



GUSTAVO DE SOUZA PESSÔA

**ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE METAIS E METALÓIDES LIGADOS A
ANIDRASE CARBÔNICA EMPREGANDO TWIMS-MS E ICP-MS**

**CAMPINAS
2014**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

GUSTAVO DE SOUZA PESSÔA

**ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE METAIS E METALÓIDES LIGADOS A
ANIDRASE CARBÔNICA EMPREGANDO TWIMS-MS E ICP-MS**

**ORIENTADOR: PROF. DR. MARCO AURÉLIO ZEZZI ARRUDA
COORIENTADOR: PROF. DR. FÁBIO CESAR GOZZO**

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
POR GUSTAVO DE SOUZA PESSÔA, E ORIENTADA PELO PROF.DR. MARCO AURÉLIO
ZEZZI ARRUDA.**

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2014**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Danielle Dantas de Sousa - CRB 8/6490

P439a Pessôa, Gustavo de Souza, 1982-
Análise de especiação de metais e metalóides ligados a anidrase carbônica empregando TWIMS-MS e ICP-MS / Gustavo de Souza Pessôa. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Marco Aurélio Zezzi Arruda.

Coorientador: Fábio Cesar Gozzo.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Especiação química. 2. Mobilidade iônica. 3. ICP-MS. I. Arruda, Marco Aurélio Zezzi. II. Gozzo, Fábio Cesar. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Speciation analysis of metals and metalloids bound to carbonic anhydrase using TWIMS-MS and ICP-MS

Palavras-chave em inglês:

Chemical Speciation

Ion Mobility

ICP-MS

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Marco Aurélio Zezzi Arruda [Orientador]

Dosil Pereira de Jesus

Carla Beatriz Grespan Bottoli

Valderi Luiz Dressler

Fernando Barbosa Júnior

Data de defesa: 07-07-2014

Programa de Pós-Graduação: Química

**Aos meus pais,
Às minhas irmãs
E a minha esposa, Lívia**

“Senhor,
Fazei de mim um instrumento de vossa paz.
Onde houver ódio, que eu leve o amor,
Onde houver ofensa, que eu leve o perdão.
Onde houver discórdia, que eu leve a união.
Onde houver dúvida, que eu leve a fé.
Onde houver erro, que eu leve a verdade.
Onde houver desespero, que eu leve a esperança.
Onde houver tristeza, que eu leve a alegria.
Onde houver trevas, que eu leve a luz!
Ó Mestre,
Fazei que eu procure mais:
Consolar, que ser consolado;
Compreender, que ser compreendido;
Amar, que ser amado.
Pois é dando que se recebe,
Perdoando que se é perdoado,
E é morrendo que se vive para a vida eterna!”

Oração de São Francisco de Assis

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas, em específico ao Instituto de Química, por possibilitar a realização desta tese.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda, por todos os ensinamentos, oportunidades e confiança durante a realização deste doutorado.

Ao Prof. Dr. Fábio César Gozzo, por ter me recebido no Grupo Dalton de Espectrometria de Massas para os estudos de mobilidade iônica.

Aos amigos do Grupo de Espectrometria Preparo de Amostras e Mecanização (GEPAM): Adílson, Alessandra Melo, Alessandra Sussulini, Alessandra Vieira, Alisson, Aline Lopes, Ana Cristi, Bruna Campos, Bruna Maciel, Cícero, Daiane Torres, Daiane Letícia, Eduardo, Elidiane, Eraldo, Fabiana, Giovani, Heloísa, Herbert, Javier, Josiane, Katherine, Larissa, Marcelo, Mônica, Odilon, Renata, Rodrigo, Sara, Silvana e Tatiana pelo apoio e bom convívio durante o desenvolvimento desta tese de doutorado.

Aos amigos do Grupo Dalton, Alexandre e Eduardo Pilau por todo apoio durante os experimentos realizados.

À técnica do Instituto de Química, Ivanilce, pelo suporte na realização deste trabalho.

Ao técnico do Instituto de Química, Daniel, pelo suporte na realização dos experimentos de dicroísmo circular.

Aos funcionários do Instituto de Química e, em especial a Bel da CPG, pela colaboração sempre que necessária.

