fita dupla face (3M, St. Paul, U.S.A), para análise. Foram adicionados sobre a mica 2 a 3 μ L de matriz, HCCA 20 μ g/ μ L em 50% de acetonitrila. Após a secagem do solvente e

cristalização da amostra, aplicou-se sobre a mica 2 μL de soluções de TFA em concentrações variadas (0,1 %, 0,2 % e 0,3%). Parte da amostra sobre a mica foi extraída com solução de TFA 0,1% e foi aplicada diretamente sobre a placa do MALDI como controle. A análise foi realizada por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF (Autoflex II, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) para identificação da proteína, conforme o procedimento detalhada no item 3.4.3.

3.3.3 Identificação das proteínas

Os espectros foram obtidos por meio de um espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF Autoflex II (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Para peptídeos e fragmentos de proteínas de baixa massa o equipamento foi operado em modo refletor, a calibração do espectrômetro de massa foi realizada com os picos m/z da mistura de peptídeos Pepmix (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) e a matriz empregada foi o HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ em 50% de acetonitrila. A análise foi realizada com a intensidade do *laser* variando entre 10 % e 20 % da intensidade máxima.

Adquirido o mapa peptídico, procedeu-se à identificação das proteínas em banco de dados. A base de dados utilizada foi a NCBIInr (Matrix Science, Mascot Search). Para a ribonuclease A bovina a busca foi delimitada para a classe dos mamíferos, para isso a opção outros mamíferos (*other mammalia*) foi selecionada no quadro de taxonomias (*taxonomy*), além disso, a busca foi ajustada para desconsiderar os fragmentos gerados por clivagens perdidas (*missed cleavages*), nenhuma modificação estrutural da proteína foi ponderada para a busca (*fixed modifications* e *variable modifications*). A massa da proteína informada foi 13,7 kDa (*protein mass*), o erro admitido na busca foi de 0,7 Da (*peptide tol. \pm*). Para a identificação da MRJP-1 a busca foi delimitada para o reino animal (*other metazoa*), fragmentos gerados por uma clivagem perdida (*missed cleavages*) foram considerados, assim como, fragmentos com a metionina oxidada (*variable modifications*). A massa da proteína informada foi 52 kDa (*protein mass*) o erro admitido na busca foi de 1,5 Da (*peptide tol. \pm*). Ambas as buscas foram ajustadas para correspondência dos valores aos fragmentos iônicos protonados (MH^+) e gerados por meio de digestão trípica (*enzyme/trypsin*).

3.4 Extração do sal por decomposição

A proteína ribonuclease A bovina (Sigma, St. Louis, EUA) foi utilizada como modelo para a validação do método de extração do sal testado. Três amostras de 10 μL foram preparadas, ribonuclease A 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ em água deionizada milli-Q (Millipore, Billerica, EUA), ribonuclease A 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ em tampão de NH_4HCO_3 100 mmol/L e ribonuclease A 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ em tampão de NH_4HCO_3 100 mmol/L. Esta última amostra foi submetida a aquecimento (40 °C) por 15 minutos (Thermomixer comfort, eppendorf), com a tampa do tubo aberta. As três amostras foram analisadas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF (Autoflex II, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Para isso, 1 μL de cada solução foi aplicada à placa de amostras do MALDI juntamente com 1 μL de matriz de ácido sinapínico (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ em solução de 50% de acetonitrila. O equipamento foi operado em modo linear e calibrado com pico de m/z do padrão citocromo C (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). As análises foram realizadas com a intensidade do *laser* variando entre 10 % e 20 % da intensidade máxima.

Outro procedimento para extração do sal tamponante foi avaliado em superfície de mica. Duas amostras foram preparadas, sendo que apenas uma foi submetida ao procedimento desenvolvido para extração do sal. Assim sendo, 1 μL da amostra, procedente da fragmentação triptica das proteínas do cérebro de abelhas *Apis mellifera*, foi depositado sobre cada uma das superfícies de mica. Após adsorção dos peptídeos e secagem da solução, 2 μL de solução tampão NH_4HCO_3 100 mmol/L foram aplicados sobre as micas. Após a secagem do tampão, 2 μL de água deionizada foram aplicados sobre uma das superfícies de mica que posteriormente foi assentada sobre a superfície de um termostato mantida a 40 °C, esta última etapa foi repetida. Por último, soluções de matriz HCCA (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ em 50% de acetonitrila, e TFA 0,2% foram aplicadas sobre as micas para as análises por MALDI-TOF (Autoflex II, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). A mica foi fixada à placa de amostras do MALDI, por meio de uma fita dupla face (3M, St. Paul, U.S.A) e a calibração do espectrômetro de massa foi realizada com os picos m/z da mistura de peptídeos Pepmix (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Associação AFM-MS

A Figura 24 ilustra os resultados obtidos pela metodologia AFM-MS para a proteína Ribonuclease A bovina. A amostra analisada por AFM, ainda adsorvida em mica, foi ionizada e detectada por MALDI-TOF. A imagem evidencia a formação de uma monocamada protéica sobre a superfície de mica, tendência já prevista para a proteínas RNase A [29]. O espectro confirma a presença da proteína na superfície de mica e evidencia a pureza da amostra.

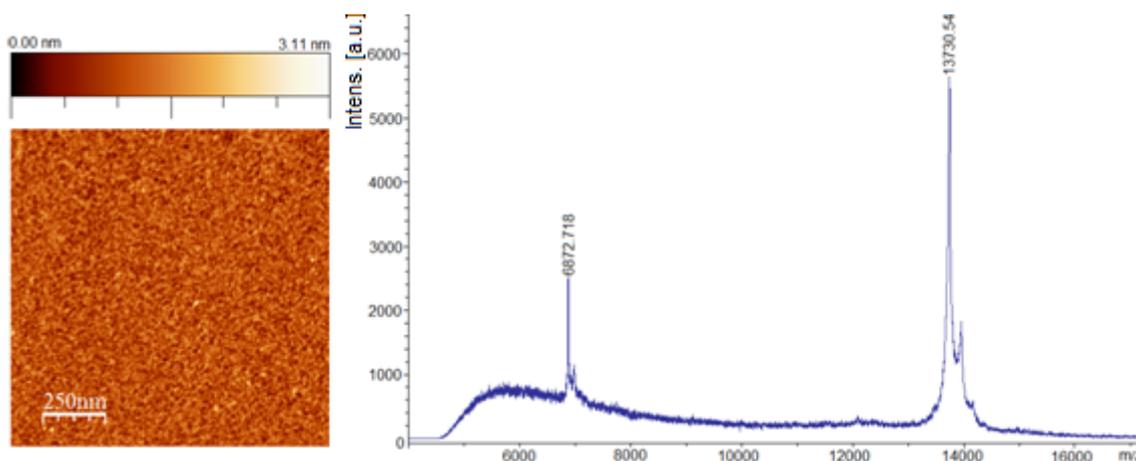


Figura 24. Imagem topográfica das proteínas (RNase A bovina) sobre a superfície de mica (esquerda) e espectro de massa da mesma amostra (direita).

Algumas vezes a mica é manipulada em contato direto com fitas adesivas. Os polímeros componentes dessas fitas podem ionizar e suprimir os sinais dos peptídeos de interesse (Figura 26). É imprescindível, portanto, evitar esse tipo de contaminação, para isso, é necessário prevenir o contato da amostra com as substâncias adesivas, isso deve ser feito evitando-se o extravasamento da solução para fora da superfície de mica e minimizando o contato da mica com a fita adesiva, como descrito na Figura 25.

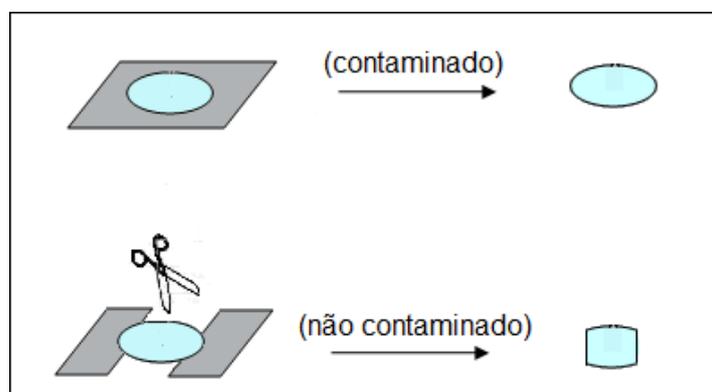


Figura 25. Montagem para fixação da mica no AFM. A montagem descrita minimiza o contato da mica com a fita, possibilitando a excisão da parte contaminada.

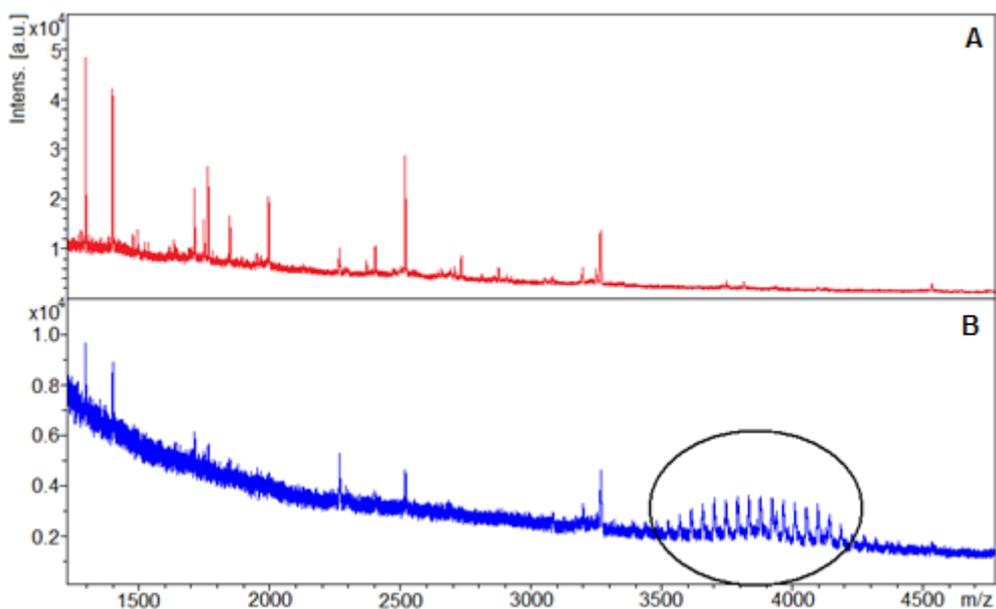


Figura 26. Comparação dos espectros de massa de fragmentos trípticos (MRJP-1). Contaminado por polímero (B) e não contaminado (A)

4.1.1 Testes de concentração

A implementação do método, utilizando a MRJP-1 como proteína modelo, permitiu que a compatibilidade entre os dois instrumentos, no que se refere a concentração, fosse testada. A concentração inicial de $3,7 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ foi avaliada.

Os primeiros resultados, ilustrados pelas Figura 27 e Figura 28, demonstram que sob essa concentração a MRJP-1 pode ser detectada por MALDI-TOF, no entanto, a formação de aglomerados dificulta a visualização das unidades protéicas, restringindo a análise por microscopia de força atômica, impedindo a determinação da morfologia e o dimensionamento das estruturas protéicas.

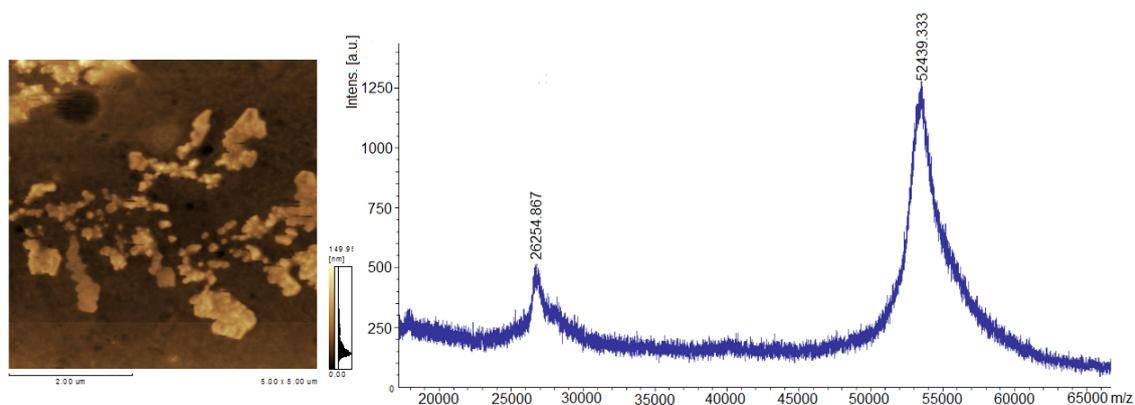


Figura 27. Proteína MRJP-1 ($3,7 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) por AFM-MS. Imagem topográfica das proteínas sobre a superfície de mica (esquerda) e espectro de massa da mesma amostra (direita).

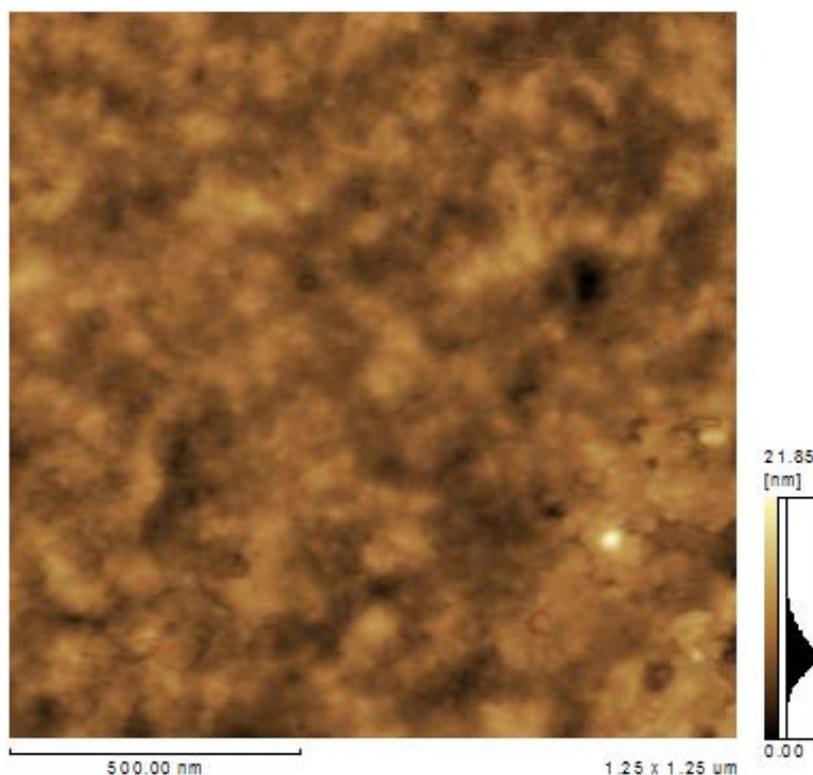


Figura 28. Ampliação de seção da imagem anterior (Figura 27), MRJP-1 (3,7 µg/µL).

A imagem acima ilustra claramente a proximidade entre as unidades protéicas e a compleição de aglomerados. A elevada concentração de proteínas impede, portanto, a visualização das estruturas singulares, assim, a morfologia e as dimensões das proteínas ou dos complexos formados não podem ser determinadas. Assim sendo, a amostra deve ser diluída para o progresso da análise.

Já o espectro se apresenta com baixa resolução, o que já era esperado para uma proteína relativamente grande (aproximadamente 52 kDa), pois na faixa de alta massa molar a sensibilidade do MALDI-TOF é comprometida. A dificuldade de ionização e de vôo das proteínas grandes dentro do analisador e a baixa velocidade de chegada desses íons de alta massa ao detector são as prováveis causas da diminuição de intensidade dos picos no espectro [31]. Como já foi dito, para aumentar a sensibilidade do equipamento e possibilitar a detecção dessas proteínas, pode-se abrir mão de artefatos que aumentem a resolução. No caso em tela, abdicou-se de se usar o refletor e o equipamento foi operado em modo linear. Em consequência disso a proteína pode ser detectada e o espectro se apresentou com baixa resolução.

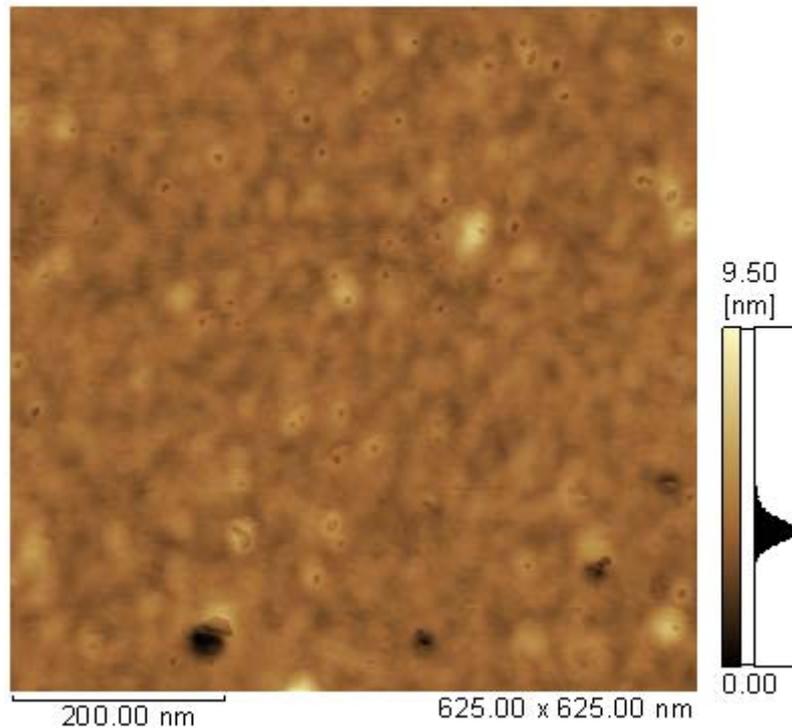


Figura 29. Imagem topográfica das estruturas protéicas obtida por AFM, amostra de MRJP-1 diluída 10 vezes ($0,37 \mu\text{g}/\mu\text{L}$).

