



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UNICEUB

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ESPECTROMETRIA DE MASSA: UMA APLICAÇÃO BIOLÓGICA.

LEONEL ALVES DE OLIVEIRA

Monografia Apresentada ao
Departamento de Ciências Biológicas do
Centro Universitário de Brasília como
parte dos requisitos para obtenção do
grau de Licenciado em Biologia.

Orientador: Dr. MARCELO BUZZI

Brasília - 2001

AGRADECIMENTOS

Primeiramente e sobre todas as coisas a Deus que me faz ver Suas mãos onde geralmente se vê apenas a força da “natureza” e o trabalho do homem. Viver na presença de Deus tem me feito um homem realizado.

Ao Dr. Marcelo Buzzi e à Farmacêutica Lillian Harboe pela paciência, carinho, acessibilidade, pela boa vontade e por serem verdadeiros companheiros.

Ao Professor Marcelo Ximenes que desempenhou com muita competência o seu papel de educador.

À Professora Maria Hosana pelas valiosas correções e sugestões.

Ao Dr. Sérgio Garavelli pelas informações sobre magnetismo.

À Coordenadora Magda que sempre acreditou no meu trabalho.

Aos colegas de trabalho e de turma pelos ricos ensinamentos, incentivo e respeito.

À minha mãe por ter me ensinado a ser forte em tempos de fraqueza.

E à minha amada Simone que em todos os momentos tem sido suporte para mim.

RESUMO

A partir de interpretações sobre a física de um campo eletromagnético sobre partículas eletricamente instáveis, foi desenvolvida uma técnica analítica de alta precisão que possui imensa aplicação na área biológica. Esta técnica é a espectrometria de massa que pode ser entendida como uma grande ferramenta de aplicação biológica pelo fato de, nas últimas seis décadas, ter representado um método eficiente para a identificação e quantificação de compostos químicos bioativos. Alguns exemplos de aplicação biológica e biomédica podem ser observados nos testes de doping, onde se procura a presença de drogas estimulantes, na análise residual de pesticidas em alimentos, nas análises de acúmulo de metais pesados no organismo, uma vez que podem desencadear neuropatias periféricas, e no seqüenciamento de proteínas que representam um importante papel na descoberta de fenômenos fisiológicos e patológicos associados às atividades proteicas do genoma humano. A espectrometria de massa é, sem dúvida, uma potente instrumentação analítica que tem alcançado mais espaço no mundo científico e tecnológico por solucionar problemas e gerar muitas perspectivas de progresso em análises químicas.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	II
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. DESENVOLVIMENTO DAS TÉCNICAS	5
2.1. ESPECTROMETRIA DE MASSA	6
2.2. FASES PRÉ-ANALÍTICAS	8
2.2.1. Extração	8
2.2.2. Derivatização	9
2.2.3. Separação	9
2.3. FASE ANALÍTICA	10
3. APLICAÇÕES	13
3.1. A SÍNTESE DE RETINOL	15
3.2. DOPING	16
3.3. ANÁLISE DE ELEMENTOS.....	18
3.4. PROTEOMA HUMANO	19
4. PERSPECTIVAS	21
5. INTERPRETAÇÃO DE ESPECTROS.....	21
7. CONCLUSÃO.....	23
8. BIBLIOGRAFIA	24

1. INTRODUÇÃO

Desde a Antigüidade clássica as propriedades e características do campo magnético vêm sendo estudadas e descritas. Os gregos registraram a propriedade atrativa que um tipo de pedra chamada magnetita exercia sobre fragmentos de ferro. Há também registros escritos sobre a utilização de magnetos na navegação, datados do século XII. Vários físicos descobriram propriedades interessantes sobre os efeitos que o campo magnético proporciona em materiais eletrizados, e assim estabeleceram uma estreita relação entre magnetismo e eletricidade.

O primeiro trabalho desenvolvido neste aspecto é datado do século XIX e foi realizado por Hans Christian Oersted. Ele demonstrou que uma corrente elétrica afetava a orientação da agulha de uma bússola. Como a orientação de uma bússola está relacionada à orientação do campo magnético terrestre, ele estabeleceu, ainda que de modo arcaico, uma relação entre os campos elétrico e magnético. Em experiências posteriores, André-Marie Ampère e colaboradores elaboraram um teorema que estabelecia que a fonte fundamental do magnetismo é uma corrente elétrica. Esta teoria propõe que a interação magnética básica é a força magnética que uma carga elétrica em movimento exerce sobre outra carga.

Uma das características mais importantes da força magnética atuando sobre uma partícula eletricamente carregada em movimento num campo magnético é a perpendicularidade da força em relação ao vetor velocidade da partícula. Sendo assim, a força magnética altera a direção deste vetor, provocando um desvio na sua trajetória sem alterar a sua energia cinética. No caso especial do vetor velocidade da partícula ser perpendicular ao campo magnético, a partícula se desloca numa órbita circular de modo que

a descrição do raio desta órbita fornece o produto da massa da partícula pela aceleração centrípeta do movimento circular (V^2/R), de acordo com a segunda Lei de Newton (fig. 1). Neste caso, a força resultante é qvB , pois v e B são perpendiculares. Então, a segunda Lei de Newton dá:

