



## Proposta de um modelo de simulação de análises de espectrometria de massa para aulas práticas de Bioquímica no ensino superior

### *Proposal for a mass spectrometry analysis simulation model for practical Biochemistry classes in higher education*

*Eduardo Fernandes Barbosa*

*Universidade Federal do Oeste da Bahia*

*E-mail: [barbosaeduardofernandes@gmail.com](mailto:barbosaeduardofernandes@gmail.com)*

*Fomento: Universidade Federal do Oeste da Bahia*

### Resumo

A espectrometria de massa representa uma ferramenta de grande importância na elucidação de vários aspectos da bioquímica moderna. A presente proposta objetiva possibilitar a qualquer estudante de graduação um contato com essa técnica, por meio de simulações em aulas práticas. O baixo custo envolvido e a execução simples viabilizam e facilitam sua aplicação. O estudante pode compreender os princípios básicos da técnica de espectrometria de massa e se capacitar à interpretação de dados obtidos por meio dessa metodologia. Possibilita-se ainda ao estudante o contato com ferramentas modernas de busca em bancos de dados disponíveis na *internet*, tanto para investigações de similaridade estrutural com os dados obtidos na simulação, quanto na elucidação de possíveis estruturas secundárias nas biomoléculas. Após a aplicação dessa proposta espera-se que o estudante possa compreender melhor e mais criticamente os dados oriundos dessas técnicas avançadas de caracterização que são amplamente utilizadas nas ciências bioquímicas e moleculares.

**Palavras-chave:** Espectrometria de massa; Simulação; Ensino de Bioquímica.

### Abstract

Mass spectrometry is a very important tool to elucidate many aspects of modern biochemistry. This proposal aims to enable that any graduate student get an initial contact with this technique through simulations in practical classes. Low cost and simple implementation enable and facilitate its application. The student can understand the basic principles of mass spectrometry and enable data interpretation obtained through this methodology. This simulation can provide to students an initial contact with modern research tools on Internet databases for structural similarity, as well as the elucidation of possible secondary structures in biomolecules. After application of this proposal it is expected that students can understand better and more critically the data from these advanced characterization techniques largely used in biochemical and molecular sciences.

**Keywords:** Mass Spectrometry; Simulation; Biochemistry Teaching.

## Ficha da atividade desenvolvida

**Título:** Proposta de um modelo de simulação de análises de espectrometria de massa para aulas práticas de Bioquímica no ensino superior.

**Público alvo:** Docentes e discentes do ensino superior, envolvidos no ensino e estudo de disciplinas relacionadas à Bioquímica e Biologia Molecular.

**Disciplinas relacionadas:** Bioquímica Básica, Bioquímica Clínica, Química de Proteínas, Química Instrumental, Química Analítica, Química Orgânica, Biologia Molecular, Toxicologia e Farmacologia.

### Objetivos educacionais:

- ✓ Compreender os componentes subatômicos que contribuem para a massa de um átomo;
- ✓ Familiarizar com os princípios da espectrometria de massa;
- ✓ Compreender e interpretar dados adquiridos por meio da técnica espectrometria de massa;
- ✓ Conduzir o estudante ao contato inicial com as ferramentas de bioinformática: busca em bancos de dados de similaridade de sequências e de estruturação secundária de biomoléculas;
- ✓ Contextualizar o estudante com situações que envolvem procedimentos bioquímicos comuns em análises de cunho clínico e de pesquisa, correlacionando inclusive com casos e quadros clínicos;
- ✓ Trabalhar em equipes e dividir tarefas.

**Justificativa de uso:** A viabilidade dessa proposta relaciona-se ao seu baixo custo, execução simples, incentivo ao trabalho em equipe para aquisição de dados, com fácil envolvimento dos discentes. O estudante pode ter um contato inicial e se familiarizar com técnicas que estão na fronteira do conhecimento científico, mesmo enquanto se gradua em uma instituição que ainda não possui esse tipo de equipamento de alto custo em sua estrutura. O estudante pode compreender os princípios básicos da técnica de espectrometria de massa e se capacitar à interpretação dos dados obtidos por meio dessa técnica. Outro ponto é o contato do estudante com ferramentas modernas de busca de bancos de dados na rede mundial de computadores, em busca da verificação da similaridade com os dados obtidos na simulação, assim como na elucidação de estruturação secundária de biomoléculas. Após a aplicação dessa proposta de simulação o estudante pode facilmente se tornar apto e capacitado a compreender o manuseio de um espectrômetro de massa e interpretar mais criticamente resultados (espectros).

### Conteúdos trabalhados:

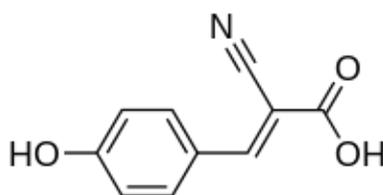
- ✓ Massa atômica;
- ✓ Ligações químicas;
- ✓ Constituição elementar e estrutural das biomoléculas;
- ✓ Espectrometria de massa e sequenciamento de proteínas;
- ✓ Bioinformática: busca em bancos de dados pela *internet* e uso de *softwares* disponíveis *on-line*.