A Figura 29 ilustra a imagem da amostra diluída em 1/10 e sugere que a concentração permanece alta para a análise por AFM. A proximidade entre as partículas ainda é elevada, o que impede que estas sejam dimensionadas. Entretanto, percebe-se que a diluição foi favorável, pois acarretou no enriquecimento da imagem, permitindo que uma possível morfologia seja presumida.

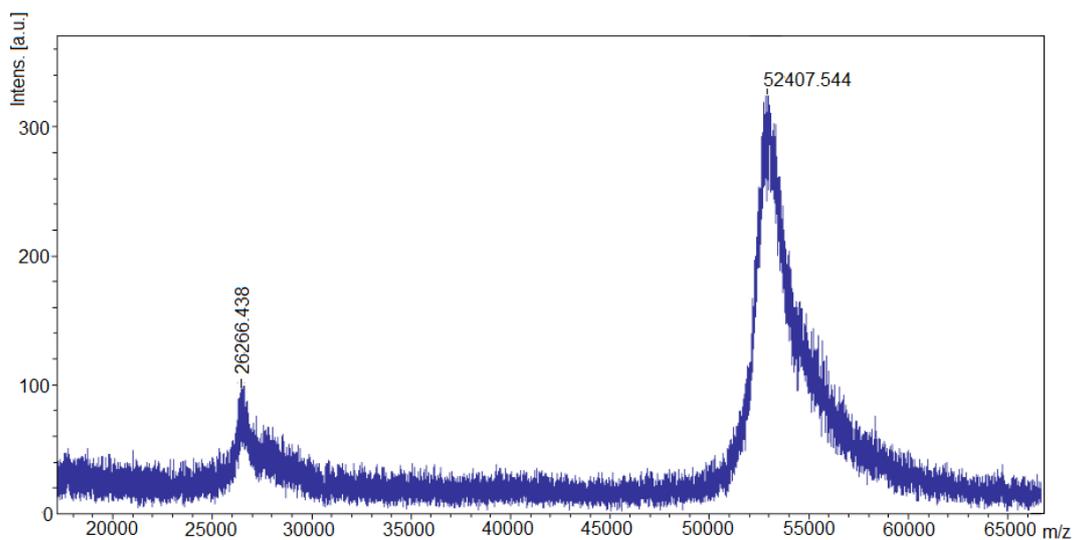


Figura 30. Espectro de MALDI-MS, em mica, da MRJP-1 diluída 10 vezes ($0,37 \mu\text{g}/\mu\text{L}$).

O espectro de MALDI-TOF (Figura 30) obtido a partir da amostra em mica, previamente analisada por AFM, evidencia que após a diluição, a MRJP-1 permanece detectável, porém, esta ainda não é a concentração mais adequada para aquisição das imagens. Sendo assim, a amostra foi novamente diluída e novas imagens foram adquiridas.

As amostras diluídas em 100 vezes foram analisadas, a Figura 31 demonstra, por meio das imagens obtidas, que grande parte das estruturas protéicas estão suficientemente espaçadas para que sejam dimensionadas. Mantém-se, porém, a formação de aglomerados.

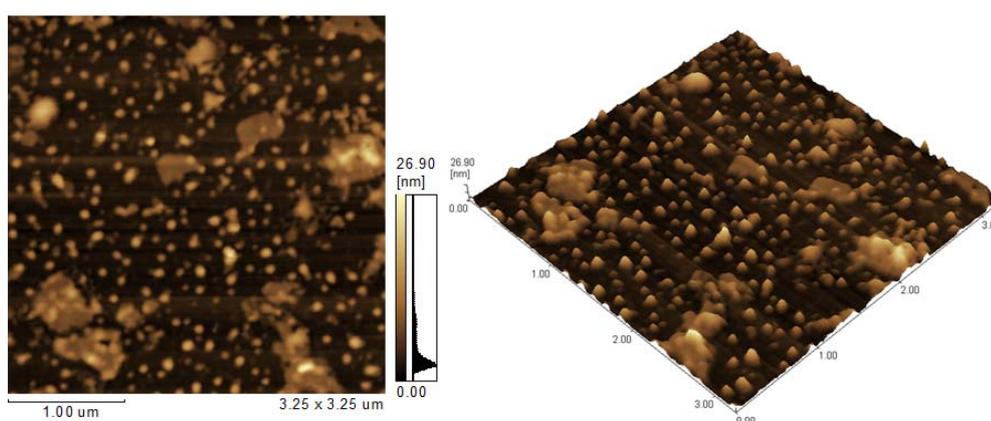


Figura 31. Imagens topográficas das estruturas protéicas obtida por AFM, amostra de MRJP-1 (0,037 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Imagem bidimensional (esquerda) e tridimensional (direita).

A detecção da proteína MRJP-1 por MALDI-MS, na amostra diluída em 100 vezes foi difícil. Em algumas análises não foi possível detectá-la. Quando detectada, o espectro de massa apresentou-se com intensidade e resolução extremamente baixas, como evidencia a Figura 32.

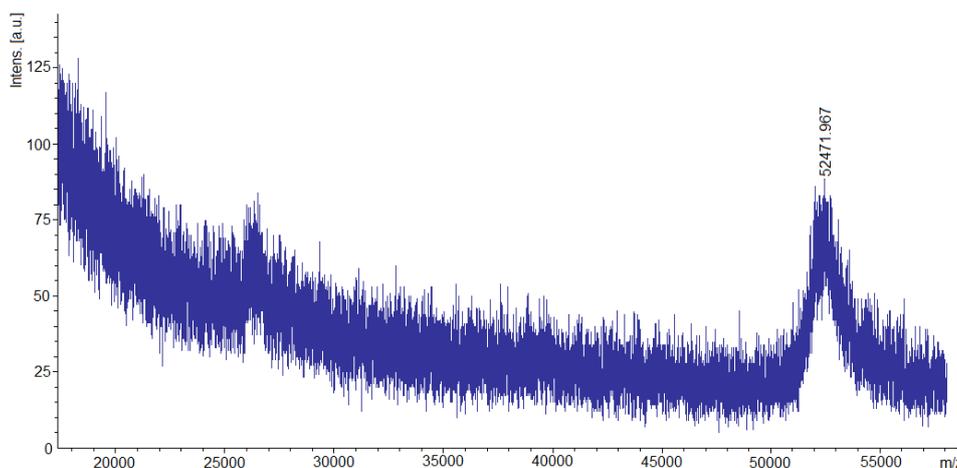


Figura 32. Espectro de MALDI-MS, em mica, da MRJP-1 diluída 100 vezes (0,037 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

Por fim, a amostra de MRJP-1 diluída em 1000 vezes foi analisada por AFM-MS. As estruturas, demonstradas pela imagem na Figura 33, estão ainda mais afastadas e todas elas podem ser dimensionadas.

Os resultados obtidos indicaram a presença de outra proteína na amostra, a apsimina (aproximadamente 5,5 kDa), frequentemente encontrada junta a MRJP-1, é tida como um possível ligante dessa proteína[]. A detecção da apsimina foi possível mesmo nas amostras mais diluídas (Figura 34), das quais se obteve as melhores imagens. As análises por AFM não revelaram a presença da proteína, pois as estruturas maiores (MRJP-1) possivelmente encobriram e ocultaram a apsimina. Nesse caso, a espectrometria de massa surge como um importante método complementar, indicando a presença do contaminante ocultado na imagem de AFM.

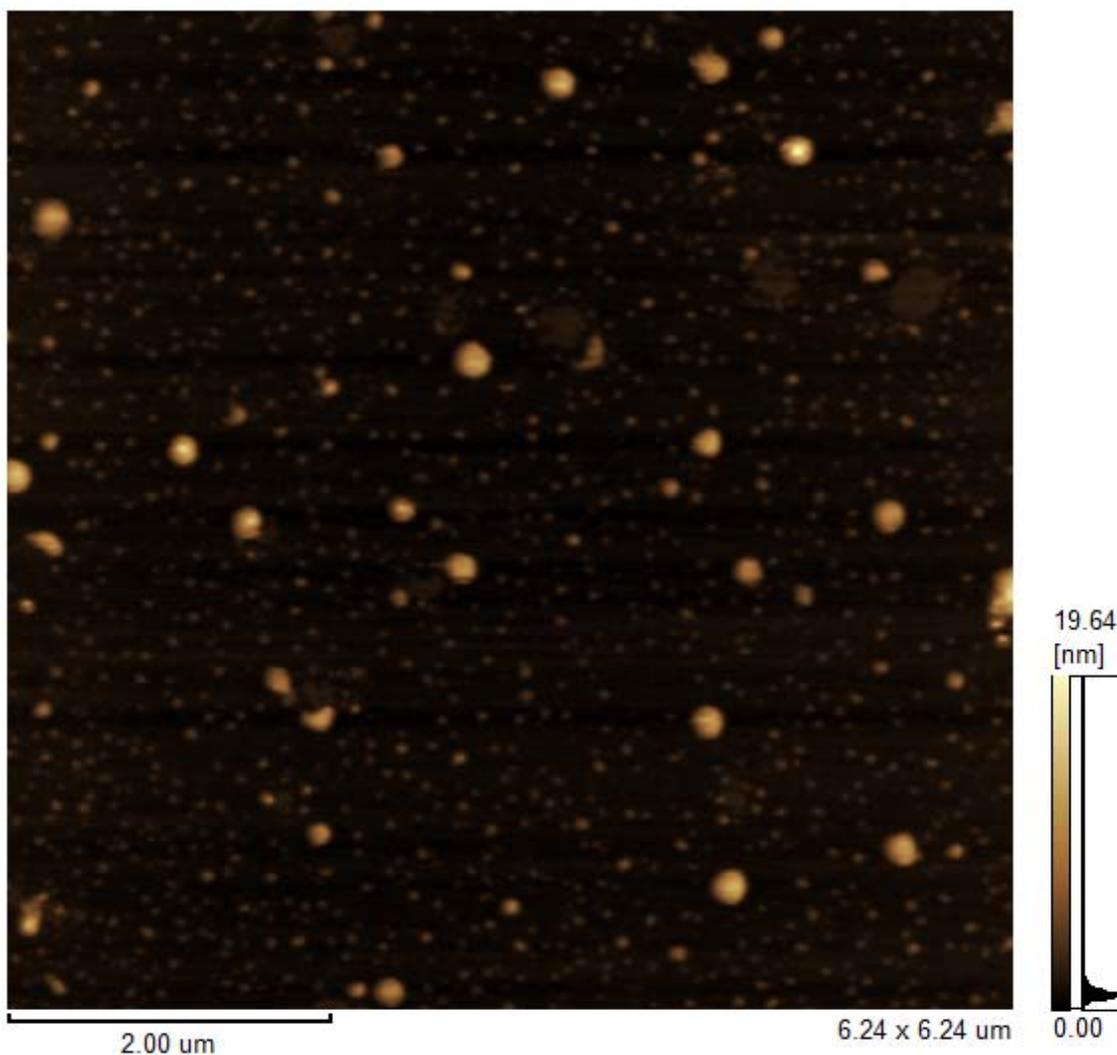


Figura 33. Imagem topográfica das estruturas protéicas obtida por AFM, amostra de MRJP-1 diluída 1000 vezes (3,7 ng/μL).

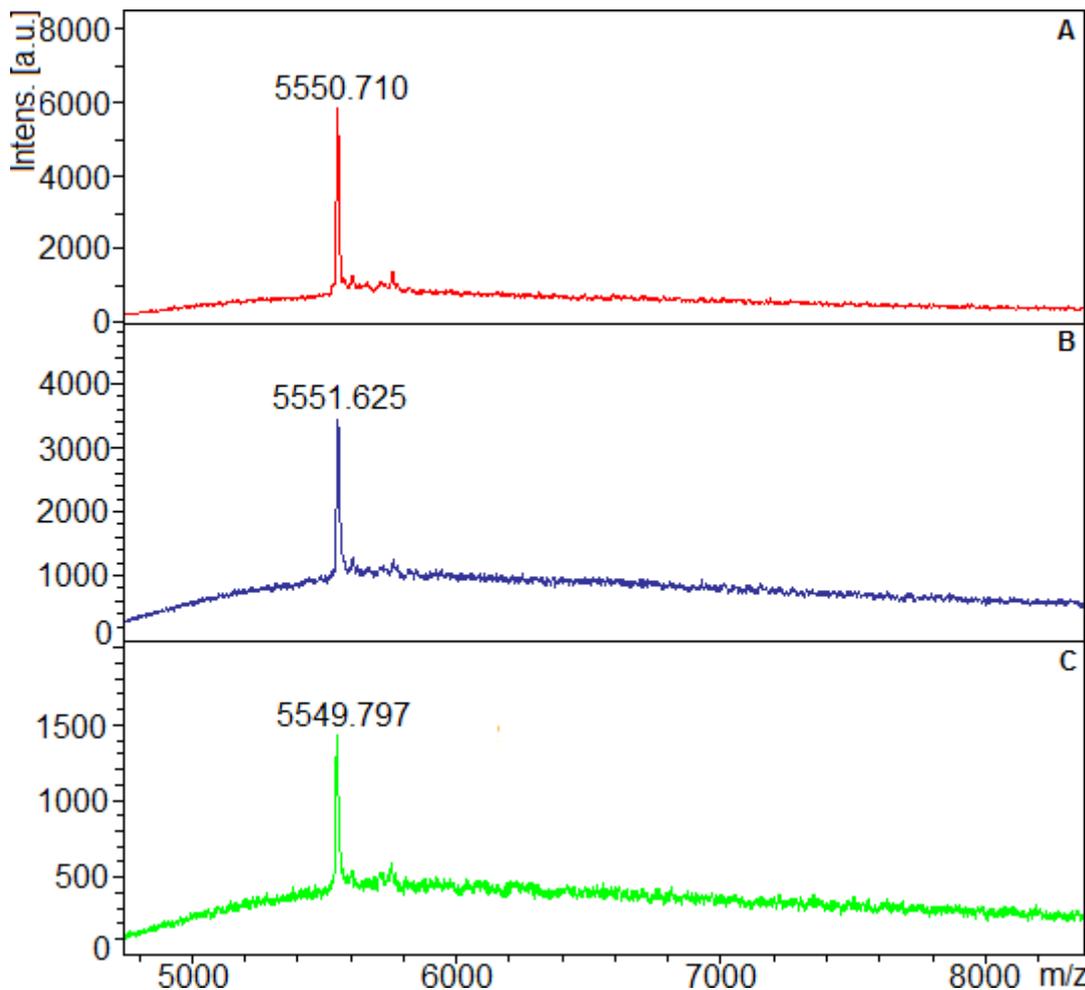


Figura 34. Espectros da apsimina obtidos em mica. Amostras diluídas 10 vezes (A), 100 vezes (B) e 1000 vezes (C).

Já foi dito que a sensibilidade do MALDI-TOF é comprometida para medidas de massa na faixa de alta massa molar, proteínas menores e peptídeos normalmente ionizam melhor por MALDI que proteínas maiores. Esse problema corriqueiro representa uma limitação ao método de associação AFM-MS. Como foi observado nos testes de concentração, as amostras devem estar bastante diluídas para que sejam adquiridas boas imagens por AFM, entretanto essa diluição excessiva pode dificultar a detecção das proteínas por MALDI-TOF. Essa dificuldade de detecção é agravada quando se trata de proteínas de alta massa. Portanto, a aplicabilidade do método AFM-MS é limitada, sendo especialmente aplicável à proteínas menores ou de fácil ionização. Os resultados corroboram com a afirmativa supracitada, pois demonstram que a associação não é apropriada à análise da MRJP-1 nativa, não fragmentada (aproximadamente 52 kDa), entretanto, possui aplicabilidade para a análise da apsimina (aproximadamente 5,5 kDa).

4.2 Extração do sal por decomposição

Um dos principais percalços encontrado no desenvolvimento de um protocolo para a digestão em mica foi a presença da solução tampão empregada na digestão enzimática. Isso porque os sais são supressores de sinal nas análises por MS, portanto devem ser extraídos da amostra. Normalmente, nos experimentos rotineiros de digestão enzimática, os sais procedentes da solução tampão são extraídos por meio de *zip-tips* (Figura 35), pontas de pipetas que contêm imobilizadas em suas extremidades colunas C18, C4 ou alguma outra resina. Entretanto, a dessalinização com *zip-tips* traz em si o problema de perda de amostra, o que pode resultar grandes prejuízos para as análises. Atualmente, uma das maiores limitações em química analítica de proteínas é o manuseio e a consequente perda de amostra, que muitas vezes podem levar à ineficiência da análise. Nas situações em questão, digestão em mica ou em superfície de mica, essa limitação é agravada, pois as análises por microscopia de força atômica requerem amostras mais diluídas, e qualquer perda poderá prejudicar as posteriores análises por MALDI-MS. Além disso, a digestão em superfície de mica impossibilita a aplicação de *zip-tips*, pois as proteínas não estão em solução. Já para a outra metodologia testada, a digestão em mica, a *zip-tips* é aplicável, porém prejudicial, pois o sistema não se apresenta mais como uma solução homogênea, mas sim com duas fases, constituindo uma interface mica-solução, na qual, passa a existir uma superfície carregada negativamente. Está particular situação potencializa a perda de amostra em um procedimento com *zip-tips*, pois parte da amostra que permanecerá adsorvida na mica será perdida no processo de dessalinização.