$B =$ Campo Magnético *(Equação 1.1)*

$q =$ Carga Elétrica da Partícula

$v =$ Velocidade

$r = mv / qB$

$r =$ Raio do movimento circular

$m = rqB / v$

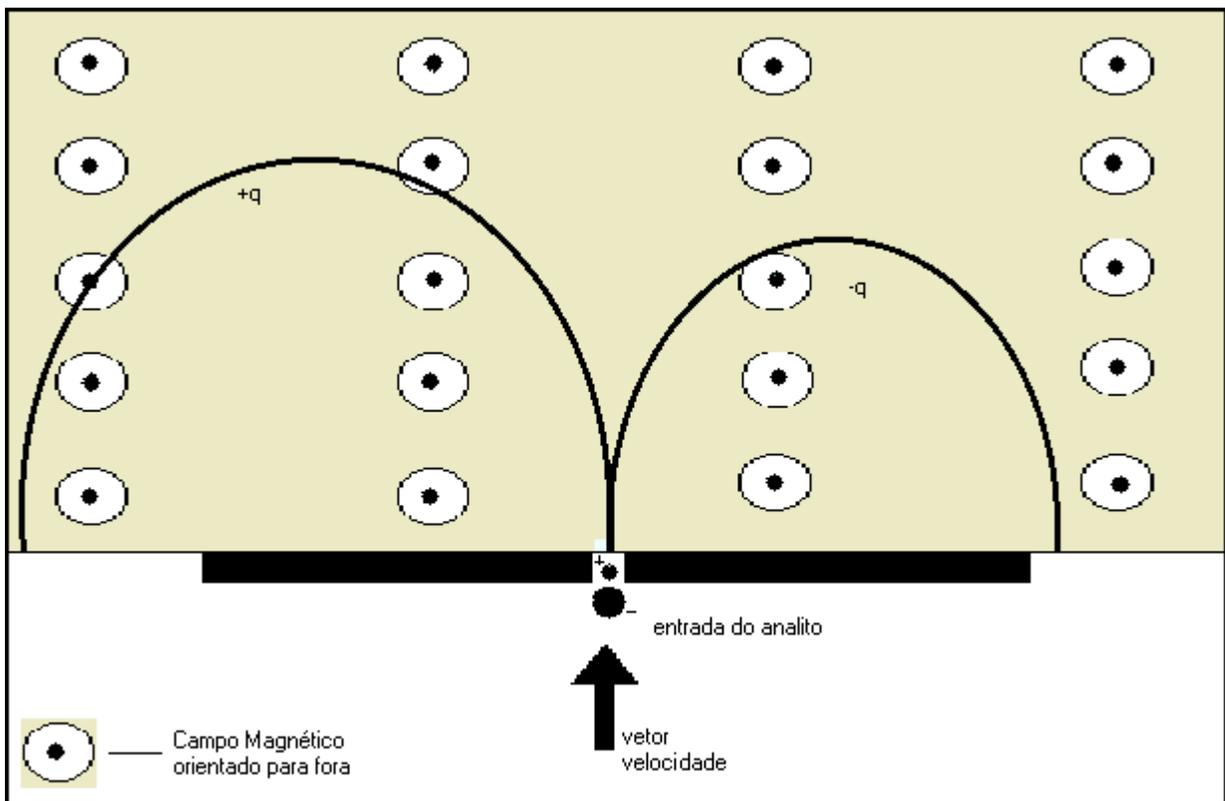


Figura 1. Funcionamento básico de um Espectrômetro de Massa.

(Tipler 1991.)

A força magnética sobre uma partícula que se move num campo magnético uniforme pode ser equilibrada por uma força elétrica, com os módulos e as direções dos campos magnético e elétrico apropriadamente ajustados. Gerando um cruzamento entre os

campos equilibrados em módulo, qualquer partícula que possuir como módulo da velocidade o módulo do campo elétrico dividido pelo campo magnético, independentemente de sua massa ou carga, passará pelos campos sem sofrer deflexão alguma. Logo uma partícula com velocidade maior que o módulo do quociente entre os campos será desviada na direção da força magnética, e a que possuir velocidade menor será defletida na direção do campo elétrico. Esta configuração dos campos recebeu o nome de filtro de velocidades. (Tipler 1991.)

Segundo o experimento de J.J. Thomson em 1897, os desvios sofridos por partículas eletricamente carregadas por ação conjunta dos campos elétrico e magnético com diferentes combinações forneceu dados para se concluir que as razões entre carga (Q) e massa (m) eram sempre as mesmas, e em 1913, Thomson demonstrou que o neônio consiste de diferentes espécies atômicas isotópicas com massa atômica de 20 e 22 g/mol. Este foi um marco fundamental para a análise química, pois a partir das propriedades eletromagnéticas dos campos se tornou possível detectar isótopos de determinado elemento químico. Porém, estas conclusões e demonstrações não saíram da teoria. Em 1919, Francis William Aston, desenvolveu um equipamento capaz de medir a massa de moléculas ionizadas, bem como isótopos de um elemento químico, determinando além de sua existência, a sua abundância na natureza. Este aparelho foi chamado de **espectrômetro de Massa**, cujo mecanismo de funcionamento está inteiramente associado ao eletromagnetismo através de um sistema físico denominado quadrupolo (fig. 2). (Thomson apud Kiltson 1996.)

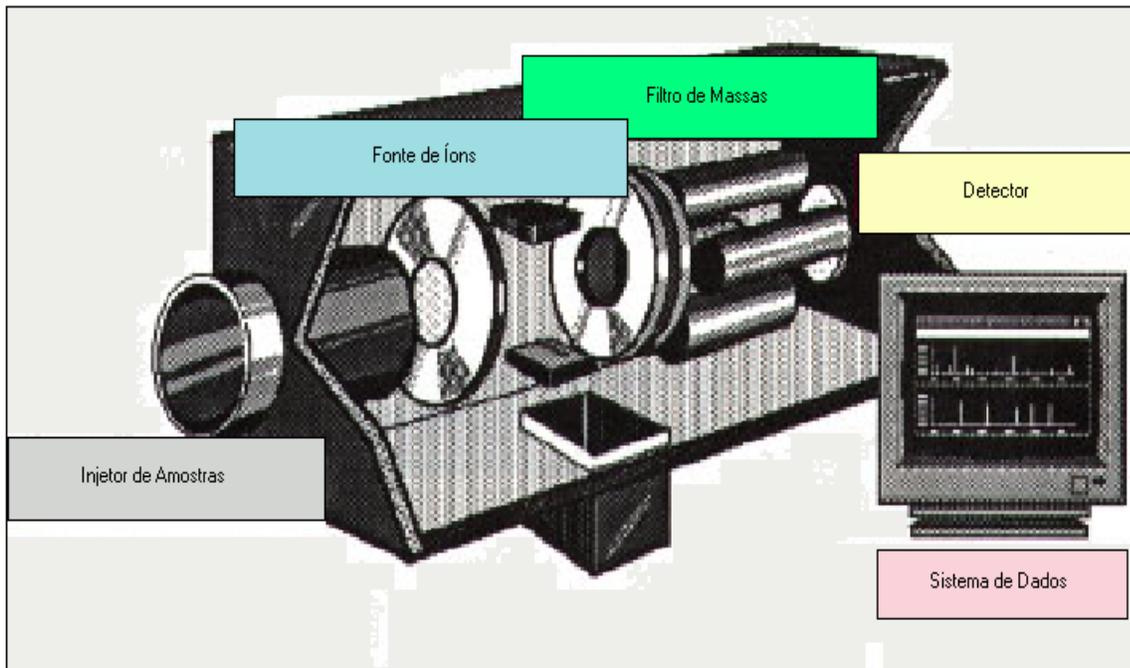


Figura 2. Esquema do quadrupolo

O quadrupolo é um sistema constituído por quatro barras paralelas com cargas opostas entre si gerando um campo eletromagnético. O espaço existente entre as barras é onde ocorre o fluxo dos íons, que de acordo com suas propriedades eletromagnéticas promovem desvios na trajetórias destes íons de acordo com a relação carga / massa (fig.2.1).