## 1 Introdução

A espectrometria de massa pode ser definida como uma técnica analítica de determinação da massa molecular de uma grande diversidade de compostos. É reconhecida por apresentar alta precisão e sensibilidade. Atualmente, essa técnica tem sido utilizada nas mais diversas áreas da pesquisa científica, dentre elas: medicina diagnóstica, toxicologia, bioquímica clínica, proteômica (e demais “ômicas”), toxilogia e desenvolvimento de novos fármacos. Essa técnica se baseia na ionização dos compostos, que podem receber um ou mais prótons, seguindo com a análise desses íons. Na análise dos íons, eles são submetidos a campos eletromagnéticos, que podem causar a aceleração ou aprisionamento dos mesmos, dependendo do tipo de equipamento utilizado [1-3].

A composição básica de um espectrômetro de massa inclui: uma parte responsável pela ionização das moléculas; um sistema analisador desses íons e um detector sendo que ao conjunto é acoplado a um sistema computacional responsável por controlar os ajustes do equipamento durante a análise, e armazenar os dados adquiridos para posterior análise. Os tipos de ionização mais utilizados em estudos bioquímicos são: ionização do tipo MALDI (do inglês: *Matrix-assisted laser desorption/ionization*), no qual a ionização e dessorção da amostra são mediadas pela energia fornecida por disparos de um feixe de laser, incidindo sobre a amostra misturada a uma determinada matriz [4]. A matriz é um composto com caráter ácido, cujo principal papel é fornecer um ou mais prótons às moléculas constituintes da amostra. Uma das matrizes mais utilizadas na ionização a *laser* é o ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico, cuja estrutura está apresentada na Figura 1.



**Figura 1.** Esquema molecular da estrutura do ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico.

Outra forma de ionização branda, amplamente utilizada para a análise de biomoléculas é aquela conhecida como “*Electron spray*” (ESI, do inglês *Electron Spray Ionization*), na qual a amostra em solução é finamente borrifada ao passar por um tubo capilar, sendo então submetida a uma alta voltagem, para obtenção de um aerossol. As



microgotas sofrem um processo de implosão coulombica e/ou evaporação do solvente, resultando normalmente em estados multicarregados [5].

A outra porção que constitui o espectrômetro de massa refere-se ao sistema analisador. O analisador por tempo de voo (TOF, do inglês “*time of flight*”) submete as partículas ionizadas a um campo eletromagnético de carga oposta, causando a sua aceleração no interior de um tubo com pressão reduzida. A velocidade adquirida pelas moléculas é relativa à sua massa molecular e ao número de cargas adquiridas. Essa razão é identificada como  $m/z$  ( $m$  = refere-se à massa e  $z$  = refere-se à carga).

Existem diversos outros tipos de analisadores de massas, tais como, quadrupolos, “*ion-traps*” (tridimensionais e lineares), “*Fourier-transform ion cyclotron resonance*” (FT-ICR), “*orbitrap*”, entre outros, que já são comercialmente disponíveis, sendo que cada um apresenta aspectos positivos e negativos, que devem ser levados em consideração de acordo com as características da amostra e objetivos da análise [1]. Sistemas híbridos, apresentando analisadores do tipo TOF em combinações sequenciais com os demais podem resultar na obtenção de resoluções expressivamente elevadas [6, 7].

Considerando a importância didática dessa temática, a proposta de simulação de experimentos de espectrometria de massa para aulas práticas apresenta como objetivos:

- Introduzir aos alunos a técnica de espectrometria de massa, seus princípios físicos e químicos e aspectos básicos;
- Propiciar aos alunos maior vivência com a constituição elementar das biomoléculas;
- Evidenciar a contribuição dos prótons e nêutrons de cada átomo na massa total da molécula;
- Promover um primeiro contato dos alunos com espectros de massa referentes aos íons íntegros e alguns de seus fragmentos;
- Introduzir aos alunos os principais aspectos referentes à interpretação de espectros de massa e a elucidação da estrutura primária de moléculas por meio da espectrometria de massa;
- Conduzir o estudante ao contato inicial com as ferramentas de bioinformática: bancos de dados de similaridade e de estruturação secundária de biomoléculas;
- Contextualizar o estudante com situações que envolvem procedimentos bioquímicos comuns em análises de cunho clínico e de pesquisa, correlacionando inclusive com casos e quadros clínicos.



## 2 Procedimentos e Recursos

### 2.1 Descrição dos materiais

- ✓ Bolas de isopor de tamanho único (35 mm)
- ✓ Alfinetes de tamanho único
- ✓ Palitos roliços de madeira (6,5 cm)
- ✓ Balança analítica

#### 2.1.1 Descrição dos procedimentos

O tempo estimado para a realização completa de cada aula compreende entre 3 e 4 horas/aula, a depender do número total de estudantes. Em uma turma composta por 40 alunos, sugere-se, por exemplo, dividir a turma em duas partes de 20 alunos para a execução da simulação. Em cada turma de 20 alunos, sugere-se a divisão em 4 grupos de 5 estudantes, tanto para um melhor aproveitamento da aula, quanto para otimizar a dinâmica de aquisição de dados frente a um número limitado de balanças analíticas, por exemplo.

