Weliton Pedro Batiston

Quimiometria aplicada à cromatografia líquida multidimensional capilar hifenizada a espectrometria de massas sequencial para proteômica *shotgun*

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração em Química Analítica e Inorgânica.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos

2015

DEDICATÓRIA

Primeiramente a Deus,

Dedico este trabalho a minha família, que na mais simples humildade me ensinou os maiores valores da vida. A minha mãe Cecília, ao meu pai Pedrão e meu irmão Denis.

As grandiosas orações da minha tia “Madre” (Irmã Maria do Carmo), minha madrinha Aparecida e pelo companheirismo de meus tios Belmiro e Luzia.

Ao meu amor, Camila Fontes Neves, pela paciência e genialidade de garantir momentos descontraídos e alegres em nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço (por ordem alfabética) a orientação do Professor Dr. Álvaro José dos Santos Neto e coorientação do Professor Dr. Emanuel Carrilho. Pela oportunidade de participar em dois (gigantes) grupos de pesquisa (por ordem alfabética): BioMicS e Croma. Posso dizer, que as minhas inquietações científicas, nesta etapa, foram saciadas, por meio das valiosas discussões, troca de experiências, amadurecimento, visão e pensamento científico. Com enorme admiração a estes dois grandes pesquisadores, sou muito grato.

Ao Professor Dr. Fernando M. Lanças pela disponibilidade e oportunidade de usufruir do Laboratório de Cromatografia (Croma). Além das ótimas aulas a respeito de métodos cromatográficos.

Ao Prof. Dr. Edenir Pereira Filho pelas discussões (extra-aulas) da excelente disciplina de quimiometria e por sua colaboração neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro pelas aulas e discussões a respeito da quimiometria.

Ao Pesquisador técnico Dr. Guilherme Miola Titato, que me proporcionou um excelente aprendizado a respeito da instrumentação em espectrometria de massas sequencial. Além da paciência e colaboração no desenvolvimento do método MS/MS aplicado a proteômica.

À Pesquisadora técnica Dra. Elaine Alves Ferreira pela atenção, paciência e disponibilidade de materiais além da grande amizade.

Aos Professores que fizeram parte da minha banca de qualificação e me ajudaram no direcionamento inicial do projeto: Prof. Dr. Andrei Leitão, Prof. Dra. Ana Maria Plepis e Profa. Dra. Maria Teresa (Teka).

Á Odete, pessoa que abriu muitas portas para o conhecimento científico, principalmente para a utilização do pHmetro.

Aos meus amigos, de ambos os grupos, que tornam a pesquisa mais instigante e descontraída: Luis Felipe (Pipe), Diego Borba, Paulo Leão, Jonatan Catai, Jackiney, Adriano, Thiago Mazzu, Esmeraldo, Thiago Segato, Alessandra Maffei, Fabiana Marques, Arley, Júlia Martins, Tanare, Felipe Andrade, Adriel, Juliana Alberice, Rosemeire, Aline Ishikawa, Meire, Rodrigo, Bruno, Letícia, Vivane, Mariane, Patricia Souza, Daiane, Ana Carolina Port, Suellen, Anderson, Maraissa, Scarlet , Lucas, Amanda, Carlos Eduardo, Guilherme Mizlara, Ana Carolina, Luciana, Regiane, Julia Postigo, Beatriz Miranda, Antonio, Andréia Peraro, Fayene, Juliane, Giorgio, Ricardo, Patrícia, Dalton, Amanda Hikari, Rubiane, Giselle e Leonardo.

Aos Professores que me proporcionaram os primeiros passos para a carreira acadêmica: Prof. Dr. Makoto Matsushita (orientador de iniciação científica), Profa. Dra. Sandra Gomes, Prof. Dr. Jesui Visentainer e Prof. Dr. Nilson Evelazio de Souza e a todos os amigos do Grupo Cromalimentos UEM.

Aos Professores que fizeram parte da minha caminhada no período da Graduação (UEM), que muito me ensinaram. Em especial o Prof. Expedito L. Silva, Profa Elza Andreotti, Profa. Cida (Maria Aparecida), Marilde B. Zorzi, e Neide Maria M. Kiouranis e à todos os meus amigos do curso de Química da Uem.

A todos os funcionários do Instituto de Química de São Carlos por toda disposição e auxílio nos momentos que precisei. À CNPq, FAPESP, e CAPES, pelo suporte financeiro e pela bolsa de estudos concedida durante o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os meus amigos e familiares que não couberam nestas entrelinhas, o meu total reconhecimento e gratidão.

*“A satisfação da curiosidade é uma das
maiores fontes de felicidade da vida”*

(Linus Pauling)

RESUMO

O sequenciamento genético do DNA humano permitiu maior compreensão da funcionalidade dos seres vivos e principalmente a causa de muitas doenças. Entretanto, os estudos em genética têm se limitado a resolverem os problemas da ciência, e atualmente, a solução para o avanço nessa área tem se atribuído à proteômica. Dessa forma, a pesquisa em química analítica intensificou-se na busca de estratégias melhores para a caracterização de proteomas, em três aspectos principais: preparo de amostra, desenvolvimento da instrumentação analítica e bioinformática. Verifica-se a possibilidade da aplicação de muitas técnicas, atualmente, destaca-se a análise de peptídeos (proteômica *shotgun*) por cromatografia líquida multidimensional acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC/LC-MS/MS), devido à possibilidade de automatização, minimização dos problemas e resultados satisfatórios na análise de amostras biológicas complexas. Portanto, neste trabalho desenvolveu-se um método LC/LC-MS/MS (modalidade *on-line column switching*) o qual se constitui de coluna trocadora catiônica (*homemade*), *trap* de aprisionamento e limpeza, coluna capilar hidrofóbica e separação e detecção por espectrometria de massas sequencial automatizada. Com a proposta de uma instrumentação analítica aperfeiçoada, realizamos a confecção de um *trap* com partículas de elevada retenção dos peptídeos, o que permite ótima recuperação de amostra. Por se tratar de uma técnica de elevada complexidade instrumental, devido a difícil compatibilidade entre as dimensões cromatográficas, possíveis perda de analito no processo e elevado tempo de análise, propomos uma nova abordagem de otimização, por meio de estudos quimiométricos. Assim, neste trabalho, foram avaliados doze parâmetros instrumentais e destes houve uma simplificação de apenas dois fatores, responsáveis por 95% da resposta ótima do método. Este fato permitiu valores da cobertura da proteína de BSA (92,92%), número de peptídeos (73) e score (3816,29) superiores aos reportados na literatura, os quais apresentam tempos de análise maiores. Este estudo fornece informações do comportamento químico dos peptídeos em relação ao método proposto, por meio de uma superfície de resposta e equação matemática que pode contribuir para a aplicação em diferentes proteomas.

ABSTRACT

The genetic sequence of human DNA has helped the comprehension of life and principally the cause of various diseases. However, genetic studies have limited to resolve science problems and currently solutions to advance in this field have been attributed to proteomics. Thus, the analytical chemistry has intensified on the search for a better strategy to proteomic characterization in three principal aspects: sample preparation, development of analytical instrumentation, and bioinformatics. Proteomics involves the application of many techniques, currently; the peptide analyses (shotgun proteomics) by multidimensional liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC/LC-MS/MS) is the state of the art. The main reasons are because it allows full system automation, less problems in repeatability, and adequate results in analysis of highly complex biological samples. Therefore, this dissertation developed the method LC/LC-MS/MS (modality on-line column switching), this has a cation exchange column (homemade), trap column to clean, hydrophobic capillary column and separation and detection by tandem mass spectrometry. We have proposed an improved analytical instrumentation, with a homemade trap that particles have high retention of peptide, which permit great recuperation of samples. Because it is an instrumental technique difficult, such as, obtain compatibility between the chromatography dimensions, can lose samples in the process and long time analysis, we have proposed a new optimization approach with chemometric analysis of data. On that, were evaluated twelve instrumental parameters and there was a simplification only two factors, these were responsible for 95% of greater response of method. As a result, the coverage of BSA protein was 92,92%, number of redundant peptides 73 and score of 3816,29 values of high significance if compare from that there are in literature that presented greater time analysis. This work describes information about chemistry of peptides to method proposed through a surface of response and math equation that can contribute to different proteomes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modos de análise em cromatografia líquida multidimensional aplicada à análise proteômica	6
Figura 2. Cromatogramas de fosforilase <i>b</i> digeridas com tripsina em diferentes modalidades de LC.....	11
Figura 3. Representação da técnica de ionização MALDI.....	12
Figura 4. Representação da técnica de ionização ESI (<i>Electrospray</i>).....	13
Figura 5. Representação da otimização experimental clássica.....	15
Figura 6. Número de artigos referenciados pelo Scopus desde 1991 com os termos de pesquisa: planejamento experimental aplicados à LC e MS.	16
Figura 7. Esquema dos componentes da coluna e <i>trap</i> (<i>homemade</i>).	21
Figura 8. Ilustração da configuração do sistema cromatográfico multidimensional <i>on-line column switching</i>	25
Figura 9. Estratégia aplicada no planejamento experimental para LC/LC-MS/MS.	27
Figura 10. Cromatogramas de peptídeos de Citocromo C na avaliação dos sistemas de injeção <i>Full-loop</i> e <i>Microliter Pick-Up</i>	29
Figura 11. Imagens de MEV das partículas de sílica modificada com grupo sulfônico (VARIAN).....	36
Figura 12. Diferenças entre a configuração <i>forward-flush</i> e <i>back-flush</i>	38
Figura 13. Tipos de <i>trap</i> do fabricante Dionex testados para a configuração do sistema LC/LC-MS/MS.	40
Figura 14. Estrutura do material adsorvente empacotado no <i>trap homemade</i>	42
Figura 15. Estrutura de 20 aminoácidos.....	43
Figura 16. Imagens de MEV das partículas do polímero Strata X (Phenomenex)....	44
Figura 17. <i>Workflow</i> para o processamento dos cromatogramas de autoMS/MS adquiridos do método LC/LC-MS/MS (MicroTOF-Q II).....	53
Figura 18. Configurações do <i>Spectrum Selector</i>	54
Figura 19. Configurações da aba SEQUEST.	55

Figura 20. Adição dos cromatogramas e sequenciamento.....	56
Figura 21. Sequenciamento dos peptídeos em proteínas.	57
Figura 22. Gráfico de Pareto e Superfície de Resposta da absorbância de peptídeos por espectrofotometria UV-Vis em 214 nm.	62
Figura 23. Gráfico normal dos contrastes (<i>DoE</i> 1 referente a primeira dimensão)...63	
Figura 24. Cromatogramas da melhor resposta referente ao <i>DoE</i> 1 e Ensaio 11...64	
Figura 25. Gráfico de Pareto e Superfície de Resposta da absorbância de peptídeos por espectrofotometria UV-Vis em 214 nm.	68
Figura 26. Gráfico normal dos efeitos (<i>DoE</i> 2 referente a segunda dimensão).....68	
Figura 27. Cromatogramas da melhor resposta referente ao <i>DoE</i> 2 e Ensaio 4..69	
Figura 28. Gráfico de Pareto e Superfície de Resposta da absorbância de peptídeos por espectrofotometria UV-Vis em 214 nm.	72
Figura 29. Gráfico normal dos contrastes (<i>DoE</i> 3 referente as duas dimensões). ...73	
Figura 30. Cromatogramas da melhor resposta referente ao <i>DoE</i> 3 e Ensaio 9..74	
Figura 31. Perfil cromatográfico do digerido triptico de BSA aplicada à modalidade cromatografia líquida unidimensional (LC-UV)..	75
Figura 32. Foto da fonte de ionização (aberta) do espectrômetro de massas micrOQTOF-QII.....	77
Figura 33. Gráfico de Pareto e Superfície de Resposta (<i>DoE</i> 4).....	80
Figura 34. Gráfico normal dos efeitos (<i>DoE</i> 4)	80
Figura 35. Gráfico de Pareto e Superfície de Resposta	85
Figura 36. Gráfico normal dos efeitos (<i>DoE</i> 5)	86
Figura 37. Cromatogramas de autoMS/MS da melhor resposta referente ao <i>DoE</i> 5 e Ensaio 1..	86
Figura 38. Cromatogramas de íons autoMS/MS da melhor resposta referente ao Composto Central e Ensaio 5.....	89
Figura 39. Cromatogramas de autoMS/MS equivalente da Figura 38 sob uma visualização diferente.....	90

Figura 40. Gráfico de Pareto e Modelo Composto Central da Superfície de Resposta.	92
Figura 41. Sequenciamento dos peptídeos referente aos Ensaios 4 e 5 da Tabela 11	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Configuração do sistema cromatográfico multidimensional	24
Tabela 2. Compatibilidade dos <i>trap</i> da Dionex no sistema LC/LC-MS/MS.	41
Tabela 3. Valores utilizados na programação do método autoMS/MS na etapa de fragmentação dos peptídeos da proteína de BSA.	52
Tabela 4. Dados do experimento (<i>DoE</i> 1).....	61
Tabela 5. Dados do experimento (<i>DoE</i> 2).....	67
Tabela 6. Dados do experimento (<i>DoE</i> 3).....	71
Tabela 7. Dados do experimento (<i>DoE</i> 4).....	78
Tabela 8. Valores dos parâmetros fixados para a aplicação do planejamento experimental em toda a técnica LC/LC-MS/MS.....	82
Tabela 9. Fatores avaliados no planejamento experimental em todo o método.	83
Tabela 10. Dados do experimento (<i>DoE</i> 5).....	84
Tabela 11. Dados do experimento (referente ao composto central).	88
Tabela 12. Tabela de Análise de Variância (ANOVA).....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

γ	Valor questionado
2D-PAGE	<i>Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis</i> (eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional)
A	Valor alvo
Aa	Aminoácido
ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise da variância
autoMS/MS	Espectrometria de massas sequencial automatizada
BB	Box-Behnken
C₁₈	Grupo hidrofóbico octadecil
CAD	Collision activation dissociation (dissociação ativada por colisão)
CC	Composto central
CHAPS	<i>3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate</i>
CID	<i>Collision induced dissociation</i> (dissociação induzida por colisão)
d	Desejabilidade
D	Média geométrica das desejabilidades
Do	Doehlert
DoE	<i>Design of Experiments</i> (planejamento experimental)
DTT	Ditiotreitol
EP	Erro puro
ERLIC	<i>Repulsion-hydrophilic interaction chromatography</i> (cromatografia de interação hidrofílica de repulsão eletrostática)
ESI	Electrospray
F_{cal}	Teste F calculado
F_{tab}	Teste F tabelado
FA	<i>Formic acid</i> (ácido fórmico)
Faj	Falta de ajuste
FT-ICR	<i>Fourier transform ion cyclotron resonance</i> (transformada de Fourier de ressonância ciclônica de íons)
G.L.	Grau de liberdade
HILIC	<i>Hydrophilic interactions liquid chromatography</i> (cromatografia líquida de interação hidrofílica)
Homemade	Fabricação própria

HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (cromatografia líquida de alta performance)
IAA	Iodoacetamida
LI	Limite inferior
LS	Limite superior
MALDI	<i>Matrix assisted laser desorption ionization</i>
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MQ	Média quadrática
MS	<i>Mass spectrometry</i> (espectrometria de massas)
MudPIT	<i>Multidimensional protein identification technology</i> (tecnologia multidimensional de identificação de proteínas)
n_c	Capacidade de pico
PFP	<i>Pentafluorophenyl</i> (pentafluorofenil)
qp	Quantidade de pico
R	Regressão
r	Resíduo
Rcf ou g	Quantidade que a força aplicada é superior à força gravitacional da Terra
RP	<i>Reversed-phase</i> (fase reversa)
SCX	<i>Strong cation exchange</i> (trocadora catiônica forte)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (dodecil sulfato de sódio)
SEC	<i>Size-exclusion chromatography</i> (cromatografia de exclusão por tamanho)
shotgun	Espingarda (análise de peptídeos) analogia referente ao sequenciamento genético
SQ	Soma quadrática
TFA	Trifluoroacético
tg	Tempo do gradiente
ToF	<i>Time-of-flight</i> (tempo de voo)
t_{R1}	Tempo de retenção do primeiro pico do cromatograma
Trap	Coluna de aprisionamento
t_{Rn}	Tempo de retenção do último pico do cromatograma
UHPLC	<i>Ultra-high-pressure liquid chromatography</i> (cromatografia líquida de ultra pressão)
W	Largura do pico

SUMÁRIO

1.	Introdução	1
1.1.	Proteômica: importância e desafios na caracterização de proteomas	1
1.2.	Técnicas de separação aplicadas à proteômica	2
1.3.	Cromatografia líquida multidimensional	5
1.4.	Capacidades de pico e ortogonalidade em cromatografia multidimensional	9
1.5.	Espectrometria de massas e bioinformática	12
1.6.	Quimiometria: planejamento experimental aplicado à cromatografia e espectrometria	14
2.	Objetivos	18
2.1.	Objetivos específicos	18
3.	Parte experimental	20
3.1.	Padrões e Reagentes	20
3.2.	Materiais	20
3.3.	Equipamentos e acessórios	21
4.	Procedimento Experimental	22
4.1.	Preenchimento das colunas	22
4.2.	Preparo das amostras	22
4.3.	Dessalinização das amostras	23
4.4.	Configuração adotada no cromatógrafo UHPLC capilar	23
4.5.	Ilustração e descrição do sistema cromatográfico multidimensional	24
4.6.	Preparo das fases móveis e plugue das soluções salina	26
4.7.	Abordagem quimiométrica: Planejamento experimental	27
5.	Resultados e discussões	28
5.1.	Parâmetros instrumentais	28
5.1.1.	Desenvolvimento da configuração do sistema para injeção da amostra	28

5.1.2. Desenvolvimento da configuração do sistema de eluição dos analitos da primeira dimensão.....	30
5.1.3. Planejamento das condições da primeira dimensão.....	31
5.1.4. Planejamento das condições do <i>trap</i>	36
5.1.5. Planejamento das condições da segunda dimensão.....	44
5.2. Escolha dos solventes utilizados no sistema LC/LC-MS/MS	45
5.2.1. Escolha dos solventes da primeira dimensão.....	45
5.2.2. Escolha dos solventes utilizados no <i>Trap</i>	47
5.2.3. Escolha dos solventes utilizados na segunda dimensão	48
5.3. Escolha dos parâmetros instrumentais do espectrômetro de massas micrOTOF-QII	49
5.4. Sequenciamento dos peptídeos em proteína	53
5.4.1. Parâmetros do Software SEQUEST	53
5.5. Estudo quimiométrico: planejamento experimental	58
5.5.1. Estratégia para aplicação do planejamento experimental no sistema LC/LC-MS/MS <i>on-line column switching</i>	58
5.6. Aplicação do planejamento experimental	59
5.6.1. Avaliação dos fatores significativos da primeira dimensão	59
5.6.2. Avaliação dos fatores significativos da segunda dimensão	64
5.6.3. Avaliação dos fatores significativos nas duas dimensões (LC/LC)	70
5.6.4. Avaliação dos fatores significativos da plataforma autoMS/MS.....	76
5.7. Aplicação final do planejamento experimental.....	81
5.7.1. Observações para a aplicação do <i>DoE</i> em todo o sistema LC/LC-MS/MS	81
5.7.2. Avaliação dos fatores significativos de todo o sistema LC/LC-MS/MS <i>on-line column switching</i>	82
5.7.3. Superfície de resposta aplicada ao método LC/LC-MS/MS <i>on-line column switching</i>	87

6. Conclusões.....	98
7. A ideia do projeto	101
8. Referências	102
Anexo 1. Peptídeos identificados referentes às duas regiões de máxima resposta do composto central.	109
Anexo 2. Alguns espectros de autoMS/MS provenientes do Software SEQUEST..	111
Anexo 3. Informações técnicas do método LC/LC-MS/MS	113

1. Introdução

1.1. Proteômica: importância e desafios na caracterização de proteomas

Proteoma é o conjunto de todas as proteínas expressas em uma célula, tecido ou organismo, resultantes da expressão funcional de um determinado genoma. Esse termo foi utilizado pela primeira vez por Mark R. Wilkins e colaboradores no ano de 1996.^{1,2} A ideia foi rapidamente adotada pela comunidade científica como uma das vertentes em pesquisas sobre o genoma humano, analogia que denominou a palavra proteoma. Assim, o termo proteômica originou-se a partir da junção de “proteína” e “genômica” na década de 90. Proteômica engloba as estratégias para a identificação e quantificação de todas as proteínas em um dado proteoma, incluindo expressão, localização celular, modificações pós-traducionais, conjunto de todas as isoformas, espaço e tipo da célula. Logo, a pesquisa em proteômica é muito mais desafiadora em relação à genômica.³⁻⁵

Como evidência da complexidade do proteoma, sabe-se que o DNA é codificado por quatro bases nitrogenadas, e que estas apresentam certa estabilidade. Enquanto isso, as proteínas apresentam combinações dos 20 diferentes aminoácidos existentes, além de serem muito mais dinâmicas e variáveis devido a gama de modificações e reações químicas.⁵⁻⁷ Outro impasse é a quantificação; verifica-se a existência de 20.000 proteínas em uma única população de células de tecido ou fluido biológico. Além disso, estas possuem enorme diversidade de concentração e acredita-se que a razão entre as proteínas menos abundante e a albumina sérica é da ordem de 1:100.000. Estudos indicam a possibilidade de 100.000 formas de proteínas codificadas pelos aproximados 20.235 genes do genoma humano, e a determinação explícita da função de cada uma apresentam-se como um enorme desafio.^{8,9}

Contudo, a compreensão da funcionalidade do proteoma em amostras biológicas, permite atribuir solução às limitações dos estudos em genômica, uma vez que as proteínas são o produto final do genoma e exercem papéis essenciais em muitos processos bioquímicos da célula.⁴ Atualmente, a proteômica vem sendo considerada como a ferramenta mais apropriada para a compreensão dinâmica dos

genes, e sua contribuição é verificada em muitas áreas do conhecimento, como a biologia, bioquímica e medicina. São destacados três principais objetivos em proteômica: 1) entender os caminhos metabólicos nas diversas atividades celulares, de forma a conhecer novos alvos farmacológicos;^{5,6} 2) identificar novas moléculas bioativas para o desenvolvimento de novos fármacos⁷ e 3) procurar proteínas que indicam a ocorrência de um estado normal ou patológico de um organismo (biomarcadores) para diagnóstico precoce e monitoramento da evolução de doenças neurológicas,¹⁰ infecciosas,⁶ cardíacas,⁸ esclerótica múltipla e neoplásicas,^{11,12} etc.

Verificou-se na última década que o principal objetivo dos avanços em proteômica é a descoberta de biomarcadores para doenças como o câncer. Tanta importância é dada a este tema, que o meio científico aposta como a solução de diagnósticos e tratamentos terapêuticos mais rápidos, precisos e eficientes.^{4,13,14} Entretanto, a procura de marcadores biológicos clinicamente relevantes não é uma tarefa simples, o maior problema está relacionado com a extensiva heterogeneidade da concentração dinâmica das proteínas.¹⁵ Na maioria das vezes, o biomarcador possui concentração baixa sendo mascarado pelas macromoléculas mais abundantes. Além do mais, a ocorrência de numerosas modificações pós-traducionais faz com que, na maioria das vezes, a busca por biomarcadores seja frustrante e ilusória, o que torna os avanços em bioanalítica indispensáveis.¹⁰⁻¹⁵

Nesse contexto, os tecidos cancerosos conservados em formaldeído e parafina figuram como amostras interessantes e extremamente desafiadoras para a aplicação em proteômica.^{16,17} Este método de conservação de tecidos é utilizado por muitos hospitais e funciona como banco de dados para estudos patológicos.¹⁸ Apesar das dificuldades inerentes relacionadas à análise, como por exemplo, o desenvolvimento de técnicas de extração, desparafinização e identificação das proteínas modificadas (devido o tratamento químico que o tecido recebe); este tipo de amostra tem despertado interesse, como uma alternativa relevante para análises bioanalíticas que visam à elucidação da doença e descoberta de biomarcadores.