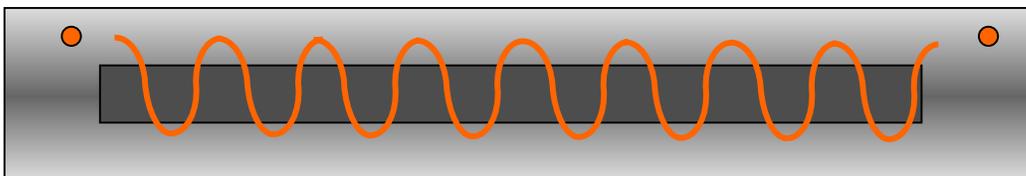


Figura 2.1. Trajetória dos íons no campo eletromagnético

2. DESENVOLVIMENTO DAS TÉCNICAS

Ao término da Segunda Guerra Mundial, a ciência analítica sofreu um grande crescimento no que se refere ao desenvolvimento de técnicas e instrumentos de análise de precisão. Algumas técnicas que já haviam sido fundamentadas desde o final do século XIX, só começaram a ser desenvolvidas a partir do pós-guerra. O crescimento extraordinário que a informática sofreu desencadeou uma série de benefícios para as áreas de análise da química, e as técnicas analíticas de precisão puderam então, ser associadas a sistemas eletrônicos e informatizados que favoreceram a precisão e a velocidade no processamento dos dados analíticos. (Morrison e Boyd 1979.)

As espectroscopias de infravermelho e de ressonância magnética nuclear, as cromatografias de fase gasosa e líquida e a espectrometria de massa são exemplos de técnicas de análise de precisão que se desenvolveram muito a partir da associação a sistemas informatizados. A espectrometria de massa ganhou importância devido a inúmeras aplicações práticas que foram descobertas em áreas diversas que vão da medicina à engenharia. (Morrison e Boyd 1979.)

A espectrometria de massa também é uma técnica de muita relevância científica desenvolvida a partir de estudos sobre o campo eletromagnético. É através dela que se pode obter dados precisos sobre a massa atômica de determinado composto químico. É no ramo da química orgânica que se encontram as maiores utilidades da espectrometria de massa, tanto para a síntese quanto para a análise de compostos químicos, mas existe também ampla aplicação nas áreas biomédica e biológica, tanto que atualmente algumas técnicas biomoleculares de diagnóstico estão ganhando força com o emprego da espectrometria de massa. (Morrison e Boyd. 1979.)

A espectrometria de massa é uma técnica que associa conhecimentos de várias áreas científicas. Ela é fundamentada em princípios físicos sobre o eletromagnetismo, se aplica em análises de estruturas químicas, algumas delas biologicamente ativas, e é interpretada através de cálculos integrais onde é medida a intensidade do analito ionizado através da relação carga/massa (m/z) e de sua abundância natural. Apresentando tais características a espectrometria de massa assume um caráter interdisciplinar e transversal no desenvolvimento científico uma vez que inter-relaciona os conhecimentos das ciências puras.

2.1. Espectrometria de Massa

Espectrometria de massa é uma técnica analítica que fornece dados sobre o valor da massa de um determinado composto químico através de um gráfico denominado **espectro de massa**, cuja representação se dá através de picos de acordo com a massa e abundância (fig. 3).

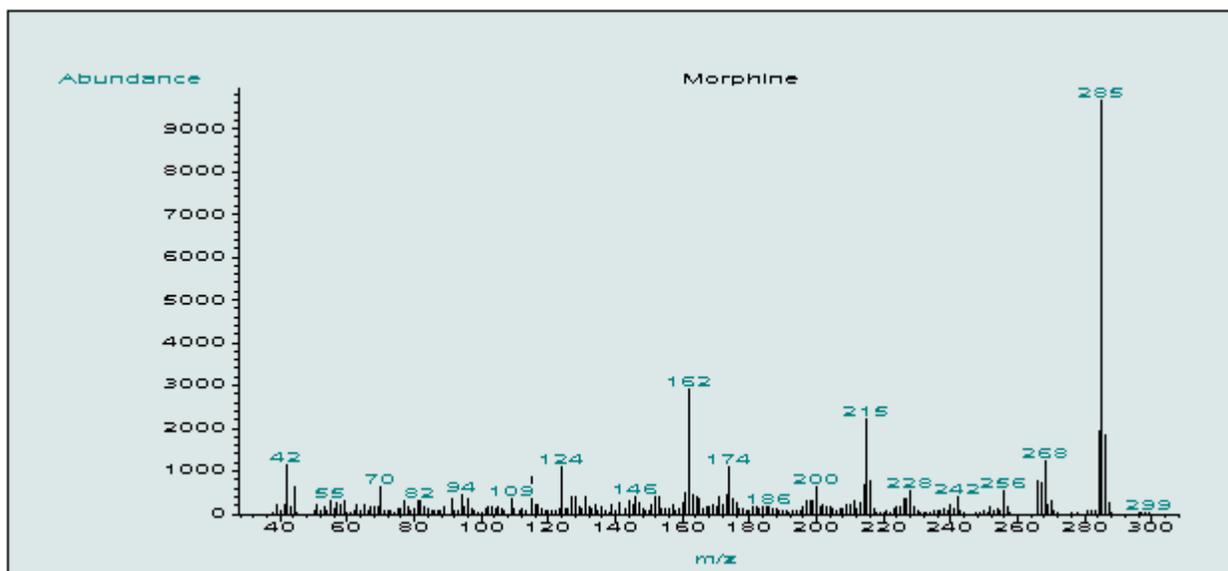


Figura 3. Espectro de massa da morfina Fonte: MSD ChemStation User's Guide. Hewlett-Packard.USA 1995

O equipamento utilizado para realizar esse tipo de análise é um espectrômetro de massa que é um instrumento analítico desenvolvido a partir de interpretações da física do efeito de um campo eletromagnético sobre partículas carregadas eletricamente. Ele mede a relação massa (m) / carga (z) de uma substância química e fornece um gráfico que expressa a sua massa molecular.

Um espectrômetro de massa, quase sempre está conjugado a outros instrumentos que desenvolvem a fase pré-analítica. São cromatógrafos de fases líquida e gasosa, indutores de plasma e espectrômetros de outras categorias que servem como preparadores para a análise do espectrômetro. O grau de especificidade com que este equipamento trabalha requer uma preparação delicada. Nem sempre é possível analisar uma substância em meio a uma mistura, é necessário que ela seja individualizada e que adquira algumas propriedades ou configurações químicas necessárias para a sua detecção.

Uma mistura química é composta pela união ou ligação de diversas substâncias. Ao se deparar com uma mistura, o analista precisa estabelecer qual é a categoria ou substância que se quer analisar. Se forem proteínas, haverá necessidade de isolara sua amostra da presença de outros compostos químicos como lipídeos, carboidratos e outras biomoléculas. Caso o analista queira detectar as categorias de lipídeos presentes na sua mistura, ele terá que isolar os lipídeos através de técnicas de extração e desprezar todo o restante. Após a extração da classe desejada, a amostra deverá ser submetida a processos de separação, derivatização e ionização, para que adquira um caráter eletroquímico adequado à sensibilidade do equipamento. Isto pode ser obtido por impacto eletrônico ou por ação química. Todas estas fases são consideradas como pré-analíticas e são de extrema importância para o êxito da análise. (Baugh 1993.)