Em um primeiro momento, será realizada uma investigação preliminar (um possível "teste de qualidade" dos materiais utilizados) sobre a homogeneidade de massa dos materiais propostos para a simulação (bolas de isopor, alfinetes e palitos de madeira). O Quadro 1, apresentado adiante (Desenvolvimento da atividade), representa o roteiro prático da Aula Prática número 00: Pré-preparo dos materiais e validação da sua aplicação no modelo simulação proposto.

Em um segundo momento, para a montagem de modelos referentes às moléculas de aminoácidos (Aula prática 01, Quadro 2), serão utilizadas bolas de isopor para simular a delimitação da região do espaço atômico no qual estão contidas as partículas subatômicas que contém massa (prótons e nêutrons). A massa de cada próton e de cada nêutron será representada por um alfinete fincado na bola de isopor. As ligações químicas serão representadas por palitos de madeira. A aquisição dos dados que irão compor o espectro de massa (que representam os resultados da aula prática) serão obtidos por meio da pesagem dos modelos prontos, utilizando a balança analítica.

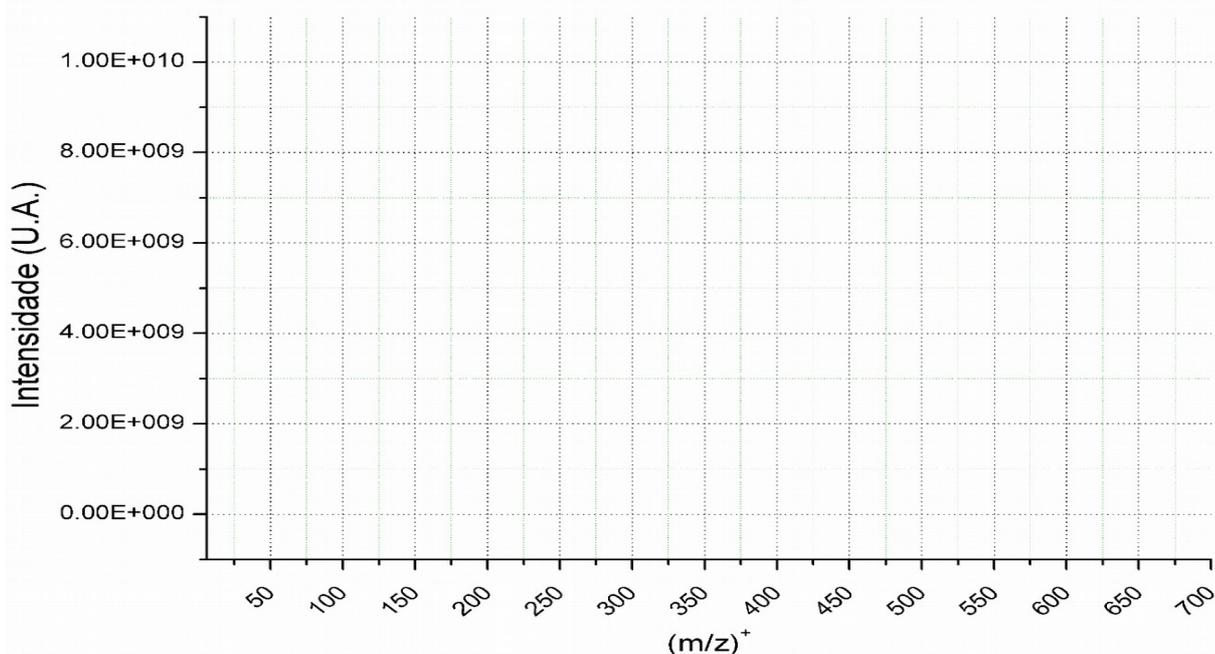
Antes de se montar e pesar os modelos, deve se colocar na balança zerada todas as bolas de isopor e todos os palitos que serão necessários para montar o modelo em questão, e zerar ou tarar a balança. Nesse momento, o docente deve exaltar aos estudantes que: *i)* toda a massa da molécula é referente à soma da massa dos prótons e



nêutrons presentes nos átomos (representado pelos alfinetes); *ii*) a contribuição das massas das ligações químicas (constituída por interações eletrônicas) é desprezível para a massa total dos átomos e moléculas. As massas das bolas de isopor, dos palitos e dos alfinetes serão medidas em balança analítica.

Em um terceiro momento (Aula 02, Quadro 3), por se tratar da montagem de modelos referentes a estrutura de sequências polipeptídicas, as quais são moléculas maiores, os alfinetes, representando prótons e nêutrons, serão separados em sacos ou envelopes pequenos.

Uma vez montado os modelos moleculares propostos, segue-se com a mensuração da massa, em balança analítica, dos modelos que representam os compostos ionizados íntegros (parentais) e dos íons resultantes de possíveis fragmentações ou quebras das ligações químicas. O aluno deve tomar nota de cada valor, e utilizá-los na construção do gráfico referente ao espectro de massa daquela molécula em questão, assinalando um pico no eixo  $m/z$  para cada valor de massa obtido. O modelo do gráfico de *intensidade versus  $m/z$*  é apresentado na Figura 2. Atente-se em relação ao parâmetro **Intensidade Relativa** referente a cada pico. Esse parâmetro relaciona-se e ilustra a propensão de cada molécula de romper suas ligações em pontos específicos, formando alguns fragmentos de maneira mais abundante, sendo posteriormente detectados de maneira mais intensa.