12,15-17

1.2. Técnicas de separação aplicadas à proteômica

Atualmente existem três técnicas aplicadas à proteômica: *Bottom-up*, *Top-down* e *Middle-down*.⁴ A primeira técnica também conhecida como *shotgun*, trata da análise de peptídeos, os quais são produtos da digestão proteolítica feita por algumas enzimas específicas, tipicamente a tripsina.^{15,19} A *shotgun* possui a vantagem de melhor separação cromatográfica, fácil ionização, e maior estabilidade dos peptídeos, além da obtenção de espectros com ótima resolução, provenientes do espectrômetro de massas (MS).⁴ Contudo, após a análise por *shotgun* necessita-se da utilização de softwares, estes comparam os espectros de massas experimentais obtidos dos peptídeos com os espectros de massas teóricos de um banco de dados, o que permite a elucidação da provável sequência dos peptídeos relacionados a proteína em questão. Este processo é denominado como a cobertura da proteína, sendo que a sequência peptídica exata é um parâmetro determinante no sucesso da análise. A técnica *Top-down* é utilizada para caracterizar proteínas intactas e possui a vantagem de ótimos resultados para estudos das modificações pós-traducionais; por outro lado, possui dificuldade de fracionamento, ionização e fragmentação na fase gasosa no MS, causado por supressão iônica. Por fim, *Middle-down* permite a análise de peptídeos maiores, o que possibilita o estudo das modificações pós-traducionais, sem apresentar os desafios analíticos de uma proteína intacta conforme a técnica *Top-Down*.⁴

A origem dos grandes avanços em proteômica tem sido atribuída ao uso da eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional (2D-PAGE).^{1,2,8} Esta técnica foi consolidada como um método poderoso na separação de misturas complexas de inúmeras proteínas em uma única análise.^{8,20} A técnica baseia-se na aplicação de potencial elétrico sobre o gel, onde na primeira dimensão ocorre a focalização isoelétrica—separando as proteínas de acordo com os seus pontos isoelétricos (pI)—enquanto na segunda dimensão a separação ocorre por meio das massas moleculares.^{7,9} Depois de isolar as proteínas, estas podem ser identificadas de maneira intacta ou por *shotgun*, utilizando MS ou cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS). Contudo 2D-PAGE é uma técnica trabalhosa, demorada, dispendiosa e com sérias limitações intrínsecas.^{8,7,20}

A análise completa do proteoma em um único gel é extremamente difícil, devido as diferentes concentrações das proteínas, o que geralmente ocasiona a

perda de resolução por supressão das proteínas menos abundantes.^{4,9,15,17} Por se tratar de macromoléculas com características químicas diferentes, sejam, básicas, ácidas, hidrofóbicas, hidrofílicas, diferentes grupos funcionais e tamanhos; a solubilização completa das proteínas retidas no gel em um único detergente ou mistura destes (*SDS* e *CHAPS*, por exemplo) não é eficiente, resultando em perda de analito e baixa sensibilidade na detecção por MS.^{2,8,4} Outro inconveniente é o número de etapas que a análise se submete, pois é necessário recortar cada ponto que contém a proteína no gel antes da aplicação em MS, o que aumenta a manipulação da amostra e dificulta a automatização da técnica.^{8,17}

Nos últimos anos, verificam-se inúmeros trabalhos aplicados em análise de proteômica *shotgun* por cromatografia líquida hifenizada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) e redução das análises por 2D-PAGE.^{8,20,21} Descobriu-se que a técnica LC-MS/MS possui ótima automatização e eficiência de separação dos peptídeos. As principais estratégias adotadas para tal finalidade são o aumento do comprimento da coluna,²² a diminuição do tamanho das partículas do material de preenchimento^{12,23} e a fabricação de colunas capilares com partículas uniformes.^{23,24} Consequentemente, isto leva a tempos de análise longos e pressões elevadas, sendo necessária a utilização de cromatógrafo em escala miniaturizada como *UHPLC* (*ultra high pressure liquid chromatography*), desenvolvido pelo grupo de Jorgenson,²⁵ o qual tem demonstrado muitas vantagens em abordagens proteômicas.²⁴⁻²⁶

Dentre as aplicações descritas na literatura, destacam-se os resultados de Kocher et al. que demonstraram recentemente a identificação de 2.516 proteínas de *HeLa* com coluna cromatográfica de 50 cm de comprimento, 75 µm de diâmetro interno (i.d.) e partículas de C₁₈ com tamanho de 2 µm. Estes autores concluíram que o número de peptídeos identificados aumentou linearmente com a maximização da capacidade de pico.²⁶ Iwasaki et al. identificaram 2.602 proteínas de *E. coli* por meio da eficiência da coluna monolítica com 3,5 m de comprimento. Eles verificaram que o ganho de resolução da longa coluna analítica diminui a supressão de íons melhorando a detecção dos peptídeos, aspecto também observado por outros autores.^{22,24} Xie et al. relataram que a capacidade máxima de pico afeta diretamente na cobertura da análise em proteômica.²⁴ Shen et al. observaram que ao diminuir

o diâmetro interno da coluna capilar de 75 para 15 μm , o número de espécies identificadas aumentou aproximadamente 200 vezes. Este fato deve-se provavelmente ao aumento da concentração de analitos na eluição da coluna estreita, o que torna vantajoso o uso de (espectrometria de massas com ionização por electrospray) ESI-MS, proporcionando um método de análise muito interessante para amostras limitadas.²³

Apesar do surpreendente avanço na instrumentação analítica miniaturizada para os estudos em proteômica, as estratégias atuais ainda não são suficientes para a solução completa de amostras biológicas complexas em um tempo de análise adequado.^{12,13,19} Atualmente, nenhum método de separação é capaz de resolver todos os componentes com uma única coluna cromatográfica.^{24,26}

Nos últimos anos, verificou-se que a combinação de duas ou mais colunas cromatográficas é necessária, pois aumenta a capacidade de pico e consequentemente melhora a resolução. Para um melhor desempenho, observa-se que as separações nas diferentes colunas devem possuir ortogonalidade, ou seja, as propriedades físico-químicas da primeira coluna cromatográfica devem ser diferentes da segunda. Essa estratégia é conhecida como cromatografia multidimensional, pois utiliza duas (ou mais) colunas que representam diferentes dimensões cromatográficas. Recentemente essa técnica tem se intensificado nas pesquisas, tanto na configuração do modo *on-line* quanto *off-line*.^{9,24,27}

1.3. Cromatografia líquida multidimensional

A cromatografia líquida (LC) unidimensional é reconhecida por ser simples, universal, robusta e sensível, contudo verifica-se que a LC multidimensional proporciona maior cobertura do proteoma.^{9,24} Esta última permite geralmente dois modos de configuração, o modo *off-line* ou *on-line*, conforme Figura 1.^{24,27} A configuração *off-line* é baseada na coleta de frações da primeira dimensão e reinjeção na segunda dimensão.⁹ O modo *on-line* realiza a transferência direta de frações do eluente da primeira dimensão para a segunda dimensão, sem interrupção na vazão da fase móvel.

Figura 1. Modos de análise em cromatografia líquida multidimensional aplicada à análise proteômica. A) Configuração *off-line* com coleta de amostra e reinjeção. B) Configuração *on-line column switching* e C) Configuração *on-line* pela tecnologia *MudPIT*.

Adaptado de: PALMA, D. S.; HENNRICH, M. L.; HECK, A. J. R.; MOHAMMED, S. Recent advances in peptide separation by multidimensional liquid chromatography for proteome analysis. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 3791-3813, 2012.

A estratégia *off-line* oferece maior simplicidade instrumental e flexibilidade quando as fases móveis entre as dimensões são diferentes, pois as frações podem

ser: diluídas, concentradas ou dissolvidas em solventes apropriados. O principal problema, está relacionado com maior risco de perda e contaminação de amostra, devido à manipulação e dificuldade de automatização do sistema, o que geralmente resulta em maiores tempos de análise.^{21,27,28}

No modo *on-line*, a manipulação da amostra é reduzida, o que contribui para evitar o volume morto, perda da amostra e redução no tempo de análise. No entanto, essa técnica apresenta requisito rigoroso na escolha dos solventes da fase móvel, uma vez que devem ser compatíveis em ambas as dimensões; caso contrário, surge a necessidade de uma coluna de aprisionamento (*trap*) para limpeza da amostra (*clean-up*) e troca do eluente, antes da transferência dos analitos para a segunda coluna. Além disso, o tempo de análise da segunda dimensão deve ser mais rápido, de modo a não perder a resolução obtida na primeira dimensão. Esta estratégia é denominada como *column switching*.^{9,24,27}

Outra aplicação do sistema *on-line*, foi desenvolvida pelo grupo de Yates, denominada como a tecnologia *MudPIT* (*multidimensional protein identification technology*).²⁰ Esta consiste de um sistema compacto com a combinação da coluna de troca catiônica (SCX) e uma coluna hidrofóbica de fase reversa (RP) com grupo octadecil acoplados em um capilar de sílica fundida com agulha diretamente ligada ao ESI-MS; este conjunto permite uma interface ao *electrospray*.^{20,29} A *MudPIT* é uma técnica simples e possui a enorme vantagem de completa automatização e, em geral, isto reduz o tempo de análise. Os inconvenientes são: a quantidade limitada de amostra que pode ser carregada no equipamento, necessidade de dessalinização antes da injeção no MS e a dificuldade da cobertura total do proteoma.^{9,20,29}

Como uma diretriz de parâmetros gerais na escolha do método instrumental mais adequado, pode-se adotar modos *off-line* para amostras de elevada complexidade como o plasma, onde a cobertura do proteoma é mais exigente; enquanto que o modo *on-line*, é mais conveniente quando se deseja trabalhar com tamanhos de amostras relativamente limitados ou de compostos instáveis.²⁷

Durante a última década, a combinação da SCX com coluna de RP geralmente a base de sílica modificada com o grupo hidrofóbico octadecil (C₁₈) tem sido o método mais utilizado em cromatografia multidimensional aplicada a peptídeos.^{8,21,24,27-30} O sucesso dessa configuração deve-se a elevada

ortogonalidade do sistema, uma vez que a primeira dimensão SCX fraciona os peptídeos devido à interação eletrostática, e a segunda dimensão RP separa os analitos de cada fração da SCX por meio das propriedades hidrofóbicas. Além do mais, essa configuração destacou-se pela capacidade da SCX em permitir o uso de modificadores orgânicos, geralmente acetonitrila, que melhora a recuperação do peptídeo e remove os detergentes e agentes caotrópicos. Estes são frequentemente utilizados para extrair e digerir as proteínas, e caso não sejam removidos, ocasionam problemas de supressão iônica durante o processo de ionização na análise por ESI-MS.²⁷

Geralmente, os grupos da fase estacionária utilizados nas colunas de SCX são ácidos fortes derivados de ácidos sulfônicos. Estas fases possuem baixo valor de pKa e podem ser submetidos a pH baixos, aproximadamente 3, sem a perda da carga negativa. Dessa forma, a interação eletrostática do peptídeo (carga positiva) com a fase estacionária (carga negativa) é favorável para a retenção, o que permite avaliar as modificações pós-traducionais (fosforilação e acetilação N-terminal) dos peptídeos, já que estes possuem diferenças na carga líquida total e consequentemente tempos de retenção diferentes.²⁴

Estudos comparativos indicam que o modo *on-line* SCX-RP sob gradiente salino de vazão controlada de forma semi-contínuo pelas bombas, proporciona melhor identificação e cobertura do proteoma em relação ao modo *off-line* com vazão contínuo de gradiente salino.³¹ Conforme estudos apresentado por Xie et al., a configuração multidimensional SCX-RP foi aplicada a vários proteomas e sub-proteomas de bactérias, fungos, animais e plantas; e possibilitou a identificação e padronização de milhares de proteínas.²⁴

Com o objetivo principal de aumentar a ortogonalidade e a cobertura do proteoma, muitos pesquisadores têm focado na investigação de colunas cromatográficas mais adequadas para a configuração multidimensional. Assim, tem-se explorado a cromatografia de interação hidrofílica (HILIC) com fase estacionária polar recoberta com fase aquosa; cromatografia de interação hidrofílica de repulsão eletrostática (ERLIC), baseada em troca aniônica em combinações com interações hidrofílicas; cromatografia de troca aniônica análoga a SCX e a combinação de duas dimensões hidrofóbicas (RP-RP) variando-se a característica das fases móveis

(como pH ou solvente).^{8,24,27} Há ainda, a possibilidade do uso da cromatografia multidimensional abrangente (do inglês *comprehensive chromatography*), onde todo o eluente da primeira dimensão ou parte representativa dele, é introduzido na segunda dimensão. Contudo essa técnica apresenta extrema dificuldade para otimização dos parâmetros operacionais e instrumentais, exigindo grande experiência do analista em sistemas cromatográficos multidimensionais, bem como instrumentação e software apropriados.^{8,9}

1.4. Capacidades de pico e ortogonalidade em cromatografia multidimensional

A eficiência de separação cromatográfica em HPLC e atualmente em UHPLC é usualmente descrita pela capacidade de picos (n_c). O qual representa o número máximo de componentes que pode ser teoricamente separada numa dada coluna cromatográfica, em determinado intervalo de tempo do gradiente (tg).⁹

Uma estratégia para melhorar a n_c por meio dos parâmetros cromatográficos: é diminuir a taxa do gradiente de fase orgânica (de modo que o comprimento da coluna cromatográfica seja a mesma). Além de utilizar colunas de comprimento maiores, com aumento proporcional no tempo do gradiente e empregar colunas empacotadas com partículas de sorbentes menores, conforme discutidas em 1.2. Segundo Gilar et al.⁴¹ o ganho de n_c por meio das duas primeiras estratégias não é linear e portanto a partir de um certo ponto há o decréscimo de n_c , além do inconveniente acréscimo significativo no tempo de análise. Além disso, a segunda e terceira estratégia é limitada pela pressão que o equipamento pode resistir, o que evidencia a importância de sistemas cromatográficos miniaturizados na escala nano e capilar em UHPLC.²⁵

Devido a esses impasses, os sistemas cromatográficos multidimensionais (LC/LC) são atrativos, pois permitem melhora significativa na separação cromatográfica, em menores tempos de análise (geralmente). A capacidade de pico para a separação multidimensional é definida como o produto múltiplo das capacidades de picos do número das dimensões de separação. Sendo assim,

quando se combina os modos LC ortogonais com as capacidades de pico de 50 e 100, o resultado da capacidade de pico é de 5000, conforme a Equação 1.^{25,42}

$$n_c = n_1 \times n_2 \dots \times n_n \quad 1$$

Onde n_c é a capacidade de pico total e n_1 , n_2 e n_n são as capacidades de pico de cada dimensão cromatográfica. Portanto, a capacidade de pico, depende da ortogonalidade das dimensões de separação.⁴³ Outro parâmetro importante que deve ser avaliado é que o ganho de resolução da primeira dimensão não pode ser perdido nas dimensões posteriores.^{43,24}

Caso a seletividade dos dois modos não seja completamente ortogonais (diferente), a capacidade de pico máxima atingível é menor do que o esperado. Por exemplo, a combinação da SCX com RP não é completamente ortogonal. Pois, além da interação eletrostática que a SCX fornece sobre os analitos com carga, há a interação hidrofóbica equivalente às fornecidas pelas colunas RP.

Apesar desse obstáculo, as configurações que fornecem as melhores ortogonalidades são a RP-RP (com diferentes pH em cada dimensão), SCX-RP e HILIC-RP, conforme discutidas por Gilar et al.,⁴¹ por meio do conceito de ortogonalidade geométrica (Figura 2).

Segundo esta teoria, a modalidade HILIC-RP possui superioridade sobre a SCX-RP e RP-RP, contudo HILIC-RP possui difícil compatibilidade entre as fases móveis para modalidades *on-line column switching*, o que torna a modalidade SCX-RP mais atrativas e usuais devido a maior compatibilidade das fases móveis ou utilização de *traps* de aprisionamento do(s) analito(s).²⁴ Em comparação a essas três modalidades multidimensionais, a SCX-RP possui eficiência inferior na resolução de picos, contudo ela fornece os melhores mecanismos para a diminuição do efeito de matriz de amostras biológicas complexas, como por exemplo a remoção de sais, detergentes ou agentes caotrópicos utilizados na extração de proteínas, fatores estes primordiais em relação a n_c .⁹

Figura 2. Cromatogramas de fosforilase *b* digeridas com tripsina em diferentes modalidades de LC. (A) C₁₈, pH 2,5; (B) Pentafluorofenil (PFP) de fase reversa; (C) C₁₈ pH 10; (D) SEC; (E) HILIC; (F) SCX.

Adaptado de: GILAR, M.; OLIVOVA, P.; DALY, A. E.; GEBLER, J. C. Orthogonality of Separation in Two-Dimensional Liquid Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 6426-6434, 2005.

Uma possibilidade de tornar a capacidade de pico equiparável ao valor teórico das colunas SCX é aumentar o número de frações que sofrerão eluição para a segunda dimensão. Por exemplo, ao utilizar a modalidade SCX-RP podem-se realizar alíquotas de eluente salino com intervalos menores de concentração.⁴⁴ Segundo Horvath et al.,⁴⁵ se um pico é separado em duas frações a capacidade de pico é de aproximadamente 80% da capacidade de pico teórico. Se o mesmo pico é

submetido a 10 frações a capacidade de pico pode chegar a 97%. Contudo, é necessário avaliar a quantidade de amostra, uma vez que sua limitação (como é o caso das aplicações em proteômica) pode ocorrer à perda de sensibilidade na detecção por MS, fator crucial na identificação de peptídeos ou proteínas de menores quantidades.

1.5. Espectrometria de massas e bioinformática

O sucesso da proteômica com a separação e detecção por espectrometria de massas foi estabelecido devido ao advento das técnicas de ionização MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) e ESI (*Electrospray*).³²

A técnica MALDI faz uso de pulsos de raio laser, o qual é incidido sobre a amostra. Por sua vez, essa amostra costuma estar combinada a uma matriz apropriada que absorve a alta energia do laser, fazendo com que os analitos sejam levados à fase gasosa e ionizados. Essa técnica fornece majoritariamente íons monocarregados, sendo geralmente utilizada em associação às separações eletroforéticas feitas em gel uni- e bi-dimensionais (Figura 3).

Figura 3. Representação da técnica de ionização MALDI

Adaptado de: CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Quim Nova**, v. 31, n. 3, p. 676, 2008.

A interface ESI-MS usa altas tensões (2-6 kV) aplicadas em um capilar para a geração de gotículas de *spray*, conforme o tipo de carga desejado (seja o modo positivo ou negativo), assim denominado como *electrospray*. Por meio da evaporação do solvente, as gotículas de carga são convertidas em íons na fase gasosa, ocasionando a repulsão coulômbica, proporcionando assim adequabilidade para a detecção em MS (Figura 4).

Essa técnica produz, no caso de peptídeos e proteínas, principalmente espécies multiplamente carregadas. A ESI possui ótima compatibilidade com a LC, adaptando-se perfeitamente ao fornecimento contínuo de fase móvel, bem como ao tipo de solvente tipicamente usado em colunas de fase reversa.^{24,33}

Figura 4. Representação da técnica de ionização ESI (*Electrospray*)

Adaptado de: EKMAN, R.; SILBERRING, J.; WESTMAN-BRINKMALM, A. M.; KRAG, A. **Mass Spectrometry: Instrumentation, interpretation and applications**. New York: Wiley, 2012. 390.⁴⁶

Outra parte integrante do espectrômetro de massas é o analisador, o qual tem a finalidade de separar os íons formados de acordo com suas razões massa e carga (m/z).³⁴ Dependendo do tipo de método proteômico, faz-se necessário que o analisador seja sequencial. Assim, após o isolamento dos íons na primeira etapa de análise, estes são submetidos a uma etapa de fragmentação (MS/MS) geralmente pela colisão energeticamente suficiente com um gás inerte (tal como argônio, nitrogênio ou hélio), antes da segunda etapa de análise.³² Isso permite relacionar o

íon fragmentado com o íon precursor (intacto), aumentando a certeza na identificação de um determinado analito.³⁴

Geralmente a fragmentação em proteômica é por meio do processo de dissociação induzida por colisão (*collision induced dissociation* – CID), também conhecida como dissociação ativada por colisão (*collision activation dissociation* – CAD). Trata-se de um processo intrínseco do espectrômetro de massas e possui dois processos: a ativação da colisão e dissociação unimolecular.^{32,47} Em instrumentos como o analisador ToF os íons são submetidos à colisão com energias na faixa de 10 a 100 eV, e rapidamente são convertidos em energia vibracional distribuída por toda a molécula e conseqüentemente nas ligações covalentes da mesma.⁴⁷ Portanto, o processo de dissociação unimolecular, esta relacionado com a energia vibracional capaz de romper as ligações químicas mais suscetíveis dos íons. Um fato conveniente deste processo é que uma fração tanto do excesso de energia quanto da energia da ligação é liberada como energia translacional, favorecendo uma ampliação dos picos nos espectros.⁴⁷

Os analisadores de massas normalmente utilizados em proteômica são o *ion trap*, o *ion trap* linear, o triplo quadrupolo, o *Orbitrap*, o tempo de voo (ToF), o ressonância ciclotrônica de íons (ICR), bem como os híbridos dessas configurações.^{4,34}

Caso a metodologia adotada seja a *shotgun*, a análise final dos peptídeos e a identificação das proteínas é feita via software. Estes acessam banco de dados e relacionam a sequência de aminoácidos dos peptídeos contidos nos espectros de fragmentação MS/MS a proteínas.^{4,5} Os softwares mais utilizados em bioinformática são o SEQUEST e o MASCOT.³²

1.6. Quimiometria: planejamento experimental aplicado à cromatografia e espectrometria

A necessidade de maximizar o avanço na pesquisa científica para obter economia de custo e tempo, instigou os pesquisadores a elaborarem experimentos mais eficientes, como o planejamento experimental (*DoE*), o qual constitui uma das abordagens de maior aplicação da quimiometria. Os estudos em *DoE* são baseados

em princípios estatísticos fundamentados na aquisição máxima de informação útil do sistema avaliado com número mínimo de experimentos e levando a otimizações ou respostas mais satisfatórias.^{35,36}

Normalmente a otimização de experimento (clássica) é feita alternando uma variável e fixando-se as demais, conforme apresentado na Figura 5. Verifica-se que ao atingir o valor de pH “ótimo”, representa-se por 40%, altera-se a temperatura até que a resposta seja otimizada pela obtenção de aproximadamente 60% da resposta máxima possível. Essa metodologia é denominada na literatura como univariada.³⁶

Figura 5. Representação da otimização experimental clássica. Os círculos representam os experimentos realizados, em destaque o círculo preenchido, onde obteve-se a “melhor” resposta, contudo, neste caso a estratégia não permite a obtenção de 100% da resposta máxima possível (estrela).

Adaptado de: HIBBERT. D. B. Experimental design in chromatography: A tutorial review. **Journal of Chromatography**, v. 910, p. 2-13, 2012.

Todavia, esta estratégia não permite atingir a máxima resposta do sistema em estudo, uma vez que não se analisam as interações entre os dois fatores, apresentam falta de previsão de respostas, as quais não foram testadas, não distinguem as variações aleatórias e, além disso, exigem uma quantidade enorme de experimentos que são fatores que podem ocasionar o insucesso de uma investigação.³⁶ Pode-se dizer que as primeiras críticas na literatura em química analítica sobre os planejamentos clássicos (exaustivos) foram feitas por Deming³⁷ e Schoenmakers,³⁸ no final de 1980. No entanto a aplicação do planejamento experimental em cromatografia, assim como em espectrometria de massas, mostrou um crescimento somente na última década, como ilustrado na Figura 6.

Figura 6. Número de artigos referenciados pelo Scopus desde 1991 com os termos de pesquisa: “*design of experiments*” ou “*experimental design*” e *chromatography* ou *mass spectrometry* - (pesquisa realizada em 08/12/2014).

Basicamente, o primeiro passo para a realização do *DoE*, é a escolha das variáveis ou fatores que podem interferir significativamente na resposta desejada no projeto. Nessa etapa é necessário que o investigador tenha conhecimento suficiente

do sistema e confiança na escolha da amplitude de cada fator, ou seja, valores adequados de máximos e mínimos. Neste momento, é necessário uma extensiva cautela na leitura de textos, artigos e livros.³⁶ Aplica-se o planejamento fatorial completo ou fracionário, dependendo da quantidade de fatores. Esta etapa proporciona modelos simples do sistema, contudo identificam os fatores mais importantes. Realiza-se o tratamento dos dados estatísticos, utilizando uma função matemática empírica, geralmente linear ou quadrática com termos de interação dos fatores mais significativos; e se estes possuem faixas satisfatórias, encontra-se a região ótima de trabalho.³⁹ Nesta etapa, uma superfície de resposta fornece informação visual das magnitudes dos fatores e proporciona o conhecimento das condições de melhor resposta.^{36,39}

Segundo Hibbert, o planejamento experimental aplicado à cromatografia pode ser classificado como um método de validação da robustez e otimização das condições da técnica.³⁵ Os fatores geralmente investigados são a composição da fase móvel, pH, temperatura, volume de injeção, velocidade do gradiente e vazão.^{30,39} Verifica-se também estudos com *DoE* em espectrometria de massas, os fatores normalmente investigados são o potencial do tubo da lente, energia de colisão e temperatura do capilar.^{33,40}

Apesar de muitos autores relatarem a importância do *DoE* como uma ferramenta eficiente em análises químicas, sua aplicação em proteômica é escassa, tanto no preparo de amostra quanto na instrumentação analítica. Verifica-se também poucas pesquisas em LC-MS/MS,^{30,40} e tratando-se de LC/LC-MS/MS, não há estudos relatados na literatura. Segundo Andrews, *DoE* aplicado à plataforma LC e bioinformática apresenta ótimo requisito para a investigação da cobertura completa de proteomas.³³ Desta forma surge a necessidade de estudos quimiométricos voltados para esta área.^{15,21,30}

2. Objetivos

Desenvolver a técnica cromatografia líquida em configuração multidimensional hifenizada à espectrometria de massas sequencial (LC/LC-MS/MS) para análise de peptídeos (proteômica *shotgun*). Aperfeiçoar a resposta do sistema por meio de estudo quimiométrico, de modo a atribuir a melhor ortogonalidade, capacidade de pico, cobertura do proteoma, valor de *score* e identificação de proteínas.

2.1. Objetivos específicos

- 1) Analisar as variáveis instrumentais e operacionais do cromatógrafo líquido *UHPLC* (*Ultra high pressure liquid chromatography*) multidimensional em escala miniaturizada (capilar) e do espectrômetro de massas sequencial MS/MS micrOTOF-QII.
- 2) Configurar um sistema cromatográfico e espectrométrico para análise da técnica proteômica *shotgun*, no modo *on-line*, *column switching* e autoMS/MS. O sistema será constituído por uma primeira dimensão com uma coluna de troca catiônica, seguido por um *trap* e segunda dimensão por coluna hidrofóbica (C₁₈). O processo final de separação e detecção será realizado por espectrometria de massas sequencial automatizado (autoMS/MS).
- 3) Desenvolver uma instrumentação diferenciada da literatura, por meio de um *trap* (*homemade*) com fase estacionária de elevada retenção dos analitos e desta forma atribuir maior cobertura a proteomas.
- 4) Otimizar as condições instrumentais do sistema por meio de estudo quimiométrico (*DoE*) com padrões da proteína de albumina de soro bovino (BSA). Esta estratégia tem a finalidade de atribuir a cobertura da proteína e comparar os dados obtidos com os de outros autores, de modo a avaliar a eficiência do método proposto.

- 5) Promover a aplicação de softwares para tratamentos de dados em sequenciamento e identificação de proteínas.
- 6) Propor um modelo de superfície de resposta e equação, de modo a verificar a previsão da região de ótimo do método proposto, e desta forma compreender o comportamento da modalidade LC/LC-MS/MS para aplicações de proteomas.

3. Parte experimental

3.1. Padrões e Reagentes

Os padrões de proteínas de albumina de soro bovino (BSA) e citocromo C digerido foram adquiridos respectivamente pelas empresas: Sigma Aldrich e LC Packings da Dionex Company. Os reagentes utilizados para o preparo das amostras foram: ureia (Sigma-Aldrich), bicarbonato de amônio (Sigma-Aldrich), ditioneitol (DTT) (Fluka Analytical), cloreto de cálcio (Mallinckrodt GenAR), iodoacetamida (GE Healthcare) e tripsina (Sigma-Aldrich). Os solventes, sais e ácidos utilizados na composição das fases móveis foram: acetonitrila grau HPLC (Tedia), fosfato de sódio monobásico monohidratado (Tedia), ácido fórmico 98% de pureza (Fluka Analytical), ácido trifluoroacético 99% de pureza (Sigma-Aldrich) e cloreto de sódio (Mallinckrodt). A água utilizada para preparar todas as amostras e soluções foi purificada com sistema Milli-Q da Milipore.

3.2. Materiais

Para a dessalinização das amostras utilizou-se ponteiras preenchidas com fase reversa de octadecil (TopTip™). As colunas e conexões de aço inox (*homemade*) foram adquiridas da Valco Instruments, estas possuem as seguintes dimensões: 5,0 cm de comprimento e 0,5 mm de diâmetro interno. A coluna trocadora catiônica foi empacotada (*homemade*) com partículas de sílica modificada na superfície com grupos de ácido para-etil benzeno sulfônico com área superficial de $466 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, tamanho da partícula de $54 \text{ }\mu\text{m}$, tamanho do poro de $72 \text{ }\text{\AA}$ e capacidade da trocadora catiônica de $0,66 \text{ meq g}^{-1}$ (Varian). O *trap* (*homemade*) foi empacotado com partículas de fase reversa de sorvente polimérico com área superficial de $813 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, tamanho da partícula de $33 \text{ }\mu\text{m}$ e tamanho do poro de $91 \text{ }\text{\AA}$ (Strata X da Phenomenex). A Figura 7 representa o esquema das conexões da coluna e *trap homemade*.