2.2. Fases pré-analíticas

Entende-se por fase pré-analítica todos os processos químicos que antecedem a análise do MS. Não se pode analisar um produto químico em sua forma bruta, pois apresenta complexos tipos de ligações entre os vários componentes químicos que o constituem. É necessário realizar o isolamento do composto que se deseja analisar. As principais fases pré-analíticas são: extração, derivatização e em alguns casos a separação por cromatografia.

2.2.1. Extração

Nesta fase uma mistura sofre um processo de separação de acordo com a categoria de substâncias que se deseja obter (fig. 4).

Isto pode se dar através de solubilizações com solventes orgânicos, como tolueno, hexano ou acetona. Devido às suas características físico-químicas, os solventes arrastam determinado grupo de substâncias. (Freeman 1981.)

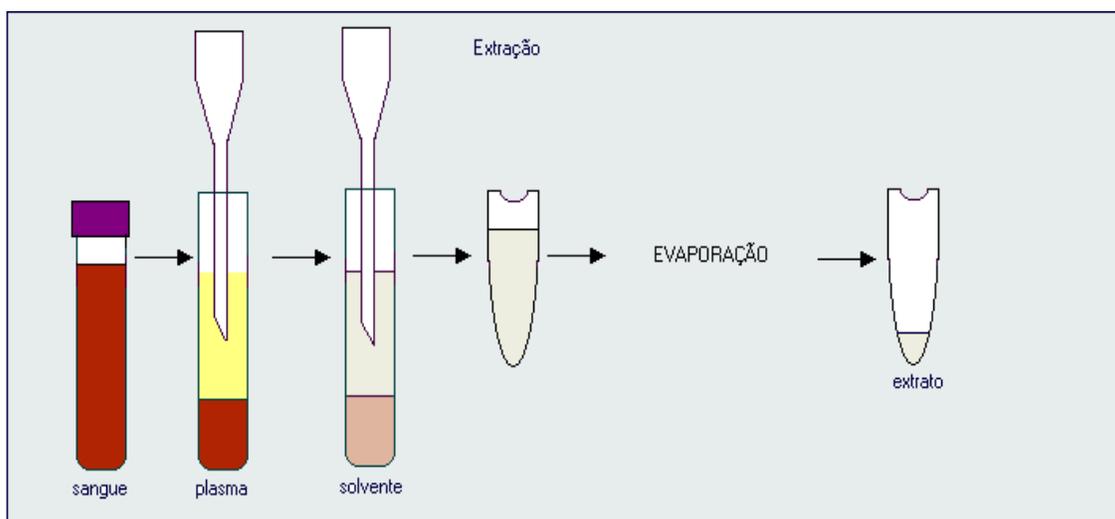


Figura 4. Esquema de extração química.

2.2.2. Derivatização

A derivatização tem como objetivo otimizar a volatilização do analito e viabilizar sua detecção no instrumento analítico. Consiste na reação entre um determinado agente derivatizante e o analito. Este agente se prende à molécula facilitando sua detecção por possuir propriedades físico-químicas específicas, e dificultando a reação com interferentes. Podem ser substâncias fluorescentes, de absorvância por raio ultravioleta e compostos que fornecem ao analito um caráter mais volátil. Esse tipo de aplicação é utilizado tanto na cromatografia de fase líquida como na de fase gasosa.

Na análise de homocisteína utiliza-se Orto-ftaldialdeído (OPA) como derivatizante devido a suas propriedades fluorescentes, de modo que a homocisteína é identificada e quantificada por um detector fluorimétrico uma vez que tenha reagido com este composto. (Baugh 1993.)

2.2.3 Separação

A função de um cromatógrafo é realizar a separação dos diversos componentes que constituem uma amostra. O funcionamento básico de um cromatógrafo envolve a volatilização da amostra de acordo com o ponto de “ebulição” (volatilização) de cada constituinte, em uma coluna especialmente preparada. Após esse passo a amostra passa por um detector e registrador gráfico. Este equipamento utiliza um gás, geralmente hélio, que atua como transportador da substância através da coluna até o detector (fig. 5). É chamado de gás carreador ou gás de arraste e é um gás nobre para impossibilitar possíveis reações com o analito transportado. Quanto mais eficiente for o processo de extração, melhor e mais simplificada será a interpretação do gráfico cromatográfico, pois a presença de

contaminantes gera vários picos que em muitos casos podem ser confundidos com picos de substâncias desejáveis na análise. (Freeman 1981.)

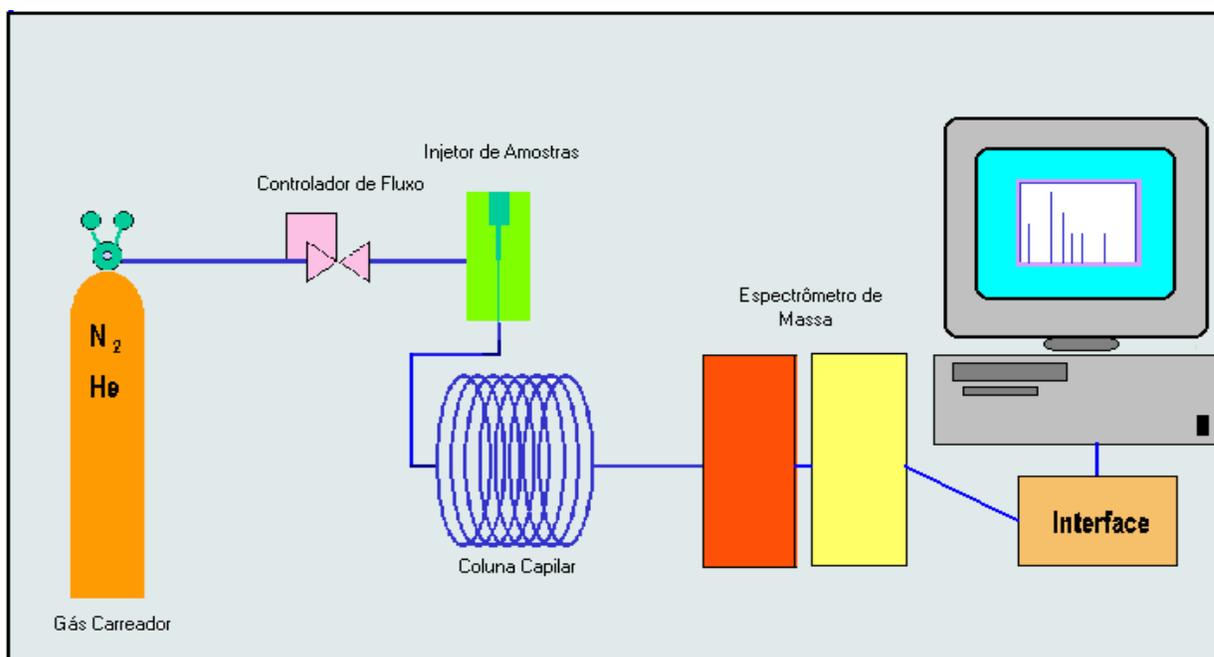


Figura 5. Diagrama simplificado de um Cromatógrafo de Fase Gasosa acoplado ao Espectrômetro de Massa.

