

## 2 TÉCNICAS ANALÍTICAS: DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ELEMENTOS-TRAÇO E TÉCNICAS PROTEÔMICAS

### 2.1. Determinação e quantificação de elementos-traço

As técnicas analíticas dedicadas à determinação e quantificação de elementos-traço são inúmeras, mas uma que tem se destacado nos últimos anos, devido à seu caráter multielementar, baixos limites de detecção e alta precisão, é a espectrometria de massa com fonte de plasma induzido (ICP-MS – Inductively coupled plasma mass spectrometry).

Esta técnica foi desenvolvida no final dos anos 80, com o intuito de combinar a facilidade de introdução de amostra e a rapidez de análise da tecnologia de ICP com os limites de detecção baixos e preciso de um espectrômetro de massa (Warra e Jimoh, 2011).

Os componentes das amostras são decompostos a íons positivos em um plasma de argônio a alta temperatura e analisados baseados na suas razões massa/carga. Um ICP-MS consiste, basicamente, dos processos de introdução de amostra e geração de aerosol, ionização por uma fonte de plasma, separação das massas e detecção. As amostras líquidas são bombeadas e introduzidas através de um nebulizador, que a converte, com argônio, em um vapor fino. O aerosol então passa por uma câmara de spray onde as gotas maiores são descartadas (Jarvis, Gray *et al.*, 1992). Este processo é necessário para produzir e selecionar gotículas pequenas o suficiente para serem vaporizadas no plasma.

Após a passagem da amostra pelo nebulizador e sua parcial desolvatação, o aerosol se move para dentro do corpo do plasma e é misturado com mais gás argônio. O plasma quente remove qualquer solvente remanescente e causa a atomização dos constituintes da amostra, seguida de ionização. A atomização/ionização ocorre à pressão atmosférica, portanto a interface entre o

ICP e o MS se torna crucial ao criar um ambiente de vácuo para o sistema MS. Os íons passam por um pequeno orifício em um sistema a vácuo, onde um jato supersônico é formado e os íons então são passados para o sistema de MS em altas velocidades, se expandido no sistema à vácuo (Jarvis, Gray *et al.*, 1992). O vácuo é necessário para que os íons fiquem livres para se moverem sem colisões com as moléculas de ar. No primeiro estágio do MS, os íons são removidos do plasma por um sistema de extração por bomba. Um feixe de íons é produzido e focalizado e então levado ao separador de massas e posteriormente ao detetor (Newman, 1996).

As técnicas hífenadas envolvendo o ICP-MS estão em constante desenvolvimento na área de estudos de biomoléculas. Embora o ICP-MS não permita a obtenção da forma química ou estrutural dos analitos presentes (pois todas as formas do analito são convertidas a íons positivamente carregados no plasma), este instrumento é um excelente analisador elementar e também funciona como um excelente detector ao ser acoplado à cromatografia a líquido de alta resolução (High performance liquid chromatography - HPLC). O acoplamento do ICP-MS a esta técnica de separação permite a separação dos analitos de interesse em suas formas químicas constituintes, levando à identificação de frações distintas de amostras protéicas. Este tipo de acoplamento possui inúmeras vantagens, como análises mais rápidas, possibilidade de automação, menor contaminação das amostras e perdas, maior reprodutibilidade em comparação a outros métodos, menores riscos de oxidação ou degradação das amostras por bactérias (Michalke, 2002) e, principalmente, maior sensibilidade, proporcionada pelo ICP-MS. O acoplamento HPLC-ICP-MS é usualmente utilizado em conjunto com colunas de exclusão de tamanho (Size exclusion chromatography – SEC), muito utilizada para a separação de biomoléculas como proteínas, onde a retenção do soluto depende da sua massa molecular, e não o peso molecular. Este tipo de coluna é vantajosa por ser um método brando de separação, que geralmente não resulta na perda de espécies elementares ou em alterações ao passar pela coluna (Schaumlöffel, 2007; Tastet, Schaumlöffel *et al.*, 2008).

## **2.2. Técnicas proteômicas**

Estudos proteômicos geralmente consistem de três etapas principais: o preparo das amostras, a separação das proteínas, geralmente utilizando a eletroforese bidimensional (2D), e a identificação destas proteínas através de técnicas de espectrometria de massa e ferramentas de bioinformática (Abbot, 1999).