**Figura 2.** Modelo de gráfico de intensidade *versus*  $m/z$  (razão massa/carga) para construção do espectro de massa.



Após a elaboração do gráfico referente ao espectro de massa do composto, o aluno deverá interpretar as relações entre os picos assinalados, com o objetivo final de elucidação da estrutura proposta para a aula. O espectro de massa obtido e a sua interpretação comporão o **Relatório de Aula Prática**, cujo modelo segue apresentado na forma de anexo, no Anexo A.

### 3 Desenvolvimento da Atividade

Serão apresentados os desenvolvimentos de três aulas práticas de simulação de espectrometria de massa nessa presente proposta. A primeira aula a ser desenvolvida refere-se a uma investigação preliminar (um possível "teste de qualidade" dos materiais utilizados) sobre a homogeneidade de massa dos materiais propostos para a simulação. O Quadro 1, apresentado a seguir, representa o roteiro prático da Aula Prática número 00: Pré-preparo dos materiais e validação da sua aplicação no modelo simulação proposto.

**Quadro 1.** Roteiro proposto de aula prática número 00, intitulada "Pré-preparo dos materiais e validação da sua aplicação no modelo simulação proposto".

<b>Aula prática n. 00) Pré-preparo dos materiais e validação da sua aplicação no modelo simulação proposto</b>
<b>Objetivo:</b> Verificar se o material proposto para a modelagem e simulação apresenta variabilidade de massa compatível com o objetivo da simulação proposta.
<b>Tutorial de preparo da aula prática:</b> Pesar, em balança analítica, 50 exemplares de cada material que será utilizado na construção dos modelos (bolas de isopor, alfinetes e palitos). Anotar o valor de cada item e ao final calcular a massa média e o desvio-padrão de cada componente.

As planilhas para coleta e notação dos dados referentes a aula prática estão disponíveis no Anexo B. Sugere-se que cada grupo subdivida as medidas de aquisição de dados igualmente entre seus membros. Esta primeira parte da simulação tem como objetivos principais: *i)* propiciar ao estudante uma noção de coleta metódica/metodológica de dados em laboratório; *ii)* treinar o estudante na aquisição correta das medidas de massas em balança analítica; *iii)* introduzir aos estudantes noções de ferramentas e tratamentos estatísticos básicos; *iv)* fornecer noções de amostragens. Recomenda-se o uso das balanças analíticas (que apresentam a resolução de quatro casas decimais) nessa proposta de simulação para que o aluno possa perceber a sensibilidade alcançada por meio desse equipamento de pesquisa científica.

Balanças semi-analíticas (que apresentam a resolução de duas casas decimais) ou balanças não analíticas não são indicadas para a execução dessa proposta porque sua



resolução é menor do que o desvio da massa média dos alfinetes. Caso a faculdade ou universidade não possua balança analítica em seus laboratórios, sugere-se a utilização de materiais de maior massa que o alfinete, como pregos de ferro, por exemplo, os quais os valores médios de massa unitária são maiores que os erros de medida referentes à resolução do equipamento menos sensível.

A seguir representamos o Quadro 2, o qual representa o roteiro prático da Aula Prática número 01: Análise da estrutura de aminoácidos.

**Quadro 2.** Roteiro proposto da aula prática número 01, intitulada “Análise da estrutura de aminoácidos”.

<b>Aula prática número 01: Análise da estrutura de aminoácidos</b>
<p><b>Proposta:</b> A presente aula tem como proposta de simulação a análise do espectro de massa de uma amostra resultante da digestão ácida completa de um peptídeo com massa 260 Da. A digestão foi realizada com o uso de uma solução concentrada de HCl P.A., em uma atmosfera inerte de Neônio.</p>
<p><b>Objetivos:</b> Elucidar quais são os aminoácidos que constituem a cadeia polipeptídica. Sabe-se que na proteína nativa a sequência de resíduos na cadeia polipeptídica está organizada em ordem crescente de massa. A trinca de aminoácidos é uma unidade que se repete <math>n</math> vezes na proteína nativa. É possível prever se a cadeia com 20 repetições dessa trinca tem a propensão em se organizar em nível de estrutura secundária em forma de alfa hélice ou folha beta? É possível determinar a qual proteína pertence a sequência encontrada? Caso sim, descreva quais as principais características dessa proteína e cite um caso clínico envolvendo deficiência na produção de tal macromolécula.</p>
<p><b>Tutorial de preparo da aula prática:</b></p> <p><b>OBS:</b> cada ligação química simples será representada por um palito de madeira, as duplas por dois e as triplas por três.</p> <p><input type="checkbox"/> Inicialmente separe 43 bolas de isopor. Adicione 1 alfinete em 20 bolas. Em seguida, separe 10 bolas, e adicione em cada uma 12 alfinetes. Separe 7 bolas e coloque 16 alfinetes em cada uma. Por fim, separe 3 bolas e adicione 14 alfinetes em cada uma.</p> <p>Montagem (<b>OBS: siga rigorosamente cada etapa</b>):</p> <p><b>Pico 1</b> (Intensidade relativa de <math>3 \times 10^9</math> U.A.):</p> <p>Materiais necessários:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1) Número de átomos (bolas de isopor): 11</li><li>2) Número de ligações químicas (palitos de madeira): 11</li><li>3) Número de prótons e nêutrons (alfinetes): 76</li></ol> <p><input type="checkbox"/> Pese em balança analítica a massa de cada grupo de materiais que serão utilizados em cada pico e anote, para serem descontados posteriormente.</p> <p>Sequência de ligações com o palito de madeira: 1) <i>Grupo funcional 1</i>: ligue três átomos contendo um alfinete a um átomo contendo 16 alfinetes, por ligações simples.</p> <p>2) <i>Grupo funcional 2</i>: Ligue um átomo contendo 12 alfinetes a um átomo contendo 16 alfinetes por ligação dupla; e por ligação simples a um átomo contendo 16 alfinetes ligado a um átomo contendo um alfinete por ligação simples.</p> <p>3) <i>Cadeia lateral (R)</i>: um átomo contendo um alfinete.</p> <p>4) <i>Ligações ao carbono alfa</i>: Ligue um átomo contendo um alfinete, e os grupos resultantes das etapas 1, 2 e 3, por meio de ligações simples.</p> <p>Pese a estrutura resultante em balança analítica, anote o resultado e posteriormente represente o pico com a intensidade sugerida no gráfico-modelo para elaboração do espectro de massa.</p> <p><b>Pico 2</b> (Intensidade relativa de <math>5 \times 10^9</math> U.A.):</p> <p>Materiais necessários:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1) Número de átomos (bolas de isopor): 14</li><li>2) Número de ligações químicas (palitos de madeira): 14</li><li>3) Número de prótons e nêutrons (alfinetes): 90</li></ol> <p><input type="checkbox"/> Pese em balança analítica a massa de todos os materiais que serão utilizados no pico e anote.</p>