Figura 7. Esquema dos componentes da coluna e *trap* (*homemade*). (a) Uniões utilizadas para conectar a coluna com sistema cromatográfico, (b) Tela para retenção de partículas, (c) Tubulação utilizada para preenchimento com o leito particulado, (d) Ferrolho para a fixação e vedação da tubulação.

3.3. Equipamentos e acessórios

- Balança analítica Mettler Toledo modelo AG 285
- Sistema de ultrapurificação de água Elga Purelab Ultra ou Millipor Milli-Q
- pHmetro bancada Ion-PHB-500
- Eppendorf Centrifuge 5415R
- Thermomixer da eppendorf
- Agitador de tubos tipo vortex da Scientific Industries
- Lavadora ultrassônica Ultra Cleaner Unique
- Bomba de empacotamento de colunas da Shimadzu Prominence LC-20AT.
- *Ultra high pressure liquid chromatography* (UHPLC capilar), série UltiMate 3000 da Dionex nanoRSLC, com detecção por espectrofotometria UV/Vis.
- Coluna trocadora catiônica (*homemade*) empacotada com partículas de sílica modificada com grupos de para-etil benzeno sulfônico (5 cm x 0,5 mm i.d. 54 μm , 72 Å), proveniente do fabricante VARIAN.
- *Trap* (*homemade*) empacotado com partículas de sorvente polimérico (5 cm x 0,5 mm i.d., 33 μm , 91 Å), proveniente do fabricante Phenomenex.
- Coluna cromatográfica hidrofóbica de octadecil empacotada com Acclaim PepMap C₁₈ (15 cm x 300 μm i.d., 2 μm , 100 Å).
- Espectrômetro de massas micrOTOF-QII Bruker

4. Procedimento Experimental

4.1. Preenchimento das colunas

Aproximadamente 20 mg de fase estacionária trocadora catiônica foram usadas por meio de uma bomba da *Shimadzu Prominence* LC-20AT. A vazão inicial e final utilizada no empacotamento das partículas foram de 0,1 à 1,5 mL min⁻¹ respectivamente, a pressão final do preenchimento foi por volta de 25 bar. O *trap* foi preenchido da mesma forma com aproximadamente 15 mg de fase estacionária do polímero Strata X, a pressão final foi de 20 bar.

4.2. Preparo das amostras

1. As amostras de proteínas foram preparadas em diversas concentrações (1 à 40 mg mL⁻¹) em solução aquosa.
2. Adicionou-se solução de ureia 8 mol L⁻¹ na solução de amostra na razão de 1:1.
3. Em seguida realizou-se a redução das proteínas, desta forma, foi adicionado uma solução de DTT 5 mmol L⁻¹ do volume final e incubou-se durante 25 min na temperatura de 56 °C em um *Thermomixer* sob *agitação* de 300 rpm.
4. A alquilação foi realizada por meio da adição da solução de IAA de forma que a concentração final fosse de 14 mmol L⁻¹. Em seguida, incubou-se durante 30 min à temperatura ambiente sob proteção da luz.
5. Adicionou-se solução de DTT 5 mmol L⁻¹ da concentração final de modo a eliminar a quantidade excedente de IAA na solução. Incubou-se durante 15 min à temperatura ambiente protegido da luz.
6. Diluiu-se a amostra na razão de 1:5 em 50 mmol L⁻¹ de bicarbonato de amônio de modo a reduzir a concentração de ureia para 0,8 mol L⁻¹.
7. Adicionou-se solução de cloreto de cálcio até a concentração final de 1 mmol L⁻¹.
8. Preparou-se solução de tripsina (20 ng µL⁻¹) em bicarbonato de amônio 50 mmol L⁻¹ gelado.

9. A digestão das proteínas foram realizadas por meio da adição da solução de tripsina na proporção de 1:50 de enzima/substrato, seguido por incubação durante 16 horas a 37 °C em *Thermomixer* sob agitação de 300 rpm.
10. A reação enzimática foi inativada pela adição de TFA na concentração final de 0,4%.
11. Centrifugou-se as amostras em 2500 rcf ou força g por 10 min em temperatura ambiente, seguido pelo descarte do pallet.

4.3. Dessalinização das amostras

1. Realizou-se a dessalinização das amostras com ponteiros preenchidas com partículas de sílica com a superfície modificada com octadecil (C₁₈).
2. O material empacotado das ponteiros foi lavado com 50 µL de solução aquosa contendo 60% de acetonitrila. Seguido pela lavagem com 50 µL de solução aquosa contendo 0,05% de TFA. Ambos os processos foram realizados três vezes.
3. Pipetou-se 250 µL de amostra de modo que a alíquota foi depositada sobre as ponteiros empacotadas com C₁₈.
4. Lavou-se a amostra com a solução aquosa no volume de 50 µL contendo 0,05% de TFA por três vezes.
5. Os peptídeos foram desorvidos da ponteira empacotada com a solução aquosa de 60% de acetonitrila, de modo que o volume final foi de 50 µL.
6. Os peptídeos dessalinizados foram submetidos a secagem com fluxo contínuo de nitrogênio.
7. Estes foram resuspendidos em água com volume final de 150 µL e armazenados à -20 °C até a realização das análises.

4.4. Configuração adotada no cromatógrafo UHPLC capilar

A Tabela 1 contém a descrição dos acessórios utilizados na configuração do cromatógrafo multidimensional capilar.

Tabela 1. Configuração do sistema cromatográfico multidimensional

Configuração do amostrador		Quantidade
A	Seringa com capacidade máxima de 250 μ L	1
B	Agulha com capacidade máxima de 15 μ L	1
C	Alça de amostragem (<i>loop</i>) com volume de 125 μ L	1
D	Buffer com capacidade máxima de 500 μ L	1
Configuração das conexões		
E	Nano viper 75 μ m de diâmetro interno por 650 mm de comprimento	1
F	Nano viper 75 μ m de diâmetro interno por 550 mm de comprimento	1
G	Nano viper 75 μ m de diâmetro interno por 350 mm de comprimento	2
H	Nano viper 75 μ m de diâmetro interno por 250 mm de comprimento	1
I	Nano viper 50 μ m de diâmetro interno por 150 mm de comprimento	3
J	Nano viper 50 μ m de diâmetro interno por 350 mm de comprimento	1
L	Nano viper 50 μ m de diâmetro interno por 550 mm de comprimento	1
Configuração das colunas e <i>trap</i>		
M	Coluna trocadora catiônica	1
N	<i>Trap</i>	1
O	Coluna analítica hidrofóbica C ₁₈	1
Sistema de detecção		
P	Espectrofotômetro UV-Visível	1
Q	Espectrômetro de massas micrOTOF-QII Bruker	1

4.5. Ilustração e descrição do sistema cromatográfico multidimensional

A Figura 8 apresenta a configuração do sistema multidimensional *on-line column switching* e direção dos fluídos para a separação dos peptídeos nas dimensões cromatográficas. As letras indicam os componentes da Tabela 1.

Figura 8. Ilustração da configuração do sistema cromatográfico multidimensional *on-line column switching*. a) injeção de amostra pela alça de amostragem - b) equilíbrio e carregamento de amostra com tampão fosfato na coluna SCX – c) dessalinização dos peptídeos no trap – d) equilíbrio e separação dos peptídeos na coluna hidrofóbica capilar, seguido por separação e detecção por espectrofotometria UV-Vis ou MS/MS.

Quando a válvula de injeção (inferior) de seis pórticos está na posição de carregamento (2-1), a amostra é aspirada pela seringa e colocada na alça de amostragem (*loop*) conforme a letra “a” da Figura 8. A válvula é programada para a posição “injetar” 6-1 (letra “b”), o que permite que a bomba A (de carregamento) impulsione a amostra para a coluna cromatográfica de troca catiônica. A válvula de seis pórticos (esquerda) na posição 6-1 permite o carregamento da amostra na coluna de troca catiônica (SCX). A fração da amostra que não é retida pela SCX é presa no *trap* adaptado na válvula direita cuja posição deve ser 10-1.

Depois de concluído o carregamento da primeira dimensão, a coluna SCX é removida do caminho do fluxo por meio do giro da válvula de comutação (esquerda) na posição 1-2. Isto permite a dessalinização da amostra recolhida no *trap* com a bomba B (letra “c”). Após esta etapa, a válvula da direita é comutada para a posição 1-2 de modo que a bomba C executa o gradiente no *trap* e na coluna analítica de separação de RP (letra “d”).

Finalizada a separação da primeira fração, a válvula da direita está na posição 1-2 e a válvula da esquerda na posição 1-2, após a etapa de equilíbrio o sistema de válvula retorna para as condições iniciais de modo a eluir os outros peptídeos de maior retenção da coluna SCX. Assim, uma solução salina de menor concentração é injetada. Desta forma o fluxo é direcionado ao *trap*, onde ocorre novamente a dessalinização e direcionamento para a coluna analítica de RP. O processo é repetido com injeções (*salt plug*) em concentrações crescentes de solução salina, até que todos os peptídeos da SCX sejam eluídos e separados na coluna analítica de RP.

4.6. Preparo das fases móveis e plugue das soluções salina

O solvente escolhido para o carregamento da amostra na coluna trocadora catiônica foi solução tampão fosfato de sódio monobásico. Este foi preparado na faixa de concentração de 5-15 mmol L⁻¹, seguido pela medição do pH (2,5-3,0) e adição de solvente orgânico (5-25% de ACN). O solvente aquoso para dessalinização foi preparado com a composição de 2% de ACN e 0,02% de TFA. Os solventes utilizados como gradiente na coluna analítica foram: ACN com 0,1% de ácido fórmico e solução aquosa com 0,1% de ácido fórmico. Os eluentes salinos foram preparados em frasco âmbar com volume de 2 mL com a solução de dessalinização em diversas concentrações do sal cloreto de sódio (500 mmol L⁻¹ – 4000 mmol L⁻¹). A solução salina para limpeza da coluna trocadora catiônica foi composta de 3,5 mol L⁻¹ de NaCl com 2 % de ACN e uma segunda solução aquosa com 5% de ACN. Todas as soluções foram filtradas em membranas com tamanho de poro de 0,2 µm e 47 µm de diâmetro interno, seguido por sonificação durante 20

min. O preparo das soluções foi realizado conforme a literatura especializada ⁴⁹ e do manual da Thermo Dionex.

4.7. Abordagem quimiométrica: Planejamento experimental

A estratégia para avaliar e otimizar a plataforma LC/LC-MS/MS foi por meio da abordagem quimiométrica o planejamento experimental (*DoE*). Este foi realizado em 3 planejamentos fatorial fracionário (*DoE* 1,3 e 5) e 2 planejamentos fatorial completo (*DoE* 2 e 4) e um composto central *DoE* 6, cada qual dividido em experimentos e respostas específicas de forma a avaliar cada compartimento do sistema LC/LC-MS/MS, conforme ilustrado na Figura 9. Todos os *DoE* foram avaliados com nível de confiança de 95% e utilizou-se os softwares Excel para o gráfico normal dos efeitos e o programa Statistica, para o Gráfico de Pareto e Superfície de Resposta.⁶³

Figura 9. Estratégia aplicada no planejamento experimental para LC/LC-MS/MS.

5. Resultados e discussões

5.1. Parâmetros instrumentais

5.1.1. Desenvolvimento da configuração do sistema para injeção da amostra

O sistema de injeção adotado foi o *Microliter Pick-Up* que permite injetar a amostra sem a perda da mesma no processo de preenchimento na alça de amostragem (*loop*) e na lavagem da agulha.⁴⁸ Esta configuração necessita de um solvente de transporte compatível ou igual à fase móvel de carregamento, no caso a solução tampão. A lavagem da agulha é realizada com esta solução, seguida pelo preenchimento do *loop*, onde os líquidos da extremidade são a solução tampão e entre estes se tem a amostra. Para que a configuração *Microliter Pick-Up*, seja precisa é necessária à compatibilidade de todo o sistema de injeção do cromatógrafo, conforme a Equação 2:

$$Vol_{(máx.)} = (0,5 \times Volume\ do\ Loop - 3 \times Volume\ da\ Agulha) \quad 2$$

Portanto, para o sistema desenvolvido com volume de *loop* de 125 µL e volume de agulha de 15 µL a capacidade do volume de injeção de amostra é de até 40 µL. Caso não seja respeitada este calculo, a configuração do sistema de injeção, não funciona, uma vez que a sucção de amostra na agulha ocorre pela aspiração da seringa, portanto o *loop*, *buffer* assim como a agulha, deve possuir compatibilidade em suas dimensões, de modo que permita a aspiração/injeção de forma adequada em termos de pressão.

Esta configuração é interessante para o sistema LC/LC-MS/MS proposto neste trabalho, devido à possibilidade de injeção de volumes de amostra limitados ou ainda na avaliação do sistema cromatográfico com padrões analíticos de elevado custo, de modo que isto permite uma economia significativa na avaliação da análise,

principalmente na aplicação do planejamento experimental, uma vez que são realizadas inúmeras injeções seja de padrões ou amostras.⁴⁸

O sistema *Microliter Pick-Up* foi avaliado por cromatografia líquida unidimensional por meio da coluna analítica hidrofóbica Acclaim PepMap C₁₈ (15 cm × 300 µm i.d., 2 µm, 100 Å) e detecção em 214 nm. O objetivo deste experimento foi comparar o sistema *Full-loop*, usualmente utilizado em cromatografia líquida, com o *Microliter Pick-Up* e verificar os possíveis alargamentos de pico e compatibilidade dos solventes de transporte. O solvente utilizado nas extremidades neste caso foi 5% de ACN com 0,1% de FA. A Figura 10 mostra uma irregularidade em relação à linha base do cromatograma inerente ao sistema *Microliter Pick-Up* e diferença entre os tempos de retenção.

Figura 10. Cromatogramas de peptídeos de Citocromo C na avaliação dos sistemas de injeção *Full-loop* e *Microliter Pick-Up*. As condições cromatográficas adotadas para ambos os casos foram: volume de injeção 1 µL, concentração de amostra 8 pmol µL⁻¹, temperatura do forno de 32 °C e vazão de 4 µL min⁻¹. As condições de eluição foram: 5 min de equilíbrio isocrático com 5% de ACN, seguido por uma taxa de 1,66% ACN min⁻¹ até 55% de ACN, seguido por condição isocrática de 90% ACN durante 5 min. A detecção foi realizada em 214 nm. O tempo total da análise foi de 38 min.

É conveniente mencionar que o sistema *Full-loop* injetou 1 μL de amostra (por meio de um *loop* com volume de 1 μL) e o sistema *Microliter Pick-Up* injetou 1 μL de amostra mais o volume da solução das extremidades. Provavelmente, as observações adversas entre os sistemas de injeção, estejam relacionadas com os efeitos de dispersão que a amostra é submetida entre o solvente das extremidades no sistema *Microliter Pick-Up*. Uma informação importante é que esse sistema realiza o corte de amostra por meio de uma equação (Low Dispersion Factor – L.D. factor), que calcula a fração de amostra que possui o menor comportamento parabólico do fluido, de modo a minimizar o efeito de dispersão.

Entretanto, pode-se concluir que o perfil cromatográfico foi satisfatório para a separação dos peptídeos, com picos finos e bem definidos, boa resolução e razão sinal e ruído adequados. Desta forma o sistema *Microliter Pick-Up* tornou-se atrativa para a aplicação no sistema multidimensional.

5.1.2. Desenvolvimento da configuração do sistema de eluição dos analitos da primeira dimensão

Existem duas modalidades, para a eluição dos analitos retidos na fase estacionária da coluna SCX, no sistema LC/LC *on-line column switching*. A primeira é por meio da vazão controlada de gradiente salino pela bomba e a segunda é por meio de plugues de solução salina realizadas pelo sistema de injeção do equipamento cromatográfico.⁴⁹

Verificou-se que a primeira modalidade tem maior eficácia na eluição dos analitos. Contudo, esta possui alguns inconvenientes como: difícil controle das concentrações dos gradientes salinos; limpeza cuidadosa das bombas com água, para que não haja entupimento com sal; necessidade de observar o volume de atraso de 250 μL (*volume delay*) devido à troca de solventes no sistema de eluição; além do maior desgaste dos selos das bombas e das conexões, devido à passagem de solução salina.

Desta forma, optou-se pela segunda modalidade, onde são injetados plugues de sal, com diferentes concentrações, por meio do sistema de injeção do cromatógrafo, para a coluna trocadora catiônica. Esta possui a vantagem de fácil

dessalinização; menor volume de solução salina; maior controle do volume dos plugues de sal, uma vez que é realizada pelo volume do *loop*; além do mais, esta modalidade permite menor desgaste nos selos das bombas, uma vez que o plugue de sal é via o amostrador e não pela bomba. Contudo, é necessário verificar o volume das alíquotas de sal adequado para a eluição dos peptídeos, pois há dois tipos de interações químicas que ocorrem em colunas trocadoras iônicas, conforme serão discutidas a seguir. Além do mais o volume utilizado nos plugues de sal deve ser compatível com o sistema de injeção da amostra, no caso o *Microliter Pick-Up*. Outro inconveniente é a possibilidade de dispersão da solução salina na fase móvel o que pode diminuir a eficiência da eluição dos analitos. Contudo, este problema pode ser contornado com a velocidade da vazão da fase móvel da primeira dimensão.

Para a injeção dos plugues de sal adotou-se o sistema *Full-loop*, este preenche totalmente a alça de amostragem, assim como a lavagem do mesmo com apenas um tipo de solução. Esta configuração foi necessária para que a eluição dos peptídeos seja eficiente, uma vez que um volume inferior de solução salina pode não ser suficiente para a eluição dos analitos, isto se deve, principalmente a forte interação eletrostática dos analitos com a fase estacionária SCX. Desta forma, verificou que a razão da quantidade de volume dos plugues de sal em relação ao volume da coluna de 13 vezes ($125\ \mu\text{L}/9,82\ \mu\text{L}$) foi adequado para a eluição dos peptídeos e, além disso, proporcionou compatibilidade com o sistema *Microliter Pick-Up* de injeção de amostra.

5.1.3. Planejamento das condições da primeira dimensão

Há dois tipos de trocadores iônicos: os catiônicos e aniônicos.^{14,49} Os trocadores catiônicos possuem grupos negativos imobilizados na superfície da partícula da fase estacionária, enquanto que os trocadores aniônicos possuem grupos positivos imobilizados. Desta forma, para a fase móvel com pH menor que o ponto isoelétrico (pI) do analito (seja proteínas ou peptídeos), estes irão possuir carga resultante positiva e portanto sua retenção será em colunas trocadoras catiônicas. Analogamente, quando o pH é maior que o pI os analitos estarão

negativos e portanto a retenção ocorre em trocadores aniônicos. Verifica-se, que quando há maior quantidade de peptídeos com $pI < 6$ (proteínas ácidas) estas são retidas com melhor eficiência em colunas trocadoras aniônicas, enquanto que os peptídeos com $pI > 8$ (proteínas básicas) são retidos em colunas trocadoras catiônicas e pI entre 6 e 8 ambos os trocadores podem ser utilizados.⁴⁹

É observado que a separação de peptídeos por colunas trocadoras aniônicas é menos comum. Este fato pode estar relacionado devido uma parte considerável dos peptídeos de tecidos humanos (29%) ter uma carga líquida neutra ou presença de grupos funcionais básicos (carga positiva) em pH menor que 8,5 e, portanto estes peptídeos não serão retidos em uma coluna trocadora aniônica. A razão para isso é devido os elevados valores de pK_a das cadeias laterais dos aminoácidos lisina (10,5) e arginina (12), pois em pH igual a 8,5 estes ainda estão carregados positivamente ou caso haja um aminoácido com resíduo ácido que torne o peptídeo neutro.^{14,24} Uma informação apropriada é que a digestão de proteínas com a enzima tripsina, proporciona principalmente clivagens (hidrólises) principalmente no lado do grupo carboxílico que contém os resíduos lisina e arginina, o que garante quantidades elevadas de resíduos básicos e carga positiva na região de pH mencionada.²⁴

Outra possibilidade de escolha, na modalidade de troca iônica em cromatografia é a utilização de partículas de sílica modificadas na superfície com grupos trocadores fortes ou fracos.⁴⁹ O primeiro, refere-se à carga da fase estacionária independente de um elevado intervalo de pH da fase móvel, ou seja a carga da fase estacionária praticamente não muda com a variação de pH. O segundo, a carga da fase pode variar em determinado pH, uma vez que trocadores fracos podem tornar-se ionizáveis em um intervalo pequeno de pH. Portanto, trocadores iônicos fortes ou fracos não estão relacionados com a força de interação do analito com a fase estacionária, mas com o intervalo que a carga da fase estacionária varia com o valor do pH da fase móvel.⁴⁹

Diante de tais considerações anteriores, planejou-se o desenvolvimento da configuração da primeira dimensão do sistema cromatográfico *on-line column switching*. A estratégia em adotar uma coluna trocadora catiônica deve-se a maior aplicação desta em proteômica, assim como sua maior adequabilidade em estudos

para proteômica *shotgun*.²⁷ Utilizaram-se partículas modificadas na superfície com grupos de ácidos sulfônicos, por este ser um trocador catiônico forte.⁴⁹ Desta forma, a variação do pH no estudo quimiométrico garante que somente houve interferência na carga resultante dos analitos e não da fase estacionária.

Por meio da consulta de alguns programas, verificou-se que os peptídeos de BSA apresentarem pI maiores que 3.⁴⁹⁻⁵¹ Portanto, teoricamente parte destes ficarão positivamente carregadas nesse pH, o que permite a retenção em colunas trocadoras catiônicas e desta forma possibilita avaliar as eluições por gradiente ou plugue de soluções salinas. Entretanto, a grande maioria dos peptídeos de BSA são ácidos ($3 < pI < 6$).⁴⁹⁻⁵¹ Conforme descrito anteriormente, a separação de peptídeos ácidos seria facilitada em colunas trocadoras aniônicas, uma vez que ao aumentar o pH do meio, na faixa de 10, tem-se maiores quantidades de peptídeos com carga líquida negativa. Contudo ao otimizar esta amostra em colunas trocadoras catiônicas, tem-se uma melhora nos peptídeos ácidos e conseqüentemente, de forma mais pronunciada, em peptídeos básicos e neutros. Este foi um dos motivos da escolha de peptídeos de BSA, como amostra inicial na avaliação do sistema LC/LC-MS/MS.

Além disso, os protocolos referentes à otimização da plataforma em espectrometria de massas sequencial disponibilizados por empresas do ramo como a Bruker e Thermo, aconselham a utilização da proteína de BSA para a otimização ou primeira aplicação do método em desenvolvimento. E ainda, os softwares direcionados no sequenciamento de proteínas como SEQUEST e MASCOT aconselham que o método analítico deva ser otimizado com a digestão proteolítica de uma proteína conhecida, de modo a verificar a cobertura total da mesma, esta normalmente é a BSA.^{52,53}

As dimensões da coluna trocadora catiônica também foram planejadas, pois colunas longas apesar de aumentarem a eficiência, também aumentam significativamente o tempo de análise. Verificou-se por meio da literatura que o comprimento de 5 cm é o usualmente utilizado em proteômica, com adequado tempo de análise e eficiência.^{24,27,41,49} Segundo Lanças, F.M., colunas analíticas com diâmetros interno diferentes possuem eficiência similares, contudo i.d. menores possuem a vantagem de economia de fase móvel.⁵⁴

O volume da coluna é outro fator que deve ser considerado no planejamento do método cromatográfico, pois definido o sistema de eluição como sendo o plugue de sal, suas dimensões devem ser compatíveis com o volume de injeção da solução salina, de modo que o plugue de sal preencha totalmente a coluna e elua eficientemente os analitos.

Optou-se pela fabricação de uma coluna trocadora catiônica (*homemade*) de modo a verificar sua eficiência para amostras biológicas complexas, além do mais caso haja problemas de entupimento da coluna ou perda de eficiência, torna-se prático a troca e um novo empacotamento da fase estacionária. Sendo assim, optamos primeiro, conhecer os pontos positivos e negativos que uma amostra complexa pode gerar no sistema LC/LC-MS/MS, e após esta etapa pretendemos adquirir uma nova coluna trocadora catiônica de maior eficiência.

Conforme discutido na introdução em 1.4., a literatura menciona que as fases trocadoras catiônicas não fornecem capacidades de pico superiores aos modos de fase reversa (C₁₈) com diferentes pH nas dimensões cromatográficas e HILIC na primeira dimensão conforme pode-se verificar na Figura 2.⁴¹ Por outro lado, são as fases estacionárias mais adequadas e consolidadas na atualidade para a diminuição do efeito de matriz em proteômica. Consequentemente, há uma melhora significativa na detecção por espectrometria de massas, fator relevante em relação a maiores capacidades de pico.²⁷

Com a proposta de discutir estes aspectos e entender o sistema cromatográfico multidimensional deste estudo, conforme já discutido em 1.4, pode-se verificar na Figura 2 os diferentes tipos de cromatogramas obtidos por LC/LC para proteômica. Observa-se que realmente os alargamentos de picos são evidentes em SCX assim como em SEC. Estes podem ser relacionados com a eficiência da coluna (H), por meio de quatro incógnitas da equação de van Deemter (3): o efeito de caminhos múltiplos (termo A), difusão longitudinal (B), transferência de massa na fase móvel (C_m) e transferência de massa na fase estacionária (C_s), assim colunas com ótima eficiência de separação possuem valores baixos de H.

$$H = A + \frac{B}{\mu} + (C_s + C_m)\mu \quad 3$$

Ao analisar a equação 3, pode-se dizer, que a magnitude dos termos B e C são dependentes da velocidade linear média da fase móvel (μ), logo o valor deste pode ser controlado pela vazão dos fluidos no sistema LC/LC, contudo deve ser adequado de modo a contornar a difusão linear em B, mas que não afete as etapas de equilíbrios necessário dos analitos com a fase estacionária em C. Sabe-se, que o tamanho variado de partículas em uma faixa elevada, assim como formatos irregulares contribuem com o alargamento de pico, uma vez que ocorre maiores probabilidades de ocorrência dos caminhos múltiplos pelos analitos, e desta forma o valor de A é elevado, aspecto este indesejável.

Por meio dessas observações, realizamos uma análise por microscopia de varredura eletrônica (MEV) das partículas de SCX, Figura 11. Verifica-se que as partículas possuem tamanhos variados por volta de 30 a 60 μm , coerentes com a especificação do fabricante, porém, possui formatos irregulares; este fato diminui a eficiência da coluna de modo que partículas menores e esféricas apresentam o formato ideal para maiores capacidades de pico e eficiência.⁵⁴

Por meio da observação da Figura 2, da Equação de van Deemter e das imagens de MEV (Figura 11) pode-se sugerir a seguinte hipótese: a síntese de partículas de sílica modificada com grupos sulfônicos não permite uma estrutura de simetria esférica. Consequentemente, isso afeta a capacidade de pico das colunas SCX em análises cromatográficas. Desta forma, as imagens de MEV são condizentes com os cromatogramas de SCX obtidos e discutidos na literatura.^{24,55} Uma analogia, que evidencia esta afirmação é que as partículas de C_{18} possuem formatos esféricos e, portanto produzem cromatogramas que possuem eficiências maiores (menores larguras de pico), conforme apontadas na Figura 2. Como conclusão, estas observações ajudam a compreender as limitações do sistema cromatográfico, em contrapartida permitem um direcionamento para o aprimoramento da técnica.