### **2.2.1. A importância do preparo de amostras para aplicações proteômicas**

O preparo de amostra é fundamental para uma boa análise proteômica. Diversas estratégias são utilizadas para preparar amostras biológicas para estudos proteômicos, porém como esta etapa é crucial, deve-se tomar certas precauções. Devido à grande diversidade de amostras proteicas, o procedimento ótimo para qualquer tipo de amostra deve ser determinado empiricamente. Idealmente o processo resulta na completa solubilização, desagregação, desnaturação e redução das proteínas da amostra (Amersham-Biosciences, 2004). No geral, o ideal é manter o preparo de amostras o mais simples possível, para evitar perdas. Um preparo de amostra básico consiste na ruptura celular (quebrar a membrana ou parede celular das células presentes na amostra, para liberar as proteínas), e então a solubilização destas proteínas de modo a obter uma amostra adequada para conseguir uma boa dosagem proteica e consequente uso na eletroforese bidimensional.

Algumas opções de preparo de amostra são:

- a) Disrupção celular – a disrupção celular é geralmente realizada utilizando um (ou mais) dos métodos a seguir:
  - Lise osmótica (geralmente utilizadas para culturas celulares)
  - Ciclos de congelamento/descongelamento da amostra com o objetivo de romper membranas celulares e extrair proteínas presentes na amostra (bactérias)
  - Lise por detergentes (para bactérias, fungos e leveduras)

- Sonicação
- Lise enzimática
- Utilizando um tampão de lise (contendo uréia e detergentes)
- Quebra mecânica (com ou sem o uso de nitrogênio líquido)
- Alta pressão
- Homogeneização mecânica

Cuidado deve ser tomado para controlar o pH da amostra, evitar o calor (especialmente em amostras com uréia) e tomar cuidado com degradação proteolítica da amostra (utilizando, por exemplo, inibidores de proteases ou trabalhando rapidamente e no gelo).

b) Solubilização das proteínas: Esta etapa é extremamente importante, pois se as proteínas não estiverem bem solubilizadas a eletroforese bidimensional não dará resultados adequados.

- Utilizando substâncias caotrópicas:

- Ex: Uréia - eficiente na quebra de ligações de hidrogênio
- Tiouréia - eficiente na quebra de interações hidrofóbicas.

- Utilizando detergentes não-iônicos ou zwitteriônicos:

- Ex: NP-40, Triton X-100 – não muito eficazes na solubilização de proteínas de membrana muito hidrofóbicas
- CHAPS, sulfobetaínas (e.g. SB 3-10 ou ASB 14) – mais eficientes na solubilização de proteínas hidrofóbicas

- Utilizando agentes redutores:

- Ex: DTT, dithioerythritol (DTE), tributylphosphine (TBP), tris (2-carboxyethyl)phosphine (TCEP)
- Sonicação
- Utilizando anfólitos carreadores

c) Remoção e/ou inativação de compostos interferentes: Este é um passo extremamente importante no preparo de amostras para eletroforese bidimensional. Diversos compostos são reconhecidamente interferentes, e são removidos como descrito a seguir:

- Proteases: utilizando inibidores de proteases (leupeptina, E-64, EDTA, benzamidina, etc).
- Sais: Os sais interferem diretamente no processo eletroforético, migrando pelo gradiente de pH, produzindo calor e se acumulando nas duas extremidades da fita IPG (Immobilized pH Gradient – Gradiente de pH Imobilizado). Isto causa zonas de alta condutividade, queda de voltagem e diminuição do campo elétrico. Por causa disso, as proteínas não focalizam em seu ponto isoelétrico (pI) e aparecem no gel final como arrastes/faixas. Sua remoção pode ser feita por diálise ou gel filtração, e, dependendo da amostra, por precipitação.
- Lipídios: Estes compostos interferem profundamente na eletroforese, e sua remoção se dá através do uso de detergentes em concentrações acima de 2% ou através de precipitação. Cuidado deve ser tomado, pois o detergente pode interferir na eletroforese, devendo ser removido antes desta etapa. Remoção através de detergentes específicos deslipidificantes.
- Ácidos nucleicos – aumentam a viscosidade da amostra e podem causar manchas de fundo nos géis. Ácidos nucleicos de alto peso molecular obstruem os poros do gel. Podem ligar-se à proteínas através de interações eletrostáticas e impedir a focalização das mesmas. Remoção através de detergentes específicos. No caso dos ácidos nucleicos DNA e RNA, que também acabam por ser corados na coloração de géis pelo método da prata; causam arraste horizontal na parte acídica do gel; precipitam com as proteínas quando a amostra é aplicada na ponta básica do gel para IEF. São removidos através da precipitação de proteínas, tratamentos com DNAases/RNAases, por sonicação e pelo método de extração de DNA/RNA (Fenol/clorofórmio).
- Polissacarídeos: Remoção através de procedimentos enzimáticos ou precipitação.
- Material insolúvel: Removido geralmente através de centrifugação.