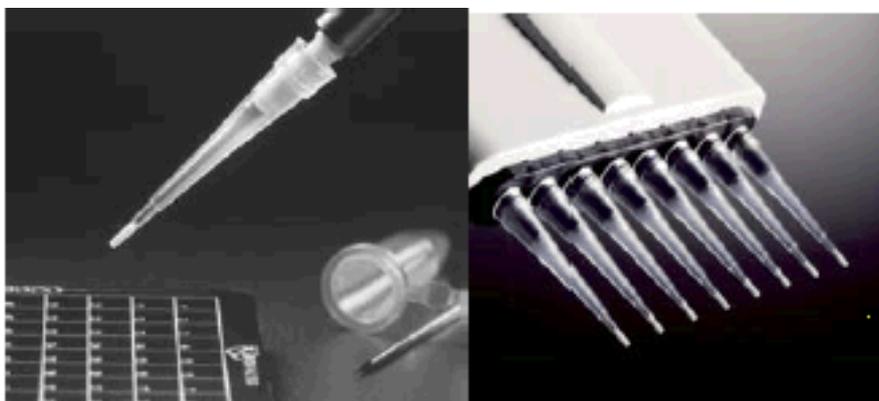


Figura 35. Fotos de *zip-tips*. Percebe-se a coluna imobilizada na extremidade da ponteira [32].

Para contornar o problema descrito a cima, uma forma alternativa para dessalinização foi experimentada. O método provado se fundamentou na utilização de um sal volátil para preparação da solução tampão. O bicarbonato de amônio se decompõe sob ação do calor, acima de 36 °C, produzindo CO₂, NH₃ e vapor de água, portanto, pode ser extraído da solução. Como resultado, tem-se um procedimento muito mais rápido e barato para extração do sal, sem perda de amostra, além de permitir a extração do sal da superfície de mica.

Confrontando os espectros apresentados na Figura 36, percebe-se que há, entre o primeiro (A) e os demais (B e C), uma grande diferença de intensidade e resolução. A influência do sal é, portanto, confirmada pelo espectro A, o qual evidencia redução na intensidade em aproximadamente 10 vezes quando comparado ao espectro da Ribonuclease A em água milli-Q. Em amostras menos concentradas, possivelmente o sal poderia causar a perda total do sinal.

As comparações também comprovam a eficiência do método utilizado para extração do sal. Na Figura 36, o espectro C ratifica a decomposição do sal tamponante ($\text{NH}_4\text{HCO}_3 (\text{s}) \rightarrow \text{NH}_3 (\text{g}) + \text{H}_2\text{O} (\text{g}) + \text{CO}_2 (\text{g})$) que praticamente se iguala ao espectro B no que se refere à intensidade e resolução. O teste, portanto, valida o método de extração do sal por decomposição, resultando em um procedimento mais rápido, simples e barato para extração do sal, quando comparado aos procedimentos de rotina.

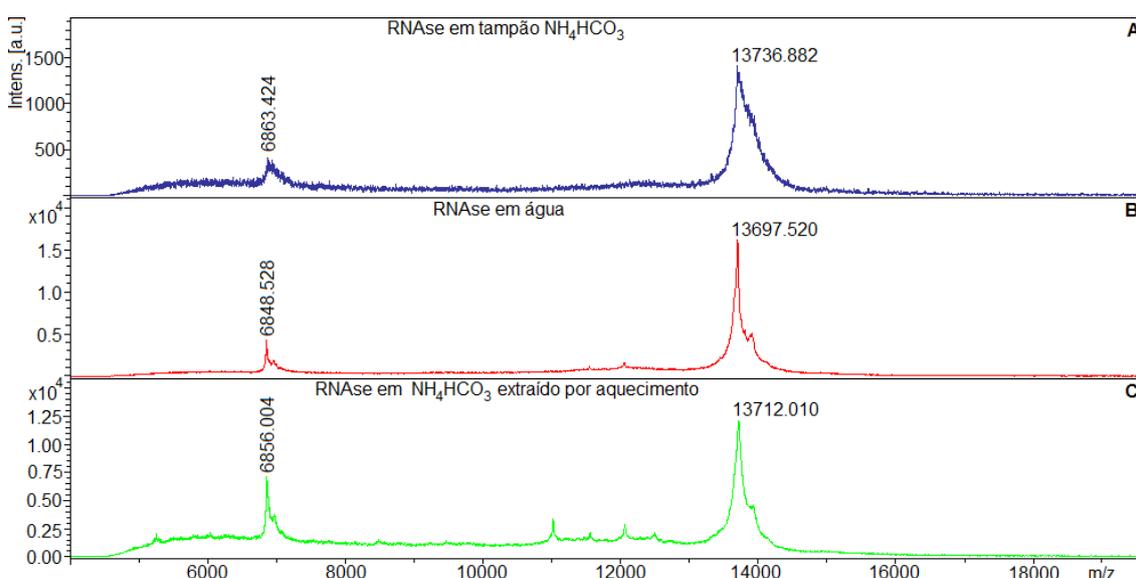


Figura 36. Comparação dos espectros de massa da proteína Ribonuclease A em tampão de NH₄HCO₃ (A), em água milli-Q (B) e em tampão extraído por decomposição (C).

O procedimento para extração de sal tamponante por decomposição também foi avaliado em superfície de mica.

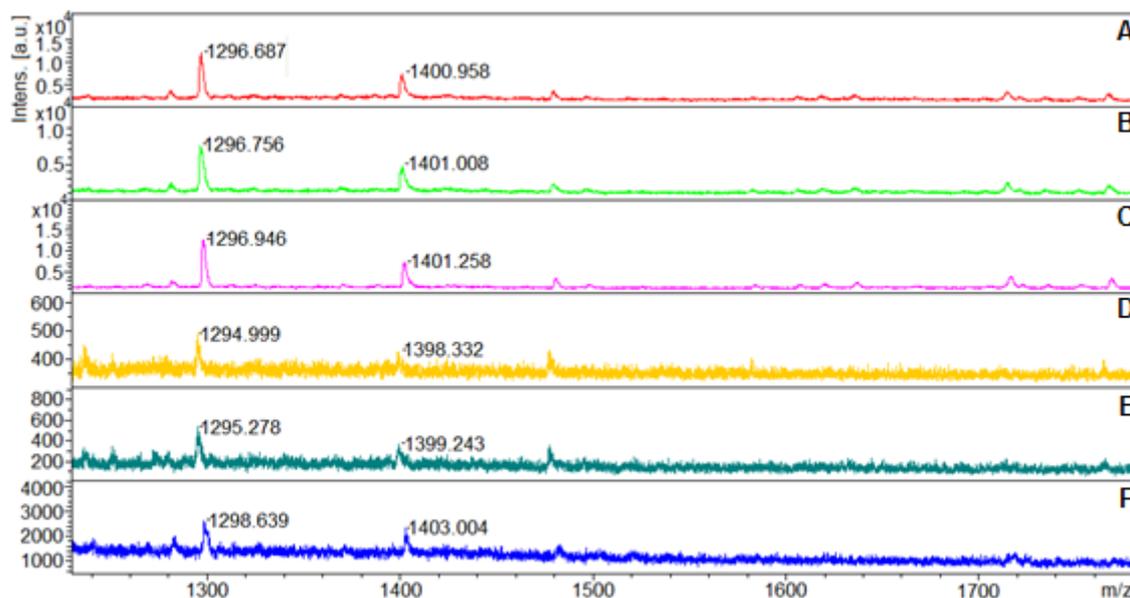


Figura 37. Comparação dos espectros de massa de fragmentos trípticos (MRJP-1) adsorvidos em superfície de mica. Amostra em tampão de NH_4HCO_3 extraído por decomposição (A, B e C) e em tampão de NH_4HCO_3 não extraído (D, E e F). Cada espectro foi obtido com tiros de *laser* em regiões distintas da amostra.

A influência do sal é visivelmente amortizada após sua extração por decomposição, percebe-se com clareza uma grande diferença na intensidade, resolução e ruído dos espectros ilustrados na Figura 37.

Agora, os espectros evidenciam a eficiência do procedimento testado, em superfície de mica, validando-o para aplicação na metodologia AFM-MS, como etapa crucial para o procedimento de digestão em superfície de mica.

4.3 Digestão e identificação de proteínas em mica

4.3.1 RNase A

A proteína ribonuclease A foi submetida ao procedimento de digestão em mica. O experimento forneceu o espectro de massa dos fragmentos trípticos da proteína, ilustrado na Figura 38.

A digestão enzimática em mica forneceu o mapa peptídico da Ribonuclease A, possibilitando a identificação da proteína que estava aderida à mica. A digestão tríptica gerou cinco fragmentos, cujos valores das massas, apurados pela espectrometria de massa, foram utilizados na identificação da ribonuclease A bovina por PMF (Matrix Science, Mascot Search) (Figura 39).

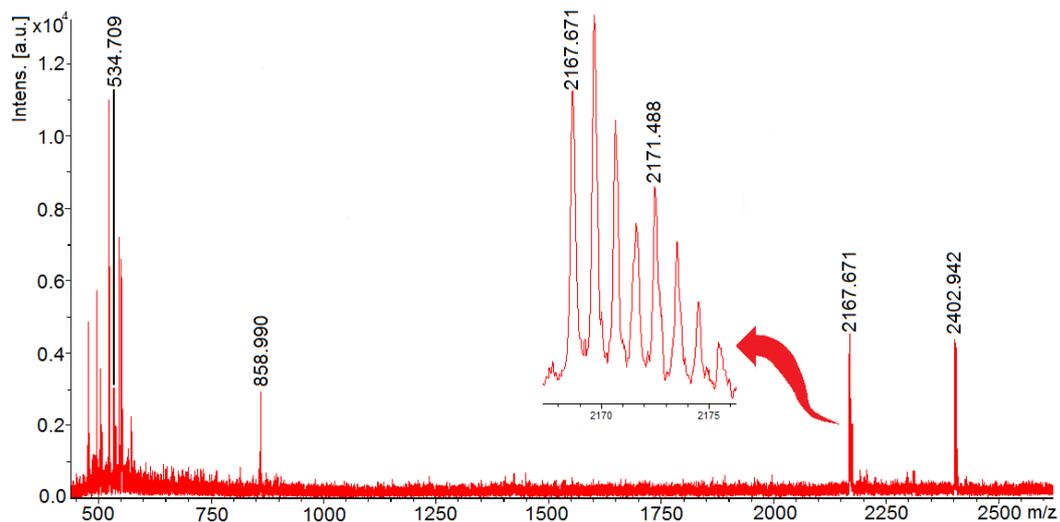


Figura 38. Mapa peptídico da Ribonuclease A originado pela digestão trípica em mica. A proteína avaliada estava previamente aderida à superfície de mica.

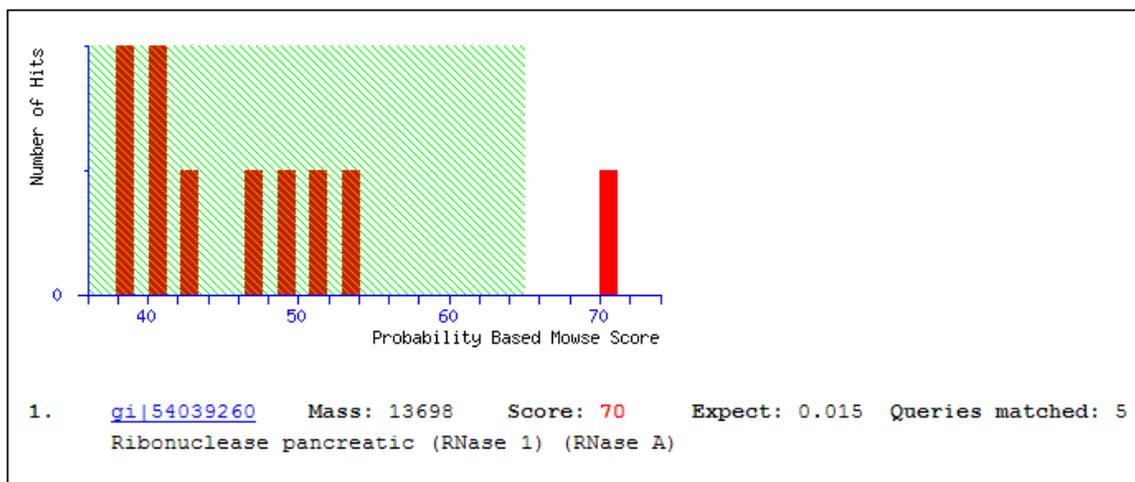


Figura 39. Resultado da busca. Identificação positiva da Ribonuclease A (Mascot Search).

O procedimento utilizado possui aplicabilidade nos estudos morfológicos e de interatoma de proteínas. Nesses estudos, as moléculas são analisadas por AFM, com aquisição de imagens ricas em informações morfológicas, e posteriormente são identificadas por espectrometria de massa.

4.3.2 MRJP1

As frações seis, sete e dez colhidas do HPLC passaram por digestão enzimática em superfície de mica. A Figura 40 mostra os espectros que possibilitaram a identificação da MRJP-1 em superfície de mica. A digestão enzimática em superfície de mica forneceu o mapa peptídico da MRJP-1, possibilitando, além da identificação da proteína (Figura 41), que outras interpretações e proposições fossem aferidas.

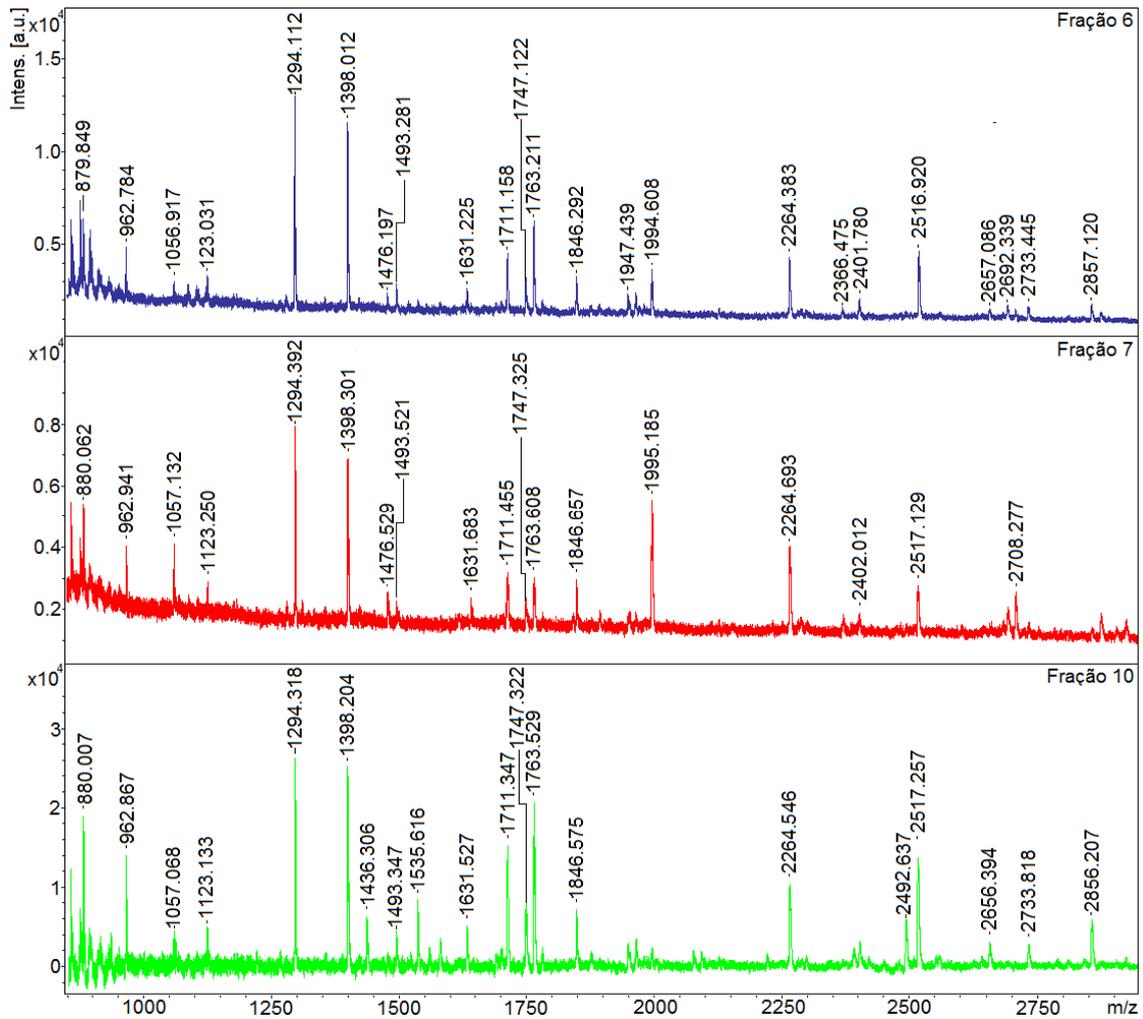


Figura 40. Espectros de massa dos fragmentos tripticos obtidos por meio de digestão, em superfície de mica, das frações 6, 7 e 10 colhidas do HPLC.

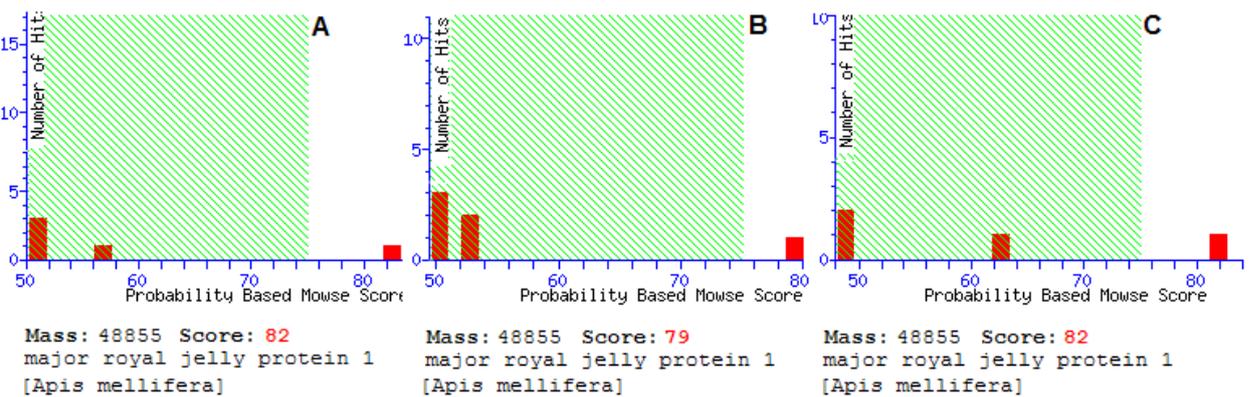


Figura 41. Resultados das buscas. Identificações positivas da MRJP-1 nas frações seis (A), sete (B) e dez (C) (Mascot Search).