Às Profa. Dra. Gisela Umbuzeiro e Profa. Dra. Cassiana Coneglian pela supervisão no Programa de Estágio Docente.

Aos técnicos do laboratório da Faculdade de Tecnologia, Gil e Ádria, por toda ajuda e ensinamentos durante um ótimo período de convívio.

Aos alunos da Faculdade de Tecnologia, os quais proporcionaram bons momentos e uma grande experiência, além das amizades.

Agradeço a Deus, a Jesus pelo suporte espiritual e pela oportunidade de realizar mais este trabalho.

Ao meu Tio Berto e sua família, pela pronta acolhida que recebi em sua casa, logo que cheguei a Campinas.

Aos meus sogros Lucas e Olívia que me receberam e apoiaram como um filho em sua família.

À minha cunhada querida, Lidiege, por sua amizade e generosidade em todos estes anos.

A minha bela e apaixonada esposa, Lívia por sempre caminharmos juntos e na mesma direção. Teu amor foi a fonte de renovação das minhas forças nos momentos mais árduos e a recompensa mais sublime nos momentos mais felizes.

Às minhas irmãs, Thamara e Amanda, pelo carinho e amor dados ensinando-me e reforçando o significado da palavra irmandade.

Aos meus pais, Osmair e Margareth, agradeço a educação que me foi dada, os valores e os deveres passados e todas as oportunidades que me foram proporcionadas. Enfim, a todo amor recebido, apoio e confiança em mim depositados sempre.

Enfim, gostaria de agradecer a todos que de alguma forma, contribuíram para a realização desta tese de doutorado.

SÚMULA CURRICULAR

Dados pessoais

Gustavo de Souza Pessôa

Data de nascimento: 04 de dezembro de 1982

Naturalidade: Alfenas, Minas Gerais

Email: gutopessoa@yahoo.com.br

Formação Acadêmica

- | | |
|-------------|---|
| 2008 - 2014 | Doutorado em Ciências
Universidade Estadual de Campinas |
| 2005 - 2008 | Mestrado em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Alfenas |
| 2001 - 2004 | Graduação em Ciências Biológicas (Bacharelado e
Licenciatura)
Universidade Federal de Alfenas |

Produção Científica

Pessôa, G. S.; Pilau, E. J.; Gozzo, F. C.; Arruda, M. A. Z. Ion mobility mass spectrometry: an elegant alternative focusing on speciation studies. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v.26, p. 201 – 206, 2011.

Pessôa, G. S.; Pilau, E. J.; Gozzo, F. C.; Arruda, M. A. Z. Ion mobility spectrometry focusing on speciation analysis of metals/metalloids bound to

carbonic anhydrase. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 405, p. 7653 – 7660, 2013.

Trabalhos apresentados em eventos

Pessôa, G. S.; Pilau, E. J.; Gozzo, F. C.; Arruda, M. A. Z. Análise de especiação empregando espectrometria de mobilidade iônica. In: II Encontro Brasileiro sobre Especiação Química, 2010, São Pedro, Brasil, Forma de apresentação: Oral.

Pessôa, G. S.; Pilau, E. J.; Gozzo, F. C.; Arruda, M. A. Z. Travelling wave ion mobility spectrometry: the influence of pH conditions and reaction time in the affinity between divalent metals and carbonic anhydrase. In: II International Congress on Analytical Proteomics, 2011, Ourense, Espanha. Forma de apresentação: Oral.

Pessôa, G. S.; Pilau, E. J.; Gozzo, F. C.; Arruda, M. A. Z. Travelling wave ion mobility spectrometry: a powerful tool to speciation analysis. In: IV Congresso da Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas (BrMASS), 2011, Campinas, Brasil. Forma de apresentação: Painel

Pessôa, G. S.; Pilau, E. J.; Gozzo, F. C.; Arruda, M. A. Z. Especiação química envolvendo aspectos conformacionais da anidrase carbônica ligada a metais. In: III Encontro Brasileiro sobre Especiação Química, 2012, Bento Gonçalves, Brasil, Forma de apresentação: Oral e Painel.