Sequência de ligações com o palito de madeira:

1) *Grupo funcional 1*: ligue três átomos contendo um alfinete a um átomo contendo 16 alfinetes, por ligações simples.

2) *Grupo funcional 2*: Ligue um átomo contendo 12 alfinetes a um átomo contendo 16 alfinetes por ligação dupla; e por ligação simples a um átomo contendo 16 alfinetes ligado a um átomo contendo um alfinete por ligação simples.

3) *Cadeia lateral (R)*: três átomos contendo um alfinete ligados a um átomo contendo 12 alfinetes.

4) *Ligações ao carbono alfa*: Ligue um átomo contendo um alfinete, e os grupos resultantes das etapas 1, 2 e 3, por meio de ligações simples.

Pese a estrutura resultante em balança analítica, anote o resultado e posteriormente represente o pico com a intensidade sugerida no gráfico-modelo para elaboração do espectro de massa.

**Pico 3** (Intensidade relativa de  $9 \times 10^9$  U.A.):

Materiais necessários:

1) Número de átomos (bolas de isopor): 18

2) Número de ligações químicas (palitos de madeira): 18

3) Número de prótons e nêutrons (alfinetes): 131

Pese em balança analítica a massa de todos os materiais que serão utilizados no pico e anote.

Sequência de ligações com o palito de madeira:

1) *Grupo funcional 1*: ligue 2 átomos contendo um alfinete a um átomo contendo 16 alfinetes, por ligações simples.

2) *Grupo funcional 2*: Ligue um átomo contendo 12 alfinetes a um átomo contendo 16 alfinetes por ligação dupla; e por ligação simples a um átomo contendo 16 alfinetes ligado a um átomo contendo um alfinete por ligação simples.

3) *Cadeia lateral (R)*: uma cadeia de três átomos contendo 12 alfinetes unidos por ligações simples entre si. Ligue ao átomo do meio, por ligação simples: a) um grupamento contendo um átomo com 16 alfinetes ligado por ligação simples a um átomo contendo um alfinete; b) um átomo contendo um alfinete. Ao final da cadeia adicione dois átomos contendo um alfinete aos átomos das extremidades.

4) *Ligações ao carbono alfa*: Ligue um átomo contendo um alfinete, e os grupos resultantes das etapas 2 e 3, por meio de ligações simples. Por fim, ligue o átomo da extremidade da cadeia lateral ao átomo contendo 14 alfinetes, fechando um anel de cinco membros.

Pese cada estrutura resultante em balança analítica, anote o resultado e posteriormente represente o pico com a intensidade sugerida no gráfico-modelo para elaboração do espectro de massa.

**OBS:** Não esqueça de converter o valor da massa obtida (em gramas) para Daltons, usando a relação: massa média dos alfinetes = 1 Da

Nessa aula prática o estudante, ao manipular os materiais e realizar a montagem dos modelos, é induzido a um contato direto com as subpartículas atômicas responsáveis pela massa de cada elemento; revisa sobre os tipos de ligações químicas presentes nas biomoléculas e é instigado a deduzir os principais grupos funcionais presentes nessas moléculas. Após a pesagem do material e obtenção do espectro de massa, o estudante deve ser orientado a analisar as massas obtidas e identificar quais foram os aminoácidos encontrados. Em seguida, recomenda-se que os alunos realizem uma busca por padrões de estruturação secundária de proteínas em bases de dados disponíveis da *internet*.