2.3. Fase Analítica

Nessa etapa o primeiro passo é formação de íons a partir da molécula da substância original. A ionização é responsável pela fragmentação das moléculas e a aceleração de cada um desses fragmentos. Para formar um íon é necessário alterar a configuração eletroquímica da molécula que está sendo analisada, e este processo pode se dar através de diferentes técnicas, porém, na espectrometria de massa utiliza-se com maior frequência as ionizações química e por impacto eletrônico, sendo que a primeira é mais branda.

A ionização proporciona a fragmentação de uma substância em várias estruturas sub-moleculares. De um único tipo molecular obtém-se vários fragmentos diferentes e cada um deles adquire carga elétrica, pois pela ionização são retirados elétrons da sua estrutura.

Pode ocorrer também, a simples retirada de um único elétron ao invés da fragmentação da molécula (fig. 5).

O elétron possui uma massa extremamente pequena, mas a sua carga (-q) é igual, em módulo, à carga de um próton (+q), portanto, em termos da massa, a molécula ionizada não perde praticamente nada, mas em relação à carga, assume uma configuração elétrica positiva devido à retirada de um elétron. Quando ocorre este fenômeno, diz-se que houve a formação de um **íon molecular** que representa a massa relativa da molécula.

A ionização por impacto eletrônico pode ser obtida pelo aquecimento de um filamento de tungstênio e a ionização química pela reação entre duas substâncias. Geralmente é um gás que promove fragmentação e retirada de elétrons. Por ser mais branda, fragmenta menos e gera, com isso, maior abundância de íon molecular e seus isótopos.

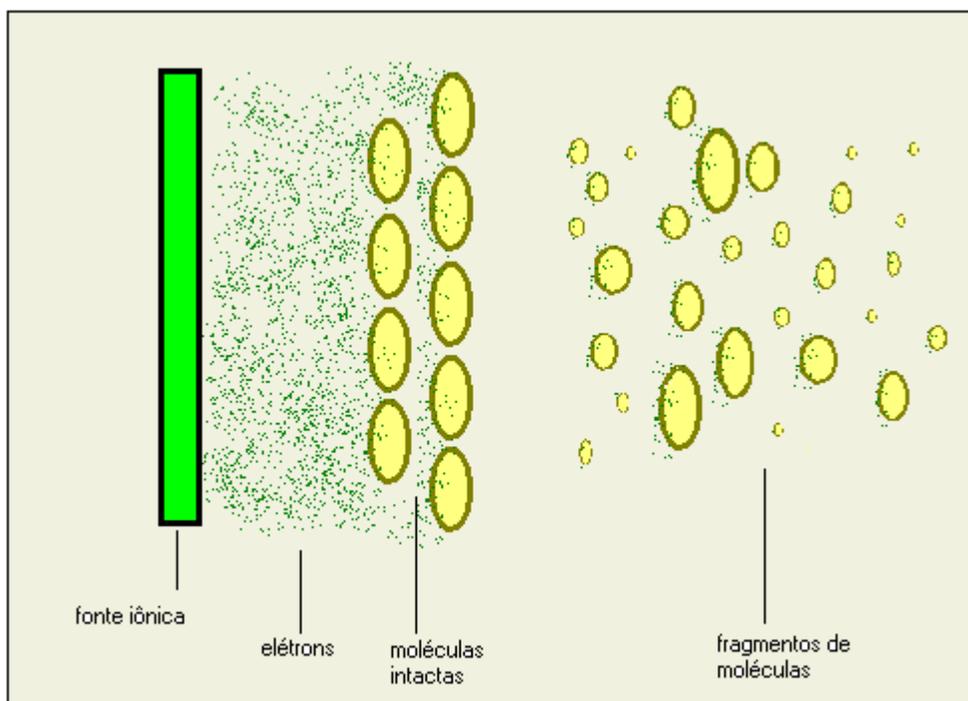


Figura 5. Esquema de ionização por Impacto Eletrônico.

A fase analítica da espectrometria de massa está completamente relacionada aos efeitos que um campo eletromagnético exerce sobre partículas carregadas. Pela equação 1.1, entendemos que uma partícula em desequilíbrio eletrônico acelerada em um campo magnético descreve uma trajetória circular. O princípio da análise se baseia exatamente na trajetória descrita.

O espectrômetro possui, dentre suas subunidades, um sistema denominado quadrupolo. Este é definido por um conjunto de quatro barras opostas e paralelas que geram um campo eletromagnético por onde as partículas ou moléculas irão passar. O desvio sofrido pela partícula, por ação do campo permitirá o registro de todo o trajeto. Este apresenta proporcionalidade direta à massa desta partícula. É a partir deste registro que o equipamento traça um gráfico que apresenta a unidade de massa atômica de cada partícula analisada, bem como dos seus isótopos. Em relação aos isótopos de um elemento, podemos citar vários exemplos: o carbono C possui massa atômica igual a 12, porém possui um isótopo de massa 13 ^{13}C cuja ocorrência na natureza é muito menor, enquanto o ^{12}C tem uma abundância natural de 98.90%, o ^{13}C possui apenas 1.10%. O caso do mercúrio Hg é um dos mais interessantes, pois possui 7 isótopos diferentes. O mais comum é o ^{202}Hg , porém existem ^{196}Hg , ^{198}Hg , ^{199}Hg , ^{200}Hg , ^{201}Hg e ^{204}Hg . Já o alumínio Al, o ouro Au e o iodo I não possuem isótopos e a sua abundância natural é de 100%. (MSD - Hewlett-Packard 1995.)

Ao analisar uma amostra, o espectrômetro de massa registra a abundância dos isótopos. Como a maioria das substâncias analíticas de interesse biológico possui o carbono como maior constituinte, o registro dos isótopos representa a presença de isótopos de carbono como constituintes da substância em análise. Então, quando se menciona

abundância de isótopos em uma substância, deve-se entender como sendo a quantidade de isótopos de determinado elemento químico. No caso de substâncias orgânicas, este elemento é predominantemente o carbono.