Observação: cuidados com a precipitação – a precipitação acarreta perdas, e pode concentrar compostos interferentes juntamente com as proteínas. Existem diversos tipos de precipitação, cada uma mais adequada para certo tipo de amostra (ex: precipitação por acetona, TCA, sulfato de amônio, etc), portanto deve-se analisar bem o protocolo para evitar perdas.

## 2.2.2 Eletroforese uni e bidimensional (1D e 2D)

A eletroforese bidimensional foi descrita por O'Farrel (O'Farrel, 1975), e continua sendo o modo mais direto e poderoso para mapear o proteoma de um organismo (Baldisserotto, Lopez-Vasquez *et al.*, 2004; Xu, Garrett *et al.*, 2006). Nesta técnica as proteínas são separadas por dois passos, através de duas de suas propriedades físico-químicas, o ponto isoelétrico (pI) e o peso molecular (PM) (Figura 2). A eletroforese bidimensional é um método de separação extremamente eficiente porque as proteínas em uma amostra são separadas simultaneamente fornecendo informações sobre o seu ponto isoelétrico, massa molecular, expressão, abundância relativa e modificações pós-traducionais, verificadas pela alteração da mobilidade eletroforética (Pandey e Mann, 2000).

O primeiro passo, também chamado de primeira dimensão, é a focalização isoelétrica (Isoelectric focusing – IEF), que separa as proteínas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI). É formado um gradiente de pH, no qual as proteínas carregadas movem-se até o seu pI, onde possuem carga nula e estacionam. Antes do desenvolvimento de gradientes de pH immobilizados, dispostos em fitas de plástico disponíveis comercialmente, a eletroforese bidimensional era realizada com um sistema descontínuo, o que não permitia uma grande reprodutibilidade dos géis de IEF. Porém com o desenvolvimento destes gradientes immobilizados, ou fitas IPG (Immobilised pH Gradients), a eletroforese se tornou extremamente reprodutível, e ainda é o método mais utilizado para a realização da separação de proteínas na primeira dimensão.

Após a IEF, as fitas são equilibradas em solução contendo DTT, para romper as pontes dissulfetos (ligações S-S) presentes nas proteínas, facilitando o acesso do SDS às partes mais internas das mesmas, devido à eliminação da estrutura terciária protéica, e iodoacetamida, para evitar a reoxidação dos grupos tióis (alquilação).

O segundo passo (segunda dimensão) separa as proteínas de acordo com seu peso molecular por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE). O gel é uma matriz constituída de polímeros de acrilamida com ligações cruzadas de N-N-Metil bisacrilamida. A

porosidade dos géis pode ser escolhida, adequando-se melhor à amostra a ser separada. As porcentagens usuais são 5%, 7,5%, 10%, 12,5% e 15%. Quanto maior a concentração de acrilamida, menores serão os poros do gel resultante. O persulfato de amônio é utilizado para gerar radicais livres, e o TEMED (tetrametiletilenodiamina) é o catalisador que auxilia na transferência do elétron do radical livre.