Os resultados obtidos podem ser apresentados na forma de Relatório de Aula Prática. Para auxiliar o professor na aplicação dessa aula e nortear as correções dos relatórios e das respostas esperadas, algumas considerações conceituais estão disponibilizadas no Anexo C.



Em seguida, representamos o Quadro 3, contendo o roteiro prático da Aula Prática número 02: Simulação de espectrometria de massa - sequenciamento de peptídeos.

**Quadro 3.** Roteiro proposto da aula prática número 02, intitulada “Simulação de espectrometria de massa - sequenciamento de peptídeos”.

<b>Aula prática número 02: Simulação de espectrometria de massa - sequenciamento de peptídeos</b>
<p><b>Proposta:</b> A presente aula tem como proposta de simular a análise do espectro de massa de um fragmento proteico de uma amostra resultante da digestão trípica (com o uso da enzima tripsina, que cliva ligações peptídicas após os resíduos de aminoácidos carregados positivamente, principalmente lisina e arginina). A amostra apresenta elevado grau de pureza, e a proteína íntegra presente possui massa de 66.463 Da. A hidrólise foi realizada em um meio reacional contendo tampão bicarbonato de amônio 50 mmol × L<sup>-1</sup>. O tempo de reação foi de 24 h à temperatura de 37°C.</p>
<p><b>Objetivos:</b> Elucidar a sequência dos aminoácidos que constituem a cadeia polipeptídica do fragmento proteico.</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Sabe-se que o fragmento analisado representa os resíduos de aminoácidos que ocupam as posições entre 490 e 495 na estrutura primária da proteína nativa. A massa neutra do peptídeo em questão é de 659,34 Da, enquanto sua massa monocarregada é de 600,35 Da. O pI do fragmento analisado é previsto em 5,66. A fórmula molecular do fragmento é de C<sub>28</sub>H<sub>47</sub>N<sub>7</sub>O<sub>10</sub>.</li><li>- Em relação à mesma proteína, na análise de outro fragmento com massa 728,37 Da (quando monocarregada), revelou-se a sequência de aminoácidos CVLHEK, sabendo-se que são referentes às posições entre 483 – 489 na estrutura primária dessa proteína nativa.</li></ul> <p>A partir dos dados obtidos na aula e das informações apresentadas, elucide a qual proteína o fragmento analisado pertence. Supondo que essa amostra é oriunda da urina de um paciente, quais correlações clínicas seriam possíveis de serem sugeridas?</p>
<p><b>Tutorial de preparo da aula prática:</b></p> <p><i>Tutorial de montagem do material e aquisição de dados:</i> Pesar cada “pacotinho”, anotar a massa, converter a massa para Daltons (relação massa média dos alfinetes = 1 Da). Considerando a intensidade relativa sugerida abaixo, monte o espectro de massa e elucide a sequência dos aminoácidos nesse fragmento peptídico.</p> <p><b>Montagem da aula prática:</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- separar pacotinhos de papel ou de plástico contendo as quantidades de alfinetes relativos a cada pico:</li></ul> <p>Pico 1) 102 alfinetes Pico 2) 199 alfinetes Pico 3) 298 alfinetes Pico 4) 385 alfinetes Pico 5) 514 alfinetes Pico 6) 660 alfinetes</p> <p>Pico 1) Intensidade relativa (em U.A.): 6 x 10<sup>9</sup> Pico 2) Intensidade relativa (em U.A.): 4 x 10<sup>9</sup> Pico 3) Intensidade relativa (em U.A.): 8 X 10<sup>9</sup> Pico 4) Intensidade relativa (em U.A.): 3 X 10<sup>9</sup> Pico 5) Intensidade relativa (em U.A.): 2,5 X 10<sup>9</sup> Pico 6) Intensidade relativa (em U.A.): 2 X 10<sup>9</sup></p> <p><b>Dica:</b> Após elucidar manualmente a sequência de aminoácidos, utilize os bancos de dados presentes na internet para identificar por similaridade a qual proteína essa sequência pertence.</p> <p>Sugestão de site: <a href="http://www.uniprot.org/blast/">http://www.uniprot.org/blast/</a></p> <p><b>OBS:</b> os pacotinhos contêm os números de massa respectivos aos íons da série b formados na fragmentação do peptídeo em questão.</p>



Nessa aula prática, são abordados e trabalhados os seguintes temas: hidrólise enzimática de proteínas pela enzima tripsina, em conjunto com suas características e condições de hidrólise; propriedade bioquímica do ponto isoelétrico; sequenciamento *de novo* de sequências polipeptídicas; busca por similaridade em bancos de dados (*Protein Data Bank* - PDB) disponíveis na internet. Por fim, contextualiza-se o conteúdo ao estudante por meio da correlação com um caso clínico clássico.

#### **4 Impacto no ensino-aprendizado**

A aplicação dessa técnica de simulação de análise de espectrometria de massa possibilita ao estudante uma redução do abismo que pode existir entre os aspectos teóricos e práticos referentes ao estudo de Bioquímica, Biologia Molecular e disciplinas correlatas.

Por meio da execução dessa proposta, o aluno pode vivenciar situações em que confronta aspectos mais abstratos com procedimentos práticos simples, como na montagem de estruturas ou modelos moleculares e na mensuração da massa de prótons e neutros, o que pode auxiliar na sedimentação de tais conceitos e melhor aprendizado de assuntos correlatos.