Pessôa, G. S.; Arruda, M. A. Z. Evaluation of zinc isotopes bound carbonic anhydrase by ICP-MS. In: III International Congress on Analytical Proteomics, 2013, São Pedro, Brasil. Forma de apresentação: Oral e Painel.

Premiação

Prêmio de melhor pôster na área de Inorganic Chemistry, no IV Congresso da Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas (BrMASS), 2011, Campinas, Brasil.

Resumo

ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE METAIS E METALÓIDES LIGADOS A ANIDRASE CARBÔNICA EMPREGANDO MOBILIDADE IÔNICA E ICP-MS. No Capítulo 1, é proposta a técnica de mobilidade iônica na modalidade TWIMS, acoplada a um espectrômetro de massas do tipo ESI-Q-ToF MS/MS para análise de especiação da anidrase carbônica ligada a Ba^{2+} , Zn^{2+} , Cu^+ , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Pb^{4+} , Se^{4+} e Se^{6+} . O método é aplicado com sucesso na separação de espécies com diferentes estados de oxidação, mesmo quando as espécies de Se^{4+} e Se^{6+} são adicionadas em uma mistura com a anidrase carbônica. O método também é aplicado para avaliação do estado de enovelamento da anidrase carbônica, em condições nativas e desnaturadas, sendo considerado satisfatório na elucidação das diferentes conformações da proteína. No Capítulo 2, a técnica de ICP-MS é usada na análise de especiação isotópica de Zn ligado à anidrase. A exatidão das medidas aproximou-se das condições naturais observadas para a razão isotópica de Zn ao final das otimizações. A precisão obtida situa-se dentro da margem observada para analisadores de m/z do tipo quadrupolo. Os principais desafios enfrentados neste capítulo foram minimizar os efeitos de discriminação de massas e a remoção de interferências poliatômicas. A enzima foi enriquecida com os isótopos ^{67}Zn e ^{68}Zn , sendo observada maior razão isotópica para anidrase ligada ^{67}Zn . A atividade da anidrase enriquecida com isótopos de Zn apresentou resultados estatisticamente semelhantes.

Abstract

SPECIATION ANALYSIS OF METALS AND METALLOIDS BOUND TO CARBONIC ANHYDRASE USING ION MOBILITY AND ICP - MS . In Chapter 1, ion mobility in the TWIMS mode is proposed, coupled to a ESI-Q-ToF MS/MS mass spectrometer for speciation analysis of carbonic anhydrase bound to Ba^{2+} , Zn^{2+} , Cu^+ , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Pb^{4+} , Se^{4+} and Se^{6+} . The method is successfully applied to separation of selenium species with different oxidation states, even when the species Se^{4+} and Se^{6+} are incubated in a mixture with carbonic anhydrase. The method is also applied for evaluating the carbonic anhydrase folding state in native and denatured conditions, and it is considered as satisfactory in the elucidation of different conformations of the protein. In Chapter 2, an ICP-MS is used for the isotopic speciation analysis of Zn bound to anhydrase. The accuracy measurements are closer to natural conditions for Zn isotope ratio, in the end of the optimization. The precision is within the range observed for m/z analyzer such as quadrupole. The main challenges in this chapter are to minimize the effects of mass discrimination and the removal of polyatomic interferences. The enzyme is enriched with ^{67}Zn and ^{68}Zn isotopes, and the highest isotope ratio is observed for ^{67}Zn bound to anhydrase. Anhydrase activity of Zn enriched isotopes yield similar statistical results.

Sumário

Lista de abreviaturas.....	xxv
Lista de tabelas.....	xxvii
Lista de figuras.....	xxix
1. Introdução.....	1
2. Revisão bibliográfica.....	3
2.1. Anidrase carbônica.....	3
2.1.1. Atividade enzimática.....	5
2.1.2. Aspectos Químicos.....	6
2.1.3. A importância biológica da anidrase.....	8
2.2. Análise de especiação.....	14
2.3. Espectrometria de mobilidade iônica.....	17
2.3.1 Um breve histórico.....	18
2.3.2. Princípios da TWIMS.....	21
2.3.3. Instrumentação da TWIMS.....	22
2.3.4. Algumas aplicações da TWIMS.....	27
2.4 ICP-MS.....	31
2.4.1. Diluição isotópica.....	32
2.4.2. Interferências em isótopos de zinco.....	35
2.4.3. Fontes de variação na composição isotópica.....	37