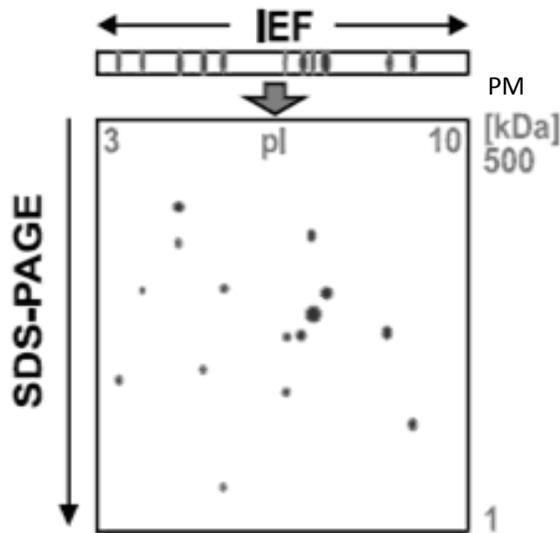


Figura 1. Esquema de separação de proteínas através da técnica de eletroforese

O uso do SDS é feito para que a separação dependa apenas da massa molecular da proteína, e não de sua forma e carga nativa. Como o SDS é um detergente aniônico que interage com as cadeias peptídicas das proteínas, ocorre a desnaturação das proteínas e a formação de um complexo de SDS-proteína, carregado negativamente (figura 3). Ao aplicar a corrente elétrica, todas as proteínas, então com a mesma carga, migram em direção ao eletrodo positivo e são separadas somente pelas diferenças entre as suas massas molares. As proteínas menores migram mais rapidamente enquanto as maiores têm mais dificuldade de atravessar a malha do gel e, portanto, movem-se mais lentamente.

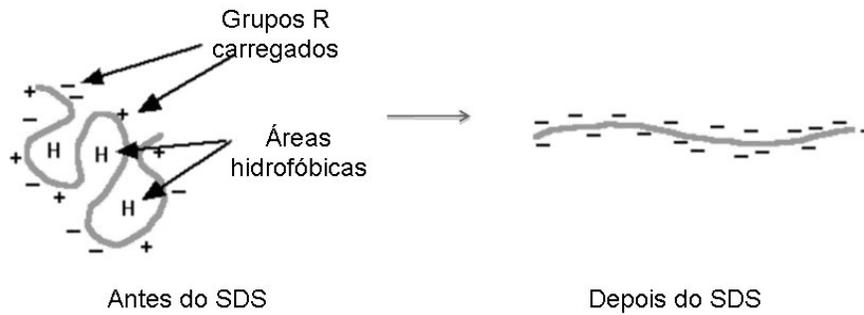


Figura 2. Esquema da modificação das proteínas causada pelo uso do SDS na eletroforese bidimensional

O resultado final, após a coloração dos géis, é um perfil protéico onde cada *spot* corresponde a uma ou a algumas poucas proteínas, facilitando a posterior análise por espectrometria de massa.

A eletroforese unidimensional consiste em separar as proteínas apenas por seu peso molecular, aplicando as amostras diretamente no gel com auxílio de um gel de empilhamento, fazendo com que as proteínas migrem verticalmente, sem passar pela etapa de separação por ponto isoelétrico. Embora forneça menos detalhes a respeito das proteínas das amostras, possui grande utilidade no caso de análise de proteases e outros.

### 2.2.3. Métodos de coloração de eletroforese

Diversos métodos de coloração de géis de eletroforese podem ser usados para visualizar as proteínas separadas. Após uma etapa inicial de fixação das proteínas no gel, geralmente usando uma mistura de etanol e ácido acético, as proteínas são coradas. Os métodos mais utilizados são a coloração por Coomassie Brilliant Blue, por prata e por fluorescência.

A coloração por Coomassie possui sensibilidade na faixa de 30-100 ng de proteína, menos sensível que os dois outros métodos (Patton, 2002), porém com a vantagem de ser um método simples e diretamente compatível com a espectrometria de massa.

A coloração por fluorescência, embora possuindo alta sensibilidade e compatibilidade com a espectrometria de massa, requer equipamentos e softwares

especiais e caros, não sendo, portanto, a primeira opção, especialmente para laboratórios pequenos (Poland, Rabilloud *et al.*, 2005).

Já a coloração com prata possui grande sensibilidade, na faixa de 0,1 ng de proteína por ponto protéico. Este método apresenta algumas desvantagens, como por exemplo, a demora do processo, podendo-se estender até 7 h de trabalho, a possibilidade de gerar coloração negativa em regiões saturadas de proteínas do gel e, dependendo do protocolo utilizado, a incompatibilidade com a espectrometria de massa, porém diversos protocolos já existem que tornam este método de coloração adequado com relação à posterior espectrometria de massa. Neste método, as proteínas se ligam aos íons de prata, que então são reduzidos em condições apropriadas, construindo uma imagem visível das proteínas com o metal prata finamente dividido.