3. APLICAÇÕES

Um espectrômetro de massa quase sempre está associado a outros equipamentos analíticos. Durante muitos anos a unidade GC-MS – “*Mass Spectrometry and Gas Chromatography*” - foi a mais comum, porém existem as associações LC-MS – “*Mass Spectrometry and Liquid Chromatography*”, ICP-MS – “*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*” e TOF-MS - “*Time of Flight and Mass Spectrometry*”, que atualmente estão sendo amplamente utilizadas.

As aplicações de LC-MS e GC-MS são muito amplas. Em análises biomédicas e farmacêuticas podem ser empregadas para controle terapêutico de antibióticos, síntese de fármacos, dosagens de tóxicos e opióides e identificação e quantificação de metabólitos.

A sigla ICP-MS denota outro poderoso instrumento de análise que é empregado para análises de elementos. Através de um sistema de indução de plasma, consegue detectar a presença e abundância de metais em fluidos orgânicos. Este equipamento é amplamente utilizado na indústria, na medicina e em análises mineralógicas (fig. 6).



Figura 6. ICP-MS. Perkin Elmer

A tecnologia TOF-MS analisa o tempo de voo, onde partículas eletrizadas são aceleradas por um campo elétrico em alto vácuo. A energia cinética de todas as partículas é a mesma no momento em que são introduzidas no aparelho, porém sofrem alterações de acordo com a sua massa molecular segundo a equação da energia cinética ($E = mv^2/2$), no final do tubo de vácuo existe um detector que registra o tempo de voo de cada partícula.

Algumas aplicações práticas dessas tecnologias com espectrometria de massa serão relatadas nos tópicos seguintes.

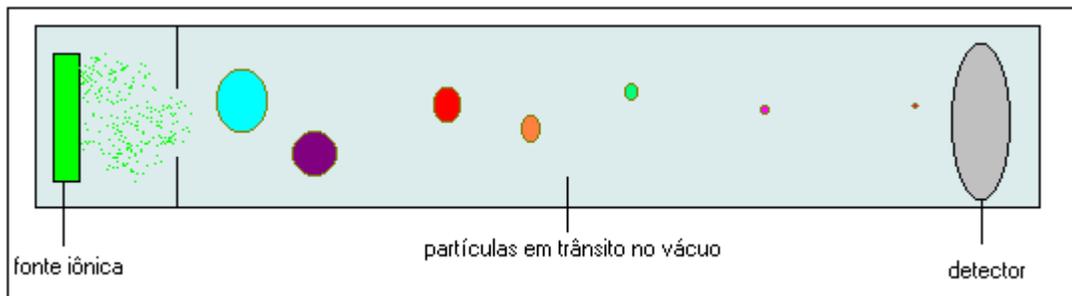


Figura 6. Esquema do tempo de voo do TOF-MS

3.1. A síntese de Retinol

Em meados da década de 40, a mais viável fonte de retinol (vitamina A) era a extração a partir do óleo de fígado de tubarão. A vitamina A só é produzida nos vegetais, mas os animais podem armazená-la sob a forma de pro-retinóides como o retinol palmitato que pode ser convertido a retinol pela ação da enzima retinol palmitato esterase.

Os custos operacionais para a obtenção deste composto eram altíssimos, envolviam a contratação da companhia de pesca, a preparação de recursos humanos para proceder à extração do óleo, gastos com acondicionamento e transporte dessa matriz, e mais uma série de custos durante a manipulação do retinol.

Dentre os métodos analíticos utilizados para identificar a sua estrutura química, foram empregados a cromatografia para separar substâncias diferentes e a espectrometria de massa, que forneceu o espectro de massa do retinol palmitato. Após a amostra ter sido submetida a todo este aparato analítico, conseguiu-se identificar a exata configuração química do retinol palmitato. A partir daí, era só sintetizar o composto e analisar seu espectro de massa para verificar a similaridade ao espectro do material extraído do óleo de fígado de tubarão.

Após inúmeras tentativas, conseguiu-se sintetizar a tão desejada vitamina A. Os resultados desta pesquisa serviram como benefício para toda a população mundial. Os baixos custos, a produção em larga escala e o fim da pesca predatória e diminuíram o custo final de consumo. Estes foram alguns dos muitos benefícios que esta pesquisa gerou.

(Devlin. 1992.)

3.2. Doping

Em análise toxicológica, tanto clínico-terapêutica como em causas judiciais e criminalísticas, o emprego de GC-MS se tornou fundamental, pois sua abrangência vai da identificação à concentração de drogas de relevância biológica. As dificuldades encontradas pelos analistas nesse tipo de pesquisa se dão em virtude dos processos metabólicos que uma droga sofre no organismo. Nesse caso, torna-se necessário identificar as vias metabólicas sofridas por este analito, bem como os seus produtos, pois pode ocorrer que um composto original não seja identificado, mas observa-se que outras estruturas intimamente relacionadas estão presentes. (Freeman 1981.)

Em uma análise toxicológica, amostras de cabelo, sangue e urina são utilizadas para dosar níveis tóxicos de drogas. Cada tipo de amostra obedece a um protocolo específico de acordo com sua estrutura química que determinará a classe de solventes que será empregada na extração e o tipo de derivatização a ser usado.

Em alguns casos, a intoxicação do organismo pode ser voluntária devido a algumas potencialidades físicas que podem gerar. Isso, no meio esportivo recebe o nome de “doping”, e pode ser entendido como uma espécie de estimulação do organismo através de substâncias químicas excitantes. É um tipo muito comum de fraude que ocorre dentre os esportistas.

O hipismo apresenta grande índice de “doping”. Atualmente, realizar exames de “doping” em cavalos se tornou muito comum. Utilizando técnicas de análise adequadas, no GC-MS e no TOF-MS, consegue-se obter um bom desempenho na identificação e quantificação de drogas estimulantes. (Casseta e Allen 2000)

Os principais tipos de drogas usadas para doping na atualidade são: eritropoietina, anfetaminas, cocaína e efedrina.

A eritropoietina é uma droga que está contida em remédios contra a anemia, pois aumenta a quantidade de eritrócitos no sangue. Os estimulantes também são amplamente utilizados, principalmente as anfetaminas, cocaína e efedrina, pois atuam no sistema nervoso e cardiovascular, aumentando a energia, reduzindo a fadiga e atuando como estimuladores da coragem. Inúmeros casos de utilização indevida de medicamentos e o uso de drogas estimulantes por atletas foram registrados pela mídia e toda população mundial teve acesso a essas informações.