A digestão triptica da MRJP-1 gerou tanto fragmentos que se localizam no início da sequência, quanto outros, localizados no fim da sequência de aminoácidos da proteína. Portanto, a estrutura primária da proteína estava íntegra. Assim, é possível concluir que a diferença entre os valores de massa

experimentais da MRJP-1, adquiridos nesse trabalho (aproximadamente 52 kDa), e o valor teórico esperado (aproximadamente 55 kDa), não é devido a excisão de parte da estrutura primária, mas provavelmente devido a ausência de determinada modificação pós-traducional. Essa conclusão reforça as suspeições de que as estruturas observadas nas Figura 57 e Figura 58 (item 4.5.3) possam ser carboidratos provenientes da glicosilação da MRJP-1.

Os picos de massa em aproximadamente 1.711 Da não correspondem a nenhum valor de massa teórico esperado, entretanto, surgem com intensidade relativamente elevada. Já os picos em aproximadamente 1.631 Da concordam com os valores de massa teóricos esperados para MRJP-1, no entanto, aparecem com intensidade inferior ao pico anteriormente citado. A diferença de massa entre esses dois fragmentos é de aproximadamente 80 Da, variação que pode corresponder a uma fosforilação. Portanto, os resultados apontam para dois prováveis resíduos, tirosina 65 ou serina 67 (NNY*PS*^{*}DIDQWHDK), como potenciais sítios de fosforilação.

Dois picos correspondem a fragmentos com metionina oxidada, em aproximadamente 1.763 Da, metionina 388 (M*VNDFNFDDVNFR) e 2.733 Da, metionina 202 (LSSLAVQSLDCNTNSDTM*^{*}VY IADEK).

4.4 Influência da mica na exatidão do MALDI-TOF

A metodologia de associação AFM-MS permitiu que o voo de proteínas adsorvidas à mica fosse avaliado no MALDI-TOF. Dessa forma, a influência da mica nos resultados obtidos pela espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF foi apurada.

Os espectros correlacionados na Figura 42, de fragmentos trípticos da MRJP-1, mostram que existe uma grande diferença no perfil dos espectros de massa após a aplicação do TFA sobre a superfície de mica. Após a digestão, em um primeiro momento, o espectro (A) da mostra, sem a adição de TFA, apresentou um perfil pobre em informações estruturais. Com a aplicação da solução de TFA 0,1%, os picos de massa dos fragmentos trípticos apareceram, enriquecendo o espectro (B). A aplicação de TFA também aumentou a exatidão dos resultados.

No momento da aplicação de TFA, parte da amostra foi extraída e aplicada diretamente à placa de MALDI para que se pudesse correlacionar os

espectros e identificar como a mica influencia a análise. Os resultados sugerem que há influência direta da mica à análise, que provoca uma evidente redução na ionização/dessorção dos peptídeos e na exatidão dos resultados obtidos por MALDI-TOF, confirmada pelo espectro controle (D).

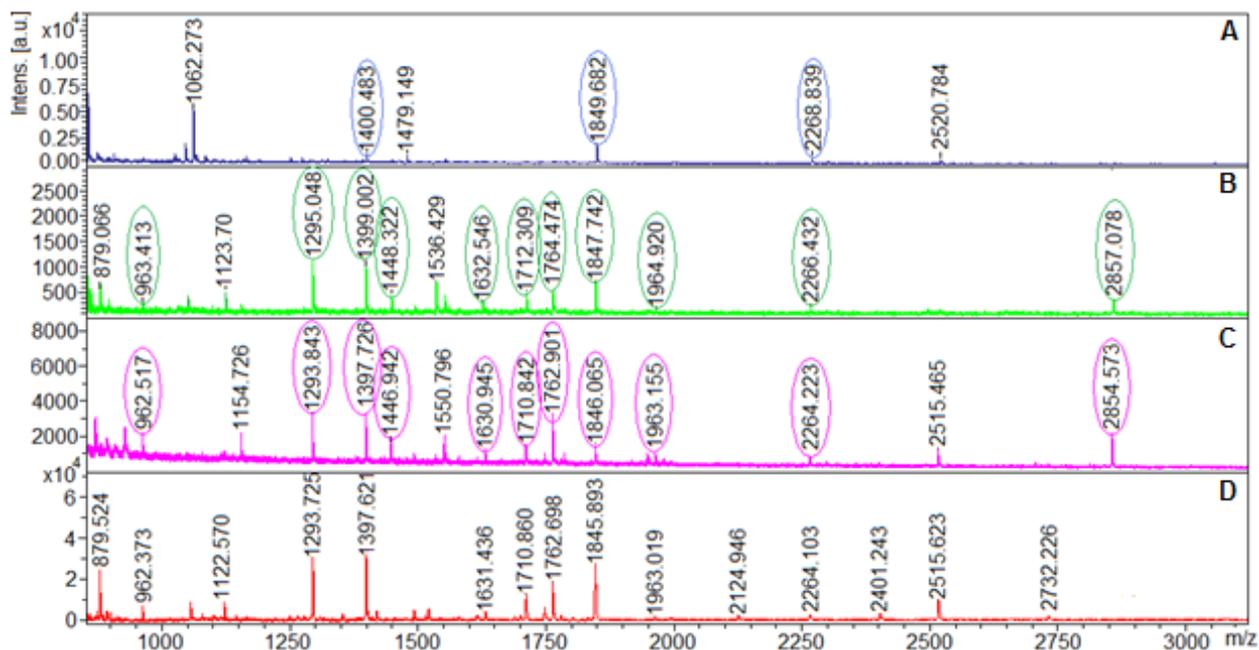


Figura 42. Comparação dos espectros resultantes da digestão triptica da MRJP-1 em superfície de mica. Espectros em superfície de mica sem a aplicação de TFA 0,1% (A), com posterior aplicação de TFA 0,1% (B), extraído da mica e aplicado diretamente à placa do MALDI (C) e espectro controle obtido por meio de digestão em mica, aplicação direto na placa (D).

Os resultados obtidos após a aplicação do TFA indicam que há um significativo enriquecimento dos espectros, inclusive no que se refere à exatidão. Para sustentação dos resultados, outra amostra foi testada. Os espectros, ilustrados pela Figura 43, de peptídeos do veneno da aranha *Loxosceles laeta*, estudados em um dos projetos em andamento no Laboratório de Química Bioanalítica da Universidade de Brasília, confirmam a influência da mica nos resultados obtidos por MALDI. É evidente nos resultados obtidos que a mica causa um deslocamento de todos os peptídeos para valores de massa maiores e que esse deslocamento é atenuado pela aplicação de TFA. Portanto, pode-se deduzir que este não é um problema gerado por influência direta da mica ao equipamento, pois, um possível comprometimento dos aparelhos não explicaria a influência do TFA no processo. Já a espessura da mica, em primeira análise, desviaria os resultados para valores de massa menores, pois uma posição adiantada dos íons levaria a uma redução no tempo de vôo.

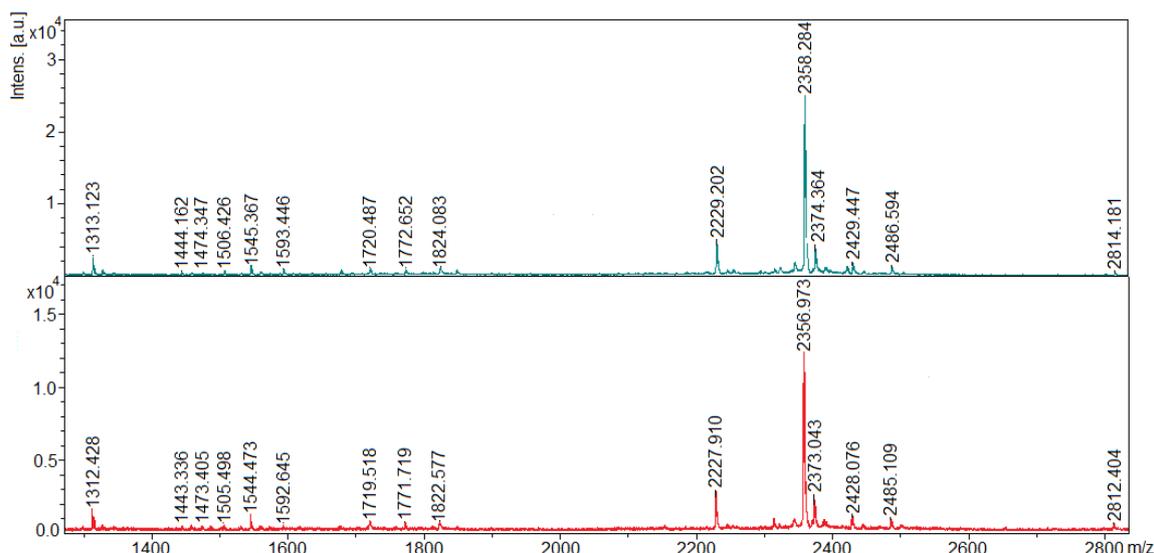


Figura 43. Espectros de peptídeos extraídos do veneno da aranha *Loxosceles laeta*.

Espectro obtido em superfície de mica (acima) e diretamente na placa de amostras do MALDI (abaixo).

A influência do TFA foi avaliada em diferentes concentrações, o que é mostrado pelos espectros de fragmentos trípticos da MRJP-1 na Figura 44. Observa-se que o TFA reverte os desvios ocasionados pela presença da mica, aproximando os resultados dos valores esperados, e que este processo é dependente da concentração de TFA.

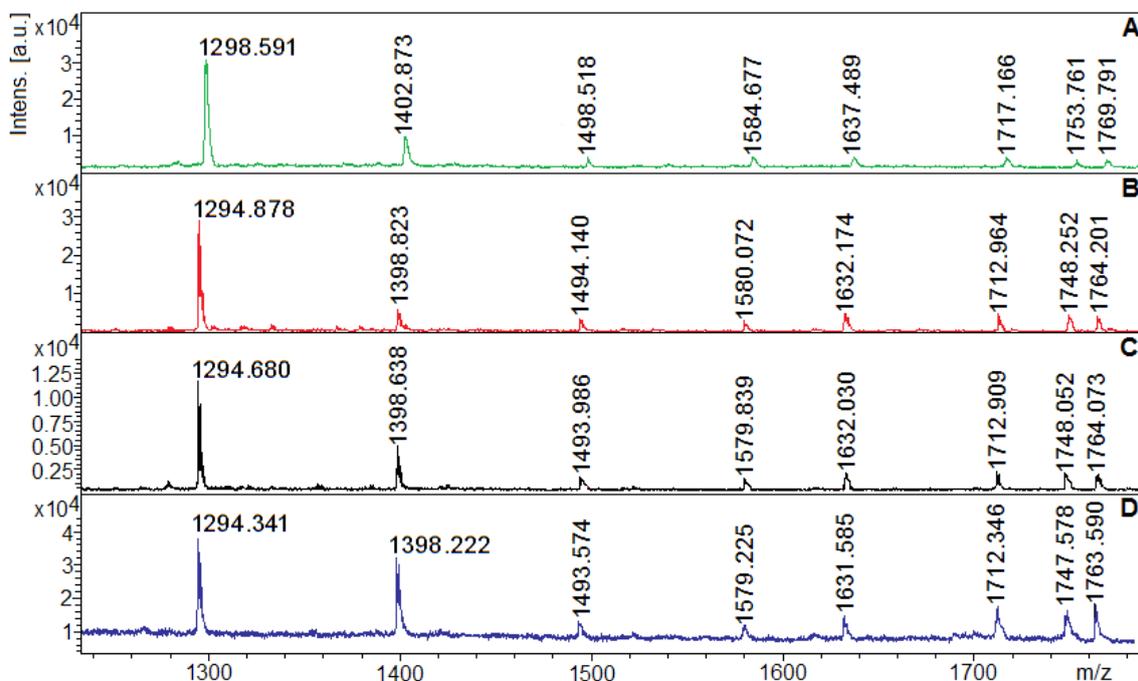


Figura 44. Comparação dos espectros de massa de fragmentos trípticos da MRJP-1 adsorvidos em superfície de mica, com aplicação de TFA em concentrações variadas. Aplicação de TFA 0,1% (A), TFA 0,2% (B), TFA 0,3% (C) e amostra aplicada diretamente à placa de amostras de MALDI (D).

Pautando-se nos resultados obtidos, na composição química da mica e nos princípios de funcionamento do MALDI-TOF, foi possível conjecturar uma proposição teórica, esquematizada na Figura 45, visando descrever como a mica interfere no processo de ionização e vôo das proteínas no equipamento MALDI-TOF.

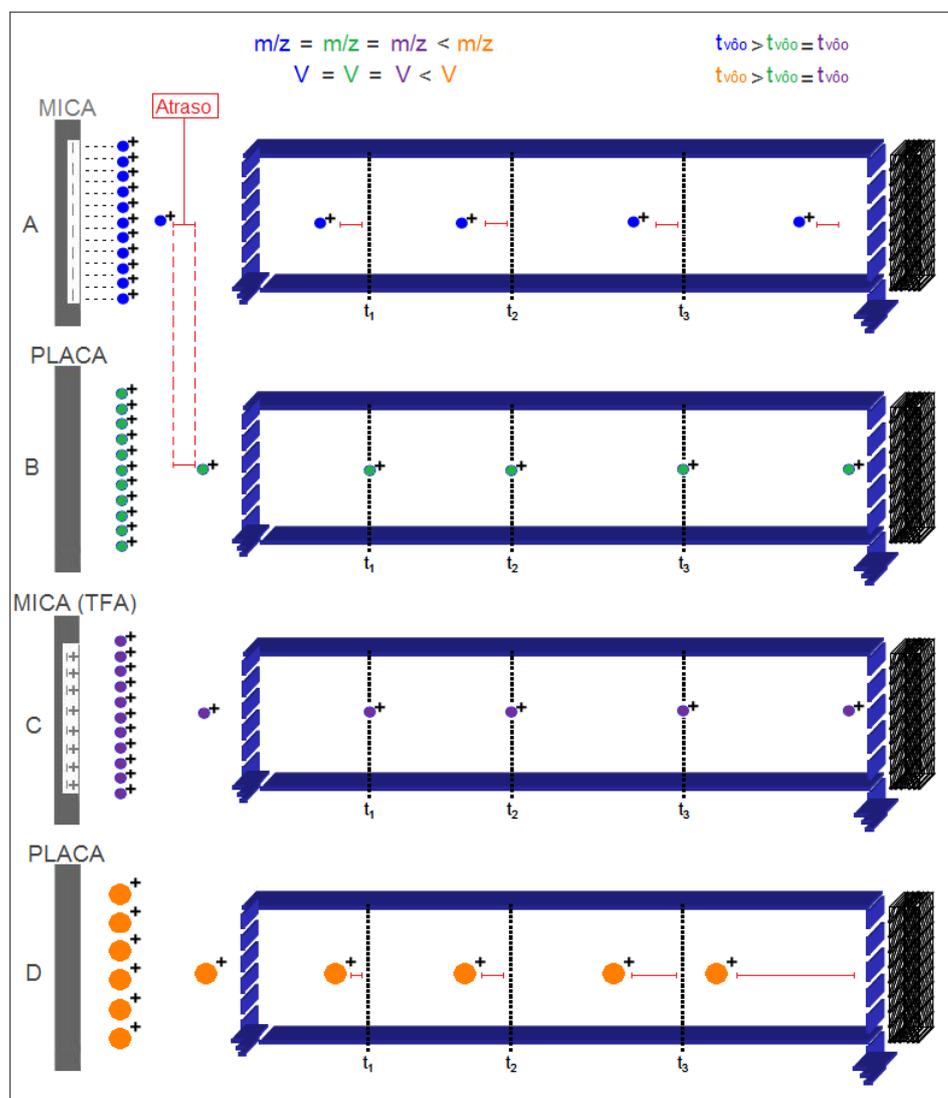


Figura 45. Proposição teórica referente à interferência da mica na análise de proteínas por MALDI-TOF. A atração eletrostática proteína-mica provoca um retardamento na “decolagem” da proteína, este atraso refletirá no tempo de vôo da proteína (A), que será maior que o tempo de vôo das proteínas aplicadas diretamente na placa de amostras do MALDI (B). O TFA atua neutralizando a mica, e, portanto, bloqueando os seus efeitos na análise (C). O atraso ocasionado pela mica não afeta a velocidade de vôo da proteína dentro da região livre de campo, que permanecerá com velocidade superior quando comparada a uma proteína de razão m/z maior (D).

Como já foi dito na etapa introdutória desta dissertação, a mica possui uma carga líquida negativa originada pela substituição isomórfica do silício (Si^{4+}) por alumínio (Al^{3+}). A valência menor do alumínio gera uma carga negativa para cada substituição. Já as proteínas detectadas por MALDI-TOF carregam uma carga líquida positiva. Os resultados obtidos sugerem que a atração eletrostática proteína-mica, provocada por essa oposição de cargas, determina um atraso na “decolagem” da macromolécula ionizada, atraso este que refletirá no tempo de vôo da proteína gerando um deslocamento dos picos para valores de massa maiores.

Sabe-se, ainda, que os íons hidrônio (H_3O^+) possuem elevada afinidade pela superfície de mica. Assim sendo, esses cátions são adsorvidos pelos sítios negativos da mica, neutralizando sua superfície [33, 34, 35 e 36]. O TFA atuará, portanto, neutralizando a superfície de mica, reduzindo, assim, a atração eletrostática proteína-mica.