#### **2.2.4 Zimografia**

A zimografia é uma técnica proteômica eletroforética que permite a visualização do número e tamanho aproximado de enzimas em amostras biológicas, com base na degradação de um substrato copolimerizado juntamente com os géis de eletroforese. No caso das proteases, utilizam-se como substrato a gelatina, caseína, fibronectina e colágeno, dentre outros (Leber e Balkwill, 1997; Itoh, Ito *et al.*, 1998; Troeberg e Nagase, 2003; Snoek-Van Beurden e Von Den Hoff, 2005). Esta técnica é muito útil na análise da composição de proteases de amostras biológicas complexas, pois a visualização dessas proteases depende diretamente da atividade proteolítica (Kjeldsen, Johnsen *et al.*, 1993; Feitosa, Gremski *et al.*, 1998; Kimura, Shinohara *et al.*, 2001; Snoek-Van Beurden e Von Den Hoff, 2005).

A zimografia com substrato de gelatina é uma técnica amplamente usada no estudo de metaloproteases, especialmente as metaloproteases de matriz (MMPs), sendo compatível com o sistema de tampão de Laemmli, comumente utilizado em eletroforese SDS-PAGE (Hummel, Penheiter *et al.*, 1996), o que a torna interessante por ser de simples aplicação, sem grandes modificações em uma técnica já estabelecida. Outras vantagens desta técnica incluem a sensibilidade na faixa de picogramas e o uso de reagentes baratos e acessíveis (Kleiner e

Stetlerstevenson, 1994; Takeshita, Tokutomi *et al.*, 2001).

Esta técnica consiste em co-polimerizar o substrato de gelatina em um gel comum de SDS-PAGE. Como o substrato está preso nos poros do gel, ele não migra quando é aplicada a corrente elétrica durante a eletroforese. A amostra biológica é desnaturada por SDS, porém não reduzida, e então aplicada no gel para separação. O tampão de solubilização da amostra não deve conter  $\beta$ -mercaptoetanol, para evitar a quebra das pontes de dissulfeto das MMPs, que evitaria a renaturação das mesmas. Após a corrida eletroforética, as proteases separadas são renaturadas dentro do gel, por lavagens repetidas com um detergente não-iônico, como o Triton X-100, que substitui o SDS do gel (Heussen e Dowdle, 1980). O gel é então incubado em um tampão adequado, permitindo que as proteases renaturadas realizem a digestão do substrato em uma zona ao redor de sua posição de eletroforese. Estas zonas são visualizadas ao corar o gel com Coomassie Blue, onde o gel inteiro fica azul e as áreas de digestão aparecem como zonas transparentes (Troeborg e Nagase, 2003). As proteases são então identificadas comparando as áreas digeridas com os padrões de peso molecular e/ou fazendo testes de inibição com inibidores específicos a certas classes de proteases. Não há análise por espectrometria de massa neste caso.

### **2.2.5.**

#### **Processamento das proteínas visualizadas através da eletroforese 2D**

A tripsina é a enzima mais comumente utilizada em estudos proteômicos para realizar a digestão das proteínas para posterior extração dos géis e análise por espectrometria de massa, embora existam outras. Ela é uma serino-protease encontrada no sistema digestivo de muitos vertebrados, onde possui a função de hidrolisar proteínas. Ela é a enzima mais vantajosa para uso em estudos proteômicos devido ao fato de apresentar custo relativamente baixo, possuir alta atividade proteolítica, a capacidade de quebrar as proteínas em peptídeos pequenos (600 - 2500 Da) e de ser covalentemente modificada, para minimizar os processos de autodigestão ou autólise (Vekemans, Janssens *et al.*, 1994; Sussulini, Garcia *et al.*, 2007). O seu mecanismo enzimático é semelhante ao de outras

serino-proteases. Ela contém uma tríade catalítica que consiste da histidina-57, aspartato-102 e serino-195. Estes três resíduos formam o sítio ativo serino-nucleofílico. O resíduo de aspartato localizado no bolso catalítico das tripsinas é o responsável por atrair e estabilizar lisinas e argininas positivamente carregadas e, portanto, é o responsável pela especificidade da enzima. Portanto, ela cliva as proteínas especificamente no C-terminal adjacente aos resíduos de arginina e lisina, resultando em conjuntos de peptídeos únicos. Estes conjuntos de peptídeos podem então ser considerados como a “impressão digital” daquela molécula específica, sendo então relativamente fácil sua identificação (Shevchenko, Jensen *et al.*, 1996; Quadroni e James, 2001).