A análise empregada nesse tipo de questão é a espectrometria de massa para determinar a presença de droga estimulante, pois o espectro de massa é altamente específico e particular (fig. 7)

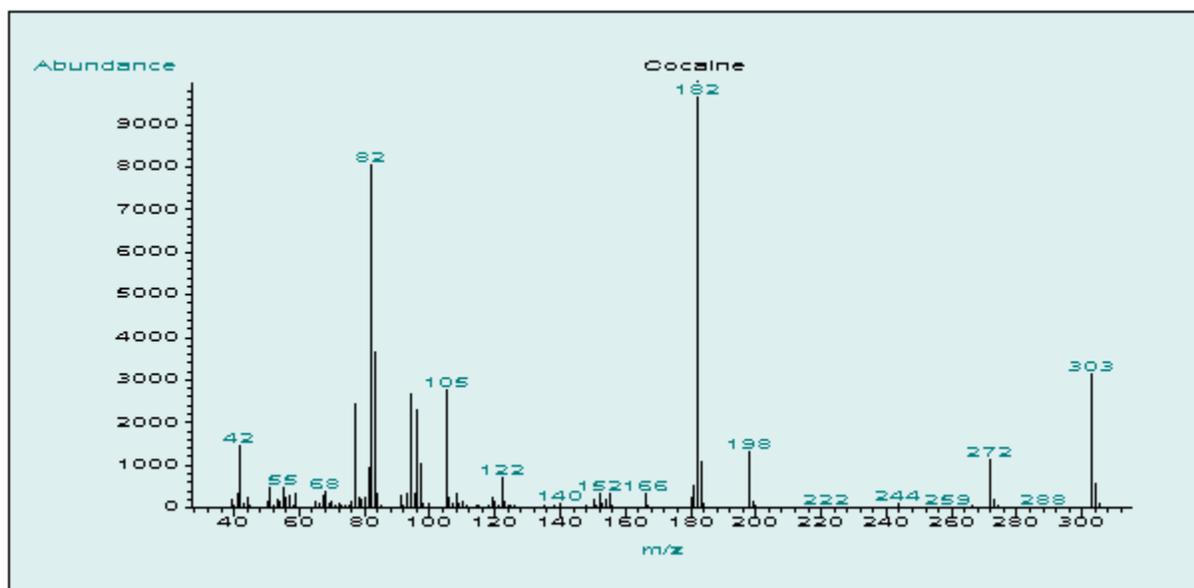


Figura 7. Espectro de massa da Cocaína. Fonte: MSD - Hewlett-Packard 1995.

3.3. Análise de Elementos

Um outro equipamento que tem sido utilizado em larga escala na medicina é o ICP-MS. Este é empregado na análise de elementos químicos. Ele detecta e quantifica elementos químicos presentes em uma amostra. Trata-se de um indutor de plasma acoplado a um espectrômetro de massa.

Nesta técnica a fase pré-analítica é constituída principalmente pela digestão em blocos aquecedores ou em forno microondas especial que submete a amostra a altos valores de temperatura e pressão. O objetivo da digestão é romper todas as ligações químicas das moléculas da amostra deixando como produto apenas os elementos químicos constituintes. Ainda na fase pré-analítica ocorre a ionização da amostra. É neste ponto uma chama de plasma induzido ioniza os elementos previamente nebulizados, em seguida estes elementos são arrastados em uma câmara de vácuo onde fica o quadrupolo até o detector. O ICP-MS é utilizado na identificação e quantificação de metais pesados e outros elementos no organismo.

Pessoas que trabalham em garimpos manuseiam o mercúrio para separar o ouro das impurezas. O mercúrio é um metal de massa molecular 202 e fica depositado no organismo podendo causar inúmeros prejuízos à saúde, dentre eles a neuropatia periférica que afeta o aparelho locomotor. Nesse caso, a quantificação de resíduos deste metal no organismo é um dado muito importante para diagnóstico e conduta terapêutica.

3.4. Proteoma Humano

Uma das grandes descobertas feita pelos cientistas da área biológica no final do século passado foi o mapeamento do genoma humano.¹

Durante várias décadas pesquisadores do mundo inteiro se uniram neste projeto somando forças, conhecimentos e tecnologias. Indubitavelmente, este foi o grande feito da genética molecular. Mas alguns pesquisadores da área envolvidos na pesquisa, afirmaram ao invés de responder a uma série de dúvidas e incertezas, o mapeamento do genoma humano gerou grandes questões no mundo da ciência. Segundo José Fernando Perez, diretor-científico da Fapesp “*Acabou a corrida para começar a maratona*”. (I)

O Dr. Francis Collins é o chefe do Instituto Nacional de Pesquisa do Genoma Humano dos EUA, e disse: “*Eu passei a vida toda investigando doenças genéticas. Cada uma dessas buscas é como procurar agulha em um palheiro. Adivinhe? O palheiro ficou três vezes menor*”. (I)

A cientista Mayana Zatz que é a responsável pelo serviço de aconselhamento genético da USP e membro do projeto Genoma, foi uma das pioneiras em mapeamento genético. Ela relata que o fim do projeto genoma trouxe mais perguntas do que respostas. (I)

Na definição biomolecular, um gene tem a função de codificar proteínas, e estas é que de fato, expressam os elementos fundamentais da bioquímica e do desenvolvimento humano. Todas propriedades do organismo podem ser entendidas como resultado da expressão de proteínas.

¹ Jornal O Estado de São Paulo. 13/02/2001. P.10

Atualmente tem-se empregado um espectrômetro de massa especial que é capaz de determinar a massa molecular de biomoléculas inteiras, de microorganismos e de analitos extremamente pequenos em concentrações mínimas o TOF-MS que analisa moléculas pelo tempo de voo num tubo de vácuo.

Uma proteína é formada por diferentes combinações dos 20 aminoácidos que podem ser seqüenciados utilizando a técnica de ionização por desorção laser. Esta é uma técnica ionizante semelhante ao impacto eletrônico da GC-MS. Um laser ioniza uma matriz química que transfere prótons para o analito. A técnica de desorção laser pode ser associada à tecnologia TOF-MS gerando o MALDI-TOF-MS (*“Matrix-assisted Laser Desorption Ionization”*). As estruturas ionizadas percorrem uma coluna de vácuo que ao final apresenta um detector capaz de registrar a trajetória, a velocidade e o tempo de voo de cada partícula submetida à análise. A coluna não é dotada de campo eletromagnético, porém, aplica-se inicialmente um campo elétrico para acelerar as partículas no vácuo. O MALDI-TOF é um equipamento extremamente versátil e de alta sensibilidade que tem sido apontado como uma ferramenta imprescindível na identificação e sequenciamento de proteínas. (Johnstone e Malcolm 1996)

Conseguindo obter registros fiéis da massa de cada subunidade protéica sintetizada pelos genes mapeados, será possível descrever o proteoma humano. Porém, é necessário descobrir que tipo ou classe de proteína cada gene irá codificar.