O mercado fornece colunas com partículas de até 3,0 μm de tamanho, contudo para a utilização de tais é necessário que o sistema cromatográfico permita elevadas pressões, ao tratar-se da modalidade *on-line column switching* a pressão do sistema é ainda mais pronunciada, uma vez que há a comutação de duas ou mais colunas em série.

Figura 11. Imagens de MEV das partículas de sílica modificada com grupo sulfônico (VARIAN).

No mercado nacional, somente a empresa Agilent fornece colunas miniaturizadas de $0,3 \times 35$ ou $0,8 \times 50$ mm (d.i. $\times$ comp.) e partículas com $3,5 \mu\text{m}$, as chamadas colunas ZORBAX Bio Series II, contudo estas permitem uma vazão muito baixa devido o limite máximo de pressão ser de somente 350 bar. Este foi outro impasse que a falta de conhecimento a respeito da compatibilidade do sistema proposto poderia sofrer, portanto a utilização de partículas maiores e o monitoramento das pressões avaliadas neste trabalho podem contribuir com o avanço da técnica em sistemas futuros, como a utilização de partículas com diâmetros ainda menores, encontrados em colunas cromatográficas comerciais.

5.1.4. Planejamento das condições do *trap*

Verificou-se que a escolha do *trap*, assim como o modo de operação do mesmo, interfere na análise dos peptídeos, principalmente nos aspectos relacionados em tempo de análise, perda de analito na dessalinização e reprodutibilidade (resultados preliminares não mostrados). Por se tratar de um

sistema capilar multidimensional *on-line column switching* é necessário verificar a compatibilidade das dimensões de separação (colunas cromatográficas) assim como o *trap*. Os principais parâmetros necessários a se avaliar no *trap* em proteômica são: capacidade máxima da amostra, pressão máxima permitida, quantidade de solvente orgânico e modo da configuração, seja, *back-flush* ou *forward-flush*, conforme discutidos a seguir.

Um ponto importante é verificar a capacidade máxima de analito que o *trap* pode suportar, pois caso a quantidade de analitos eluídos da primeira dimensão sature a fase estacionária do *trap*, haverá perda de peptídeos, uma vez que não haverá sítios de ligação disponível na fase estacionária para os peptídeos excedentes. Esse fato é uma das vantagens (apesar de maior dispêndio) em utilizar a modalidade *off-line* em relação a *on-line*. Uma vez que em *off-line* tem-se a coleta de todo o fluido contendo a amostra, seguido pela reinjeção.

Em sistema cromatográfico multidimensional capilar *on-line* assim como o nano, a utilização de colunas acopladas em série com o *trap*, ambos com diâmetro interno geralmente inferiores a 1 mm, geram pressões elevadas ao sistema. Desta forma é necessário avaliar a pressão máxima que as bombas do equipamento suportam, assim como a das colunas e *trap*, além dos parâmetros como a vazão máxima permitida e viscosidade dos solventes. Caso esteja trabalhando em condições de limites máximos de pressão, é necessário considerar também o período da análise, pois apesar do controle da temperatura da sala, onde situa-se o cromatógrafo, os períodos noturnos onde a temperatura externa abaixa significativamente, pode-se ter o aumento da viscosidade das fases móveis de modo a exceder a pressão do sistema e interromper a sequência de análise.

Há duas possibilidades de realizar o sentido da vazão na etapa de eluição, (dessalinização e gradiente de fase orgânica) em cromatografia multidimensional *on-line*: 1) *forward-flush* e 2) *back-flush*. Em *forward-flush* o sentido das vazões no *trap* é o mesmo, para a eluição, dessalinização e gradiente de fase orgânica. Já em *back-flush*, o sentido da eluição e dessalinização é diferente da vazão do gradiente orgânico, conforme ilustrado na Figura 12.

Figura 12. Diferenças entre a configuração *forward-flush* e *back-flush*

Adaptado de: Thermo Scientific Dionex. Ultimate™ 3000 RSLCnano Standard Applications. Thermo Scientific, p. 8, 2012.

O primeiro possui a vantagem de possibilitar maior resolução na coluna analítica e limpeza do mesmo, uma vez que o analito deve percorrer todo o *trap*, entretanto pode ocorrer perda da resolução adquirida na primeira dimensão ou alargamento de picos devido o efeito de dispersão dos analitos, o que torna a técnica mais difícil de aperfeiçoar. Além disso, é necessário que o *trap* não possua elevado comprimento, pois isso acarreta em aumento significativo no tempo de análise, geralmente utiliza-se *trap* em *forward-flush* com comprimento de até 2 cm. Entretanto, a dimensão do *trap* e consequentemente a quantidade de fase estacionária empacotada, não devem comprometer com a capacidade máxima de retenção de amostra, o que pode gerar uma resposta errada, devido à perda de peptídeos conforme discutido.⁵⁶

Além do mais, o processo de dessalinização e composição de solvente orgânico utilizado exige maior cautela em *trap* com menor comprimento, pois quantidade elevada de solvente orgânico na fase móvel de dessalinização pode gerar perda de peptídeos hidrofóbicos e quantidade inferior de solvente orgânico

(geralmente acetonitrila) pode gerar perda de analitos hidrofílicos, desta forma é necessário avaliar estes parâmetros, principalmente em análises complexas como em proteômica.⁵⁶

Em *back-flush*, os analitos não percolam por todo o *trap*, estes ficam retidos no início, desta forma tem-se significativa diminuição no tempo de análise, além do mais é possível utilizar *trap* com comprimento maior o que permite maior capacidade de amostra e conseqüentemente menos cautela na composição de acetonitrila no solvente de dessalinização. Uma desvantagem nesta modalidade é que os picos podem ter menor resolução, porém pode-se ganhar em capacidade de pico otimizando as condições da coluna trocadora iônica e coluna analítica, de modo que a resolução extra do *trap* não seja significativa, uma vez que a elevada ortogonalidade das duas dimensões exerce forte influência na capacidade de pico.^{41,43}

A aplicação de separação em três colunas é pouco verificada em cromatografia multidimensional, devido os impasses de compatibilidade, principalmente pelo motivo de ganho de resolução da primeira dimensão e perda de resolução nas dimensões seguintes, além do tempo de análise maior e inviável ortogonalidade do sistema, conforme discutido por Malerod et al.⁴³

O sistema de configuração do cromatógrafo UHPLC capilar da Dionex permite a utilização de três tipos de *trap*, conforme listados na Figura 13.

O *trap* A, devido suas dimensões na escala nano não mostrou total compatibilidade com o sistema LC/LC-MS/MS (escala micro-capilar) proposto neste trabalho, contudo verificou-se reprodutibilidade nas análises. Apesar de sua eficiência na retenção dos peptídeos, os problemas nesta aplicação foram: elevada pressão (em torno de 800 bar) o que limita o intervalo da vazão na avaliação do sistema, baixa capacidade de amostra (10 µg especificação do fabricante) e possibilidade de aplicação somente no modo *forward-flush*, conforme recomendado pelo fabricante.

O *trap* B, foi o menos eficiente e não verificou compatibilidade, pois em pressões acima de 200 bar, as conexões não suportam e ocorre vazamentos da fase móvel.

Figura 13. Tipos de *trap* do fabricante Dionex testados para a configuração do sistema LC/LC-MS/MS. A) nano *trap column* com nano viper 100 μm i.d. $\times$ 2 cm, C₁₈, 5 μm , 100 Å. B) μ -Precolumn Holder 500 μm i.d. $\times$ 5 mm, C₁₈, 5 μm , 120 Å. C) μ -Precolumn nano viper connection tubing 500 μm i.d. $\times$ 5 mm, C₁₈, 5 μm , 120 Å.

Adaptado de: Thermo Scientific Dionex nanoViper Fingertight Fitting System. Thermo Scientific, p. 3, 2013.

O *trap* C, foi o de maior compatibilidade com o sistema proposto, pois permitiu um intervalo maior de vazão sem que houvesse o comprometimento com as pressões muito elevada, além da maior capacidade de amostra em relação ao item A. Permite também o modo de operação tanto em *back-flush* quanto em *forward-flush*. Todavia as análises cromatográficas não foram reprodutíveis e verificou-se que ao conectar o cartucho de fase estacionária com o nano Viper, pode ocorrer a

perda da fase estacionária, logo são muito delicados e exigem cuidados especiais. A Tabela 2 indica os testes realizados para os *traps*.

Tabela 2. Compatibilidade dos *trap* da Dionex no sistema LC/LC-MS/MS. Testes realizados com água acidificada 0,1% de ácido fórmico

Pressão do Sistema		
Trap	Coluna SCX comutada ao Trap	Trap comutado a coluna analítica
Vazões testadas	70 $\mu\text{L min}^{-1}$	11 $\mu\text{L min}^{-1}$
A) nano <i>trap column</i>	~ 750 bar	~ 600 bar
B) μ - <i>Precolumn Holder</i>	< 200 bar	< 200 bar
C) μ - <i>Precolumn nano viper</i>	~ 100 bar	~ 500 bar

Diante das dificuldades em conseguir a maior compatibilidade e eficiência do *trap* comercial para a modalidade *on-line column switching*, propomos uma nova abordagem de *trap* para a configuração LC/LC-MS/MS. Desta forma, empacotamos um *trap* (*homemade*) com partículas de material adsorvente polimérico de fase reversa, superior aos *trap* convencionais empacotados com partículas de octadecil (C_{18}). Segundo o fabricante, a Phenomenex, a fase polimérica (Strata X) possui elevada retenção de compostos neutros, ácidos ou básicos, sob elevadas quantidades de solvente orgânico no processo de lavagem.

Enquanto os *traps* de C_{18} apresentam apenas retenção hidrofóbica, a superioridade de retenção deste *trap homemade* é devido a três mecanismos: presença de duplas ligações, interações dipolo-dipolo e retenção hidrofóbica, conforme pode-se verificar na estrutura do polímero da Figura 14. Outra observação instigante e que propôs a ideia de se utilizar esta fase, é que a estrutura do polímero possui certa semelhança com a dos aminoácidos, principalmente com a disposição do oxigênio, presença do nitrogênio, cadeia aromática e hidrofóbica, como pode-se verificar ao comparar a Figura 14 com a 15.

Figura 14. Estrutura do material adsorvente empacotado no *trap homemade*

Essa abordagem é muito interessante em proteômica para a modalidade *on-line column switching*, pois os tipos de interações do polímero são equivalentes com as estruturas químicas dos peptídeos, o que pode gerar elevada recuperação de amostra em relação aos *trap* usualmente utilizados. Além do mais, dependendo da complexidade da amostra torna-se necessário a lavagem com maior quantidade de solvente orgânico. Desta forma, o material adsorvente polimérico é mais vantajoso que as fases de octadecil, pois este pode ocasionar a perda de peptídeos, um dos grandes problemas em proteômica *shotgun*, para uma análise duvidosa ou equivocada.⁵⁷

O *trap homemade*, foi planejado para análises de amostras biológicas de elevada complexidade, desta forma empacotou-se uma coluna de 5 cm de comprimento com 0,5 mm de diâmetro interno, de modo a garantir maior capacidade de amostra. Sendo assim, a modalidade adotada foi a *back-flush*, devido esta possuir menor tempo de análise.

De modo a conhecer o sistema proposto e verificar as especificações das partículas poliméricas do fabricante a Figura 16 apresenta a imagem de MEV da mesma.

Observa-se que as partículas possuem simetria esférica de tamanhos variados de uma estreita faixa, por volta de 28 a 33 μm , coerente com a especificação do fabricante. Estas características contribuem com a diminuição do

alongamento de pico para a segunda dimensão, e consequentemente permite maiores capacidades de pico.

Figura 15. Estrutura de 20 aminoácidos

Alanina (A)	Arginina (R)	Asparagina (N)	Ácido aspártico (D)	Cisteína (C)

Ácido Glutâmico (E)	Glutamina (Q)	Glicina (G)	Histidina (H)	Isoleucina (I)

Leucina (L)	Lisina (K)	Metionina (M)	Fenilalanina (F)	Prolina (P)

Serina (S)	Treonina (T)	Triptofano (W)	Tirosina (Y)	Valina (V)

Figura 16. Imagens de MEV das partículas do polímero Strata X (Phenomenex).

O desenvolvimento deste *trap* permite elevada capacidade de retenção de amostra, diminuindo possíveis perdas de analito e propõem ótima compatibilidade com o sistema LC/LC-MS/MS, principalmente por utilizar pressões que não comprometam com a capacidade máxima do equipamento UHPLC.

5.1.5. Planejamento das condições da segunda dimensão

A segunda dimensão trata-se da coluna analítica. Esta dimensão possui a função de separar os analitos e fornecer uma adequada detecção, seja por espectrofotometria ou espectrometria de massas. É interessante mencionar que uma separação cromatográfica eficiente, propõe maiores níveis de sensibilidade e resolução em espectrometria de massas. Sendo assim, o modo de operação da coluna analítica foi em fase reversa (C_{18}), ou seja, apolar. Portanto, torna-se necessário a utilização de uma fase móvel polar como acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico.⁵⁴

O fator essencial desta etapa é avaliar se os picos dos peptídeos sofrerão perda de sensibilidade, devido a maior capacidade de pico que um sistema multidimensional pode fornecer. Por exemplo, ao realizar uma análise por cromatografia unidimensional, de uma dada concentração de amostra, um pico pode ter a mistura de vários componentes e desta forma a intensidade do sinal é

significativa. Ao aplicar a mesma concentração de amostra, em um sistema LC/LC a mistura de componentes contidas no pico (do primeiro caso) é separada devido à elevada ortogonalidade de sistemas multidimensionais e desta forma ocorre a presença de uma quantidade maior de picos. Entretanto a intensidade de cada pico é menor, ou seja, é necessário avaliar se a quantidade de amostra é suficiente para a geração de picos com valor da razão sinal e ruído adequado⁴⁵ A escolha das fases móvel para esta dimensão será discutido com maiores detalhes a seguir.

5.2. Escolha dos solventes utilizados no sistema LC/LC-MS/MS

Foram necessários cinco tipos de fases móveis em três etapas da configuração cromatográfica adotada (*on-line column switching*). A primeira etapa refere-se ao solvente de carregamento da amostra, até a coluna trocadora catiônica. A segunda é o plugue de sal para eluição dos peptídeos retidos na coluna trocadora catiônica. A terceira trata-se do solvente de dessalinização dos peptídeos retidos no *trap*. E a quarta e quinta etapa são os gradientes de eluição do *trap* para a coluna cromatográfica composta por dois solventes: a fase orgânica e aquosa (ambos acidificados).

5.2.1. Escolha do solvente da primeira dimensão

Verifica-se a possibilidade de dois tipos de solvente em coluna trocadora catiônica: solução tampão ácido ou solução ácida. Escolheu-se o tampão fosfato de sódio monobásico devido possuir pKa igual a 2,15 ($\pm 1,0$ do valor do pKa) permitindo uma região tamponante adequada para a coluna trocadora catiônica, com partículas de grupos sulfônicos na fase estacionária. Além disso, a vantagem da solução tampão em relação à ácida é que o primeiro fornece menor variação de pH, caso seja necessário a adição de outros solventes na fase móvel.⁴⁹

A escolha da fase móvel mais adequada, assim como a sua composição no carregamento da amostra na primeira dimensão é um fator relevante na análise. A concentração da solução tampão é responsável pela força iônica do meio, ou seja, quanto maior a concentração do tampão menor será a força de interação

eletrostática dos analitos com os grupos carregados negativamente na fase estacionária de uma coluna trocadora catiônica. Isso se deve a compensação que uma maior força iônica possui sobre o analito em relação à fase estacionária. Analogamente, caso a força iônica de um tampão seja muito inferior, surge o risco de alguns peptídeos ficarem aderidos irreversivelmente nas partículas da fase estacionária, de modo que o plugue de sal não seja suficiente para que todo o analito percorra a coluna.⁴⁹

Outro parâmetro importante da solução tampão é que quanto maior a sua concentração maior é a sua capacidade tamponante e, portanto o intervalo da mudança de pH em adições de ácido, base ou diluição é maior. Este aspecto é muito interessante para o planejamento experimental, uma vez que torna o meio praticamente inalterado (em condições amenas) o que contribui no *DoE*, uma vez que pode-se eliminar esta variável, tornando o mesmo mais robusto e com menos fatores.⁴⁹

Outro fator determinante da fase móvel de carregamento é o pH. Sabe-se que dependendo do pH do meio os aminoácidos podem possuir carga positiva, negativa ou neutro. Em estudos em proteômica verifica-se uma elevada diversidade de biomoléculas, peptídeos, proteínas com pI diferentes. Desta forma, a escolha do pH adequado para que a maioria dos analitos de interesse tenham carga resultante positiva para trocadores catiônicos e consequentemente interação eletrostática com a fase estacionária é um fator relevante para uma maior ortogonalidade e capacidade de pico em cromatografia multidimensional.⁴⁹

Ainda em relação à composição da solução tampão de carregamento de amostra, verifica-se a necessidade da adição de certa quantidade de solvente orgânico, geralmente acetonitrila na composição do tampão. Este possui a finalidade de diminuir as interações hidrofóbicas entre a biomolécula e a fase estacionária. Deste modo, há dois tipos de interações, a eletrostática e hidrofóbica, logo é necessário que ambas sejam levadas em consideração no desenvolvimento do sistema cromatográfico.^{24,27,49}

Portanto, uma das maiores dificuldades nesta etapa é encontrar as melhores condições para que as biomoléculas tenham interações eletrostáticas e hidrofóbicas que permitam a separação na primeira dimensão, mas que estas interações não

sejam fortes o suficiente para que os analitos fiquem presos irreversivelmente na coluna ou que causem efeito de memórias nas análises posteriores (*carryover*). Desta forma, acreditamos que o estudo quimiométrico pode ajudar na avaliação destas variáveis, de modo a promover uma resposta máxima e eficiente do sistema LC/LC-MS/MS.

5.2.2. Escolha dos solventes utilizados no *Trap*

Após a separação cromatográfica da primeira dimensão e eluição para o *trap* é necessário à dessalinização dos peptídeos, devido três motivos: primeiro o sal em contato com solvente orgânico no gradiente da coluna analítica pode precipitar e obstruir a coluna; segundo a detecção por espectrofotometria UV-Vis será prejudicado devido o espalhamento da luz pelas partículas de sal e terceiro a presença de sal na detecção por espectrometria de massas ocorre supressão iônica do sinal, o que impossibilita a detecção dos analitos, e contaminação na lente do analisador de massas.

Logo, é necessário retirar todo o sal contido no *trap*, para isso devem-se tomar alguns cuidados como a composição do solvente de dessalinização. Segundo o manual da Dionex a utilização de somente água, garante que os peptídeos com maior caráter hidrofílico não sejam perdidos. É importante mencionar que, apesar de alguns peptídeos serem considerados como hidrofílicos, por se tratar de moléculas com cadeia longa de resíduos de aminoácidos, em alguma parte da molécula há hidrofobicidade, que garante a retenção destes no *trap* com fase estacionárias apolares.

Em contrapartida, uma solução composta de somente água pode ser ineficiente para a remoção de interferentes que podem permanecer retidos no *trap* e serem eluídos para a segunda dimensão cromatográfica. Para contornar esta situação adiciona-se um pouco de ACN, de modo a não perder os peptídeos de maior caráter hidrofílico, uma vez que ocorre a perda da hidrofobicidade destas moléculas em solventes orgânicos, mas que tal concentração de ACN permita uma boa limpeza e adequabilidade para a segunda dimensão cromatográfica. Portanto, é necessário considerar estes dois aspectos.^{49,56}

Como o *trap homemade* possui elevada retenção de analitos, devido às características da fase estacionária do polímero e, além disso, elevada capacidade de amostra. Escolheu-se uma quantidade de 2% de ACN de modo a garantir que não haverá a perda de peptídeos hidrofílicos, além do mais, esta composição é geralmente aconselhada para análise proteômica.^{49,56} Entretanto, na segunda dimensão avaliaram-se os gradientes com elevada fase orgânica de modo a garantir que todos os peptídeos fossem eluídos do *trap* de modo a garantir que não houvesse efeito de memória.⁵⁶

As propriedades físico-químicas do *trap homemade* são muito interessante para o desenvolvimento da modalidade *on-line column switching*, proposta neste estudo, pois torna promissora a cobertura do proteoma em *shotgun*. Outra estratégia para a melhora do método é acidificar a solução de dessalinização. Pois desta forma, haverá maior probabilidade dos peptídeos terem carga líquida positiva o que contribui com a interação no *trap* e deste modo minimiza a perda de analito. Sendo assim, adicionou-se 0,02% de TFA. Esta quantidade é adequada para que não comprometa com a durabilidade da fase estacionária do *trap*.⁵⁶

5.2.3. Escolha dos solventes utilizados na segunda dimensão

Escolheu-se uma fase móvel usualmente utilizada em cromatografia líquida com modo de operação em fase reversa, sendo esta a acetonitrila acidificada e água acidificada ambas com 0,1% de ácido fórmico. A finalidade do ácido é garantir a protonação dos silanóis residuais nas partículas de sílica modificadas com os grupos octadecil e desta forma evitar a adsorção de compostos básicos (protonados ou não). Fato que contribui com maior retenção dos analitos, e consequentemente melhor resolução cromatográfica.^{54,72} Além disso, a fase móvel ácida favorece a ionização por *electrospray* para a detecção dos analitos no modo positivo no espectrômetro de massas.

Definido as fases móveis é necessário encontrar as vazões mais adequadas para maiores capacidades de pico, contudo esta etapa deve possuir coerência com o tempo de análise. As bombas para alta pressão do equipamento UHPLC da Dionex permitem valores de até 1000 bar, contudo a coluna analítica utilizada neste

trabalho possui limite de pressão de 800 bar. Portanto, decidiu-se utilizar a vazão máxima de $11 \mu\text{L min}^{-1}$ devido gerar pressão de no máximo 600 bar.⁵⁶

Os manuais do equipamento assim como a literatura, citam valores de $5 \mu\text{L min}^{-1}$ para a separação de peptídeos. Após realizar alguns experimentos nas duas vazões de forma univariada em temperatura ambiente, verificou-se boa resolução em ambos os casos. Desta forma, decidiu-se avaliar esta faixa de vazão no planejamento experimental, de forma a verificar o grau de significância deste fator.⁵⁶

5.3. Escolha dos parâmetros instrumentais do espectrômetro de massas micrOTOF-QII

O espectrômetro de massas micrOTOF-QII da Bruker, permite realizar a detecção de íons pela m/z dos analitos de interesse por três modos distintos:

O primeiro modo é para amostras que contém moléculas-alvo conhecidas ou moléculas desconhecidas provenientes de amostras de baixa complexidade de detecção. Neste caso, os íons (analitos) não são submetidos à fragmentação e são detectados pela m/z intrínseco das moléculas ionizadas em questão. Este modo é conhecido pela abreviação MS.

O segundo modo, é para amostras onde se conhece o intervalo de massas do analito, mas não se sabe ao certo a estrutura e o número de espécies da mesma. Geralmente, aplicado para uma classe de compostos de espécies desconhecidas e também para moléculas-alvo de amostras com elevada complexidade. Neste caso, realiza-se o isolamento de certa m/z (propriamente do analito de interesse) e programa-se uma energia de colisão para a fragmentação da molécula. Estes fragmentos, assim como o íon precursor aumentam a informação sobre a molécula questionada, permitindo maior probabilidade e clareza na elucidação. Este modo é conhecido como MS/MS.

O terceiro modo é para amostras com maior complexidade, onde não se conhece o número de analitos ou caso este número seja elevado. Além disso, os analitos possuem massas moleculares diferenciadas, ou ainda, permitem várias cargas como +1, +2, +3 e +4. Normalmente, esta modalidade é utilizada para amostras biológicas complexas como em proteômica ou metabolômica, onde há

uma faixa enorme de metabólitos, peptídeos ou proteínas. Diferente do segundo modo, a seleção da m/z para que peptídeos ionizados sejam fragmentados é realizada por meio da seleção do valor *Threshold Absolute*, ou seja, é informado ao equipamento um valor limite de intensidade de detecção assim como as energias de colisões adequadas para cada intervalo da m/z , e a partir destes dados realiza-se a fragmentação de todas as espécies que possuem intensidades igual ou maiores a informada, sendo assim a fragmentação é realizada de forma automatizada, modo esse conhecido como autoMS/MS. Esta função deve ser ajustada para cada tipo de amostra e deve-se ter em mente a sua finalidade, ou seja, diferenciar o ruído experimental e interferente dos analitos de interesse.

Para o desenvolvimento do método LC/LC-MS/MS em amostras de peptídeos de BSA foi consultado o protocolo de análise da Bruker, com adaptações.⁵⁸ O valor de *Threshold Absolute* selecionado foi de 2000 cts, valor que proporcionou bons resultados. Outro parâmetro importante do modo autoMS/MS é a quantidade de íons precursores coletados (*precursor ion*), que no caso foi de 3, ou seja, para cada íon-fragmento obtido, o mesmo é correlacionado com 3 possíveis íons precursores que possam ter dado origem a esse fragmento, de modo a proporcionar informação suficiente para a elucidação daquele fragmento em questão. Para amostras de maior complexidade, como de peptídeos provenientes de diferentes proteínas (proteoma), este valor deve ser maior (5 a 20). Caso sejam análises de proteomas conhecidos ou de rotinas este valor pode ser de 1 a 2 espectros de MS/MS.

Outro parâmetro importante é o intervalo da m/z da detecção dos analitos que o equipamento irá realizar (*mass range*). É interessante mencionar que o seu ajuste deve ser suficiente para abranger todas as m/z dos analitos de interesse, mas que este intervalo não seja suficientemente elevado de modo que possa comprometer com a velocidade da leitura de detecção do espectrômetro de massas. Para peptídeos provenientes da digestão com tripsina o intervalo de m/z recomendado é de 50 a 2200.

Há ainda a possibilidade de criar uma lista de exclusão de valores de m/z . Esta tem a finalidade de excluir valores de m/z que certamente não estão contidas na amostra ou que possam ser interferentes. Outra possibilidade de exclusão é a função *Active Exclusion*, ou seja, é possível selecionar o número de espectros, de

maior intensidade, do mesmo íon precursor e selecionar o tempo que estes irão ser excluídos da análise. Para a proteína de BSA a seleção de três espectros e exclusão pelo tempo de 1 minuto é suficiente. Caso a amostra possua maior complexidade o valor deve ser de 2 com o mesmo tempo de exclusão. Portanto, estas funções estão relacionadas com a velocidade na aquisição dos dados, de modo a tornar os cromatogramas com perfil adequado para interpretação dos resultados.