### 2.3.

#### **Espectrometria de massas na identificação de proteínas**

A espectrometria de massa baseia-se na determinação precisa da relação massa-carga ( $m/z$ ) de íons gerados a partir de uma molécula na fase gasosa. Um espectrômetro de massa tem 3 componentes básicos: a fonte de ionização, que produz os íons a partir dos analitos; o analisador, que determina a relação  $m/z$  do analito de interesse; e o detector, que detecta a presença do analito.

Antes de 1970, a análise por espectrometria de massa de ácidos nucleicos e outros biopolímeros grandes era restrita pelos métodos tradicionais de ionização, como a ionização química ou de elétrons. A capacidade limitada dessas técnicas de ionização de gerar íons gasosos intactos a partir destas amostras fazia com que a obtenção de informações estruturais ou de peso molecular fossem muito difíceis. Porém, desde o advento das primeiras técnicas de ionização brandas na década de 70, como a ionização por eletrospray (Electrospray Ionization - ESI) e ionização por desorção a laser auxiliada por matriz (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - MALDI), o papel da espectrometria de massa no campo da biologia molecular tem aumentado exponencialmente (Fitzgerald e Smith, 1995). Estas técnicas são consideradas brandas pela sua capacidade de gerar íons a partir de macromoléculas não voláteis sem ou com muito pouca fragmentação da molécula analisada, e permitem todas as vantagens das análises de espectrometria de massa, incluindo alta sensibilidade, alta precisão de massa e tempo rápido de análise, a

ser aplicados a espécies de alto peso molecular, incluindo peptídeos e proteínas (Reyzer e Caprioli, 2005).

Atualmente as tecnologias mais utilizadas para ionização de proteínas e sua subsequente identificação são MALDI e ESI. Estas fontes de ionização podem ser acopladas de diversas maneiras com diferentes tipos de analisadores.

### **2.3.1. MALDI**

A técnica MALDI é considerada uma técnica de ionização branda, assim como a ESI, pois os íons formados possuem baixa energia interna. Isto permite a observação de espécies iônicas moleculares com pouca ou nenhuma fragmentação. Portanto, uma das aplicações de maior sucesso desta técnica tem sido na análise de proteínas.

A técnica MALDI foi introduzida por Karas e Hillenkamp (Jellum, Thorsrud *et al.*, 1983) como um método de transferência de moléculas grandes e lábeis para a fase gasosa na forma de íons intactos. Esta técnica gera íons intactos na fase gasosa ao misturar as moléculas do analito de interesse em uma matriz cristalina apropriada (geralmente um ácido orgânico fraco), que contém um grupo cromóforo que absorve a luz em um comprimento de onda do ultravioleta ou infravermelho. O analito de interesse é misturado com essa matriz, em excesso (de 500 a 50000 vezes) (Sporns e Wang, 1998). Este excesso de matriz é necessário, pois são os cristais da matriz que absorvem a luz UV do laser, com a amostra sendo apenas metaforicamente uma “impureza” incorporada nos cristais da matriz. Quando o pulso do laser impacta com a matriz no vácuo, as moléculas da matriz liberam o excesso de energia absorvida por sublimação e com fragmentação molecular concomitante, porém, se preparada corretamente, a amostra é levada para a fase gasosa pela pluma de sublimação, sem fragmentação (Sporns e Wang, 1998).

A análise de massas subsequente destes íons usando espectrômetros de massa convencionais acoplados a detectores de tempo-de-vôo têm permitido a determinação de massas moleculares com precisões de até 0,010 %.

Apresentemente não existem limitações resultantes das estruturas primária, secundária ou terciária das proteínas nesta técnica (Fitzgerald e Smith, 1995).

### 2.3.1.1. A importância da matriz

A matriz consiste de moléculas facilmente cristalizáveis, que absorvem na região do UV. Estes compostos devem possuir cristais estáveis em condições de vácuo, não sublimando facilmente (Beavis, 1992; Ehring, Karas *et al.*, 1992; Fitzgerald e Smith, 1995).