Uma superfície recém-clivada de mica possui maior quantidade de cargas negativas, quando comparada a uma superfície anteriormente clivada. Isso ocorre, porque as cargas negativas são compensadas por íons potássio (cátion de compensação), que se movem nos canais da rede balanceando as cargas. Entretanto, quando a mica é imersa em solução aquosa, íons potássio sobre a superfície se dissociam, e passará a existir um novo equilíbrio entre superfície negativa e cátions existentes em solução. O tempo de clivagem da mica, a composição catiônica e o pH da solução são, portanto, variáveis envolvidas no processo de ionização em mica por MALDI.

4.5 Aspectos morfológicos

4.5.1 MRJP1

As imagens e os gráficos referentes às alturas das partículas, respectivamente ilustrados pelas Figura 46 e Figura 47, corroboram com os resultados obtidos por Simuth [37], que avaliou a proteína MRJP-1 por ultracentrifugação. Este trabalho sugeriu que a MRJP-1 está presente na geléia real em três formas distintas, como monômeros (55 kDa), uma forma oligomérica (420 kDa) e agregados protéicos. Oligômeros de 350 kDa e 280 kDa também foram reportados por Bilikova et. al. [38], Kimura et. al. [39] e Tamura et. al. [40]. A imagem, ilustrada na Figura 46B, evidencia e confirma a

tendência de formação de agregados. A outra imagem (Figura 46A) ratifica a presença de estruturas compatíveis com monômeros e oligômeros de MRJP-1. O programa WSxM versão 4.0 possibilita, por meio de uma linha direcionada pelo operador, que as partículas de interesse tenham sua altura determinada, quando transpostas por essa linha. Portanto, cada pico no gráfico representa a altura de uma determinada partícula selecionada. Os gráficos, expostos na Figura 47, sugerem que as estruturas monoméricas apresentam, em sua maioria, altura entre 4,0 nm e 6,0 nm (Figura 47B), já os oligômeros, se apresentam com alturas entre 14 nm e 17 nm (Figura 47A).

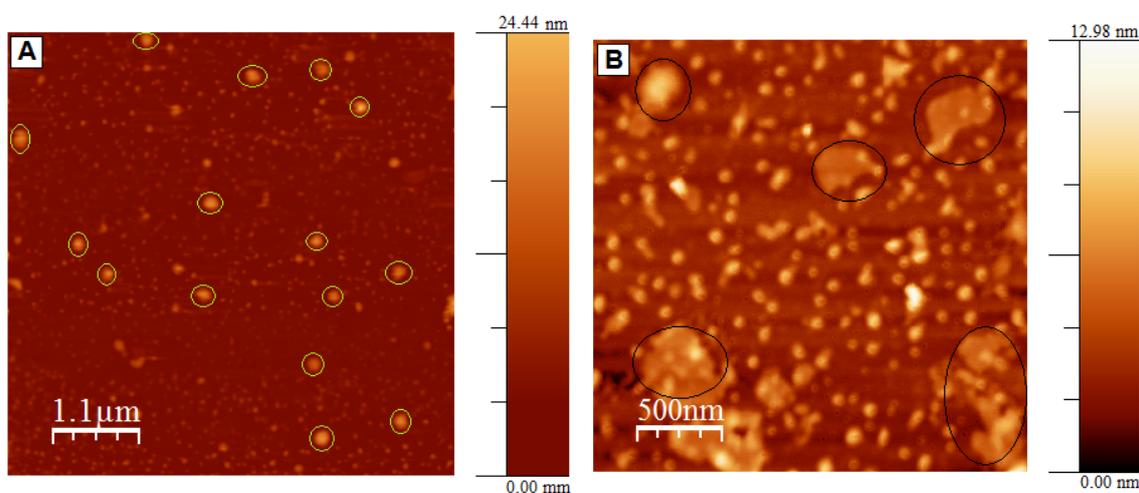


Figura 46. Imagens topográficas das estruturas protéicas (MRJP-1) obtidas por AFM. Amostra diluída 1000 vezes com estruturas globulares extensas circuladas (A). Amostra diluída 100 vezes com aglomerados circulados (B).

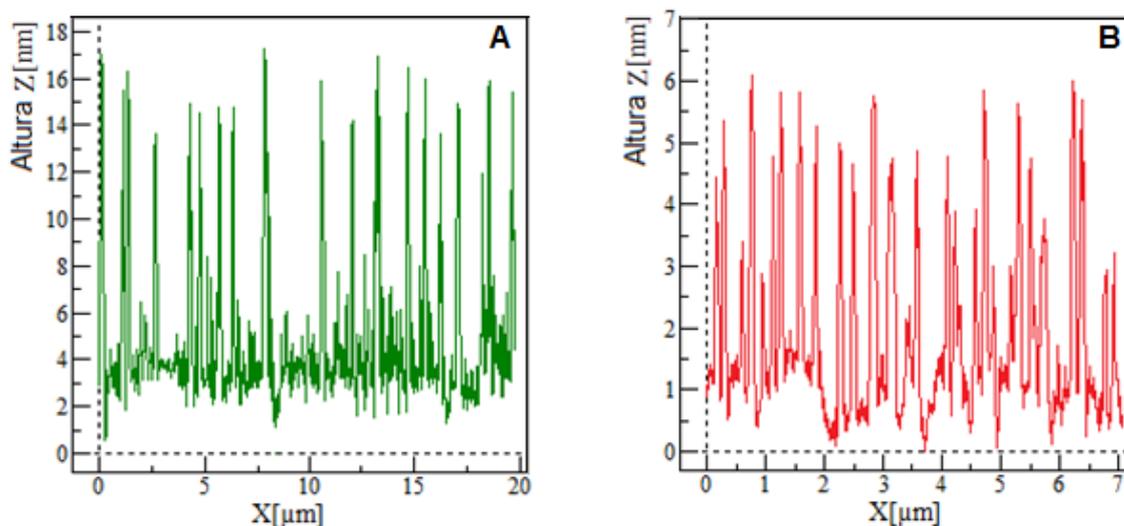


Figura 47. Gráficos alusivos às alturas de partículas reveladas pela imagem 46A. As partículas globulares maiores estão representadas pelo gráfico A e as partículas menores pelo gráfico B.

As Figura 48 e Figura 49 mostram imagens de AFM que revelam a presença de estruturas globulares, com dimensões compatíveis com aquelas esperadas para uma proteína com massa de aproximadamente 52 kDa, como a MRJP-1. Com as imagens adquiridas por AFM foi possível presumir uma morfologia para a proteína MRJP-1 do proteoma da abelha *Apis Mellifera*.

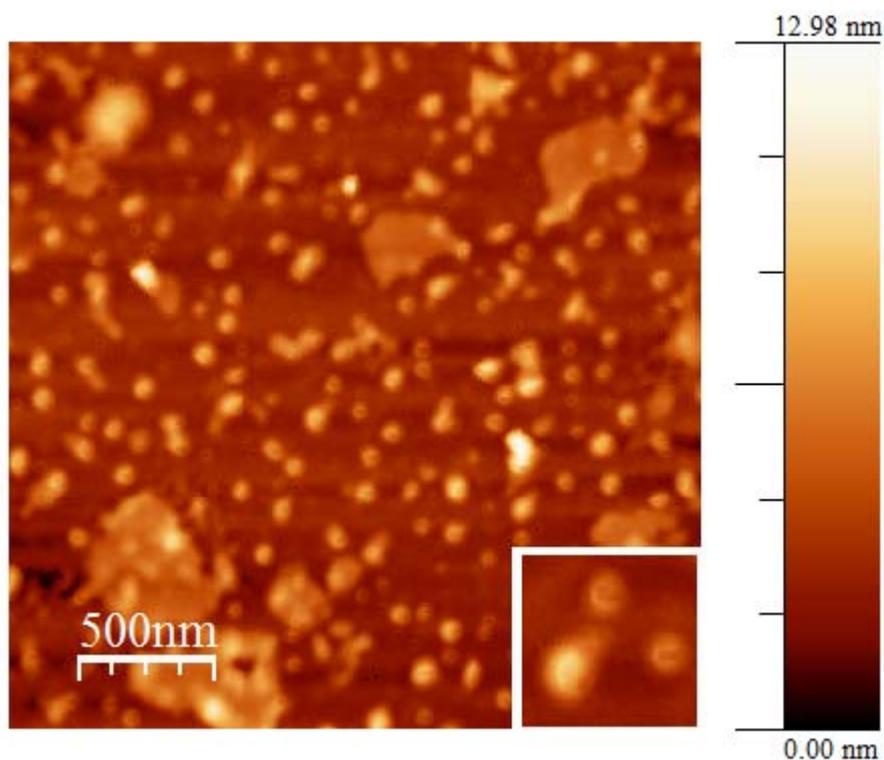


Figura 48. Ampliações da imagem topográfica (Figura 46B), amostra de MRJP-1 (0,037 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

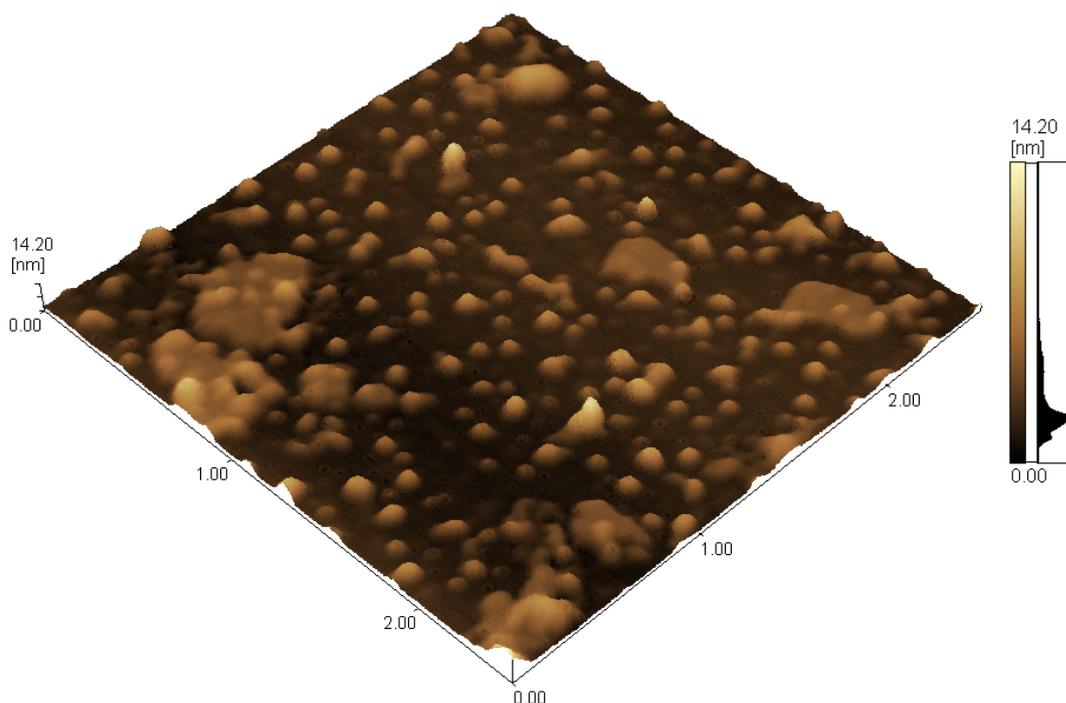


Figura 49. Imagem topográfica tridimensional (Figura 48), amostra de MRJP-1 (0,037 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

Inicialmente, nota-se a presença de um provável orifício ou canal em sua estrutura, uma subsequente ampliação indica a existência de estruturas globulares que aparentemente, em determinadas disposições, apresentam-se com um contorno característico de uma circunferência aberta.

A Figura 50 correlaciona uma imagem adquirida por AFM com uma estrutura estabelecida por meio de modelagem comparativa, realizada pelo servidor SWISS-MODEL. Esse é um procedimento de modelagem por homologia, completamente automatizado, no qual proteínas com estruturas tridimensionais conhecidas são utilizadas nos algoritmos direcionados à predição de novas estruturas protéicas com estrutura tridimensionais ainda desconhecidas.

Portanto, é importante frisar que esse modelo deve ser analisado com cautela. O modelo adquirido não tem por finalidade definir a estrutura secundária da proteína, mas sim, propiciar uma correlação com as imagens obtidas por AFM.

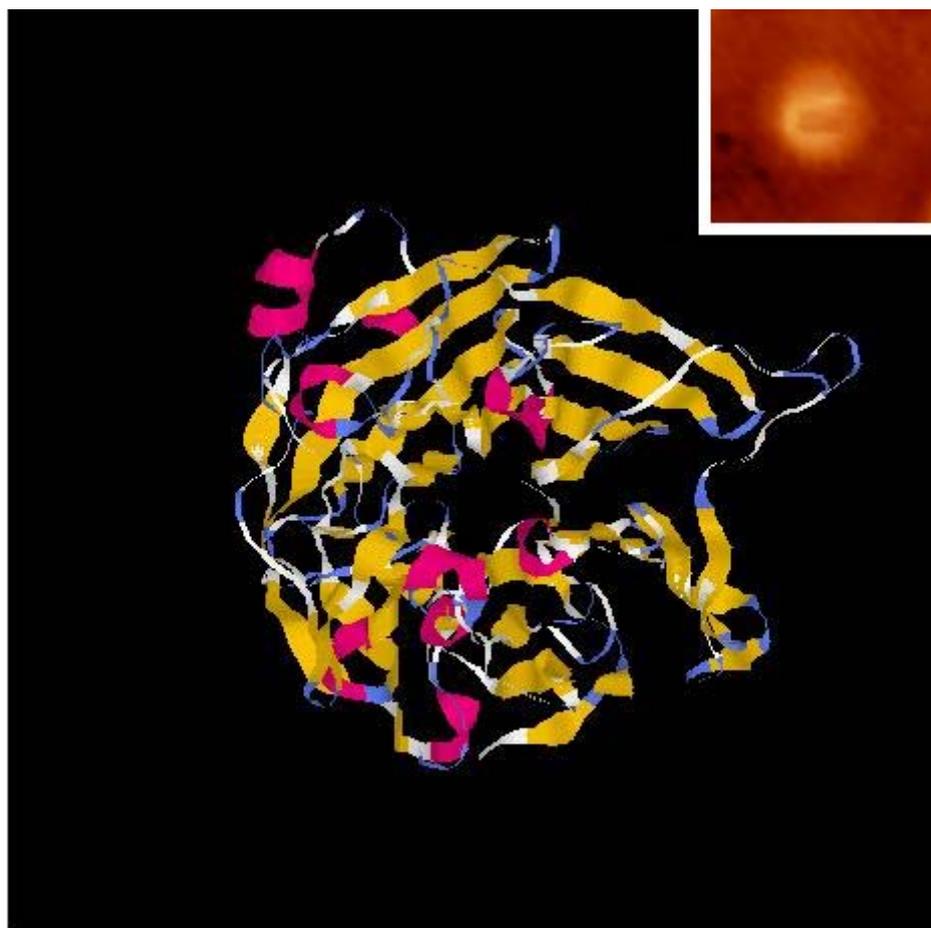


Figura 50. Modelo da MRJP-1 obtido por meio de modelagem por homologia com o servidor SWISS-MODEL, acessível via ExPasy Proteomics Server (<http://www.expasy.org/>).

O modelo foi obtido por meio de homologia, na qual houve uma identidade de sequência de aproximadamente 16 % com a proteína homóloga, no entanto, houve uma boa correlação com as imagens adquiridas por AFM, no que diz respeito à morfologia.

As imagens de contraste de fase, ilustradas pelas Figura 51 e Figura 52, corroboram e reforçam as imagens topográficas. Na Figura 51, as imagens de fase (abaixo) aumentam o contraste entre a parte central das estruturas protéicas e suas margens, reforçando assim, as interpretações dadas às imagens topográficas e à estrutura modelada, que conduzem para a existência de um espaço vazio no centro da estrutura protéica da MRJP-1. A Figura 52 exibe novamente uma imagem obtida por contraste de fase com algumas ampliações que detalham ainda mais a estrutura da MRJP-1. Nessas imagens, observam-se algumas variações estruturais. Algumas estruturas se apresentam com forma de uma circunferência fechada, outras se apresentam como uma circunferência aberta, entretanto com estruturas menores entre essa abertura, e ainda, estruturas completamente abertas.

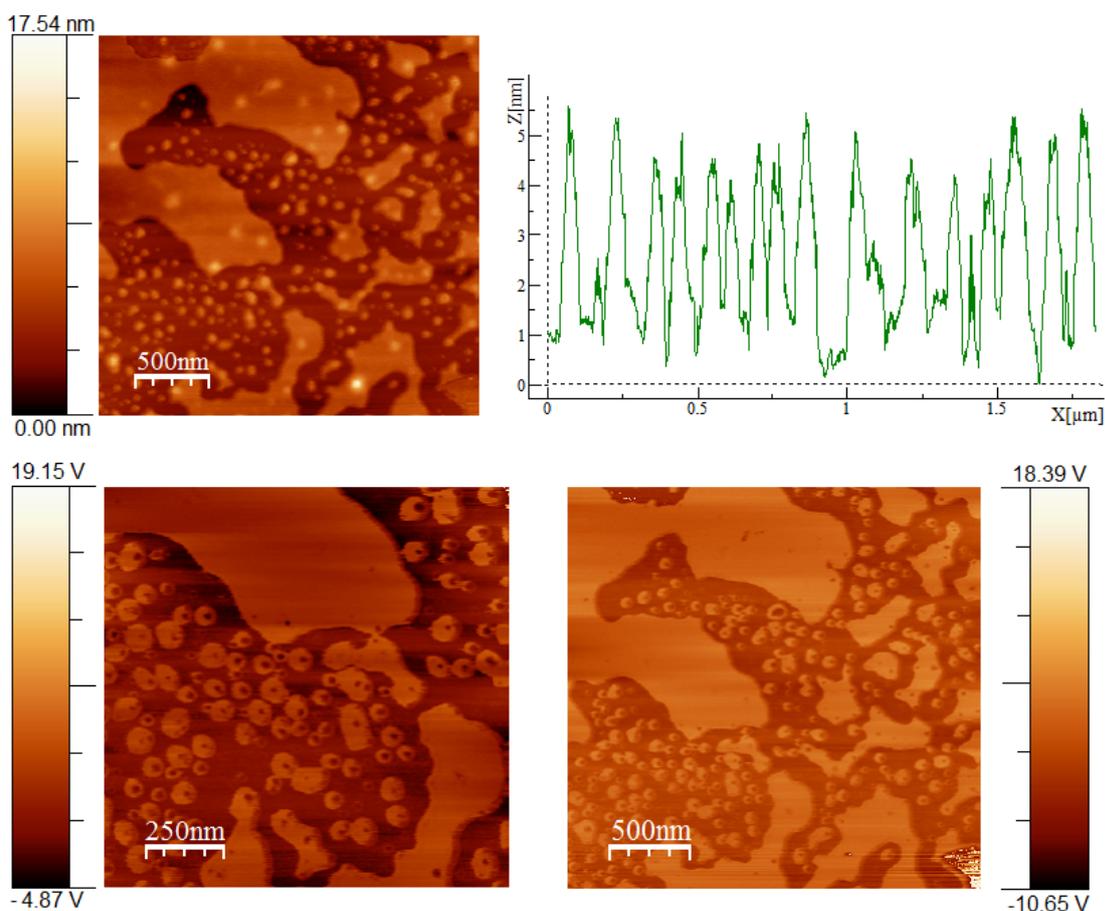


Figura 51. Imagem topográfica da MRJP-1 e aquisição da altura de algumas partículas (acima). Imagens obtidas por aquisição em modo de fase (abaixo).