É possível ainda relacionar a dependência da aquisição de dados do autoMS/MS com a intensidade. A função: *Precursor Acquisition Control* permite diferentes velocidades de aquisição dos dados de autoMS/MS. Para amostras com baixa complexidade a velocidade de aquisição tanto em altas quanto em baixas intensidades pode ser de 1 Hz, com obtenção suficiente de espectros. Caso a amostra possua elevada complexidade e dinamismo em termos da abundância de peptídeos, a velocidade da aquisição dos dados do autoMS/MS para os peptídeos de alta abundância podem ser fixados de modo a evitar o desperdício de tempo para a aquisição de dados, uma vez que um tempo longo para peptídeos de elevada abundância é desnecessário. Para estes casos a taxa de espectros autoMS/MS pode ser aumentada de 5 à 20 Hz.

Na etapa de colisão, a fragmentação dos peptídeos foi realizada por meio do processo CID ou CAD, desta forma os íons selecionados no quadrupolo são acelerados para uma região do espectrômetro (câmara de colisão) preenchida com um gás inerte, neste estudo utilizou-se nitrogênio. Este ambiente proporciona as colisões entre os peptídeos ionizados e o gás, levando a fragmentação dos peptídeos de acordo com a energia utilizada (no caso do Microtof-QII, energias na faixa de 10-80 eV são as mais frequentemente utilizadas).

Na função autoMS/MS, utilizada nesse trabalho, é necessário criar uma tabela e programar alguns parâmetros (dar valores aos mesmos) que serão combinados com alguns valores genéricos de massas. Tais parâmetros são: faixa de m/z adjacente (intervalo), valores de energia de colisão adequados para aquela m/z , bem como possíveis estados de carga para aquelas espécies. Baseado nos valores dessa tabela é que será feita a análise da amostra de interesse. A Tabela 3 indica os valores utilizados no desenvolvimento do método autoMS/MS para a proteína de BSA digerida.

Após a aquisição dos cromatogramas e espectros de massas é necessário exportar os dados em espectros de linha (Line Spectra) e com a extensão mzXML File (*.mzXML) ou mzData File (*.mzData), já que estes são compatíveis com o software (SEQUEST) de sequenciamento dos peptídeos em proteínas.

Tabela 3. Valores utilizados na programação do método autoMS/MS na etapa de fragmentação dos peptídeos da proteína de BSA.

Tipo	Massa	Intervalo (Da)	Energia de Colisão	Estado da Carga
Base	200	8	10	1
Base	200	8	15	2
Base	500	8	35	1
Base	500	8	25	2
Base	500	8	20	3
Base	1000	10	50	1
Base	1000	10	40	2
Base	1000	10	35	3
Base	3000	15	75	1
Base	3000	15	60	2
Base	3000	15	50	3

5.4. Sequenciamento dos peptídeos em proteína

5.4.1. Parâmetros do Software SEQUEST

Com a informação analítica proveniente dos cromatogramas e espectros de massas, é possível realizar o sequenciamento dos peptídeos em proteínas, por meio de Softwares, neste estudo utilizou-se o SEQUEST.⁵⁹ Este possui um sistema integrado com os equipamentos da *Thermo Fisher Scientific*. Entretanto, é uma plataforma aberta para os dados provenientes de outros espectrômetros de massas. Contudo, para o sequenciamento de arquivos com extensões mzXML File (*.mzXML) ou mzData File (*.mzData) é necessário criar um “Workflow”, por meio da seleção dos tópicos na parte esquerda da Figura 17 e desta forma, mencionar as especificações do equipamento, no caso o MicrOTOF-Q II.

Figura 17. Workflow para o processamento dos cromatogramas de autoMS/MS adquiridos do método LC/LC-MS/MS (MicrOTOF-Q II)

Após esta etapa, é necessário configurar cada tópico do *Workflow*, com as especificações do espectrômetro de massas. Em *Spectrum Selector*, no canto direito da Figura 18, verifica-se os parâmetros instrumentais utilizados no sequenciamento dos peptídeos deste projeto, como: o tipo de analisador, a forma de ionização, a razão sinal e ruído, modo positivo e outros. Entre os dados, faço destaque ao item 2. *Spectrum Properties Filter* em *Total Intensity Threshold*, este possui a finalidade de separar o sinal analítico do ruído e, portanto o seu valor deve ser adequado para a diferenciação destes.

Figura 18. Configurações do *Spectrum Selector*.

Outra configuração importante é a aba SEQUEST, Figura 19, esta possui a finalidade de interpretar os cromatogramas e espectros visando o sequenciamento dos peptídeos. Os itens de maior relevância são: 1 (*Input Data*) *Protein Database*,

trata-se da base de dados o qual o SEQUEST irá comparar com os dados experimentais, esta encontra-se disponível na internet, desta forma utilizou-se da proteína de BSA do banco de dados da Uniprot⁵⁹ e *Enzyme name*, que faz referência a enzima utilizada na digestão das proteínas, no caso foi a tripsina; 2 (*Tolerances*) *Precursor Mass Tolerance*, o qual possui a função de especificar a tolerância do íon precursor, de modo a encontrar os peptídeos candidatos e 5 (*Static Modifications*) que faz referência as modificações ocorridas no preparo de amostra, como as alquilações e oxidações.

Figura 19. Configurações da aba SEQUEST.

The screenshot displays the Thermo Proteome Discoverer 1.3.0.339 Workflow Editor. The main window shows a workflow diagram with the following nodes: Spectrum Files (0), Spectrum Selector (1), SEQUEST (2), Annotation (4), and Peptide Validator (3). The SEQUEST node is highlighted with a blue box. The Parameters panel on the right is open, showing the following settings:

Parameters	
Show Advanced Parameters	
1. Input Data	
Protein Database	Uniprot_BOVIN.fasta
Enzyme Name	Trypsin (Full)
Maximum Missed Cleavage Sites	2
2. Tolerances	
Precursor Mass Tolerance	2 Da
Fragment Mass Tolerance	0.8 Da
Use Average Precursor Mass	False
Use Average Fragment Masses	False
3. Ion Series	
Use Neutral Loss a Ions	True
Use Neutral Loss b Ions	True
Use Neutral Loss y Ions	True
Weight of a Ions	0
Weight of b Ions	1
Weight of c Ions	0
Weight of x Ions	0
Weight of y Ions	1
Weight of z Ions	0
4. Dynamic Modifications	
N-Terminal Modification	None
C-Terminal Modification	None
1. Dynamic Modification	None
2. Dynamic Modification	None
3. Dynamic Modification	None
4. Dynamic Modification	None
5. Dynamic Modification	None
6. Dynamic Modification	None
5. Static Modifications	
Peptide N-Terminus	None
Peptide C-Terminus	None
1. Static Modification	Carboxymethyl / +58.005 Da (C)
2. Static Modification	Oxidation / +15.995 Da (M)
3. Static Modification	None
4. Static Modification	None
5. Static Modification	None
6. Static Modification	None

At the bottom of the Parameters panel, there is a checkbox for **Use Neutral Loss y Ions**, which is currently unchecked. The text below it reads: "Use neutral losses of y ions for spectrum matching."

As outras abas *Annotation* e *Peptide Validator*, apesar de serem necessárias no *Workflow*, não possuem tanta significância, trata-se de ajustes específicos da

análise, de modo que maiores informações podem ser adquiridos no manual do programa.⁶⁰

Após a configuração do Software é necessário anexar os cromatogramas na aba *Spectrum Files* em *Input Data*. É interessante mencionar que o programa SEQUEST permite o sequenciamento de diversos cromatogramas, provenientes de uma única análise, ou seja, para sistemas cromatográficos multidimensionais, como se pode verificar os diversos cromatogramas anexados na Figura 20. Deste modo, é necessário nomear o arquivo e clicar no ícone indicado, de modo a iniciar o sequenciamento.

Figura 20. Adição dos cromatogramas e sequenciamento

Em seguida, o programa realiza o sequenciamento, conforme se pode verificar na Figura 21. Com os arquivos gerados, o programa menciona o *score*, a

cobertura, o número de peptídeos, a sequência de aminoácidos de cada peptídeo, os espectros de massas, processo biológico, componente celular, pl, quantidade de aminoácidos, e uma série de outros dados da proteína candidata. Para maiores informações, é possível verificar no manual do programa, disponível na internet pela empresa *Thermo Fisher Scientific* como: “*Proteome Discoverer User Guide*”.⁶⁰

Em termos didáticos, pode-se dizer que o valor de score é a probabilidade que os espectros de massas experimentais estão correlacionados com os espectros provenientes do banco de dados teórico. Este valor é dependente do tipo de algoritmo utilizado, desta forma o SEQUEST possui seu valor intrínseco assim como o MASCOT possui seu próprio valor. Algo conclusivo para os dois algoritmos é que quanto maior o valor de score das proteínas candidatas melhor é a identificação da mesma. Portanto, a detecção de todos os peptídeos assim como a obtenção de cromatogramas e espectros de massas com ótima resolução proporcionam as melhores condições para análise em proteômica *shotgun*.

Figura 21. Sequenciamento dos peptídeos em proteínas.

5.5. Estudo quimiométrico: planejamento experimental

5.5.1. Estratégia para aplicação do planejamento experimental no sistema LC/LC-MS/MS *on-line column switching*

Tendo sido pré-estabelecido os parâmetros instrumentais do sistema LC/LC-MS/MS *on-line column switching*, realizou-se o estudo quimiométrico, e como ferramenta utilizou-se o planejamento experimental (*DoE*), com o objetivo de aperfeiçoar a técnica e obter os maiores valores de score, cobertura e números de peptídeos da proteína de BSA.

Estudou-se a possibilidade de duas abordagens para o *DoE*: A) investigar o sistema por completo, ou seja, todas as dimensões cromatográficas e a detecção por espectrometria de massas para um dado conjunto de respostas ou B) avaliar por módulos, de modo a obter uma resposta para cada compartimento do sistema, ou seja, uma resposta para a coluna trocadora catiônica, outra para a coluna hidrofóbica e por fim uma resposta para o autoMS/MS.

Geralmente a aplicação de *DoE* é realizada conforme o item A, uma vez que avalia-se a resposta diante dos efeitos de todos os compartimentos em conjunto. Esta abordagem é eficaz, principalmente quando se tem certa ideia do intervalo dos valores a serem otimizados e quando há poucos fatores a serem analisados.³⁶

Como experiência e conhecimento do comportamento empírico do sistema LC/LC-MS/MS proposto era limitada, e a técnica exige vários fatores a serem analisados, os quais podem contribuir com a melhor resposta, e ainda, a ausência de relatos de aplicação de *DoE* em sistemas cromatográficos multidimensionais acoplados ao espectrômetro de massas para análises proteômicas, optou-se pela segunda abordagem.

É importante mencionar, que há a possibilidade de realizar o *DoE* com muitos fatores, os chamados planejamentos saturados, conforme os estudos propostos por Plackett R.L. e Burman J.P.⁶¹ ou as técnicas de Genichi Taguchi.^{36,62} Contudo, como as análises proteômicas necessitam de várias horas ou até mesmo dias, devido à quantidade exorbitante de analitos, acreditamos que a maior problemática da aplicação dos planejamentos saturados seria definir os intervalos dos fatores de

forma eficaz, uma vez que correríamos o risco de obter respostas ruins, além do dispêndio de tempo e uso do equipamento (limitado), devido uma escolha equivocada nos intervalos dos fatores, detalhe essencial para o sucesso da aplicação de *DoE*.³⁶

Verifica-se que os planejamentos saturados, são utilizados para otimizações de aplicações industriais, uma vez que o processo fabril possui muitos fatores a serem analisados. Contudo, os intervalos dos fatores já são bem explicitados e conhecidos, fato que facilita o sucesso da abordagem. Desta forma, a estratégia B tornou-se mais promissora para o sistema LC/LC-MS/MS *on-line column switching*.^{36,61,62}

Entretanto, após definir os fatores significativos do sistema pela aplicação da abordagem B, aplicou-se novamente o *DoE* em todos os módulos de modo a verificar o efeito por completo e assim garantir uma maior confiabilidade na otimização da resposta.

5.6. Aplicação do planejamento experimental

5.6.1. Avaliação dos fatores significativos da primeira dimensão

A primeira aplicação do *DoE* foi para a coluna trocadora catiônica. Planejou-se um teste rápido, simples e eficiente para a verificação dos possíveis fatores e intervalos dos parâmetros instrumentais da coluna SCX, que poderiam representar significância na resposta. Portanto, utilizou-se a detecção por espectrofotometria UV-Vis, de modo a verificar a maior recuperação de amostra por meio da obtenção de um pico cromatográfico para cada plugue de sal injetado ou limpeza da coluna.

O teste foi realizado da seguinte maneira: primeiro a coluna SCX foi condicionada com uma solução tampão, assim como o *trap*. A coluna hidrofóbica foi condicionada com uma solução de 100% de ACN e 0,1% FA (portanto é de se esperar que não ocorra retenção e os analitos serão eluídos em uma única etapa para cada fração da coluna SCX). Em seguida, injetou-se os analitos para a coluna SCX, os peptídeos neutros foram eluídos diretamente para o *trap*. Retirou-se a coluna SCX do caminho do fluido, por meio do giro da válvula de comutação,

permitindo a dessalinização dos analitos retidos no *trap*. Desta forma, promoveu-se a eluição com 100% de ACN e 0,1% FA. Como resultado, obteve-se um pico por meio da detecção por espectrofotometria UV-Vis no comprimento de onda de 214 nm (região de absorbância das ligações duplas dos peptídeos). Em seguida, a coluna SCX foi novamente direcionada no caminho do fluxo da solução tampão e injetou-se um plugue de solução salina (200 mmol L⁻¹ de NaCl) para a eluição dos peptídeos com cargas líquidas positivas, ou seja, retidos por interação eletrostática na coluna SCX. Novamente, retirou-se a coluna SCX do caminho do fluido o que permitiu a dessalinização dos analitos contidos no *trap*. Em seguida, realizou-se a eluição com 100% de ACN e 0,1% FA. O processo foi repetido para as seguintes concentrações de solução salina: 500, 1000, 2000, 3000, 4000 mmol L⁻¹. De modo a garantir que todos os peptídeos fossem retirados da coluna SCX, realizou-se a eluição por meio da condição isocrática de uma solução de 3,5 M de NaCl com a bomba *Loading Pump* (etapa de Limpeza). Para cada plugue de sal foi necessário o tempo de 15 minutos de análise, desta forma para cada ensaio do *DoE* foram necessário 2 horas e 30 minutos aproximadamente.^{49,56} É conveniente mencionar que os valores dos plugues de solução salina não foram avaliados no *DoE*, e portanto estes foram fixados de modo a tornar o tempo de análise adequado a disponibilidade do equipamento UHPLC.

A Tabela 4 mostra os fatores e intervalo dos valores avaliados (da primeira dimensão cromatográfica). Utilizou-se do planejamento fatorial fracionário 2⁵⁻¹ com total de 16 experimentos e duplicata de quatro ensaios experimentais, escolhido de forma aleatória, estes se encontram englobados como a média aritmética na Tabela 4. Os valores de todos os fatores e intervalos dos *DoE* iniciais, foram obtidos por meio: A) da investigação da literatura especializada^{4,23,24} e B) de alguns testes preliminares. A resposta (área) trata-se da soma dos oito picos referentes a cada fração separada na coluna SCX pelos plugues de solução salina, uma vez que não houve separação na segunda dimensão cromatográfica (coluna hidrofóbica). Portanto, é conclusivo mencionar que quanto maior a área maior será a recuperações de amostra, uma vez que a grandeza do sinal analítico (absorbância) esta correlacionado com a quantidade de peptídeos.

Tabela 4. Dados do experimento (DoE 1 referente a primeira dimensão)

			-1	1
Fatores:	1	Concentração do Tampão (mmol L ⁻¹)	5	15
	2	% ACN no Tampão	5	15
	3	pH	2,5	3,0
	4	Vazão (μL min ⁻¹)	50,00	100,00
	5	Concentração de amostra (mg mL ⁻¹)	0,63	1,00

Ensaio	1	2	3	4	5 = 1×2×3×4	Área (214 nm)
1	-1	-1	-1	-1	1	64,80
2	1	-1	-1	-1	-1	139,57
3	-1	1	-1	-1	-1	379,49
4	1	1	-1	-1	1	296,04
5	-1	-1	1	-1	-1	97,33
6	1	-1	1	-1	1	120,95
7	-1	1	1	-1	1	229,69
8	1	1	1	-1	-1	319,82
9	-1	-1	-1	1	-1	107,49
10	1	-1	-1	1	1	190,20
11	-1	1	-1	1	1	323,90
12	1	1	-1	1	-1	258,45
13	-1	-1	1	1	1	161,98
14	1	-1	1	1	-1	186,35
15	-1	1	1	1	-1	285,66
16	1	1	1	1	1	259,82

Contrastes:						
C1	C2	C3	C4	C5	C12	C13
3,46	141,20	-21,67	27,41	-19,37	-35,00	24,17
C14	C15	C23	C24	C25	C34	C35
-4,74	8,25	-24,90	-41,33	-8,27	4,53	5,99
C45						
38,64						

Os resultados mostram, com 95% de confiança, que dos cinco fatores avaliados, somente a percentagem de acetonitrila no tampão de carregamento (15%) é o fator significativo nos valores ótimos da resposta, conforme pode-se verificar na Figura 22 pelo Gráfico de Pareto e com a Superfície de Resposta, ambos obtidos pelo Software Statistica 10.⁶³

A Superfície de Resposta com os dois fatores de maior relevância, indicam a previsão de maiores absorbância dos peptídeos de BSA, para este conjunto de experimentos. Verificou-se que os cálculos de até 3 interações gerou confusão entre os contrastes, este fato ocorre quando as interações não possuem significância ou quando o planejamento fatorial fracionário não gera resposta suficiente ao modelo. Portanto, torna-se mais apropriado realizar os cálculos com até 2 interações de modo a eliminar os efeitos que geram confusão.

Figura 22. Gráfico de Pareto e Superfície de Resposta da absorbância de peptídeos por espectrofotometria UV-Vis em 214 nm.

Diante destes resultados, planejaram-se as condições instrumentais e analíticas da primeira dimensão. Desta forma, para a verificação dos parâmetros significativos da segunda dimensão fixou-se as condições da primeira dimensão tais como: solução tampão fosfato com 15% ACN, devido a melhor resposta do *DoE*; concentração do tampão de 15 mmol L⁻¹, por permitir boa capacidade tamponante; pH igual a 3,00 devido a maior adequabilidade entre a carga líquida dos peptídeos com a fase estacionária trocadora catiônica, uma vez que o pH de 2,5 gerou maiores tempos de retenção e desta forma a força iônica dos plugues de solução salina podem não ser suficientes para a eluição dos peptídeos. Estas observações, foram

semelhantes às reportadas por PALMA et al.,²⁴ vazão de $125 \mu\text{L min}^{-1}$, de modo a permitir tempos de equilíbrio rápido, assim como a análise e diminuição do efeito de dispersão; concentração de 1 mg mL^{-1} de peptídeos de BSA, de modo a garantir boa detectabilidade.

Outra maneira de avaliar os fatores significativos é por meio do gráfico normal dos contrastes. Conforme se pode verificar na Figura 23, somente o fator 2 é realmente significativo, devido este não possuir a mesma tendência no gráfico em relação aos demais fatores (conforme indicado). É possível observar também, que as melhores respostas indicam para o aumento de ACN no tampão, uma vez que o ponto está no quadrante de valores positivos. Desta forma, estes dados mostram-se condizentes com o Gráfico de Pareto.

Figura 23. Gráfico normal dos contrastes (*DoE 1* referente a primeira dimensão).

A Figura 24 mostra os cromatogramas da melhor resposta conforme as condições testadas do ensaio número 11 da Tabela 4. Os cromatogramas foram reconstruídos pelo Software Origin 8.⁶⁴

Figura 24. Cromatogramas da melhor resposta referente ao *DoE* 1 e Ensaio 11. As condições cromatográficas adotadas foram: volume de injeção 5 μL , concentração de amostra 1,00 mg mL^{-1} e volume dos plugues de solução salina de 125 μL . As condições da coluna analítica foram: vazão de 10 $\mu\text{L min}^{-1}$, e temperatura do forno de 35 $^{\circ}\text{C}$. As condições de eluição foram: gradiente isocrático de 99% de ACN durante 4 min. A detecção foi realizada em 214 nm. O tempo total do experimento foi de 2 horas e 30 minutos.

5.6.2. Avaliação dos fatores significativos da segunda dimensão

Com o pressuposto de verificar os parâmetros significativos da segunda dimensão de forma simples, utilizou-se novamente a detecção por espectrofotometria UV-Vis. Entretanto avaliaram-se duas respostas, a quantidade de picos (q_p) e a capacidade de pico (n_c). Esta foi obtida pelo cálculo da Equação 4, conforme proposta por Snyder et al. (com adaptações).⁶⁵ Onde t_{Rn} e t_{R1} são respectivamente o tempo de retenção do último e primeiro pico e W é a média de cada 4σ (largura do pico) de um dado cromatograma. O somatório da equação faz correspondência com a capacidade de pico dos cromatogramas provenientes de cada plugue de sal eluído para o *trap*, ou seja, o subscrito 0 para o primeiro

cromatograma proveniente dos peptídeos neutros, 1 para o segundo cromatograma proveniente do plugue de sal e assim subsequentemente até o último plugue (subscrito n).

É importante mencionar que a equação 4 foi aplicada somente nos cromatogramas provenientes da segunda dimensão, sendo assim o valor de n_2 obtido neste experimento deve ser multiplicado pelo valor de n_1 da primeira dimensão, conforme a equação 1. E somente desta forma obter o valor da capacidade de pico do método LC/LC multidimensional proposto.⁴³

$$n_c = \left(\frac{t_{Rn} - t_{R1}}{W} \right)_0 + \left(\frac{t_{Rn} - t_{R1}}{W} \right)_1 + \dots + \left(\frac{t_{Rn} - t_{R1}}{W} \right)_n \quad 4$$

Existe um vasto estudo a respeito da melhor forma de avaliar a capacidade de pico diante da condição cromatográfica e instrumental.⁶⁶⁻⁶⁸ Como o nosso interesse foi de avaliar as condições iniciais da plataforma LC/LC, optou-se por uma equação simples de vasta aplicação na literatura^{26,65,69} sem a necessidade de aprofundar em experimentos de maior complexidade. Uma vez que um dos objetivos da dissertação é obter a maior cobertura da proteína de BSA, sendo assim a equação citada, forneceu ótimo direcionamento para o alcance da meta. A quantidade de picos foi obtida pela soma de todos os picos obtidos em uma análise cromatográfica.

Como foram avaliadas duas respostas, tornou-se necessário aplicar a função de desejabilidade 5 e 6 descrita por Derringer R. e Suich, R.⁷⁰ seguida pela média geométrica, indicada pela Equação 8.

$$d = \left(\frac{\hat{\gamma} - LI}{A - LI} \right)^s \quad \text{Para } LI \leq \gamma \leq A; \quad 5$$

$$d = \left(\frac{\hat{\gamma} - LS}{A - LS} \right)^t \quad \text{Para } A \leq \gamma \leq LS; \quad 6$$

$$d = 0 \quad \text{Para } \gamma \text{ fora do intervalo } (LI, LS). \quad 7$$

Onde A é o valor do alvo (ótimo), LI e LS são os limites inferiores e superiores respectivamente, ou seja, caso seja desejável obter menores valores da resposta utiliza-se a equação 5, caso a otimização busque obter maiores valores da resposta utiliza-se a equação 6, γ é o valor questionado e os expoentes s e t estão relacionadas com a magnitude da resposta para os limites inferior e superior respectivamente. Desta forma, o valor de d está restrito entre o intervalo de [0 a 1]. Portanto, o resultado final é a combinação da desejabilidade global D , dada pela média geométrica das m desejabilidades individuais:

$$D = \sqrt[m]{d_1 d_2 \dots d_m} \quad 8$$

O experimento realizado foi similar ao primeiro *DoE*, contudo ao invés de realizar eluição isocrática (100% ACN e 0,1% FA) na coluna hidrofóbica, promoveu-se um gradiente com fase orgânica inicial de 8% e final de 40 ou 60%, sendo este um dos fatores avaliado nesse *DoE*. A Tabela 5 indica os dados do planejamento experimental fatorial completo 2^3 com 8 experimentos e duplicata de 2 ensaios experimentais, escolhidos de forma aleatória, englobadas como média aritmética na Tabela 5. A escolha dos fatores e intervalos de valores foi obtida estudando-se a literatura especializada^{48, 49,54} e por meio de testes preliminares.

Os resultados mostram com 95% de confiança que todos os fatores principais (1, 2 e 3) e algumas interações de segunda ordem (1×3 e 2×3) são significativos. Observa-se no Gráfico de Pareto e na Superfície de Resposta⁶² (Figura 25), que a condição ótima tende para maiores níveis de ACN no gradiente, menores temperaturas assim como menor vazão na coluna hidrofóbica.

O resultado obtido no Gráfico normal (Figura 26) dos efeitos é semelhante ao Gráfico de Pareto. Observa-se que os fatores principais 1, 2 e 3 são significativos, assim como os fatores de interação de segunda ordem 1×3 e 2×3 , uma vez que seus respectivos pontos constam nas extremidades do gráfico. Como 1, 1×3 e 2×3 , possuem valores positivos no gráfico, o aumento destes níveis indicam melhores respostas. De forma análoga, 3 e 2 estão no quadrante negativo do Gráfico e

portanto a diminuição do valor destes fatores tende aos valores de ótimo no estudo deste experimento.

Tabela 5. Dados do experimento (*DoE 2* referente a segunda dimensão)

					-1	1		
Fatores:	1 Gradiente % de ACN				40,0	65,0		
	2 Vazão (μL min ⁻¹)				5,0	11,0		
	3 Temperatura (°C)				35,0	42,0		
Ensaio	1	2	3	n _c	qp	d n _c	d qp	D
1	1	1	1	211,14	119,50	0,68	0,97	0,81
2	1	1	-1	172,21	93,00	0,47	0,35	0,41
3	1	-1	1	204,24	110,00	0,64	0,74	0,69
4	1	-1	-1	268,94	121,00	0,98	1,00	0,99
5	-1	1	1	83,30	78,00	0,00	0,00	0,00
6	-1	1	-1	127,04	111,00	0,23	0,77	0,42
7	-1	-1	1	98,50	80,00	0,08	0,05	0,06
8	-1	-1	-1	271,88	120,00	1,00	0,98	0,99
			LI	83,3	78,00			
			LS	271,88	121,00			
			S	1	1			
Efeitos:								
1	2	3	12	13	23	123		
0,36	-0,27	-0,31	0,04	0,36	0,30	0,05		

A Figura 27 mostra os cromatogramas da melhor condição encontrada no planejamento experimental, em termos de maiores quantidades de pico e capacidade de pico.⁶³ Por se tratar de uma amostra complexa, a sobreposição de picos é algo intrínseco da análise conforme verificado nos trabalhos de Wang²⁸ para o mesmo tipo de amostra. Entretanto, esta resposta pode ser melhorada com a utilização de espectrômetros de massas com alta resolução.

Figura 25. Gráfico de Pareto e Superfície de Resposta da absorbância de peptídeos por espectrofotometria UV-Vis em 214 nm.

Figura 26. Gráfico normal dos efeitos (*DoE 2* referente a segunda dimensão).