A matriz possui três papéis principais, onde:

a) a co-cristalização do analito e o excesso da matriz servem para incorporar as moléculas do analito dentro dos cristais da matriz;

b) a absorção da energia de cada pulso do laser na banda de absorção da matriz resulta na ejeção de ambos, a matriz e as moléculas do analito, para a fase gasosa;

c) possui papel na ionização das moléculas do analito, mais provavelmente por interações na fase gasosa do analito com a matriz.

A figura 4 mostra as matrizes mais comumente usadas na técnica MALDI.

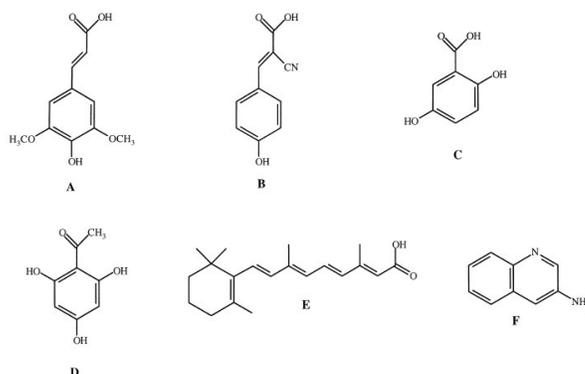


Figura 3. Matrizes mais comumente usadas na técnica MALDI. A = Ácido sinapínico (ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinâmico); B = ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico; C = ácido 2,5-dihidroxi-benzóico; D = 2', 4', 6'-trihidroxiacetofenona; E = ácido retinóico *all trans*; F = 3-aminoquinolina (Sporns e Wang, 1998).

### **2.3.1.2. Analisador**

A técnica MALDI é usada primariamente com espectrômetros de massa Tempo-de-Vôo (ToF – Time of Flight). Os ions são formados na fonte de ionização após um pulso de laser, e são então acelerados a uma energia cinética fixa por um potencial elétrico. Os ions então atravessam o tubo de vôo, que possui uma região livre de campo elétrico, e chegam ao detector em tempos característicos, de acordo com as suas massas. Este período é grosseiramente proporcional à raiz quadrada da razão massa-carga ( $m/z$ ) do íon, e pode ser usado para calcular a massa do íon. Portanto, ions mais leves terão um tempo de vôo menor que o de ions mais pesados. O rápido tempo de análise (menos de um milissegundo) permite a análise rápida e simples de diversas amostras (Fitzgerald e Smith, 1995).

Diferentes tipos de laser são utilizados com sucesso na técnica MALDI, o mais comum sendo o de nitrogênio (337 nm). As irradiações variam com a matriz e combinações de comprimentos de onda, mas geralmente são na faixa de  $10^6$  a  $10^8$  W cm<sup>-2</sup>. O laser pode ser atenuado, para reduzir a força do pulso e aumentar a resolução do equipamento. Estes lasers geralmente ocorrem em uma area de apenas 0,001 mm<sup>2</sup>, ou seja, muita energia é concentrada em apenas um ponto microscópico (Fitzgerald e Smith, 1995).

## **2.4. Ferramentas de bioinformática**

A identificação protéica é feita utilizando os valores das massas moleculares de seus peptídeos obtidos pela espectrometria de massa. No caso do MALDI, utilizam-se os sinais monoisotópicos, comparando os valores obtidos experimentalmente com valores teóricos armazenados em banco de dados disponíveis na internet como o Mascot, PepTident, ProFound e Ms-Fit, dentre outros. Estes programas utilizam um algoritmo computacional que compara as

massas determinadas para peptídeos proteolíticos com as massas calculadas para todas as clivagens enzimaticamente possíveis presentes em diversas bases de dados. A proteína é identificada baseando-se na avaliação estatística dessa comparação. Muitas bases de dados existem, como o “Genbank”, o “SwissProt Database”, o “Protein Database” e o “EMBL”. A identificação é fortemente influenciada pela quantidade de proteína na amostra, grau de modificação pós-traducional, qualidade das buscas automáticas e presença da proteína nos bancos de dados (Kopke, 2003). O conhecimento do genoma de um organismo é de grande importância para permitir a identificação exata das proteínas pelo padrão de peptídeos, e por isso organismos não muito bem estudados muitas vezes não têm suas proteínas identificadas. O ideal é fazer a pesquisa na base de dados mais próxima da taxonomia do organismo de estudo. Por exemplo, ao estudar um peixe raiado, a busca deverá, idealmente, ser conduzida na base de dados correspondente aos Actonipterygii (peixes raiados).