Por outro lado, ao compreender os princípios básicos da técnica de espectrometria de massa, o estudante se capacita à interpretação dos dados obtidos por meio dessa técnica, utilizando ferramentas modernas de busca de bancos de dados na rede mundial de computadores, por exemplo. Nesse ponto, ao submeter o aluno ao contato com as principais vias modernas de obtenção de novos conhecimentos científicos, também pode-se possibilitar uma redução da distância do conhecimento ensinado com aspectos vivenciados pelos discentes, resultando em melhoras multilaterais no processo ensino-aprendizado.

#### **5 Conclusões**

A presente proposta viabiliza um contato inicial do estudante aos princípios básicos da técnica de espectrometria de massa. Além de familiarizar o discente à aquisição, tratamento e interpretação de dados científicos, possibilita o contato dos estudantes com ferramentas modernas de busca em bancos de dados na internet, tanto pela busca da verificação da similaridade com as sequências obtidas na simulação, quanto na



elucidação de estruturação secundária das biomoléculas. Tais procedimentos representam as principais vias modernas de obtenção de novos conhecimentos científicos na Bioquímica e demais áreas biológicas, e sua compreensão se tornou essencial para uma formação sólida, atualizada e crítica dos estudantes de graduação.

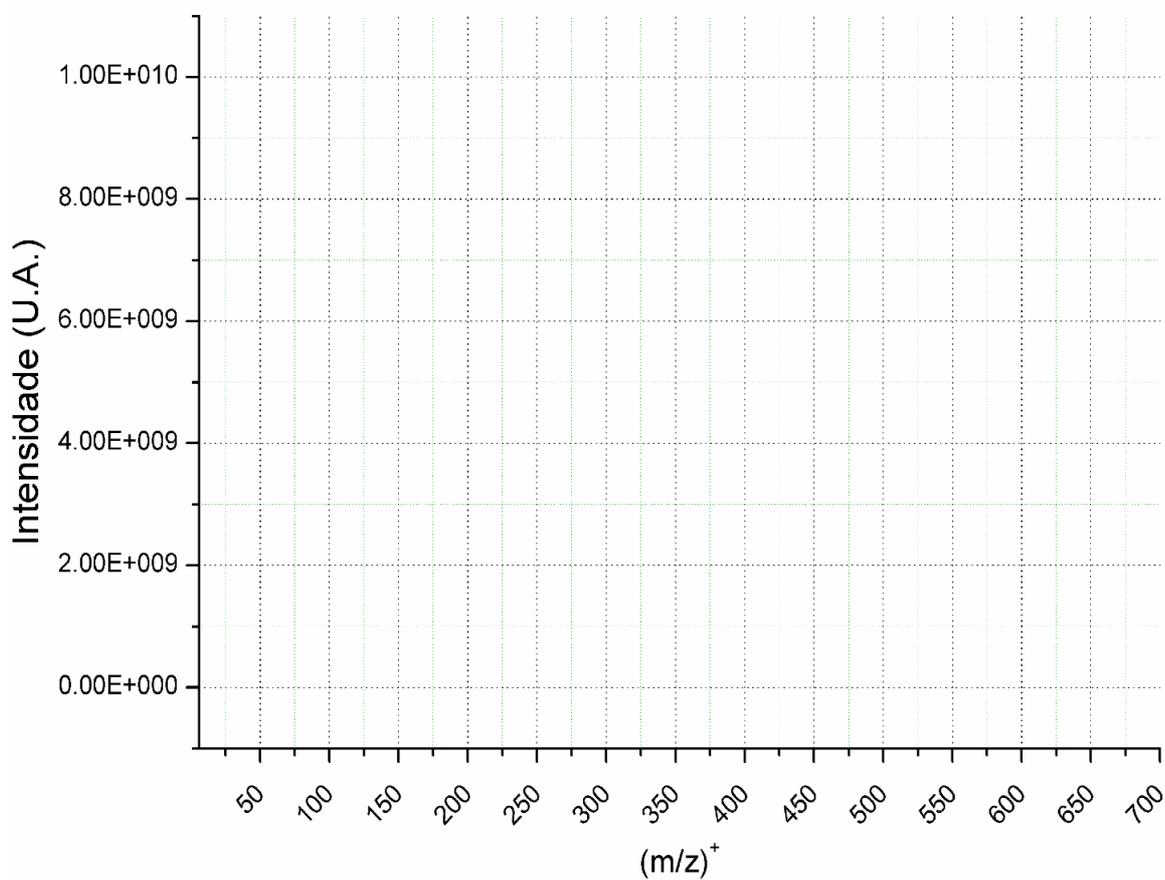
## Referências

- [1] Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics. *Nature* 2003; 422 (6928): 193-197.
- [2] Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003; 422 (6928): 198-207.
- [3] Cantú MD, Carrilho E. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. *Quim Nova* 2008; 31 (3): 669-675.
- [4] Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 1988; 60 (20): 2299-2301.
- [5] Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989; 246 (4926): 64-71.
- [6] Steen H, Mann M. The abc's (and xyz's) of peptide sequencing. *Nature Rev* 2004; 5: 699-711.
- [7] Kinter K, Sherman NE. Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry, Wiley-Intersc: New York, 2000.
- [8] Nelson DL, COX MM. *Lehninger: Princípios de Bioquímica*. 5. ed. São Paulo: SARVIER. 2011.