Figura 27. Cromatogramas da melhor resposta referente ao *DoE* 2 e Ensaio 4. As condições cromatográficas adotadas foram: volume de injeção 5 μL , concentração de amostra de 0,62 mg mL^{-1} e volume dos plugues de solução salina de 125 μL . As condições da coluna analítica foram: vazão de 5 $\mu\text{L min}^{-1}$ e temperatura do forno de 35 $^{\circ}\text{C}$. As condições de eluição foram: equilíbrio com 5% de ACN sob condição isocrática durante 4 min, seguido por taxa de 2,03% ACN min^{-1} até 80% de ACN e 4 min em condição isocrática de 99% de ACN. A detecção foi realizada em 214 nm. O tempo total da análise foi de 5 horas.

Verificou-se que os perfis cromatográficos foram semelhantes aos resultados obtidos por Vollmer et al., (2004)²¹, Lapek et al. (2012),¹³ Kocher et al. (2011)²⁶ e Davis et al. (2001).⁷¹ Uma interpretação interessante é atribuir à elevada retenção de alguns peptídeos (a partir de 37 minutos), estes provavelmente são aqueles que possuem cadeia carbônica longa ou a presença de aromáticos como os aminoácidos: triptofano, fenilalanina e tirosina.⁴⁹

Desta forma, pode-se inferir que o experimento foi válido, pois houve eficiência dos plugues das soluções salinas assim como a separação na coluna analítica.

5.6.3. Avaliação dos fatores significativos nas duas dimensões (LC/LC)

Os dois *DoE* anteriores avaliaram os fatores significativos de forma isolada de cada dimensão cromatográfica, ou seja, a coluna SCX onde encontrou-se somente um fator significativo e a coluna capilar RP com três fatores significativos e duas interações de segunda ordem significativa.

Entretanto, não é possível afirmar com exatidão que os fatores significativos são aqueles que foram obtidos no primeiro e segundo *DoE*, para o sistema cromatográfico como um todo (LC/LC). Isto porque não foram avaliadas as interações entre os fatores da primeira dimensão com a segunda dimensão. Em outras palavras, surgiram as seguintes indagações: será que os fatores significativos da primeira dimensão possuem maiores magnitudes em relação à segunda dimensão? Ou será que o análogo seria verdadeiro? Ou ainda, será que ambas as dimensões possuem a mesma magnitude para o melhor desempenho do método proposto?

Diante desses questionamentos, realizou-se um terceiro *DoE* onde avaliou-se todos os fatores significativos obtidos diante de ambas as dimensões cromatográficas, ou seja, um planejamento experimental em todo o sistema cromatográfico multidimensional *on-line column switching*, com a proposta de avaliar somente os fatores significativos, assim como a aplicação, com maior autoridade, nos intervalos dos níveis. Outro motivo um tanto quanto pessoal e oportuno para esta aplicação, foi que o espectrômetro de massas encontrava-se com problemas no momento e houve maior disponibilidade do UHPLC.

O experimento e os cálculos deste *DoE* foram semelhantes ao anterior, sendo assim, as respostas avaliadas foram a capacidade de pico (n_c) e quantidade de pico (qp), com detecção por espectrofotometria UV-Vis em 214 nm. A Tabela 6 mostra os dados do experimento. Trata-se de um planejamento experimental fracionário fatorial

2⁵⁻¹ com total de 16 experimentos e duplicatas de 4 ensaios experimentais, estes englobadas como a média aritmética na Tabela 6.

Tabela 6. Dados do experimento (DoE 3).

				-1	1
Fatores:	1° SCX	1	Tampão % ACN	15	25
	1° SCX	2	Vazão (μL min ⁻¹)	100	150
	2° C ₁₈	3	Gradiente % ACN	45	70
	2° C ₁₈	4	Temperatura (°C)	30	38
	2° C ₁₈	5	Vazão (μL min ⁻¹)	5	11

Ensaio	1	2	3	4	5	n _c	qp	d _{nc}	d _{qp}	D
1	-1	-1	-1	-1	1	257,27	87	1,00	0,46	0,68
2	1	-1	-1	-1	-1	83,07	60	0,00	0,21	0,00
3	-1	1	-1	-1	-1	156,13	85	0,42	0,44	0,43
4	1	1	-1	-1	1	158,90	82	0,44	0,42	0,43
5	-1	-1	1	-1	-1	144,13	110	0,35	0,68	0,49
6	1	-1	1	-1	1	91,90	50	0,05	0,11	0,08
7	-1	1	1	-1	1	211,49	96	0,74	0,55	0,64
8	1	1	1	-1	-1	135,24	52	0,30	0,13	0,20
9	-1	-1	-1	1	-1	171,71	144	0,51	1,00	0,71
10	1	-1	-1	1	1	147,04	38	0,37	0,00	0,00
11	-1	1	-1	1	1	147,04	109	0,37	0,67	0,50
12	1	1	-1	1	-1	131,72	79	0,28	0,39	0,33
13	-1	-1	1	1	1	173,73	130	0,52	0,87	0,67
14	1	-1	1	1	-1	94,36	58	0,06	0,19	0,11
15	-1	1	1	1	-1	163,27	79	0,46	0,39	0,42
16	1	1	1	1	1	106,11	50	0,13	0,11	0,12
<i>LI</i>						83,07	38			
<i>LS</i>						257,27	144			
<i>S</i>						1	1			

Contrastes:										
C1	C2	C3	C4	C5	C12	C13	C14	C15	C23	C24
-0,41	0,04	-0,04	-0,01	0,05	0,18	-0,02	-0,03	-0,06	-0,03	-0,07
C25	C34	C35	C45							
0,02	-0,009	0,02	0,12							

Como houve valores semelhantes nos contrastes das interações de segunda ordem, como pode ser verificado na Tabela 6, sendo estes C14 e C23, assim como

o C25 e C35. Pode-se dizer que estes são redundantes e não geram resposta ao modelo, portanto torna-se necessário realizar os cálculos somente com os fatores principais, ou seja, sem as interações de segunda e terceira ordem.

A Figura 28⁶³ mostra com 95% de confiança, que o fator significativo é a percentagem de ACN no tampão de carregamento. Portanto pode-se afirmar que, dos 8 fatores avaliados (considerando a soma dos fatores dos *DoE* 1 e 2) somente este é significativo no sistema LC/LC *on-line column switching*. É factível esta afirmação, pois neste *DoE* (3) avaliou-se as interações dos fatores significativos dos *DoE* 1 com o *DoE* 2.

Figura 28. Gráfico de Pareto e Superfície de Resposta da absorbância de peptídeos por espectrofotometria UV-Vis em 214 nm.

Uma análise interessante, é que podemos neste momento atribuir relevância no controle da interação hidrofóbica entre os peptídeos e a fase estacionária, para a resposta do sistema cromatográfico multidimensional, devido novamente ao fator um apresentar-se como significativo.

Com estes resultados, começou-se a adquirir maior conhecimento do sistema LC/LC-MS/MS *on-line column switching*. Pode-se dizer que, uma quantidade de

ACN inferior ou igual a 5% no tampão de carregamento faz com que os peptídeos não sejam eluídos da coluna SCX para o *trap*, devido a interação hidrofóbica prevalecer em relação à interação eletrostática. Por outro lado, uma percentagem igual ou superior a 25% de ACN no tampão de carregamento, faz com que ocorra perda de peptídeos no *trap*, uma vez que se aumenta a solubilidade dos analitos na fase móvel, de modo que a capacidade de retenção da fase estacionária polimérica do *trap* é drasticamente diminuída. Diante deste fenômeno, torna-se oportuno mencionar a importância da aplicação do *trap* com elevada capacidade de retenção, desenvolvida neste trabalho.

Outro aspecto interessante neste *DoE*, é que os fatores de maior contribuição para maiores n_c e q_p são provenientes da primeira e segunda dimensão. Como se pode verificar nos gráficos das Figuras 28 e 29. Uma importante menção a respeito de se analisar a capacidade de pico no método proposto é discutido por Kocher et al.,²⁶ onde analisou-se a correlação positiva entre maiores capacidades de pico com o número de peptídeos identificados do proteoma de *HeLa*, por meio da técnica LC-MS.

Figura 29. Gráfico normal dos contrastes (DoE 3).

A Figura 30⁶⁴ representa a resposta com maior desejabilidade dos cromatogramas referentes ao ensaio 9 da Tabela 6. Verifica-se novamente a sobreposição e alargamento dos picos.

Figura 30. Cromatogramas da melhor resposta referente ao *DoE* 3 e Ensaio 9. As condições cromatográficas adotadas foram: volume de injeção 20 μL , concentração de amostra de 1 mg mL^{-1} e volume dos plugues de solução salina de 125 μL . As condições da coluna analítica foram: vazão de 5 $\mu\text{L min}^{-1}$ e temperatura do forno de 38 $^{\circ}\text{C}$. As condições de eluição foram: 8% de ACN durante 9 min, seguido por uma taxa de 1,00% ACN min^{-1} até 45% de ACN e 4 min sob condição isocrática de 99% de ACN. A detecção foi realizada em 214 nm. O tempo total da análise foi de 6 horas.

De modo a questionar esse efeito, analisou-se os peptídeos de BSA por cromatografia líquida unidimensional (Figura 31)⁶⁴ e verificou-se uma diminuição da largura dos picos. Portanto, é conveniente mencionar que o alargamento de pico

esteja correlacionado com o efeito de dispersão causado pela eluição em diversas colunas cromatográficas e também pela irregularidade das partículas da coluna SCX, além do tamanho variado de 30 a 60 μm , conforme discutidas no item 5.1.3. Uma alternativa para melhorar o perfil cromatográfico assim como as capacidades de pico é utilizar colunas SCX com partículas menores de 3,5 μm conforme já explicitado no item 5.1.3., e mencionado por diversos especialistas da área.^{54,72} É importante destacar também, dos desafios em se otimizar um sistema multidimensional em relação ao unidimensional, conforme discutidos no item 1.3.

Figura 31. Perfil cromatográfico do digerido triptico de BSA aplicada à modalidade cromatografia líquida unidimensional (LC-UV). As condições cromatográficas adotadas foram: volume de injeção 1 μL (*full loop*), concentração de amostra de 615,68 $\mu\text{g mL}^{-1}$, temperatura do forno de 35 $^{\circ}\text{C}$, vazão de 4 $\mu\text{L min}^{-1}$, tempo de equilíbrio de 6,2 min seguida por uma rampa de gradiente com 1,03 % ACN min^{-1} até 50% de ACN e 4 min sob condição isocrática de 90% de ACN. A detecção foi realizada em 214 nm. O tempo total da análise foi de 60 min.

Ao comparar os cromatogramas da Figura 30 e 31 é oportuno mencionar a superioridade da capacidade de pico da modalidade multidimensional em relação a

unidimensional, esta característica possui um peso maior na avaliação do método em relação ao perfil cromatográfico, uma vez que os espectrômetros de massas com elevada resolução e sensibilidade garantem o perfil cromatográfico de íons melhor se a plataforma LC oferecer uma capacidade de pico elevada.^{22,26}

Não poderíamos deixar de comparar a Figura 30 com a Figura 27, uma vez que verificou-se maiores diferenças entre os tempos de retenção, contudo o alargamento do pico é visualmente mais pronunciado, o que tornou n_c menor entretanto a q_p foi maior. Uma provável explicação para este comportamento é devido ao aumento da concentração dos peptídeos injetados referentes ao cromatograma da Figura 30.

Apesar dos impasses, pode-se dizer que o experimento foi válido, para a avaliação do método cromatográfico multidimensional, uma vez que houve a separação dos analitos em todos os plugues de sal e verificou-se diferentes tempos de retenção entre alguns compostos, além da verificação dos fatores significativos e descrição da oportunidade de se melhorar o método proposto.

5.6.4. Avaliação dos fatores significativos da plataforma autoMS/MS

Após realizar o estudo quimiométrico em toda a plataforma LC/LC, e atribuir os fatores significativos e níveis adequados dos intervalos, iniciaram-se os estudos na plataforma autoMS/MS, com o mesmo objetivo. Desta forma, realizou-se uma triagem inicial com experimentos rápidos, este consistiu em duas etapas: A) injeção de amostra e eluição com tampão na primeira dimensão, seguida por dessalinização no *trap*, separação na segunda dimensão e detecção; B) eluição com solução de 3,5 M de NaCl por meio das bombas, seguido por dessalinização no *trap*, separação na segunda dimensão e detecção por autoMS/MS.

Os fatores avaliados foram: a tensão do capilar, tempo de transferência para o tubo de voo, concentração de amostra e vazão da coluna analítica. Por se tratar de uma avaliação inicial, a finalidade foi de não tornar este *DoE* muito complexo, desta forma seguiu-se algumas condições instrumentais pré estabelecidas pelo fabricante do equipamento (Bruker) como ótimas, para vazões de 1 à 10 $\mu\text{L min}^{-1}$. Desta forma, adotou-se a pressão do gás nebulizador (N_2) de 0,4 bar; a vazão do gás secante (N_2) de 5 L min^{-1} e temperatura do gás secante de 180 °C.

Antes de mencionar o experimento, é necessário descrever as funções de alguns parâmetros instrumentais do espectrômetro de massas, conforme ilustrados na Figura 32.

Figura 32. Foto da fonte de ionização (aberta) do espectrômetro de massas microQTOF-QII, com detalhes de alguns componentes e parâmetros que devem ser otimizados.

O potencial do capilar é a tensão necessária para que haja uma eficiente separação de cargas do analito, na ponta do capilar. A pressão do gás nebulizador está relacionada com a vazão de N_2 que elui de forma coaxial ao capilar da amostra e que permite tanto a formação do *spray* quanto auxilia na dessolvatação da fase móvel. A temperatura da fonte e o gás secante tem a função de eliminar o solvente da fase móvel, permitindo assim a transferência do analito para a fase gasosa. Por fim, o tempo de transferência está relacionado com o tempo necessário para acumular os íons que saem do quadrupolo e enviá-los para o tubo de voo, através de um pulso de potencial. Esse tempo está relacionado com a m/z do analito de

interesse: quanto maior a m/z do analito, maior o tempo de transferência necessário para que sejam acumuladas quantidades significativas daquele íon, para posterior transferência para o tubo de voo e detector.

O tempo de cada análise foi de aproximadamente 2 horas, com um total de 16 experimentos sem réplicas, de modo que as respostas avaliadas foram a intensidade do sinal (IS) e o perfil dos cromatogramas (PC) obtidos pelo autoMS/MS. Este foi avaliado pela atribuição de uma nota de 1 a 10. A Tabela 7 mostra o planejamento fatorial completo 2^4 sem réplicas.

A Figura 33⁶³ mostra com 95% de confiança que o aumento da tensão do capilar assim como da concentração de amostra, são os fatores significativos deste experimento. Entretanto, ao analisar os resultados e interpretação dos cromatogramas de autoMS/MS, verificou-se que o intervalo do fator 1 não foi adequado para o estudo quimiométrico. Pois, a tensão de 1600 V não forneceu a geração dos cromatogramas de autoMS/MS e, portanto é de se esperar que este fator fosse ter significância para valores de máximo no resultado final. Em outras palavras, pode-se dizer que uma análise matemática indica como significativo, contudo o intervalo dos fatores não foi adequado na avaliação do mesmo.

Faço observação neste parágrafo, o motivo pelo qual não se optou em utilizar os planejamentos saturados conforme discutidos em 5.5.1., uma vez que a escolha inadequada dos intervalos dos parâmetros poderia comprometer com todo o *DoE*.³⁵ Contudo, Andrews avaliou a plataforma de um LTQ Orbitrap-MS/MS para o proteoma digerido de *S. cerevisiae* e a tensão do capilar mostrou-se um fator significativo. Uma crítica a esta publicação, é que os autores avaliaram somente a plataforma MS de um sistema LC-MS/MS, além disso não propuseram um modelo de superfície de resposta.³³

Em relação ao fator 2 é de se esperar que concentrações maiores proporcionem intensidades de sinal maiores, como pode-se verificar na Tabela 7, contudo a concentração de peptídeos é algo muito relativo em proteomas reais, onde existe uma diversidade exorbitante entre as quantidades de proteínas.

Entretanto, este *DoE* mostrou que independente da concentração de analitos é mais importante que os parâmetros instrumentais estejam adequados para a análise, como pode-se verificar no Gráfico de Pareto e pela Superfície de Resposta

(Figura 33)⁶³, onde a tensão do capilar possui maior significância em relação a concentração.

Tabela 7. Dados do experimento (*DoE 4*)

								-1	1
Fatores:	1	Tensão do Capilar (kV)						1,6	4,5
	2	Concentração de amostra (mg mL ⁻¹)						0,50	1,00
	3	Vazão da coluna C ₁₈ (μL min ⁻¹)						5	10
	4	Tempo de transferência para o tubo de voo (μs)						70	120

Ensaio	1	2	3	4	IS	PC	d IS	d PC	D
1	-1	-1	-1	1	4,65E+04	1	0,01	0,00	0,00
2	-1	1	-1	1	8,00E+04	2	0,04	0,11	0,06
3	1	-1	-1	1	4,50E+05	4	0,30	0,33	0,32
4	1	1	-1	1	1,10E+06	6	0,76	0,56	0,65
5	-1	-1	1	1	1,50E+05	4	0,09	0,33	0,17
6	-1	1	1	1	7,00E+05	4	0,48	0,33	0,40
7	1	-1	1	1	1,95E+05	5	0,12	0,44	0,23
8	1	1	1	1	1,43E+06	6	1,00	0,56	0,75
9	-1	-1	-1	-1	3,10E+04	2	0,00	0,06	0,00
10	-1	1	-1	-1	5,55E+04	2	0,02	0,11	0,04
11	1	-1	-1	-1	3,45E+05	6	0,22	0,56	0,35
12	1	1	-1	-1	6,70E+05	8	0,46	0,78	0,60
13	-1	-1	1	-1	6,25E+04	2	0,02	0,11	0,05
14	-1	1	1	-1	1,18E+05	2	0,06	0,11	0,08
15	1	-1	1	-1	4,25E+05	10	0,28	1,00	0,53
16	1	1	1	-1	7,20E+05	10	0,49	1,00	0,70

LI				3,10E+04	1				
LS				1,43E+06	10				
s				1					

Efeitos:									
1	2	3	4	12	13	14	23	24	34
0,41	0,20	0,11	0,03	0,11	-0,04	-0,09	0,03	0,08	0,02
123	124	134	234	1234					
-0,01	0,03	-0,09	0,05	0,01					

O Gráfico Normal dos Efeitos (Figura 34) permite uma fácil visualização dos efeitos positivos que contribuem para a melhor resposta do método, e verifica-se

equivalência com a Figura 33, de modo que os fatores significativos foram 1 e 2 respectivamente.

Figura 33. Gráfico de Pareto e Superfície de Resposta

Figura 34. Gráfico normal dos efeitos (DoE 4)

Em suma, pode-se dizer que este experimento não proporcionou informação adequada ao estudo, devido a escolha de um intervalo insatisfatório para o *DoE*. Contudo, proporcionou o questionamento de outros parâmetros como a temperatura do gás secante e pressão do gás nebulizador, fatores esses considerados como ótimos nas condições de 0,4 bar e 180 °C, respectivamente, pelo fabricante do equipamento micrOTOF-QII.

5.7. Aplicação final do planejamento experimental

5.7.1. Observações para a aplicação do *DoE* em todo o sistema LC/LC-MS/MS

Após a análise dos quatro *DoE* anteriores, foi possível estabelecer com maior propriedade e conhecimento a escolha dos parâmetros instrumentais propostos neste trabalho. Entretanto, é necessário avaliar o método por completo conforme discutido em 5.5.1., de modo a verificar as interações dos fatores entre todas as plataformas, a LC/LC e autoMS/MS.

Até o momento, verificou-se que na plataforma LC/LC, a quantidade de ACN no tampão de carregamento pode ser um fator significativo na otimização do método. Em relação à plataforma autoMS/MS surge a necessidade de avaliar a tensão do capilar em um intervalo mais adequado de níveis, e desta forma constatar com maior clareza a significância deste fator.

De modo a tornar o próximo *DoE* mais consistente na avaliação dos fatores da plataforma autoMS/MS, resolvemos questionar o protocolo das condições ótimas mencionadas pela Bruker em relação aos fatores: temperatura da fonte e pressão do gás nebulizador. Em relação ao gás secante, acreditamos que este fator não possui significância na avaliação da maior cobertura de proteomas, uma vez que a sua função é permitir que os analitos da interface LC-MS estejam sem a fase móvel.

É notório mencionar a respeito do fator tempo de transferência para o tubo de voo, uma vez que este parâmetro pode representar importância ao método, principalmente na diferenciação de analitos com massas moleculares variadas, conforme discutida no item 5.6.4. Deste modo, realizou-se um experimento de forma univariada. Este consistiu de injeção direta dos peptídeos de BSA (dessalinizados)

no espectrômetro de massas e avaliaram-se diversos valores do tempo de transferência como de 60 a 130 μs e constatou-se que o tempo de 70 μs foi o mais adequado com o fornecimento de espécies com 200 à 1200 m/z , ótima geração de espectros bem resolvidos e sem ruídos. Sendo assim, fixou-se este valor para o método proteômico deste estudo.

Devido a alguns parâmetros instrumentais não apresentarem significância nos planejamentos experimentais anteriores, estes também foram fixados da melhor forma para a análise, conforme a descrição da Tabela 8.

Tabela 8. Valores dos parâmetros fixados para a aplicação do planejamento experimental em toda a técnica LC/LC-MS/MS.

Valores Fixados			
1° Dimensão	Valores	Motivos	
1 [Tampão mol L^{-1}]	15	Maior capacidade tamponante	
2 pH	3	Maior adequabilidade com SCX segundo a literatura ^{23,24}	
3 Vazão ($\mu\text{L min}^{-1}$)	125,00	Análise e tempo de equilíbrio rápido	
4 [BSA _{final}] (mg mL^{-1})	1,00	Adequado para detecção em autoMS/MS	
2° Dimensão			
5 Vazão ($\mu\text{L min}^{-1}$)	8,00	Análises rápidas com pressão adequada	
6 Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	38,00	Maior estabilidade	
3° autoMS/MS			
7 Tempo de Transferência (μs)	70	Menores ruídos e melhor perfil cromatográfico	
8 Vazão do gás de secagem (L min^{-1})	5	Valor adequado e conforme protocolo da Bruker ⁵⁸	

5.7.2. Avaliação dos fatores significativos de todo o sistema LC/LC-MS/MS *on-line column switching*

Como até o momento, realizou-se vários *DoE* em relação a parte cromatográfica, a estratégia deste *DoE* foi avaliar um número maior de fatores da plataforma autoMS/MS e desta forma atribuir um planejamento robusto na

verificação dos fatores significativos de todo o método. Os fatores selecionados e seus respectivos motivos encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9. Fatores avaliados no planejamento experimental em todo o método.

1° Dimensão		Motivos
1	[Tampão % ACN]	Fator significativo nos <i>DoE</i>
2° Dimensão		
2	% ACN no gradiente	Pode influenciar na formação do <i>electrospray</i> e separação dos peptídeos
3° autoMS/MS		
3	Pressão do gás nebulizador	Melhor formação do aerossol
4	Temperatura da Fonte	Melhores condições para o analito ir à fase gasosa via dessolvatação do analito
5	Tensão do Capilar	Fator significativo no <i>DoE</i> e literatura ³³

A Tabela 10 refere-se aos dados dos experimentos realizados, trata-se de um planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} com total de oito experimentos e duplicatas de três ensaios experimentais (escolhidas de forma aleatória), sendo estas englobadas na tabela pela média aritmética. Foram avaliadas três respostas: o valor do score, percentagem da cobertura da proteína (Cob) e número de peptídeos redundantes (Npep).

Os valores de máximos desejáveis da resposta (*LS*) referentes ao número de peptídeos, foram adquiridos do *Software ExPASy Peptide Cutter*,⁷³ trata-se de um programa, disponível na internet, que realiza a digestão virtual das proteínas. Muito útil para verificar a sequência de aminoácidos, assim como de peptídeos e suas respectivas clivagens. Desta forma, para a digestão com tripsina da proteína de BSA o programa menciona 78 clivagens, sendo este valor englobado na Tabela 10.

Verifica-se que novamente houve confusão entre as interações dos fatores, como pode-se observar nos contrastes de mesmo valor. Desta forma, realizou-se a análise dos gráficos somente com os fatores principais, conforme Figura 35 e 36.⁶³

Com 95% de confiança os fatores significativos foram a quantidade de ACN no tampão de carregamento da coluna SCX e a pressão do gás nebulizador. Faço destaque neste último parâmetro, pois esta não possui coerência com a

especificação fornecida pelo fabricante, como região de ótimo. A Figura 36 faz a elucidação dos fatores significativos, sendo o fator 1 com valor de máximo (quadrante positivo) e o fator 5 com valor de mínimo (quadrante negativo). É conveniente mencionar a respeito do fator 3 (tensão do capilar), neste *DoE* o mesmo não apresentou como significativo, fato que condiz com a previsão realizada no tópico 5.6.4, onde mencionou-se um intervalo inadequado para a avaliação deste fator.

Módulo										-1	1
Fatores:	1	SCX	% de ACN no Tampão (coluna SCX)							10	20
	2	C ₁₈	% de ACN no Gradiente (coluna analítica)							40	65
	3	ESI-MS	Tensão do Capilar (kV)							2,8	4,5
	4	MS/MS	Temperatura da Fonte (°C)							180	250
	5	MS/MS	Pressão do Gás Nebulizador (bar)							0,4	0,8

Ens.	1	2	3	4	5	Score	Cob	Npep	d Score	d Cob	d Npep	D
1	-1	-1	-1	-1	1	1674,09	51,40	36	0,93	0,44	0,42	0,56
2	1	-1	-1	1	-1	63,35	12,52	6	0,00	0,00	0,00	0,00
3	-1	1	-1	1	-1	618,47	29,98	21	0,32	0,20	0,21	0,24
4	1	1	-1	-1	1	443,96	43,82	31	0,22	0,36	0,35	0,30
5	-1	-1	1	1	1	1600,83	43,82	33	0,88	0,36	0,38	0,49
6	1	-1	1	-1	-1	157,26	22,57	11	0,05	0,11	0,07	0,08
7	-1	1	1	-1	-1	897,27	42,67	28	0,48	0,34	0,30	0,37
8	1	1	1	1	1	217,36	39,37	24	0,09	0,31	0,25	0,19
					<i>LI</i>	62,97	14,66%	8				
					<i>LS</i>	1625,05	100,00%	78				
					<i>S</i>	1	1	1				

Constrastes:												
C1	C2	C3	C4	C5	C12	C13	C14	C15	C23	C24	C25	C34
-0,26	0,00	0,02	-0,07	0,19	0,19	-0,03	-0,01	0,00	-0,01	-0,03	-0,26	0,19
C35	C45											
-0,07	0,02											

máximo) são responsáveis respectivamente por 60,85% e 34,26% da resposta. Uma avaliação pertinente dos resultados é atribuir à importância de se avaliar todo o método, uma vez que encontrou-se um fator significativo na plataforma cromatográfica e um na espectrométrica. É interessante mencionar, que este tipo de abordagem não se encontra na literatura para proteômica, somente há avaliações em LC ou MS de forma isoladas.^{30, 33, 74}

Figura 35. Gráfico de Pareto e Superfície de Resposta

A análise dos cromatogramas de autoMS/MS não foram adequados, conforme pode-se verificar na Figura 37.⁶³ Houve várias irregularidades e picos mal resolvidos. Pode-se afirmar que estes aspectos podem ter influenciado nas três respostas avaliadas.