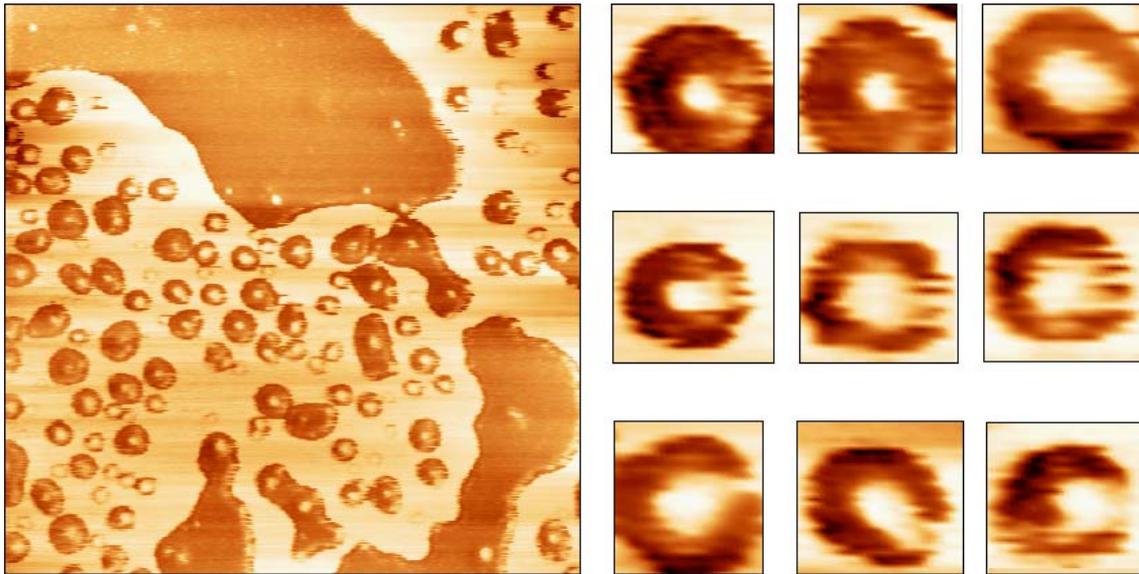


Figura 52. Imagem de fase das estruturas protéicas (MRJP-1) obtidas por AFM e ampliações.

Não é possível concluir, com os resultados obtidos por AFM, que as variações estruturais observadas ocorrem *in vivo*, pois é admissível que as condições experimentais tenham causado tais alterações estruturais.

4.5.2 Apisimina

A apisimina purificada por cromatografia líquida de alta performance, foi analisada por AFM-MS. A Figura 53 mostra um espectro de massa da apisimina adquirido após a purificação. Embora o espectro indique que há presença de oligômeros protéicos de apisimina (5,5 kDa), não é possível afirmar que há oligomerização baseado unicamente em um espectro de massa adquirido por MALDI-TOF, pois é comum a formação de agregados inespecíficos em fase gasosa, após a desorção na fonte de ionização [41 e 42].

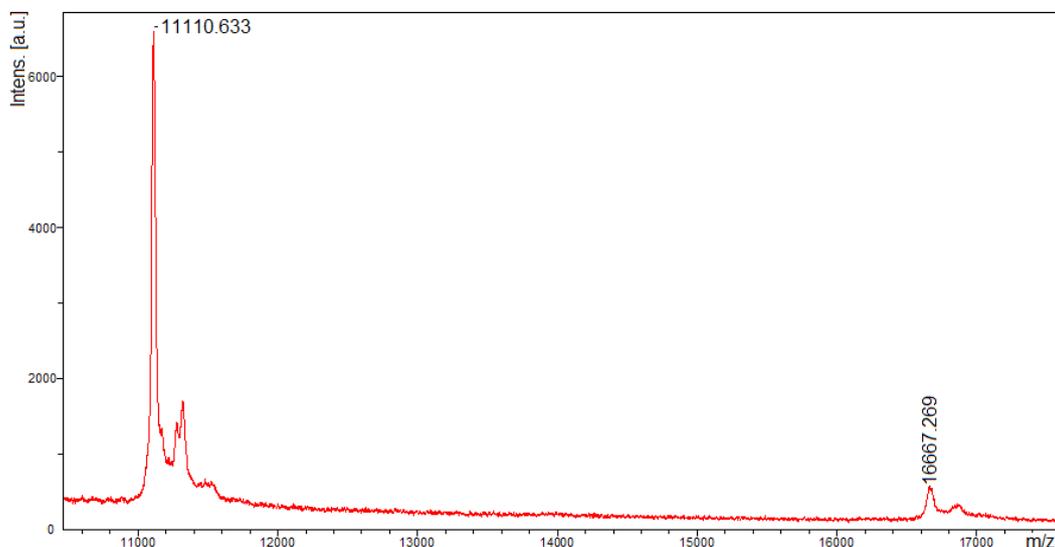


Figura 53. Espectro de massa da apisimina. Indica a presença ou a formação de oligômeros.

A formação de agregados inespecíficos sempre deve ser ponderada em estudos de interações não covalente por MALDI. Desse modo, a microscopia de força atômica surge como uma importante técnica complementar para confirmar a pureza da amostra e a formação de possíveis oligômeros observados por espectrometria de massa.

As imagens de AFM, ilustradas pela Figura 54, fornecem evidências de que há formação de oligômeros de apisimina. Confirmando a tendência de oligomerização dessa proteína já relatada por Bilikova et. al. [38].

As imagens topográficas da apisimina purificada em HPLC (fração 12 diluída em 1-100), adquiridas por AFM, revelam, pela primeira vez, a formação preferencial de complexos protéicos diméricos, circulos em verde na Figura **54**. Complexos maiores ou agregados aparecem em menor quantidade. As imagens indicam que os monômeros e os dímeros são as espécies preponderantes e que o complexo dimérico é formado com a consequente alteração estrutural da unidade protéica, marcada por um aparente desenovelamento da unidade monomérica globular e constituição de uma estrutura mais alongada com aparente aumento da superfície molecular.

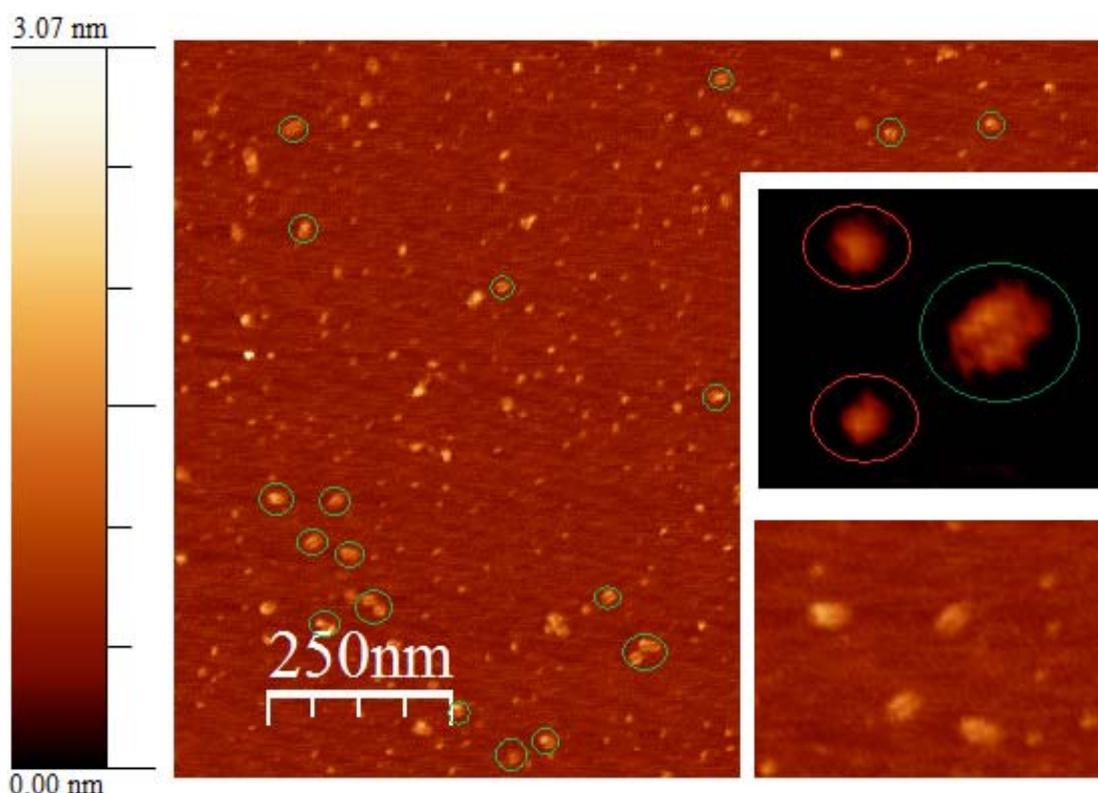


Figura 54. Imagens topográficas das estruturas protéicas concernentes a fração 12 colhida do HPLC, diluída 100 vezes (apisimina purificada).

A funcionalidade de uma proteína está diretamente relacionada à sua estrutura, os efeitos estéricos gerados pela modificação estrutural evidenciada na Figura 54, possivelmente, determinam a atividade da apisimina, sugerindo que uma das formas é inativa enquanto a outra forma é ativa

Os dímeros e os monômeros foram dimensionados (Figura 55) e uma pequena variação na altura foi constatada. A altura dos monômeros varia entre aproximadamente 0,85 nm e 1,20 nm e a dos dímeros, entre 1,20 nm e 1,4 nm.

A mesma amostra, ainda adsorvida em mica, foi ionizada e detectada por MALDI-TOF, como mostra a Figura 56, confirmando a presença da apisimina. Portanto, foi possível aplicar o método AFM-MS à proteína apisimina.

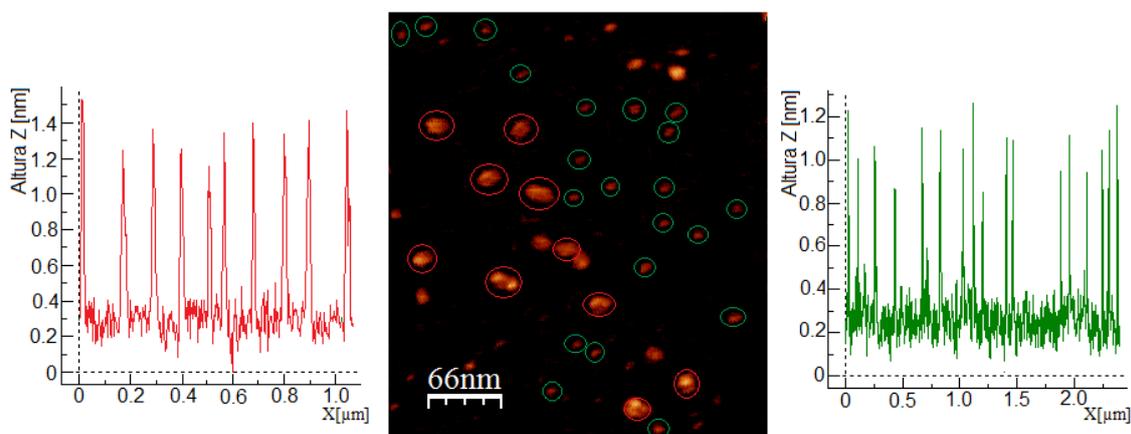


Figura 55. Gráfico referente às alturas das partículas, diméricas (direita) e monoméricas (esquerda), selecionadas na imagem (centro).

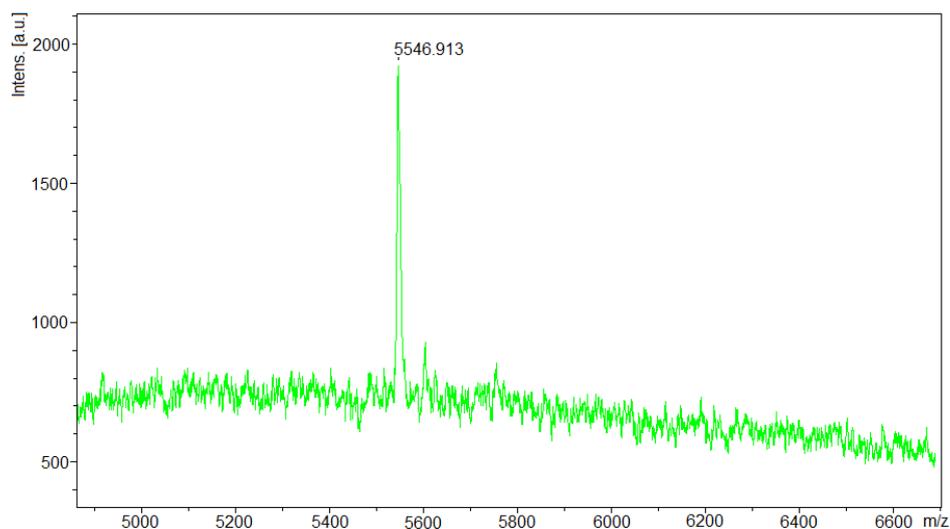


Figura 56. Espectro da apisimina (fração 12), adquirido em mica, após aquisição das imagens por AFM.

4.5.3 Possíveis carboidratos

Imagens topográficas das frações seis e sete colhidas do HPLC (diluídas 100 vezes) revelaram a presença de estruturas até então não observadas.

As Figura 57 e Figura 58 mostram que a morfologia dessas estruturas é incompatível com a morfologia da MRJP-1 e da apisimina. Essa conclusão foi reforçada pelas dimensões das partículas, extremamente menores que aquelas esperadas para a MRJP-1, como mostram os gráficos ilustrados pela Figura 59. A maioria das partículas observadas apresentam-se com altura menor que 7 Å (Figura 59), portanto, com dimensões e morfologias incompatíveis com aquelas esperadas para a MRJP-1 e para apisimina, descritas nos itens 4.5.1 e 4.5.2.

As imagens (Figura 57 e Figura 58) sugerem que há um processo de polimerização que conduz a formação de cadeias biopoliméricas. As características estruturais observadas nas imagens e a dificuldade exacerbada de ionização no MALDI são peculiaridades inerentes a polissacarídeos. Imagens similares de diferentes polissacarídeos foram adquiridas por Abu-Lail e Camesano [44], nas quais foram observadas estruturas com alturas entre 0,50 nm e 1,17 nm, dependendo do polissacarídeo. A ionização e detecção de polissacarídeos por MALDI-TOF também já foi demonstrada [45]. Este mesmo trabalho ainda comprovou que a eficiência do MALDI para proteínas é extremamente maior que para polissacarídeos. Mesmo em uma proporção proteína/polissacarídeo de 1/1.000, o sinal referente à proteína mostrou-se expressivamente superior ao sinal alusivo ao polissacarídeo.

Portanto, há a possibilidade de que as estruturas observadas sejam carboidratos (monossacarídeos) que se ligam para formar polissacarídeos. A dificuldade de ionização, descrita adiante, a dimensão das partículas e a biopolimerização são características de polissacarídeos. Entretanto, não se pode descartar, por completo, a possibilidade de que as estruturas observadas sejam proteínas contaminantes capazes de formar fibrilas. Para confirmação da proposição supracitada será necessário a aplicação de outras metodologias analíticas que confirmem a presença de polissacarídeos na amostra, por exemplo, por meio de experimentos MS/MS.