4. PERSPECTIVAS

Os químicos e bioquímicos estão certos de que o futuro dessa técnica é bastante promissor, uma vez que é fundamental para a identificação de biomoléculas. Além disso, tem aplicações em diversas áreas biomédicas, como por exemplo, a microbiologia. Atualmente se leva cerca de 2 a 3 dias para se identificar uma cepa bacteriana através de reações bioquímicas. O MALDI-TOF leva poucos minutos para fornecer o espectro de massa das proteínas de uma bactéria. Em relação às técnicas biomoleculares de diagnóstico como PCR e Captura Híbrida, a Espectrometria de Massa oferece uma grande vantagem, pois não necessita de marcadores, nem de sondas específicas podendo ser empregada em qualquer estrutura química. (Anthony M. H *et al.* 1998.)

5. INTERPRETAÇÃO DE ESPECTROS

A interpretação do espectro de massa é o ponto fundamental da análise, pois é a partir deste que muitas decisões serão tomadas. Uma má interpretação espectrométrica pode acarretar sérios prejuízos.

Especificamente em saúde, pode-se realizar monitoramento de ação antibiótica, identificação de microorganismos, análise metabólica e outros que certamente determinam uma conduta terapêutica. A especificidade da espectrometria de massa depende do bom conhecimento do analista ao realizar a interpretação dos espectros.

Em um cromatograma, são registrados picos que significam a presença de determinado composto. No Espectro de massa originado ionização química ou por impacto eletrônico observa-se a formação de barras com valores numéricos relacionados. Cada barra representa um fragmento de molécula e seu respectivo valor de massa molecular. Se o valor

da massa deste analito for conhecido, podemos facilmente procurar pelo íon molecular e seus isótopos.

Na molécula da cocaína, observamos a formação do íon molecular nas barras que registram os números de massa igual a 303, 304 e 305 respectivamente. O número 303 corresponde à massa molecular da cocaína, 304 e 305 são íons moleculares que contam com a presença dos isótopos ¹³C e ¹⁴C do carbono (fig. 8).

A grande vantagem da espectrometria de massa é a regularidade de fragmentação que serve como um indício inquestionável sobre a natureza do composto.

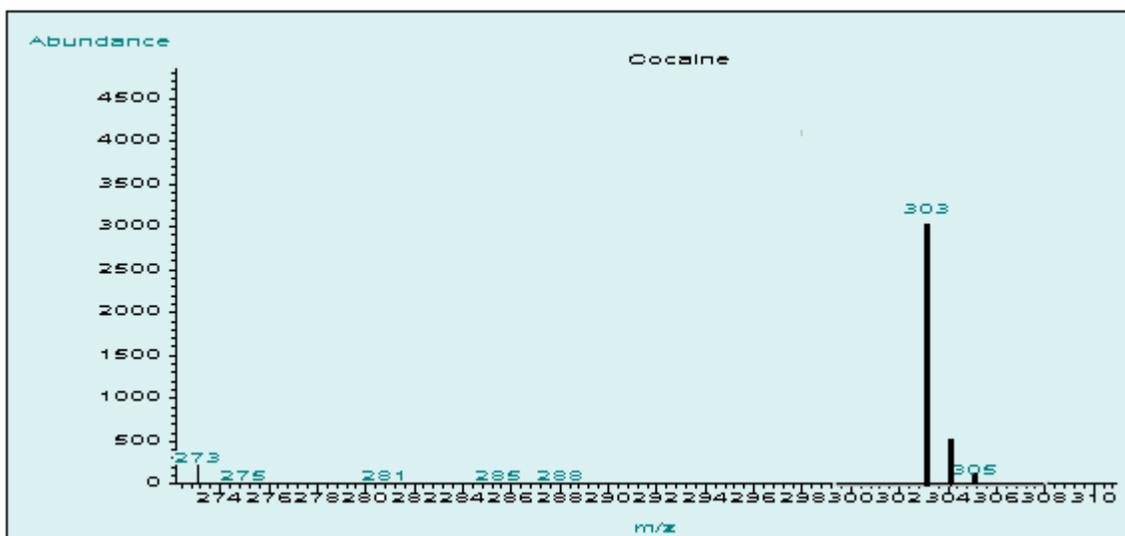


Figura 8. Íon molecular da cocaína. Fonte: MSD - Hewlett-Packard 1995

7. CONCLUSÃO

A espectrometria de massa foi apresentada como uma técnica analítica de uso indispensável na identificação de compostos químicos. Neste particular, sua aplicação é extremamente ampla e desempenha importantes funções em campos como bioquímica, arqueologia, ciências forenses, química farmacêutica e industrial e também nas ciências ambientais.

A precisão da mensuração da massa de compostos químicos fornece dados valiosos sobre a identidade química deste composto.

O desenvolvimento de mecanismos avançados de análise química tornou possível a identificação de biomoléculas e microorganismos com muita eficiência e segurança.

Um dos grandes desafios da ciência na área biológica é desvendar o papel de cada gene no desenvolvimento humano. Boa parte deste trabalho já foi realizado através do Projeto Genoma, agora resta estabelecer uma associação entre o papel de cada gene na síntese protéica. Isso só será possível através da análise proteômica do genoma humano. Nessa questão a espectrometria de massa assume um papel fundamental e reafirma a sua potencialidade.

8. BIBLIOGRAFIA

- Anthony, M. H. e Stephanie N. T. 1998. *Rapid identification and Speciation of Haemophilus Bacteria by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry, 33, p. 750-756.
- Beugh, P. J. 1993. *Gas Chromatography. A practical Approach*. Oxford University Press, New York, P.133-235.
- Casseta, B. e Allen, M. 2000. *The identification and quantitation of the Anabolic Steroid Stanozolol and its metabolites in horse urine*. Journal of Mass Spectrometry, 45, p. 50-57.
- Devlin, T. M. 1992. *Textbook of Biochemistry with clinical correlations*. Wiley-Liss, New York, p.1118-1121.
- Ewing, G. W. 1972. *Métodos instrumentais de análise química*. Editora da USP, São Paulo, p. 317 – 336.
- Freeman, R. R. 1981. *High Resolution Gas Chromatography*. Hewlett Packard Company, New York, p. 125-126.
- Hewlett-Packard. 1995. *MSD ChemStation User's Guide*. New York, p. 47-60.
- Johnhoustone, R. A. W. and Malcolm E. R. 1996. *Mass spectrometry for chemists and biochemists*. Cambridge Press, New York, p. 415-420.
- Kilton, F. G., Barbara S. L. e Charles N. M. 1996. *Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide*. Academic Press, London, p. 03-34.
- Morrison, R. e Boyd, R. 1981. *Química orgânica*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, p. 499 – 554.

Tipler, P. 1995. *Física. Eletricidade e Magnetismo*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 175-222.