Contudo, a observação e aplicação dos fatores significativos, fornecidos por este *DoE*, podem fornecer resultados melhores, uma vez que se tem informação suficiente para contornar o problema, onde aproximadamente 95% da resposta é explicada por esses dois fatores significativos. Aspectos esses, que tornam o planejamento experimental um tanto quanto instigante e surpreendente.

Figura 36. Gráfico normal dos efeitos (DoE 5)

Figura 37. Cromatogramas de autoMS/MS da melhor resposta referente ao *DoE 5* e Ensaio 1. A condição instrumental adotada encontram-se no tópico 5.3. e Tabelas 8, 9 e 10. O volume de injeção de amostra foi de 20 μL e concentração de 1 mg mL^{-1} o tempo total da análise foi de 6 h e 20 minutos.

Sendo assim, torna-se conveniente aplicar a superfície de resposta de modo a avaliar estes dois fatores significativos e encontrar as condições ótimas do método proteômico proposto.

5.7.3. Superfície de resposta aplicada ao método LC/LC-MS/MS *on-line* column switching

A literatura apresenta várias opções de modelos de superfícies de resposta, os mais usuais são: Composto Central (CC), Box-Behnken (BB) e Doehlert (Do). Cada qual possui sua vantagem, principalmente na quantidade de fatores a serem analisados e pelo número de experimentos.^{35,39} Por exemplo, caso uma proposta superfície de resposta tenha até três fatores é conveniente realizar o CC, caso seja maior o número de fatores, é aconselhável realizar o BB devido um número menor de experimentos e com a mesma eficácia que o CC.^{35,39,75}

O modelo escolhido neste trabalho foi o CC, este apresenta ótima eficiência para a avaliação de dois fatores, com um número pequeno de experimentos, além do mais, permite analisar as condições dos fatores das extremidades de forma mais pronunciada que o BB e Do. A Tabela 11 indica os experimentos realizados, trata-se de um CC com duplicatas de 3 ensaios experimentais (9 em relação ao ensaio 8 e 11 e 12 em relação ao ensaio 10), sendo as duas últimas referentes ao ponto central.^{35,36,39}

Neste experimento, optou-se em não utilizar as ponteiras preenchidas com partículas de sílica modificadas com C₁₈, TopTipTM, na etapa de dessalinização no preparo de amostra, por dois motivos: obter maiores quantidades de peptídeos, uma vez que alguns analitos podem ser perdidos nesta etapa e avaliar o processo de limpeza, assim como o de dessalinização dos analitos no sistema cromatográfico multidimensional. Por meio do cromatograma autoMS/MS representado na Figura 38,⁶⁴ verifica-se que não houve supressão do sinal e portanto pode-se eliminar a utilização da dessalinização no preparo de amostra, o que permite a diminuição no tempo de análise e muito significativamente no custo.

Verifica-se que a melhor resposta (o ensaio cinco, com parâmetros de 8% de ACN na solução tampão e pressão do gás nebulizador de 1,2) possuem valores

relevantes em termos de score (2134,05), cobertura (82,54%) e número de peptídeos redundantes (65) em relação à literatura para o mesmo tipo de amostra aplicado. Vollmer et al. (2004) apresentaram uma otimização univariada, bidimensional *off-line* (SCX/RP-MS) e obtiveram um score de 180 com a identificação de 17 peptídeos no software Spectrum Mill MS Proteomics.²¹ Mitulovic et al. (2004) realizaram a análise em um sistema *on-line* SCX/RP-MS/MS e obtiveram um score de 153 no Mascot.⁷⁶ Zhou et al. (2007) obtiveram 71,55% de cobertura da proteína de BSA em um sistema SCX-RP-MS/MS no Sequest.⁷⁷ Yuan et al. (2009), obtiveram uma cobertura de 38% em 28 h de análise de um sistema integrado com colunas iônicas, digestão *on-line* e separação em coluna hidrofóbica (C₈) e detecção por MS/MS no Sequest.⁷⁸ Fanali et al. (2012) obtiveram a identifica-

Tabela 11. Dados do experimento (referente ao composto central)

Fator	Módulo		-1,41	-1	0	1	1,41
1	SCX	% ACN no Tampão	8	10	13	16	18
2	autoMS/MS	Pressão do Gás Nebulizador (bar)	0,6	0,8	1,2	1,6	1,8

Ensaio	% ACN no Tampão	PN (bar)	Score	Cob	Npep	d Score	d Cob	d Npep	D
1	-1	-1	1646,74	71,17	58	0,55	0,39	0,47	0,47
2	1	-1	1696,62	57,99	45	0,59	0,11	0,13	0,21
3	-1	1	1848,39	78,91	57	0,73	0,55	0,45	0,57
4	1	1	1682,24	71,99	56	0,58	0,41	0,42	0,46
5	-1,41	0	2134,05	82,54	65	1,00	0,63	0,66	0,75
6	1,41	0	1455,59	66,89	53	0,37	0,30	0,34	0,34
7	0	-1,41	1062,31	52,72	40	0,00	0,00	0,00	0,00
8	0	1,41	1641,78	60,13	50	0,54	0,16	0,26	0,28
9	0	1,41	1713,78	62,93	53	0,61	0,22	0,34	0,36
10	0	0	1587,78	66,56	53	0,49	0,29	0,34	0,37
11	0	0	1650,54	64,01	53	0,55	0,24	0,33	0,35
12	0	0	1713,30	61,45	52	0,61	0,18	0,32	0,33
<i>LI</i>			1062,30	52,72	40				
<i>LS</i>			2134,10	100,00	78				
<i>S</i>			1	1	1				

ção de 19 peptídeos e uma cobertura de 88% para a proteína de citocromo C por meio de um sistema nano LC-LCQ IT-ESI-MS no Mascot, contudo a proteína em questão possui uma quantidade menor de peptídeos digeridos em relação a proteína de BSA.⁷⁹

É importante mencionar que os software de sequenciamento de proteínas, possuem seu próprio algoritmo, portanto cada programa possui um valor de score intrínseco, contudo o número de peptídeos e cobertura são relativamente aproximados, se comparados com os softwares Mascot e Sequest.

A Figura 38 e 39⁶⁴ representam os cromatogramas referente ao ensaio cinco, o qual é à maior desejabilidade, como se pode verificar na Tabela 11 (ambas as figuras são do mesmo ensaio, com modos de visualização diferente).

Figura 38. Cromatogramas de íons autoMS/MS da melhor resposta referente ao Composto Central e Ensaio 5. As condições cromatográficas e espectrais utilizadas foram as descritas no tópico 5.3. e Tabelas 8, 9, 10 e 11. O volume de injeção de amostra foi de 20 μL e concentração de 1 mg mL^{-1} . O tempo total da análise foi de 6 h e 30 min.

Nota-se que o perfil cromatográfico em até 40 min apresenta-se bem adequado, entretanto entre 45 e 60 min verificam-se picos irregulares, provavelmente devido à velocidade de aquisição dos dados para analitos com abundância, conforme relatado no item 5.3, talvez ao alterar o valor de 1 Hz para 2 Hz pode-se ter uma melhora.

Entretanto, é possível afirmar que os picos possuem resolução e intensidade de sinal adequada. Além da eficiência da separação cromatográfica multidimensional, em todos os plugues de solução salina e uma melhora significativa ao comparar com os cromatogramas da Figura 37.

Figura 39. Cromatogramas de autoMS/MS equivalente da Figura 38 sob uma visualização diferente.

Os dados foram semelhantes aos reportados por Palma et al. (2012);²⁴ Iwasaki et al. (2010);²² Xie et al. (2012)²⁷ e Yates, et al. (2009).³⁴ Em relação ao tempo de análise Marchetti, et al (2008)⁴² investigaram a capacidade de pico por cromatografia líquida multidimensional, *comprehensive off-line*, de uma mistura de BSA e mioglobina ambas digeridas, de modo que o tempo total do método foi de 28

horas. Desta forma, pode-se mencionar que este estudo possui adequabilidade em tempo de análise.

A Figura 40⁶² mostra com 95% de confiança, a significância dos fatores no gráfico de Pareto e a Superfície de Resposta modelada pelo CC. Verifica-se que há duas regiões de máxima resposta, correspondente com a quantidade de ACN no tampão de carregamento de 8% e 16% e com a Pressão do Gás Nebulizador entre 1,2 a 1,6 bar. Desta forma, pode-se confirmar que as interações hidrofóbicas dos peptídeos com a coluna SCX estão correlacionadas com as melhores respostas assim como o processo de dessolvatação que ocorre com os analitos submetidos a Pressão do Gás Nebulizador. É interessante mencionar a importância da escolha do CC neste experimento, uma vez que as condições ótimas da resposta estão na extremidade da superfície, caso fosse aplicado o BB esta visualização não seria possível.

Ao analisar o composto central é possível afirmar que a escolha do intervalo dos fatores foi acertada, pois ao caminhar na superfície de resposta para a região de máximo, correspondente aos valores de menor percentagem de ACN no tampão, há um declive para menores valores da resposta. Pois verificamos que no primeiro *DoE*, item 5.6.1, a quantidade de 5% de ACN no tampão ocasiona uma resposta inadequada para as maiores recuperações dos peptídeos. O mesmo fato ocorre ao caminhar na superfície para a outra região de máximo, o resultado dos item 5.6.2. e 5.6.3., pressupõem que realmente encontramos as regiões de máxima resposta do método proposto, em relação a análise da proteína de BSA digerida.

É possível constatar estes resultados, por meio da função matemática da superfície de resposta (Equação 9) obtida pelo programa Matlab⁸¹, esta permite a previsão da região de ótimo do modelo. Ao substituir os valores de $x = -1,4$ e $y = 0$, referentes às condições de ótimo do método, referentes à Tabela 11, tem-se o valor da desejabilidade de 0,75, valor igual ao encontrado no ensaio 5 da Tabela mencionada. É importante mencionar que a reaplicação dessas condições de ótimo instrumentais, podem ser refeitas de modo a confirmar a previsão da equação 9.

Figura 40. Gráfico de Pareto e Modelo Composto Central da Superfície de Resposta.

$$Z = 0,35 - 0,12x + 0,10y + 0,12x^2 - 0,08y^2$$

$(\pm 0,09)$ $(\pm 0,05)$ $(\pm 0,05)$ $(\pm 0,06)$ $(\pm 0,06)$

Outra informação importante a respeito da previsão da equação 9 é a Tabela 12, de Análise da Variância (ANOVA). Verifica-se que o Teste F (calculado) é superior ao teste F tabelado da Soma Quadrática (SQ) da Regressão (R), portanto o modelo quadrático esta bem ajustado e pode-se dizer que é robusto. Além disso, 93% da variação total em torno da média é explicada pela regressão do modelo, ou seja, a equação esta apta a modelar 93% dos resultados, de modo que 7% trata-se dos resíduos (e não estão sendo modelados). Entretanto o $R^2_{\text{máx}}$ indica que é possível modelar até 99% da resposta. Uma observação importante para que R tenha valor representativo é verificar se o erro puro possui valores baixos, como F tabelado é maior que o Teste F calculado, do Erro Puro (EP), o modelo esta adequado.³⁶

Ao analisar os ensaios 4 e 5 da Tabela 11 correspondentes as duas regiões de máximos da superfície de resposta, observa-se que os peptídeos: QRLRcASIQK, TcVADESHAGcEK, WVTFISLLLLFSSAYSR, AEFVEVTKLVTDLTkVHK, FPKAEFVEVTKLVTDLTk, DAIPENLPPLTADFAEDKDVcK, ccTESLVNRRPcFSALTPDETYVPK, são detectados somente na condição de 16% de ACN no tampão. Similarmente, os peptídeos: GVFR, DTHK, ATEEQLK, DTHKSEIAHRTVmENFVAFVDK, YlCDNQDTISSKLK, YNGVFQEccQAEDK, LAKEYEATLEEccAK, LcVLHEKTPVSEKVTk, ccAADDKEAcFAVEGPK, LKPDPNTLcDEFKADEKK, EccHGDLLcEADDRADLAK, QEPERNEcFLSHKDDSPDLPK são encontrados somente com a condição de 8% de ACN no tampão. O Anexo 1 indica os peptídeos encontrados nos experimentos que fazem referências as regiões de máximo do composto central.

Tabela 12. Tabela de Análise de Variância (ANOVA).

	SQ	G.L.	MQ	Teste F cal	F tab
R	0,35	4	0,09	21,81	4,12
r	0,03	7	0,00		
Total	0,38	11	0,03		
EP	0,00	3	0,00	5,31	6,59
FaJ	0,02	4	0,01		
R²	0,93	R	0,96		
R²_{máx}	0,99	R _{máx}	1,00		

Com base na literatura é possível explicar estes resultados, pois ao utilizar pouco solvente orgânico os peptídeos de maior retenção, devido às interações hidrofóbicas da coluna SCX, ficam retidos de forma irreversível na análise e são removidos para descarte no processo de limpeza da coluna SCX. De forma análoga, ao utilizar no processo de eluição muito solvente orgânico, os peptídeos de elevada solubilidade em ACN são perdidos no processo de eluição de modo que não são retidos no *trap*.^{24,27,49}

Realizamos o questionamento destas descrições, por meio de software disponível na internet,⁵¹ e não verificou correlação entre os peptídeos em suas propriedades moleculares nos quesitos polaridade e polarizabilidade. Contudo, verificou-se que o grupo dos diferentes peptídeos com a eluição de solução tampão com 5% de ACN possuem $pI < 6$, em sua maioria, (peptídeos destacados em vermelho no Anexo 1) e os eluídos com solução tampão de 16% possuem $pI > 6$, (peptídeos em verde no Anexo 1). Desta forma, estes aspectos observados estão em fase de estudo e no momento não possuímos resultados totalmente conclusivos.

Em relação ao valor ótimo de 1,2 à 1,6 bar para a Pressão do Gás Nebulizador, provavelmente esta correlacionada com a maior eficiência na dessolvatação dos peptídeos e desta forma uma quantidade maior de íons serem eficientemente transferidos à fase gasosa e consequentemente apresentam uma melhor resposta. Pode-se inferir que uma quantidade inferior não é suficiente para dessolvatar os íons de modo que alguns destes são perdidos no processo ou não são ionizados de forma adequada. Caso o valor seja excedente, pode-se dizer que o fluxo elevado de N_2 desloca os íons para fora do orifício de entrada do analisador quadrupolo. Um tema que confirma esta afirmação foi discutido na banca de defesa pelo Prof. Dr. Daniel Martins-de-Souza, o pesquisador relatou que um dos maiores problemas em proteômica *shotgun* é que alguns peptídeos gerados não são bons íons, aspecto este que impossibilita a cobertura de 100% das proteínas em proteomas, uma vez que a separação e detecção por MS tornam-se impossibilitada. Outro aspecto, mencionado pelo Prof. Dr. Álvaro José dos Santos, é a competição que existe na detecção, ou seja, o sinal de alguns íons que se encontram em abundância no MS sobrepõe os íons de menores quantidades, aspecto que afeta a sensibilidade da análise.

Desta forma, propomos uma alternativa para a melhora da resposta do método LC/LC-MS/MS *on-line column switching* deste estudo, realizando a eluição de tampão em uma primeira etapa com as quantidades de 8% e uma segunda etapa com 16% de ACN, com ajuste de tempo adequado para a análise. Deste jeito, estamos englobando as duas condições de máxima resposta no método LC/LC-MS/MS, permitindo uma cobertura superior.

Apesar da motivação em realizar este teste, o mesmo está sendo planejado para a obtenção dos resultados satisfatórios com tempo de análise adequado. Contudo, sequenciaram-se no Software Sequest as duas condições de máxima resposta obtidas, como se fossem uma única análise, ou seja, adicionaram-se os cromatogramas dos ensaios 4 e 5 (conforme especificado na Figura 20) e obteve-se o valor de score de 3816,29, uma cobertura de 92,92% e a identificação de 73 peptídeos. Valores estes, superiores aos encontrados na literatura (Figura 41). Entretanto, estes resultados são equivalentes para uma análise com tempo de 13 horas.

Nota-se na Figura 41 duas colunas relacionadas com a quantidade de peptídeos: *unique peptides* (peptídeos únicos) e *peptides* (peptídeos). Para entender a diferença destas denominações é necessário compreender o conceito de mistura de clivagens (*mix cleavage*). É importante mencionar que a digestão triptica fornece clivagens incompletas, aspecto que afeta a reprodutibilidade em análises em proteômica *shotgun*. Ou seja, uma dada sequência de aminoácidos da proteína analisada pode sofrer diferentes clivagens e desta forma fornecer vários peptídeos de uma mesma sequência, principalmente se estes contiverem elevada quantidade dos aminoácidos lisina (K) e arginina (R), pontos onde ocorre a clivagem triptica. Por exemplo, ao analisar o Anexo A, verifica-se que o peptídeo ADEKKFWGK, pode gerar ainda os peptídeos FWGK e KFWGK, conforme pode-se verificar nos dois primeiros peptídeos do ensaio 4 do mesmo anexo.

Desta forma, os “peptídeos únicos” estão relacionados com a seleção do número de peptídeos retirando a informação redundante que ocorre devido à mistura de clivagens. Já em “peptídeos” faz referência a todos os peptídeos identificados considerando a mistura de clivagens que de fato ocorre, ou seja peptídeos redundantes. É interessante mencionar que estes aspectos são um dos maiores

obstáculos em se conseguir reprodutibilidade em digestões proteolíticas, aspecto que afeta diretamente as análises em proteômica *shotgun*.^{34,80}

Figura 41. Sequenciamento dos peptídeos referente aos Ensaios 4 e 5 da Tabela 11

Thermo Proteome Discoverer 1.3.0.339

File Search Report Quantification Processing Workflow Editor Administration Tools Window Help

4_5.ms1

Proteins	Peptides	Search Input	Result Filters	Peptide Confidence	Search Summary																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
----------	----------	--------------	----------------	--------------------	----------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

É importante mencionar, as dificuldades de se obter uma cobertura de 100% das proteínas, uma conveniente descrição é reportada por Meyer, B.; Papasotiriou, G.G. e Karas, M. intitulada como “*100% protein sequence coverage: a modern form of surrealism in proteomics*”, onde os autores relatam que o valor médio das coberturas de proteínas é de 38%, além da descrição a respeito das dificuldades da obtenção de todos os peptídeos.⁸⁰

Ao analisar todo o estudo quimiométrico realizado neste trabalho, pode-se afirmar que a resposta obtida assim como a quantidade de informação adquirida do método LC/LC-MS/MS *on-line column switching* foi muito positivo, pois permitiu

verificar a melhor condição instrumental para a maior cobertura da proteína de BSA, além da possibilidade de aperfeiçoar o método com a utilização de diferentes tampões.

6. Conclusões

O planejamento e configuração da compatibilidade de todo o sistema multidimensional nos quesitos: dimensão da coluna trocadora catiônica, desenvolvimento do *trap*, composição das fases móveis; compatibilidade entre as dimensões cromatográficas; pressões adequadas ao método; sistema de injeção de amostra para condições limitadas; sistema de plugue de solução salina na eluição, sistema de limpeza nas colunas, de modo a evitar a *carryover*. Proporcionaram um excelente desenvolvimento da técnica LC/LC (*on-line column switching*).

A avaliação dos parâmetros instrumentais na plataforma autoMS/MS, relacionados ao valor *Threshold Absolute*; quantidade de íons precursores coletados; função *Active Exclusion*; tempo de transferência para o tubo de voo e dependência da aquisição de dados com a intensidade (*Precursor Acquisition Control*). Garantiram as condições de separação e detecção satisfatórias para o método autoMS/MS.

A correlação das imagens de MEV da fase estacionária da coluna SCX com os cromatogramas forneceu evidências para justificar os problemas impostos ao método, proporcionando assim alternativas para um melhor desempenho de LC/LC com ganho de capacidade de pico em trabalhos futuros.

A estratégia da aplicação de um novo *trap* para proteômica *shotgun*, com fase polimérica e retenção superior as fases tipicamente usadas de C₁₈, tornou o método robusto e proporcionou eliminação de alguns fatores no planejamento experimental, o que contribuiu com o sucesso do estudo.

A abordagem quimiométrica utilizada para avaliar cada módulo separadamente (sendo estas a primeira dimensão, a segunda dimensão e autoMS/MS) de forma a selecionar os fatores significativos e reaplicação destes em um novo planejamento experimental, serviram para avaliar todo o método LC/LC-MS/MS e permitiu resumir a poucos fatores que explicam a máxima resposta de uma das técnicas analíticas de maior complexidade da atualidade.

Sendo assim, foram avaliadas 12 variáveis e destas somente 2 foram representativas na resposta, o que permite a simplificação da otimização do método proposto, com ótimos resultados de score, cobertura e número de peptídeos

redundantes, atingindo valores de 3816,29; 92,92% e 73, respectivamente. Uma melhora significativa ao comparar com outros trabalhos que não realizaram a abordagem quimiométrica, uma vez que a maior cobertura encontrada na literatura para a proteína de BSA foi de 71,55%; ⁷⁷ score e número de peptídeos inferiores a 200 e 20, respectivamente.

Além disso, o *DoE* proporcionou a otimização da técnica em um intervalo pequeno de tempo: foram realizados seis *DoE* diferentes, cada quais aplicados entre três à quatro dias por mês. O total de tempo da otimização foi de 7 meses, considerando as interpretações dos resultados, testes pré-avaliativos e planejamento de cada etapa. Estes aspectos evidenciam a importância de se utilizar o planejamento experimental, pois projetos voltados ao desenvolvimento de instrumentação analítica exigem elevado manuseio dos equipamentos, cuja a disponibilidade na maioria das vezes são limitadas, além dos problemas técnicos que geralmente ocorrem. Pode-se mencionar que caso não houvesse esses problemas, seria possível a aplicação de proteomas reais ao método LC/LC-MS/MS.

Faço menção das possíveis limitações do modelo proposto neste trabalho, em relação à aplicação da *shotgun* proveniente de amostras reais. Talvez ocorra a necessidade de aumentar a quantidade de solvente orgânico na solução de dessalinização ou aumentar o tempo de dessalinização do método, de modo a eliminar não somente os interferentes que são provenientes do preparo de amostra, mas também da composição química intrínseca de amostras biológicas complexas, entretanto é necessário avaliar a ocorrência da perda dos peptídeos hidrofílicos (conforme discutido em 5.2.2) e a capacidade de retenção do material polimérico do *trap*. Outro fator indispensável é aumentar o número de plugues de sal e desta forma obter melhor capacidade de pico com sensibilidade adequada na detecção dos peptídeos. Em contrapartida o tempo da análise será maior. Em relação à plataforma autoMS/MS, esta pode necessitar de alguns ajustes, conforme discutido no item 5.3.

Finalmente, pode-se afirmar que por meio das interpretações dos resultados obtidos e principalmente dos estudos quimiométricos, este trabalho propõe um método analítico de excelência, com valores de score, cobertura e número de peptídeos superiores aos encontrados na literatura em trabalhos com objetivos similares. Além disso, tem-se informação suficiente, a respeito do método, para o

sucesso da aplicação de amostras biológicas complexas de diferentes proteômas, uma proposta desafiadora que será aplicada no Doutorado e de antemão obteve-se bons resultados para uma mistura complexa de seis proteínas.

7. A ideia do projeto

Eu não poderia deixar de referenciar o motivo pelo qual me levou a realizar este estudo quimiométrico. A ideia originou-se ao verificar em bancos de dados que permitem a submissão da informação (como espectros de massas, cobertura, score) a respeito de um dado proteoma de diferentes autores, como por exemplo, a plataforma PRoteomics IDentification database (PRIDE)⁸². E verifiquei que apesar de muitos autores submeterem a informação de um mesmo proteoma, havia diferenças discrepantes nos resultados. É certo que em amostras complexas este fenômeno é factível e esperado, contudo me inspirei em propor algo que pudesse contribuir de modo amenizar este problema, e a quimiometria aplicada à instrumentação analítica apresentou-se como uma ferramenta muito interessante para propor o comportamento de peptídeos em sistemas cromatográficos e espectrométricos e desta forma tentar explicar tais divergências impostas nos resultados das análises proteômicas de mesmo proteoma.

Gostaria de deixar claro, que a ideia e discussões do desenvolvimento da técnica LC/LC-MS/MS partiu do Prof. Dr. Emanuel Carrilho e as discussões a respeito da configuração multidimensional, espectrométrica do sistema e incentivo a estudar quimiometria partiu do Prof. Dr. Álvaro Jose dos Santos Neto. Desta forma, conheci o Prof. Dr. Edénir Rodrigues Pereira Filho que me propôs um ótimo conhecimento em quimiometria, além de ajudar em algumas atribuições neste trabalho. Sendo assim, restou-me a tarefa de “juntar” todas essas especialidades e desenvolver este projeto.

8. Referências

- 1 WILKINS, M. R.; SANCHEZ, J-C.; WILLIAMS, K. L.; HOCHSTRASSER, D. F. Current challenges and future applications for protein maps and post-translational vector maps in proteome projects. **Electrophoresis**, v. 17, p. 830-838, 1996.
- 2 WILKINS, M. R.; PASQUALI, C.; APPEL, R. D.; OU, K.; GOLAZ, O.; SANCHEZ, J-C.; YAN, J. X.; GOOLEY, A. A.; HUGHES, G.; SMITH-HUMPHERY, I.; WILLIAMS, K. L.; HOCHSTRASSER, D. F. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Nat. Biotechnol.**, v. 14, p. 61-65, 1996.
- 3 WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; VAN EYK, J. E.; CHUNG, M. C.; GORG, A.; HECKER, M.; HUBER, L. A.; LANGEN, H.; LINK, A. J.; PAIK, Y. K.; PATTERSON, S. D.; PENNINGTON, S. R.; RABILLOUD, T.; SIMPSON, R. J.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Guidelines for the next 10 years of proteomics. **Proteomics**, v. 6, n. 1, p. 4-8, 2006.
- 4 ZHANG, Y.; FONSLow, B. R.; SHAN, B.; BAEK, M. C.; YATES, J. R. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. **Chem. Rev.**, v. 113, n. 4, p. 2343-2394, 2013.
- 5 TYERS, M.; MANN, M. From genomics to proteomics. **Nature**, v. 422, p. 193-197, 2003.
- 6 PIMENTA, A. M. D. C. Os desafios do proteoma. **Ciência Hoje**, v. 32, n. 192, p. 16-22, 2003.
- 7 SIQUEIRA-BATISTA, R.; MENDONÇA, E. G.; GOMES, A. P.; VITORINO, R. R.; MIYADAHIRA, R.; ALVAREZ-PEREZ, C.; OLIVEIRA, M. G. A. Atualidades proteômicas na sepse. **Rev. Assoc. Med. Bras.** v. 58, n. 3, p. 376-382, 2012.
- 8 LANÇAS, F. M.; SILVA, J. C. R.; BICUDO, R. C.; NETO, M. B. A química analítica do proteoma. **Revista Analytica**, v. 6, p. 60-66, 2003.
- 9 DONATO, P.; CACCIOLA, F.; MONDELLO, L.; DUGO, P. Comprehensive chromatographic separations in proteomics. **J. Chromatogr. A**, v. 1218, n. 49, p. 8777-8790, 2011.
- 10 HYE, A.; LYNHAM, S.; THAMBISETTY, M.; CAUSEVIC, M.; CAMPBELL, J.; BYERS, H. L.; HOOPER, C.; RIJSDIJK, F.; TABRIZI, S. J.; BANNER, S.; SHAW, C. E.; FOY, C.; POPPE, M.; ARCHER, N.; HAMILTON, G.; POWELL, J.; BROWN, R. G.; SHAM, P.; WARD, M.; LOVESTONE, S. Proteome-based plasma biomarkers for Alzheimer's disease. **Brain**, v. 129, n. 11, p. 3042-3050, 2006.
- 11 HANASH, S. M.; PITTERI, S. J.; FACA, V. M. Mining the plasma proteome for cancer biomarkers. **Nature**, v. 452, n. 7187, p. 571-579, 2008.