### Resultados e Discussão:



---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Conclusões

---

---

---

---

---

---

---

---

### Referências Bibliográficas

---

---



**Apêndice B.** Modelo de planilhas para coleta e notação dos dados para aula 00.

**Aula prática n. 00) Pré-preparo dos materiais e validação da sua aplicação no modelo simulação proposto**

**Objetivo:** Verificar se o material proposto para a modelagem e simulação apresenta variabilidade de massa compatível com o objetivo da simulação proposta.

**Tutorial de preparo da aula prática:** Pesar, em balança analítica, 50 exemplares de cada material que será utilizado na construção dos modelos (bolas de isopor, alfinetes e palitos). Anotar o valor de cada item e ao final calcular a massa média e o desvio-padrão de cada componente.

Bola de isopor	massa (g)	15.	massa (g)	30.	massa (g)	45.	massa (g)
1.		16.		31.		46.	
2.		17.		32.		47.	
3.		18.		33.		48.	
4.		19.		34.		49.	
5.		20.		35.		50.	
6.		21.		36.			<b>Média:</b>
7.		22.		37.			
8.		23.		38.			<b>Erro padrão:</b>
9.		24.		39.			
10.		25.		40.			<b>Desvio padrão:</b>
11.		25.		41.			
12.		27.		42.			
13.		28.		43.			
14.		29.		44.			



*Proposta de um modelo de simulação de análises de espectrometria de massa para aulas práticas de Bioquímica no ensino superior*

Alfinete	massa (g)	15.	massa (g)	30.	massa (g)	45.	massa (g)
1.		16.		31.		46.	
2.		17.		32.		47.	
3.		18.		33.		48.	
4.		19.		34.		49.	
5.		20.		35.		50.	
6.		21.		36.		<b>Média:</b>	
7.		22.		37.			
8.		23.		38.		<b>Erro padrão:</b>	
9.		24.		39.			
10.		25.		40.		<b>Desvio padrão:</b>	
11.		25.		41.			
12.		27.		42.			
13.		28.		43.			
14.		29.		44.			

Palito	massa (g)	15.	massa (g)	30.	massa (g)	45.	massa (g)
1.		16.		31.		46.	
2.		17.		32.		47.	
3.		18.		33.		48.	
4.		19.		34.		49.	
5.		20.		35.		50.	
6.		21.		36.		<b>Média:</b>	
7.		22.		37.			
8.		23.		38.		<b>Erro padrão:</b>	
9.		24.		39.			
10.		25.		40.		<b>Desvio padrão:</b>	
11.		25.		41.			
12.		27.		42.			
13.		28.		43.			
14.		29.		44.			



## Apêndice C. Gabarito das aulas.

### GABARITO DA AULA 01)

Os três aminoácidos que compõem a cadeia polipeptídica são: glicina, alanina e hidroxiprolina (G A Hyp), já organizada em ordem crescente de massa molecular. A repetição de 20 vezes da sequência (G A Hyp), analisadas em sites disponíveis na internet (ex: <http://imtech.res.in/raghava/apssp/>; <http://chofas.sourceforge.net/>; [http://embnet.vital-it.ch/software/COILS\\_form.html](http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html), entre outros sites disponíveis no portal ExPASy), revela uma propensão de estruturação secundária em alfa-hélice. Essa sequência polipeptídica é oriunda da digestão da proteína colágeno (de acordo com Lehninger 2011, capítulo 4) [8]. O colágeno é uma proteína fibrosa, relacionada com a garantia de resistência. É encontrado em tecidos conjuntivos como tendões, cartilagens, matriz orgânica dos ossos e na córnea dos olhos. Suas fibras são resultados de uma torção super-helicoidal em sentido horário. Um possível caso clínico envolvido relaciona-se a patologia denominada de escorbuto, na qual é uma doença que tem como primeiros sintomas hemorragias nas gengivas, tumefação purulenta das gengivas (inchaço com pus), dores nas articulações, feridas que não cicatrizam, além de desestabilização dos dentes. É provocada pela carência grave de vitamina C na dieta. A vitamina C é importantíssima para o corpo porque ela é um cofator da enzima prolil-hidroxilase, que faz a hidroxilação do aminoácido prolina nas cadeias alfa de colágeno. Essa hidroxilação é tão importante porque aumenta o número de ligações de hidrogênio na molécula e dá maior rigidez ao colágeno, que é a principal proteína estrutural do corpo.

### GABARITO DA AULA 02)

Sequência polipeptídica: TPVSEK (treonina, prolina, valina, serina, glutamato e lisina)  
Juntando a sequência CVLHEK à TPVSEK obtemos CVLHEKTPVSEK. Essa sequência, quando analisada em bancos de dados presentes na internet (como por exemplo: <http://www.uniprot.org/blast/>) revela que é pertencente à proteína soro albumina humana. A presença dessa proteína na urina do paciente (preteinúria) indica possíveis quadros de infecção ou inflamação dos néfrons, e/ou insuficiência renal causada por lesão renal aguda, requerendo outros exames laboratoriais para elucidação precisa do caso.