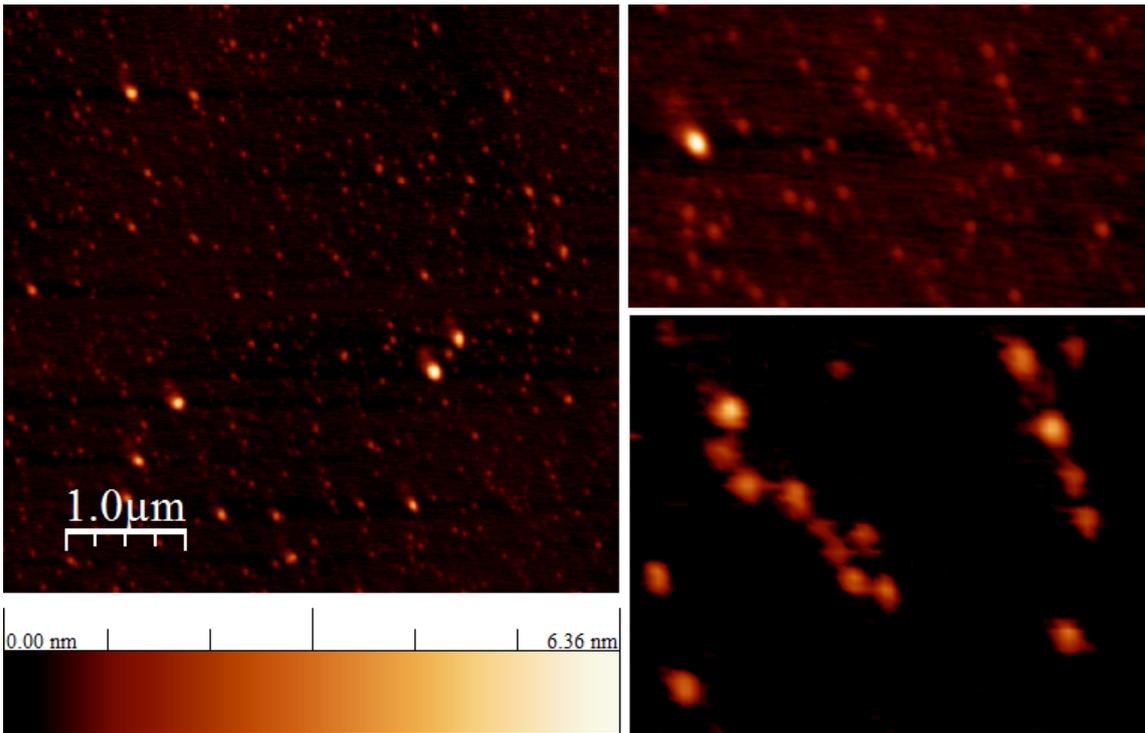


Figura 57. Imagens topográficas das estruturas concernentes a fração 7 colhida do HPLC (diluída em 1-100).

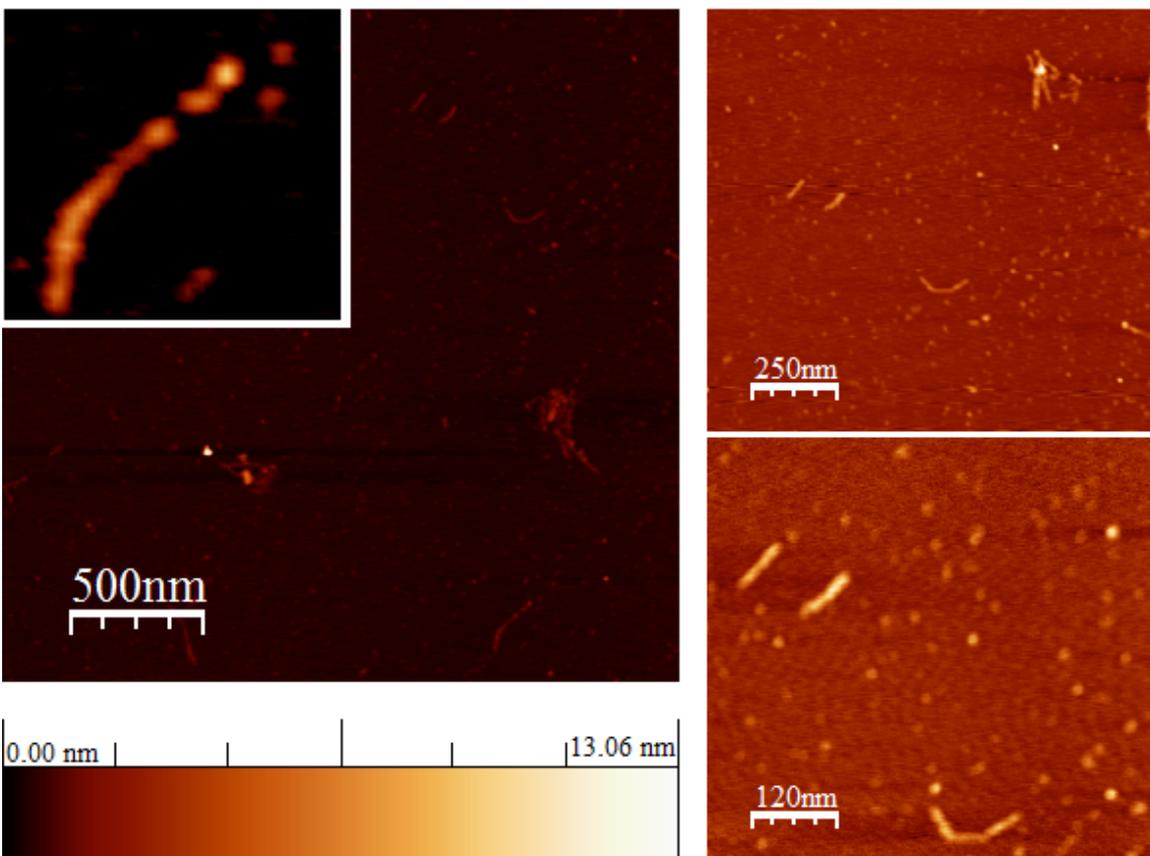


Figura 58. Imagens topográficas das estruturas concernentes a fração 6 colhida do HPLC (diluída em 1-100).

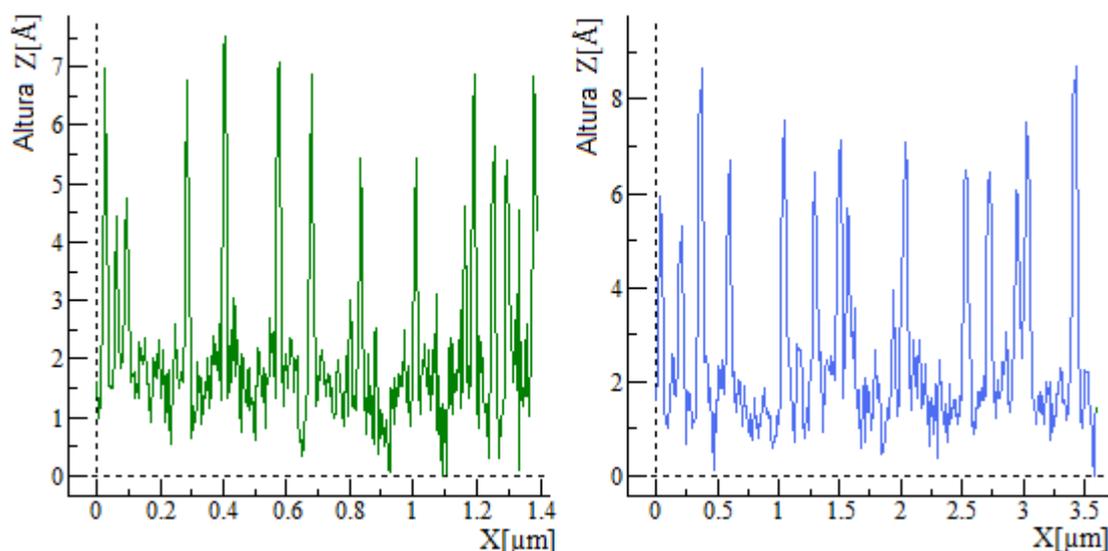


Figura 59. Gráficos referentes às alturas das partículas observadas na fração 6 (esquerda) e fração 7 (direita) expostas pela imagem.

As imagens de AFM sugerem a existência de um contaminante de baixa massa, o que direcionou os experimentos posteriores de MALDI-TOF para análises na faixa de baixa massa.

Dificilmente essas estruturas teriam sido percebidas apenas com as análises por MS, pois a matriz empregada para proteínas maiores, o ácido sinapínico, é ineficiente para a ionização e detecção de estruturas menores. Além disso, as análises por MS mostraram que essas estruturas não ionizam facilmente no MALDI. Portanto, os resultados mostram, mais uma vez, a complementaridade entre a microscopia de força atômica e a espectrometria de massa.

Estruturas com massas de aproximadamente 3,2 kDa foram detectadas por MALDI-TOF nas frações 6 e 7, como mostram as Figura 60 e Figura 61. Os resultados são sugestivos, pois esta massa somada à massa de aproximadamente 52 kDa da MRJP-1 observada neste trabalho, alcançaria o valor de massa teórico esperado para a MRJP-1 com suas modificações pós-traducionais (glicosilações). A sequência de aminoácidos da MRJP-1 equivale a uma massa de aproximadamente 47 kDa (Expasy Proteomic Server). Com as glicosilações conhecidas, essa massa chega a 55 kDa. Como a massa da MRJP-1 analisada neste trabalho é de aproximadamente 52 kDa, é provável que as estruturas observadas nas frações 6 e 7 sejam provenientes das glicosilações da MRJP-1 nativa (vide item 4.3.2), que desligadas das cadeias protéicas acumularam-se nessas frações durante o processo de separação.

4.6 Influência da apisimina na oligomerização da MRJP1

As proteínas, MRJP-1 e apisimina, foram separadas por cromatografia líquida de alta performance. O cromatograma é apresentado na Figura 60. As frações colhidas foram analisadas por espectrometria de massa, os espectros confirmaram a separação das proteínas (Figura 61e Figura 62).

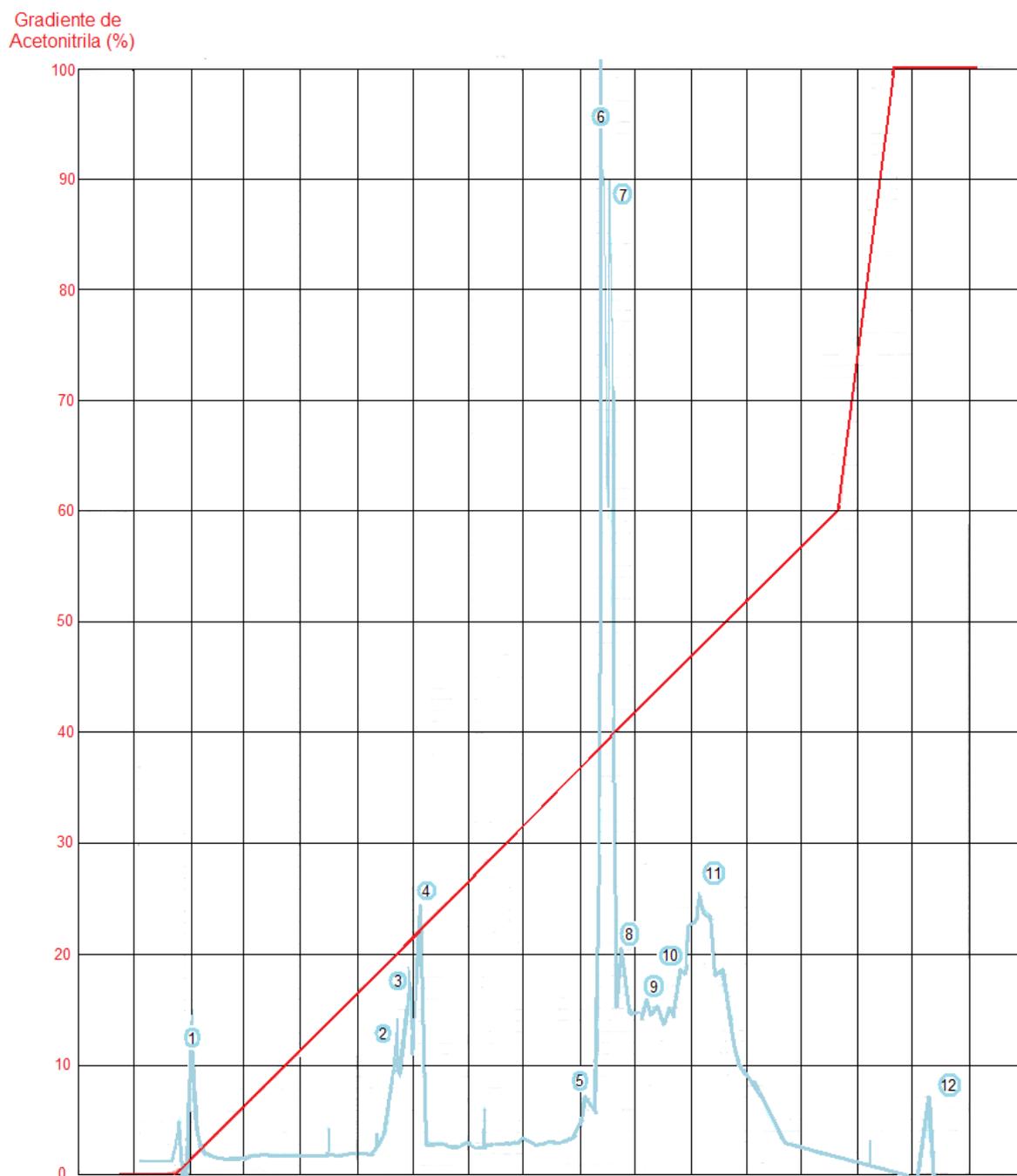


Figura 60. Cromatograma, obtido por HPLC, referente à separação das proteínas MRJP-1 e apisimina.

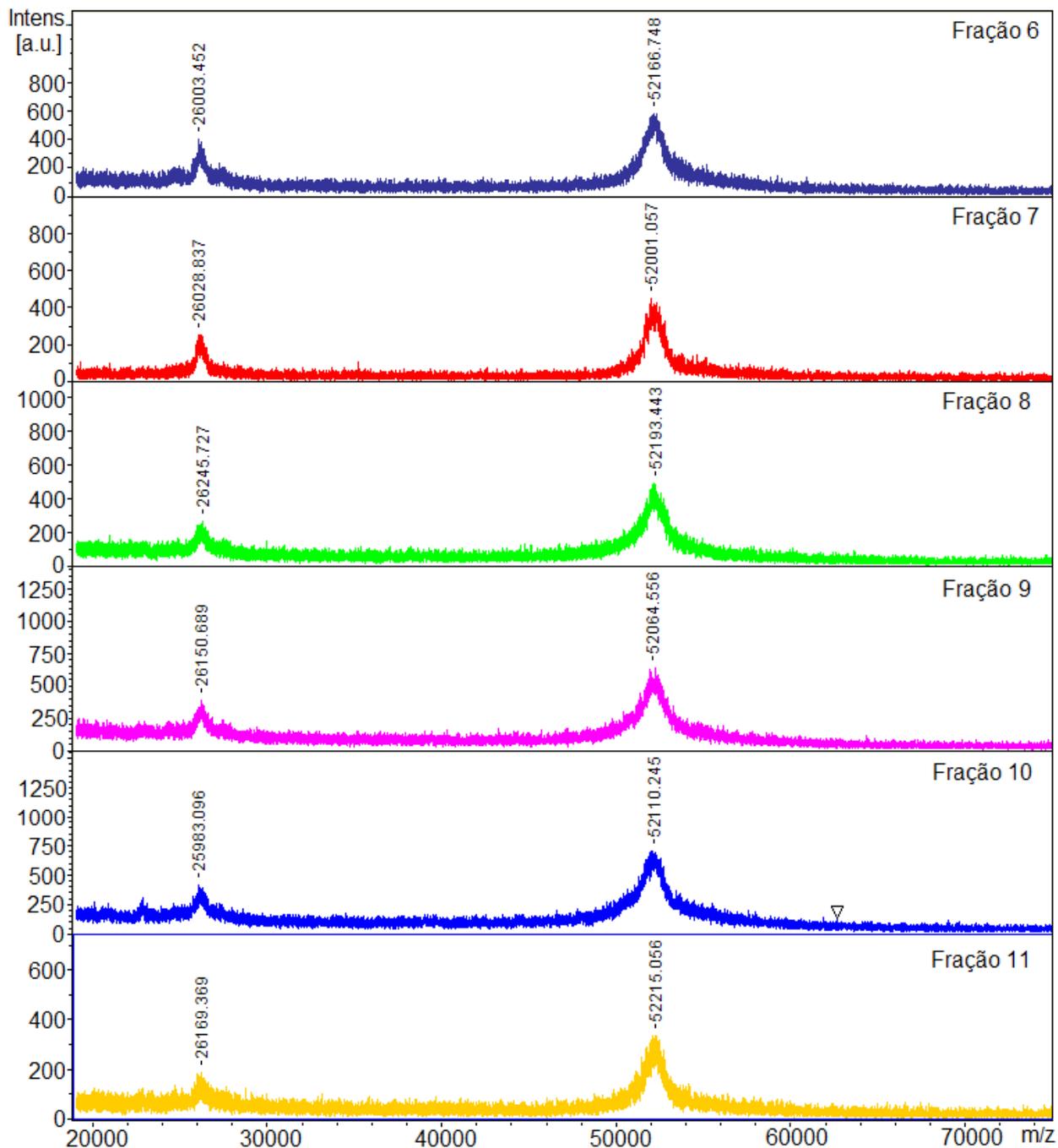


Figura 61. Espectros de massa das frações colhidas no HPLC (Frações 6 a 11). Os espectros confirmam a presença da proteína MRJP-1 nas frações apontadas.

A presença da MRJP-1 foi confirmada nas frações de 6 a 11, sendo que a apisimina (5,5 kDa) foi detectada apenas nas frações 11 e 12 (Figura 62). Portanto, a MRJP-1 apresentou-se purificada nas frações 6 a 10 e a apisimina na fração 12.