- 12 NAGARAJ, N.; WISNIEWSKI, J. R.; GEIGER, T.; COX, J.; KIRCHER, M.; KELSO, J.; PAABO, S.; MANN, M. Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. **Mol. Syst. Biol.**, v. 7, p. 548, 2011.
- 13 LAPEK, J. D., JR.; MCGRATH, J. L.; RICKE, W. A.; FRIEDMAN, A. E. LC/LC-MS/MS of an innovative prostate human epithelial cancer (PHEC) in vitro model system. **J. Chromatogr. B**, v. 893-894, p. 34-42, 2012.
- 14 SCHRATTENHOLZ, A.; GROEBE, K. What does it need to be a biomarker? Relationships between resolution, differential quantification and statistical validation of protein surrogate biomarkers. **Electrophoresis**, v. 28, n. 12, p. 1970-1979, 2007.
- 15 ERIKISSON, J.; FENYO, D. Improving the success rate of proteome analysis by modeling protein-abundance distributions and experimental designs. **Nat. Biotechnol.**, v. 25, n. 6, p. 651-655, 2007.
- 16 KAWAMURA, T.; NOMURA, M.; TOJO, H.; FUJII, K.; HAMASAKI, H.; MIKAMI, S.; BANDO, Y.; KATO, H.; NISHIMURA, T. Proteomic analysis of laser-microdissected paraffin-embedded tissues: (1) Stage-related protein candidates upon non-metastatic lung adenocarcinoma. **J. Proteomics**, v. 73, n. 6, p. 1089-1099, 2010.
- 17 TANCA, A.; PAGNOZZI, D.; BURRAI, G. P.; POLINAS, M.; UZZAU, S.; ANTUOFERMO, E.; ADDIS, M. F. Comparability of differential proteomics data generated from paired archival fresh-frozen and formalin-fixed samples by GeLC-MS/MS and spectral counting. **J. Proteomics**, v. 77, p. 561-576, 2012.
- 18 BLONDER, J.; VEENSTRA, T. D. Clinical proteomic applications of formalin-fixed paraffin-embedded tissues. **Clin. Lab. Med.**, v. 29, n. 1, p. 101-113, 2009.
- 19 BECK, M.; SCHMIDT, A.; MALMSTROEM, J.; CLAASSEN, M.; ORI, A.; SZYMBORSKA, A.; HERZOG, F.; RINNER, O.; ELLENBERG, J.; AEBERSOLD, R. The quantitative proteome of a human cell line. **Mol. Syst. Biol.**, v. 7, p. 549, 2011.
- 20 WOLTERS, D. A.; WASHBURN, M. P.; YATES III, J. R. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. **Anal. Chem.**, v. 73, p. 5683-5690, 2001.
- 21 VOLLMER, M.; HORTH, P.; NAGELE, E. Optimization of two-dimensional off-line LC/MS separations to improve resolution of complex proteomic samples. **Anal. Chem.**, v. 76, p. 5180-5185, 2004.
- 22 IWASAKI, M.; MIWA, S.; IKEGAMI, T.; TOMITA, M.; TANAKA, N.; ISHIHAMA, Y. One-dimensional capillary liquid chromatographic separation coupled with tandem mass spectrometry unveils the Escherichia coli proteome on a microarray scale. **Anal. Chem.**, v. 82, p. 2616-2620, 2010.
- 23 SHEN, Y.; ZHAO, Q.; BERGER, S. J.; ANDERSON, G. A.; RODRIGUEZ, N.; SMITH, R. D. High-efficiency nanoscale liquid chromatography coupled on-line with mass spectrometry using nanoelectrospray ionization for proteomics. **Anal. Chem.**, v. 74, p. 4235-4249, 2002.

- 24 DI PALMA, S.; HENNRICH, M. L.; HECK, A. J.; MOHAMMED, S. Recent advances in peptide separation by multidimensional liquid chromatography for proteome analysis. **J. Proteomics**, v. 75, n. 13, p. 3791-3813, 2012.
- 25 JORGENSEN, J. W. Capillary liquid chromatography at ultrahigh pressures. **Annu. Rev. Anal. Chem.**, v. 3, p. 129-150, 2010.
- 26 KOCHER, T.; SWART, R.; MECHTLER, K. Ultra-high-pressure RPLC hyphenated to an LTQ-Orbitrap Velos reveals a linear relation between peak capacity and number of identified peptides. **Anal. Chem.**, v. 83, n. 7, p. 2699-2704, 2011.
- 27 XIE, F.; SMITH, R. D.; SHEN, Y. Advanced proteomic liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 1261, p. 78-90, 2012.
- 28 WANG, N.; XIE, C.; YOUNG, J. B.; LI, L. Off-line two-dimensional liquid chromatography with maximized sample loading to reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry for shotgun proteome analysis. **Anal. Chem.**, v. 81, p. 1049-1060, 2009.
- 29 FRANZEL, B.; WOLTERS, D. A. Advanced MudPIT as a next step toward high proteome coverage. **Proteomics**, v. 11, n. 18, p. 3651-3656, 2011.
- 30 NOVOTNA, K.; HAVLIS, J.; HAVEL, J. Optimisation of high performance liquid chromatography separation of neuroprotective peptides. Fractional experimental designs combined with artificial neural networks. **J. Chromatogr. A**, v. 1096, n. 1-2, p. 50-57, 2005.
- 31 NAGELE, E.; VOLLMER, M.; HORTH, P. Improved 2D nano-LC/MS for proteomics applications: a comparative analysis using yeast proteome. **J. Biomolecular Techniques**, v. 15, p. 134-143, 2004.
- 32 CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S. Seqüenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Quim. Nova**, v. 31, n. 3, p. 669-675, 2008.
- 33 ANDREWS, G. L.; DEAN, R. A.; HAWKRIDGE, A. M.; MUDDIMAN, D. C. Improving proteome coverage on a LTQ-Orbitrap using design of experiments. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, v. 22, n. 4, p. 773-783, 2011.
- 34 YATES, J. R.; RUSE, C. I.; NAKORCHEVSKY, A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 11, p. 49-79, 2009.
- 35 HIBBERT, D. B. Experimental design in chromatography: a tutorial review. **J. Chromatogr. B**, v. 910, p. 2-13, 2012.
- 36 BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Porto Alegre: Bookman, 2010. 401 p.

37 DEMING, S. N.; PALASOTA, J. M.; LEE, J.; SUN, D. Computer assisted optimization in high performance liquid chromatographic method development. **J. Chromatogr.**, v. 485, n. 21, p. 15-25, 1989.

38 SCHOENMAKERS, P. J.; MULHOLLAND, M. An overview of contemporary method development in liquid chromatography. **Chromatographia**, v. 25, n. 8, p. 737-748, 1988.

39 FERREIRA, S. L.; BRUNS, R. E.; DA SILVA, E. G.; DOS SANTOS, W. N.; QUINTELLA, C. M.; DAVID, J. M.; DE ANDRADE, J. B.; BREITKREITZ, M. C.; JARDIM, I. C.; NETO, B. B. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **J. Chromatogr. A**, v. 1158, n. 1-2, p. 2-14, 2007.

40 CAO, J.; COVARRUBIAS, V. M.; STRAUBINGER, R. M.; WANG, F.; DUAN, X.; YU, H.; QU, J.; BLANCO, J. A rapid, reproducible, on-the-fly orthogonal array optimization method for targeted protein quantification by LC/MS and its application for accurate and sensitive quantification of carbonyl reductases in human liver. **Anal. Chem.**, v. 82, p. 2680–2689, 2010.

41 GILAR, M.; OLIVOVA, P.; DALY, A. E.; GEBLER, J. C. Orthogonality of separation in two-dimensional liquid chromatography. **Anal. Chem.**, v. 77, n. 19, p. 6426-6434, 2005.

42 MARCHETTI, N.; FAIRCHILD, J. N.; GUIOCHON, G. Comprehensive off-line, two-dimensional liquid chromatography. application to the separation of peptide digests. **Anal. Chem.**, v. 80, p. 2756-2767, 2008.

43 MALEROD, H.; LUNDANES, E.; GREIBROKK, T. Recent advances in on-line multidimensional liquid chromatography. **Anal. Methods**, v. 2, n. 2, p. 110, 2010.

44 LINK, A. J.; ENG, J.; SCHIELTZ, D. M.; CARMACK, E.; MIZE, G. J.; MORRIS, D. R.; GARVIK, B. M.; YATES III, J. R. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. **Nat. Biotechnol.**, v. 17, p. 676-682, 1999.

45 HORVATH, K.; FAIRCHILD, J. N.; GUIOCHON, G. Detection issues in two-dimensional on-line chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 1216, n. 45, p. 7785-7792, 2009.

46 EKMAN, R.; SILBERRING, J.; WESTMAN-BRINKMALM, A. M.; KRAG, A. **Mass spectrometry: instrumentation, interpretation and applications**. New York: Wiley, 2012. 390 p.

47 DASS, C. **Fundamentals of contemporary mass spectrometry**. New York: Wiley, 2007. 585 p.

48 THERMO SCIENTIFIC. **Thermo scientific dionex ultimate 3000 series autosamplers WPS-3000PL (RS) and WPS-3000FC operating instructions (original operating instructions)**. Whaltam, 2013. 186 p.

49 AGUILAR, M-I. **HPLC of peptides and proteins methods and protocols**. Totowa: Human Press, 2004. 395 p.

50 PEAKS 7. Complete Software for Proteomics. **Expasy bovine serum albumin**. Waterloo, 2014. Disponível em: <<http://www.bioinform.com/peaks/features/whatsnew.html>> Acesso em: 16 jul. 2014.

51 CHEMAXON. **Chemicalize.org**. 2014. Disponível em: <<http://www.chemicalize.org/>> Acesso em: 16 jul. 2014.

52 MATRIX SCIENCE. **Mascot database search**/Searching uninterpreted MS/MS data. 2014. Disponível em: <http://www.matrixscience.com/help/mis_help.html>. Acesso em: 10 ago. 2013.

53 BARATTINI, V.; FREEKE, J. **Analysis of bovine serum albumin (BSA) protein digest on a Thermo Scientific accucore 150-C18, 150 Å pore diameter nanoLC column**. Whaltam, 2012. 4 p.

54 LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna HPLC/CLAE**. Campinas: Átomo, 2009. 382 p.

55 DELMOTTE, N.; LASAOSA, M.; THOLEY, A.; HEINZLEM, E.; HUBER, C. G. Two-dimensional reversed-phase ion-pair reversed-phase HPLC: an alternative approach to high-resolution peptide separation for shotgun proteome analysis. **J Proteome Res.**, v. 6, p. 4363-4373, 2007.

56 THERMO SCIENTIFIC. **Thermo scientific dionex UltiMate™ 3000 RSLCnano standard applications**. Whaltam, 2012. 67 p.

57 MAGDELDIN, S.; MORESCO, J. J.; YAMAMOTO, T.; YATES, J. R., 3RD. Off-line multidimensional liquid chromatography and auto sampling result in sample loss in LC/LC-MS/MS. **J. Proteome Res.**, v. 13, p. 3826-3837, 2014.

58 BRUKER DALTONICS. **Workflow for identification of proteins after tryptic digestion using LC-autoMS/MS**: Application example BSA*. Billerica, 2014.

59 UNIVERSAL PROTEIN RESOURCE. **Serum Albumin (ALBU_BOVIN P02769)**. 2002 - 2014. Disponível em:< <http://www.uniprot.org/>>. Acesso em: 13 ago. 2014.

60 THERMO SCIENTIFIC. **Xcalibur proteome discoverer**: user guide. Whaltam, 2009. 530 p.

61 PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, v. 33, n. 4, p. 305-325, 1946.

62 TAGUCHI, G. Performance analysis design. **Int. J. of Prod. Res.**, v. 16, n. 6, p. 521-530, 1978.

63 STATSOFT **Statistica**: (data analysis software system), Version 10. Tulsa, 2011. 1v.

64 ORIGINLAB CORPORATION. **OriginPro 8 SR0**. Northampton, 2007. 1v.

65 SNYDER, L. R.; DOLAN, J. W.; DJORDJEVIC, N. M.; HILL, D. W.; WAEGHE, T. J. Reversed-phase liquid chromatographic separation of complex samples by

optimizing temperature and gradient time I. Peak capacity limitations. **J. Chromatogr. A**, v. 857, p. 1-20, 1999.

66 SHEN, Y.; LEE, M. L. General equation for peak capacity in column chromatography. **Anal. Chem.**, v. 70, p. 3853-3856, 1998.

67 GRITTI, F.; GUIOCHON, G. Optimization of the peak capacity per unit time. **J. Chromatogr. A**, v. 1263, p. 125-140, 2012.

68 DAVIS, J. M.; STOLL, D. R.; CARR, P. W. Dependence of effective peak capacity in comprehensive two-dimensional separations on the distribution of peak capacity between the two dimensions. **Anal. Chem.**, v. 80, p. 8122-8134, 2008.

69 SOLIVEN, A.; HAIDAR AHMAD, I. A.; FILGUEIRA, M. R.; CARR, P. W. Optimization of gradient reversed phase chromatographic peak capacity for low molecular weight solutes. **J. Chromatogr. A**, v. 1273, p. 57-65, 2013.

70 DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous-optimization of several response variables. **J. Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214-219, 1980.

71 DAVIS, M. T.; BEIERLE, J.; BURES, E. T.; MCGINLEY, M. D.; MORT, J.; ROBINSON, J. H.; SPAHR, C. S.; YU, H.; LUETHY, R.; PATTERSON, S. D. Automated LC-LC-MS-MS platform using binary ion-exchange and gradient reversed-phase chromatography for improved proteomic analyses. **J. Chromatogr. B**, v. 752, p. 281-291, 2001.

72 SANTOS-NETO, A. J. Como obter maior eficiência com partículas superficialmente porosas em HPLC. **Scientia Chromatogr.**, v. 3, p. 65-87, 2011.

73 EXPASY BIOINFORMATICS RESOURCE PORTAL. **PeptideCutter**. 2014. Disponível em: < http://web.expasy.org/peptide_cutter/> Acesso em: 1 nov. 2014.

74 RANDALL, S. M.; CARDASIS, H. L.; MUDDIMAN, D. C. Factorial experimental designs elucidate significant variables affecting data acquisition on a quadrupole Orbitrap mass spectrometer. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, v. 24, n. 10, p. 1501-1512, 2013.

75 FERREIRA, S. L.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; MATOS, G. D.; DAVID, J. M.; BRANDAO, G. C.; DA SILVA, E. G.; PORTUGAL, L. A.; DOS REIS, P. S.; SOUZA, A. S.; DOS SANTOS, W. N. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. **Anal. Chim. Acta**, v. 597, n. 2, p. 179-186, 2007.

76 MITULOVIC, G.; STINGL, C.; SMOLUCH, M.; SWART, R.; CHERVET, J. P.; STEINMACHER, I.; GERNER, C.; MECHTLER, K. Automated, on-line two-dimensional nano liquid chromatography tandem mass spectrometry for rapid analysis of complex protein digests. **Proteomics**, v. 4, n. 9, p. 2545-2557, 2004.

77 ZHOU, H.; DAI, J.; SHENG, Q. H.; LI, R. X.; SHIEH, C. H.; GUTTMAN, A.; ZENG, R. A fully automated 2-D LC-MS method utilizing online continuous pH and RP gradients for global proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 28, n. 23, p. 4311-4319, 2007.

78 YUAN, H.; ZHANG, L.; HOU, C.; ZHU, G.; TAO, D.; LIANG, Z.; ZHANG, Y. Integrated platform for proteome analysis with combination of protein and peptide separation via online digestion. **Anal. Chem.**, v. 81, p. 8708–8714, 2009.

79 FANALI, C.; D'ORAZIO, G.; FANALI, S. Nano-liquid chromatography and capillary electrochromatography hyphenated with mass spectrometry for tryptic digest protein analysis: a comparison. **Electrophoresis**, v. 33, n. 16, p. 2553-2560, 2012.

80 MEYER, B.; PAPASOTIRIOU, D. G.; KARAS, M. 100% protein sequence coverage: a modern form of surrealism in proteomics. **Amino Acids**, v. 41, n. 2, p. 291-310, 2011.

81 MATHWORKS. **MATLAB**, Version R2011a. MathWorks, 2011. 1v.

82 THE EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE. Proteomics identification database (PRIDE). European Molecular Biology Laboratory. 2013. Disponível em: < <http://www.ebi.ac.uk/pride/archive/>>. Acesso em: 13 ago. 2013.

ANEXOS

Anexo 1. Peptídeos identificados referentes às duas regiões de máxima resposta do composto central.

Ensaio 4		Ensaio 5	
Peptídeos	MH+ Da	Peptídeos	MH+ Da
		GVFR	479,4639
		DTHK	499,3449
FWGK	537,5221	FWGK	537,5595
KFWGK	665,8188	KFWGK	665,7747
		AWSVAR	689,3721
cASIQK	705,8858		
LVTDLTK	789,7598	LVTDLTK	789,7886
		ATEEQLK	817,9660
LSQKFPK	847,9865	LSQKFPK	847,8933
		LcVLHEK	899,0376
AEFVEVTK	922,8448	AEFVEVTK	922,4977
YLYEIR	928,0741	YLYEIR	927,3725
ALKAWSVAR	1002,1986	ALKAWSVAR	1002,1880
		LVVSTQTALA	1003,2045
QTALVELLK	1015,2394	QTALVELLK	1015,2336
QNcDQFEK	1067,6723	QNcDQFEK	1067,8232
YLYEIARR	1084,1762	YLYEIARR	1084,2239
ADEKKFWGK	1108,9405	ADEKKFWGK	1108,5733
KQTALVELLK	1143,3956	KQTALVELLK	1143,3840
LVNELTEFAK	1164,3270	LVNELTEFAK	1164,2535
		DTHKSEIAHR	1193,6110
FKDLGEEHFK	1249,0889	FKDLGEEHFK	1250,3811
QRLRcASIQK	1261,9081		
HPEYAVSVLLR	1284,3970	HPEYAVSVLLR	1284,5114
FPKAEFVEVTK	1295,3803	FPKAEFVEVTK	1295,5093
HLVDEPQNLIK	1306,4776	HLVDEPQNLIK	1306,5049
		TVmENFVAFVDK	1414,8370
SLHTLFGDELcK	1420,6629	SLHTLFGDELcK	1420,1479
RHPEYAVSVLLR	1440,6834	RHPEYAVSVLLR	1440,8705
LRcASIQKFGER	1467,3670	LRcASIQKFGER	1467,2809
TcVADESHAGcEK	1467,3215		
LGEYGFQNALIVR	1481,7496	LGEYGFQNALIVR	1480,5914
QTALVELLKHKPK	1505,8431	QTALVELLKHKPK	1506,3412
LKEccDKPLLEK	1533,9475	LKEccDKPLLEK	1533,7789
LKHLVDEPQNLIK	1547,8169	LKHLVDEPQNLIK	1547,8072
DAFLGSFLYEYSR	1568,7803	DAFLGSFLYEYSR	1568,4839
LKPDPNTLcDEFK	1577,4540	LKPDPNTLcDEFK	1577,7217
KVPQVSTPTLVEVSR	1640,9846	KVPQVSTPTLVEVSR	1640,9033

		YIcDNQDTISSKLK	1685,3587
AEFVEVTKLVTDLTk	1693,9653	AEFVEVTKLVTDLTk	1693,9087
DAFLGSFLYEYSRR	1724,8678	DAFLGSFLYEYSRR	1724,8601
mPcTEDYLSLILNR	1741,6803	mPcTEDYLSLILNR	1741,7948
		YNGVFQEccQAEDK	1748,5587
LSQKFPKAEFVEVTK	1751,8517	LSQKFPKAEFVEVTK	1752,0529
DDPHAcYSTVFDKk	1796,3086	DDPHAcYSTVFDKk	1797,0060
		LAKEYEATLEEccAK	1816,0424
		LcVLHEKTPVSEKVTk	1869,2338
RPcFSALTPDETYVPK	1881,9514	RPcFSALTPDETYVPK	1882,2271
HPYFYAPELLYYANK	1889,9575	HPYFYAPELLYYANK	1890,0593
LFTFHADicTLPDTEK	1909,1867	LFTFHADicTLPDTEK	1908,8522
		ccAADDKEAcFAVEGPK	1928,9598
SLHTLFGDELcKVASLR	1947,0011	SLHTLFGDELcKVASLR	1946,6107
WVTFISLLLLFSSAYSr	2003,1652		
LKPDPNTLcDEFKADEK	2020,9804	LKPDPNTLcDEFKADEK	2021,2807
VASLRETYGDmADccEK	2020,9945	VASLRETYGDmADccEK	2022,7029
RHPYFYAPELLYYANK	2046,3076	RHPYFYAPELLYYANK	2046,3466
AEFVEVTKLVTDLTkVHK	2055,8313		
		YTRKVPQVSTPTLVEVSR	2061,3957
FPKAEFVEVTKLVTDLTk	2065,1675		
		LKPDPNTLcDEFKADEKk	2149,1686
		EccHGDLLcEADDRADLAK	2249,5191
LFTFHADicTLPDTEKQIK	2277,6982	LFTFHADicTLPDTEKQIK	2277,6927
NYQEAKDAFLGSFLYEYSR	2302,4883	NYQEAKDAFLGSFLYEYSR	2302,3099
HLVDEPQNLIKQNcDQFEK	2355,7470	HLVDEPQNLIKQNcDQFEK	2356,0915
DAIPENLPPLTADFAEDKDVCk	2459,2225		
YNGVFQEccQAEDKGAcLLPK	2488,8210	YNGVFQEccQAEDKGAcLLPK	2488,8504
GLVLIAFSQYLQQcPFDEHVK	2493,5901	GLVLIAFSQYLQQcPFDEHVK	2493,9596
AFDEKLFTFHADicTLPDTEK	2499,7644	AFDEKLFTFHADicTLPDTEK	2499,7622
QNcDQFEKLGEYGFQNALIVR	2530,8427	QNcDQFEKLGEYGFQNALIVR	2530,6996
		QEPERNEcFLSHKDDSPDLPK	2542,4597
VHKEccHGDLLcEADDRADLAK	2613,5742	VHKEccHGDLLcEADDRADLAK	2613,9431
AFDEKLFTFHADicTLPDTEKQIK	2869,0805	AFDEKLFTFHADicTLPDTEKQIK	2869,2125
ccTESLVNRRPcFSALTPDETYVPK	3001,9956		

Os aminoácidos com letra minúscula indicam as modificações químicas que ocorreram nos peptídeos: (c) alquilação e (m) oxidação.

Anexo 2. Algunos espectros de autoMS/MS provenientes do Software SEQUEST.

Extracted from: D:\Documents and Settings\User - IQSC\My Documents\PI\24-09-14-CC_SEQUEST\5_CC\5_CC_Salt TOFMS, CID, z=+2, Mono m/z=572.20947 Da, MH+=1143.41167 Da, Match Tol.=0.8 Da

Extracted from: D:\Documents and Settings\User - IQSC\My Documents\PI\24-09-14-CC_SEQUEST\5_CC\5_CC_Salt TOFMS, CID, z=+2, Mono m/z=508.12042 Da, MH+=1015.23357 Da, Match Tol.=0.8 Da

Extracted from: D:\Documents and Settings\User - IQSC\My Documents\PI\24-09-14-CC_SEQUEST\5_CC\5_CC_Amc TOFMS, CID, z=+3, Mono m/z=381.78787 Da, MH+=1143.34906 Da, Match Tol.=0.8 Da

Extracted from: D:\Documents and Settings\User - IQSC\My Documents\PI24-09-14-CC_SEQUEST4_CC14_CC_Am
TOFMS, CID, z=+2, Mono m/z=461.94702 Da, MH+=922.88677 Da, Match Tol.=0.8 Da

Extracted from: D:\Documents and Settings\User - IQSC\My Documents\PI24-09-14-CC_SEQUEST4_CC14_CC_Salt
TOFMS, CID, z=+3, Mono m/z=630.67902 Da, MH+=1890.02250 Da, Match Tol.=0.8 Da

Extracted from: D:\Documents and Settings\User - IQSC\My Documents\PI24-09-14-CC_SEQUEST5_CC15_CC_Sa
TOFMS, CID, z=+3, Mono m/z=581.26978 Da, MH+=1741.79477 Da, Match Tol.=0.8 Da

Anexo 3. Informações técnicas do método LC/LC-MS/MS

Compartimento	Soluções		
Lavagem da vedação traseira	90% de H ₂ O e 10% ACN		
Solução do Injetor	80% H ₂ O e 20% Metanol		
Gradiente da coluna capilar (A)	100% H ₂ O e 0,1% FA		
Gradiente da coluna capilar (B)	100% ACN e 0,1% FA		
Dessalinização (<i>trap</i>)	98% de H ₂ O; 2% ACN e 0,02% de TFA		
Carregamento (coluna SCX)	Tampão fosfato 15mM com 8% ou 20% de ACN		
Lavagem da coluna SCX (A)	3,5 M de Cloreto de Sódio e 2% ACN		
Lavagem da coluna SCX (B)	95% H ₂ O e 5% ACN		
Lavagem das bombas e nano vipers do método LC/LC-MS/MS (após o uso)	100% H ₂ O		

Bombas (Figura 8)			
Carregamento (A)	Vazão ($\mu\text{L min}^{-1}$)	Solução	Pressão (bar)
Coluna SCX acoplado ao <i>trap</i>	125	Tampão com 8% ACN	165
Dessalinização (B)			
<i>Trap</i>	150	2% ACN; 0,05% TFA	145
Capilar e Nano (C)			
Coluna hidrofóbica capilar	8	10% ACN; 0,1 FA	386
Coluna hidrofóbica capilar acoplada ao <i>trap</i>	8	10% ACN; 0,1 FA	417