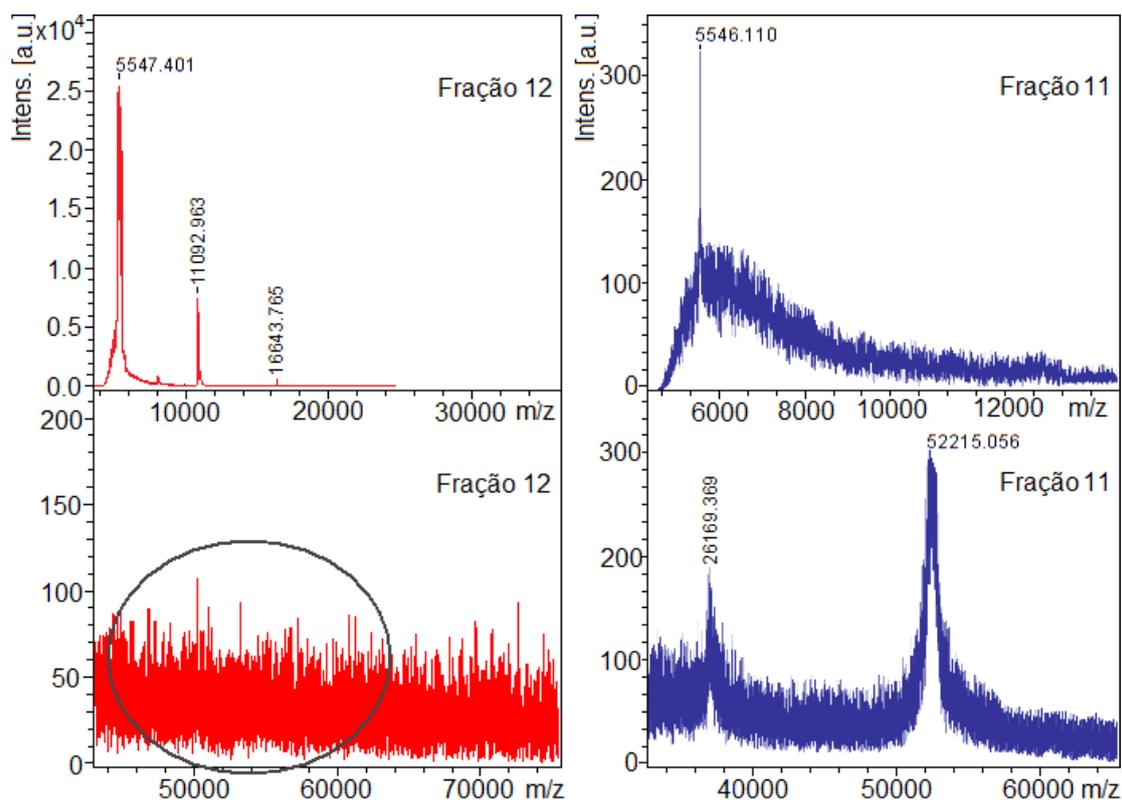


Figura 62. Espectros de massa das frações 11 (direita) e 12 (esquerda) colhidas do HPLC. A MRJP-1 não foi detectada na Fração 12.

As imagens adquiridas com a mistura (MRJP-1 e apisimina) foram confrontadas com os resultados das proteínas purificadas (frações 7 e 10).

A Figura 63 exhibe claramente a presença dos monômeros e dos oligômeros, ambos globulares. Duas partículas foram selecionadas e ampliadas, um monômero (abaixo) e um oligômero (acima), e suas respectivas alturas foram determinadas. A amostra consiste em uma mistura das proteínas MRJP-1 e apisimina.

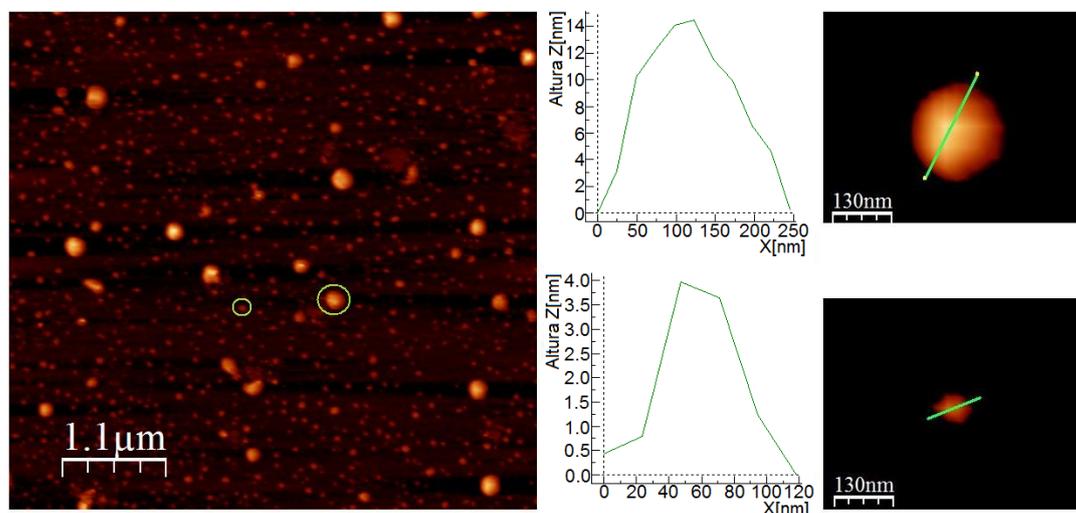


Figura 63. Imagens e medidas de altura referentes à MRJP-1 e seus oligômeros.

Esses oligômeros não foram observados em amostras purificadas, nas quais a MRJP-1 estava isolada, ou seja, sem a presença de apisimina, como é o caso das frações 10 (Figura 64) e 7 (Figura 65). Portanto, é provável que a apisimina tenha influência sobre a formação dos oligômeros, o que corrobora a hipótese de Bilikova et. al. [38].

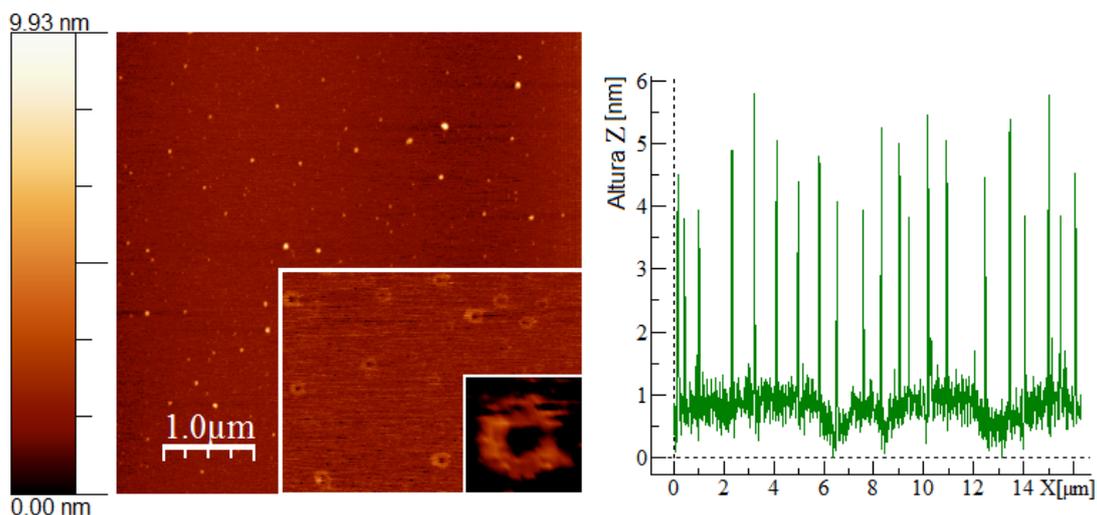


Figura 64. Imagens topográficas das estruturas protéicas (MRJP-1 purificada) concernentes a fração 10 colhida do HPLC (diluída em 1-100).

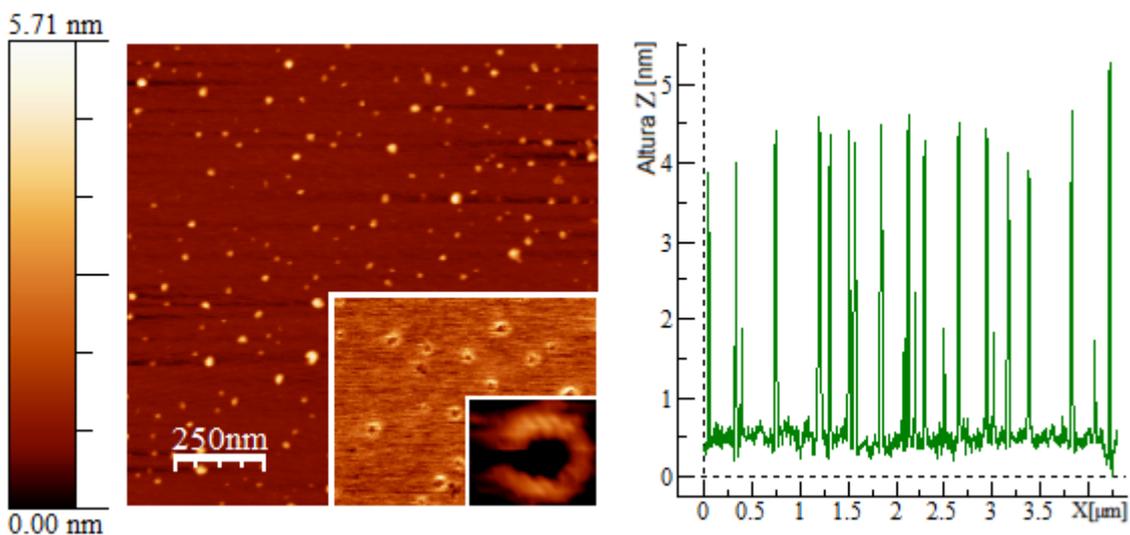


Figura 65. Imagens topográficas das estruturas protéicas (MRJP-1 purificada) concernentes a fração 7 colhida do HPLC (diluída em 1-100).

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

5.1 Conclusões e perspectivas

Neste trabalho, foi demonstrado que as imagens de AFM e espectros de MALDI-TOF podem ser obtidos de uma mesma amostra, depositada sobre a mesma superfície, fornecendo uma nova metodologia de correlação entre microscopia de força atômica e espectrometria de massa. Entretanto, evidenciou-se também que essa nova metodologia é limitada pelo poder de detecção do MALDI-TOF, e, portanto, dependerá da facilidade de ionização da proteína analisada.

O método de associação entre as técnicas de microscopia de força atômica e espectrometria de massa foi aperfeiçoado. Foi desenvolvida uma nova metodologia para extração do sal tamponante e para digestão em superfície de mica. A influência da mica no processo de ionização foi apurada e uma solução para o problema foi proposta e demonstrada.

A associação AFM-MS foi implementada quando possível. Quando não, as técnicas foram empregadas separadamente, ou seja, em amostras singulares. A experiência demonstrou que as duas técnicas se complementam e fornecem um conjunto de informações amplamente úteis para o estudo de proteínas. Estruturas que passariam despercebidas por uma das técnicas foram detectadas pela outra. A microscopia de força atômica é perfeitamente aplicável ao estudo de estruturas quaternárias, suplementando, portanto, os resultados obtidos por MALDI-TOF, técnica limitada no que se refere ao estudo de interações não covalentes.

As morfologias das proteínas MRJP-1 e apisimina, assim como dos respectivos oligômeros, foram apuradas. Além disso, possíveis polissacarídeos foram detectados, direcionando os estudos futuros para verificação e ampliação dos resultados que em primeira análise estão relacionados às modificações pós-traducionais da MRJP-1.

Além da vantagem analítica referente à redução das variáveis experimentais, características dos experimentos realizados de forma não associada, as perspectivas futuras para o aproveitamento da metodologia de associação AFM-MS são significativas, principalmente no que se refere a sua aplicação conexa às superfícies funcionalizadas. Nesses estudos, proteínas poderão ser selecionadas pela superfície funcional de acordo com as

interações proteína-superfície. Essas interações poderão ser analisadas por meio da morfologia dos complexos formados, determinada por AFM, e as proteínas selecionadas poderão ser identificadas na própria superfície de mica por MALDI-TOF.

6. Referências bibliográficas

1. Marzzoco, A.; Torres, B. B.; *Bioquímica Básica*, 2ª. Ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1999.
2. Leite, F. L.; Zeimath, E. C.; Herrmann P. S. P.; Estudo de polímeros por microscopia de força atômica, Comunicado Técnico 53, EMBRAPA, São Carlos, SP, 2003.
3. Silva, L. P.; *Protein Pept. Lett.* **2002**, 9, 117.
4. http://www.nanoscience.com/products/AFM_cantilevers.html - acesso em março 2009.
5. Ferreira, A. A. P.; Yamanaka, H.; *Quim. Nova* **2006**, 29, 137.
6. <http://www.cbpf.br/~nanos/Apostila/00.html> - acesso em março de 2009.
7. Jarosławski, S.; Zadek, B.; Ashcroft, F.; Vénien-Bryan, C.; Scheuring, S.; *J. Mol. Biol.* **2007**, 374, 500.
8. Thirlway, J.; Turner, I. J.; Gibson, C. T.; Gardiner, L.; Brady, K.; Allen, S.; Roberts, C. J.; Soutlanas, P.; *Nucleic Acids Research*, **2004**, 32, 2977.
9. Kuznetsov, G. Y.; McPherson, A.; *Scanning* **2006**, 28, 278.
10. Janovjak, H.; Kedrov, A.; Cisneros, D. A.; Sapra, K. T.; Struckmeier, J.; Muller, D. J.; *J. Neurobiol. Aging* **2006**, 27, 546.
11. Fotiadis, D.; Suda, K.; Tittmann, P.; Jen, P.; Philippsen, A.; Müller, D. J.; Gross, H.; *J. Mol. Biol.* **2002**, 318, 1381.
12. Zhang, W. K.; Xu, Q. B.; Zou, S., Li, H. B.; Xu, W. Q.; Zhang, X.; Shai, Z. Z.; Kudera, M.; Gaub, H. E.; *Langmuir* **2000**, 16, 4305.
13. Willemsen, O. H.; Snel, M. M. E.; Werf K. O.; Grooth, B. G.; Greve, J.; Hinterdorfer, P.; Gruber, H. J.; Schindler, H.; Kooyk, Y.; Figdor, C. G.; *Biophysical Journal* **1998**, 75, 2220.
14. Gonçalves R. P.; Bernadac, A.; Sturgis J. N.; Scheuring, S.; *J. Struct. Biol.* **2005**, 152, 221.
15. Shlyakhtenko, L. S.; Gall, A. A.; Weimer, J. J.; Hawn, D. D.; Lyubchenko, Y. L.; *Biophysical Journal* **1999**, 77, 568.
16. Klein, D. C. G.; Stroh, C. M.; Jensenius, H.; Van, M.; Kamruzzahan, A. S. M.; Stamouli, A.; Gruber, H. J.; Oosterkamp, T. H.; Hinterdorfer, P.; *ChemPhysChem* **2003**, 4, 1371.
17. http://en.wikipedia.org/wiki/Atomic_force_microscope#Tapping_mode - acesso em janeiro de 2009.

18. Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A.; *Princípios de Análise Instrumental*, 5^a. ed., Bookman, São Paulo, 2002.
19. Cunha, R. B.; *Tese de doutorado*, Universidade de Brasília, Brasília, 2003.
20. <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/maldi-ionisation.html> - acesso em março de 2009.
21. Song, F.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, 18, 1286.
22. Zhang, D.; Xie, Y.; Mrozek, M. F.; Ortiz, C.; Davisson, V.; Jo, B. D.; *Anal. Chem.* **2003**, 75, 5703.
23. Bittencourt, S.E.T., Silva, L.P., Azevedo, R.B., Cunha, R.B., Lima, C.M.R., Ricart, C.A.O., Sousa, M.V.; *FEBS Lett.* **2003**, 549, 47.
24. Casero, E.; Vázquez, L.; Martín-Benito, J.; Morcillo, M. A.; Lorenzo, E.; Pariente, F.; *Langmuir* **2002**, 18, 5909.
25. Klein, D. C. G.; Stroh, C. M.; Jensenius, H.; Van, M.; Kamruzzahan, A. S. M.; Stamouli, A.; Gruber, H. J.; Oosterkamp, T. H.; Hinterdorfer, P.; *ChemPhysChem* **2003**, 4, 1371.
26. You, H. X.; Lowe, C. R.; *J. Coll. Interf. Sci.* **1996**, 182, 586.
27. Gonçalves R. P.; Busselez, J.; Lévy, D.; Seguinb, J.; Scheuring, S.; *J. Struct. Biol.* **2005**, 149, 79.
28. Parra, A.; Casero, E.; Lorenzo, E.; Pariente, F.; Vázquez, L.; *Langmuir* **2007**, 23, 2747.
29. Silva, L. P.; *Protein Pept. Lett.* **2001**, 8, 343.
30. Andrade, A. C.; *dissertação de mestrado*, Universidade de Brasília, Brasília, 2006
31. McCloskey, J. A.; *Mass spectrometry, in Methods in enzymology*, vol. 193, Academic Press, San Diego, CA, 1990.
32. <http://www.millipore.com/techpublications/tech1/ps2342enus> - acesso em janeiro de 2009
33. Lee, S. S.; Fenter, P.; Park, C.; Nagy, K. L.; *Langmuir* **2008**, 24, 7817.
34. Sides, P. J.; Faruqui, D.; Gellman, A. J.; *Langmuir* **2009**, 25, 1475.
35. Eriksson, C.; Blomberg, E.; Claesso, P.; Nygren, H.; *Colloid Surf. B: Biointer.* **1997**, 9, 67.
36. Quirk, J. P.; Pashley, R. M.; *J. Chem. Phys.* **1991**, 95, 3300.

37. Simúth, J.; *Apidologie* **2001**, 32, 69.
38. Bilikova, K.; Hanes, J.; Nordhoff, E.; Saenger, W.; Klaudinya, J.; Simúth, J.; *FEBS Lett.* **2002**, 528, 125.
40. Kimura, M.; Kimura, Y.; Tsumura, K.; Okihara, K.; Sugimoto, H.; Yamada, H.; Yonekura, M.; *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2003**, 67, 2055.
41. Tamura, S.; Konob, T.; Haradab, C.; Yamaguchib, K.; Moriyama, T.; *Food Chemistry* **2009**, 114, 1491.
42. Livadaris, V.; Blais, J. C.; Tabet, J. C.; *Eur. J. Mass Spectrom.* **2000**, 6, 409.
43. Perera, I. K.; Allwood, D.; Dyer, P. E.; Oldershaw, G. A.; *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1995**, 145, 09.
44. Abu-Lail, N. I.; Camesano, T. A.; *Journal of Microscopy* **2003**, 212, 217.
45. Hsu, N.-Y.; Yang, W.-B.; Wong, C.-H.; Lee, Y.-C.; Lee, R. T.; Wang, Y.-S.; Chen, C.-H.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, 21, 2137.