CAPÍTULO 1

Análise de especiação de metais e metalóides ligados à anidrase carbônica empregando Mobilidade Iônica.....41

1.1. Objetivo.....	43
1.2. Parte experimental.....	45
1.2.1. Equipamentos e acessórios.....	45
1.2.2. Gases, reagentes e soluções.....	45
1.2.3. Parâmetros de TWIMS-MS.....	46
1.2.4. Avaliação das condições nativas e desnaturantes.....	48
1.2.5. Preparo de apo-anidrase carbônica.....	48
1.2.6. Análises de dicróismo circular.....	49
1.2.7. Avaliação da atividade enzimática.....	50
1.2.8. Avaliação da adição dos metais.....	52
1.2.9. Avaliação do efeito do pH e do tempo de incubação.....	53
1.2.10. Análise de especiação.....	54
1.3. Resultados.....	55
1.3.1. Avaliação de condições nativas e desnaturantes.....	55
1.3.2. Preparo da apo-anidrase carbônica.....	60
1.3.3. Análises de dicróismo circular.....	63
1.3.4. Avaliação da atividade enzimática.....	66
1.3.5. Avaliação da adição de metais divalentes à enzima.....	67
1.3.6. Avaliação do efeito do pH por espectrometria de massas e mobilidade iônica.....	72
1.3.7. Análise de especiação.....	77
1.4. Conclusões parciais.....	81

CAPÍTULO 2

Análise de especiação de isótopos de zinco ligados à anidrase carbônica empregando diluição isotópica.....83

2.1. Objetivo.....85

2.2. Parte experimental.....87

2.2.1. Equipamentos e acessórios.....87

2.2.2. Gases, reagentes e soluções.....87

2.2.3. Preparo das soluções e limpeza dos materiais.....88

2.2.4. Avaliação da concentração de Zn.....89

2.2.5. Avaliação da potência RF.....90

2.2.6. Otimização das condições de aquisição do ICP-MS.....90

2.2.7. Correção do tempo morto do detector.....90

2.2.8. Avaliação da voltagem da lente iônica na exatidão e precisão das razões isotópicas de Zn.....91

2.2.9. Otimização das condições da cela de reação e colisão.....91

2.2.10. Avaliação da discriminação de massas.....92

2.2.11. Determinações por ICP-MS.....93

2.2.12. Avaliação da ligação dos isótopos ^{67}Zn e ^{68}Zn à anidrase carbônica.....94

2.2.13. Avaliação da atividade enzimática da anidrase incubada com os isótopos ^{67}Zn e ^{68}Zn95

2.3. Resultados.....97

2.3.1. Avaliação da concentração de Zn.....97

2.3.2. Avaliação da potência RF.....99

2.3.3. Otimização das condições de aquisição do ICP-MS.....100

2.3.4. Correção do tempo morto do detector.....105

2.3.5. Avaliação da voltagem da lente iônica na exatidão e precisão das razões isotópicas de Zn.....	106
2.3.6. Otimização da cela dinâmica de colisão e reação.....	108
2.3.7. Avaliação da discriminação de massas.....	113
2.2.8. Determinações por ICP-MS.....	115
2.2.9. Avaliação da ligação dos isótopos ^{67}Zn e ^{68}Zn à anidrase carbônica.....	118
2.2.10. Avaliação da atividade enzimática da anidrase incubada com os isótopos ^{67}Zn e ^{68}Zn	120
2.4. Conclusões parciais.....	122
3. Considerações Finais.....	125
Referências Bibliográficas.....	127

Lista de abreviaturas

α -AC	alfa-anidrase carbônica
ADP	Adenosina difosfato
AIMS	do inglês, <i>Aspiration Ion Mobility Spectrometry</i>
AMP	Adenosina monofosfato
Apo-BCA	do inglês, <i>Apo-bovine carbonic anhydrase</i>
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
ATD	do inglês, <i>Arrival Time Distribution</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BCA	do inglês, <i>bovine carbonic anhydrase</i>
CF	Conformação
CID	do inglês, <i>collision induced dissociation</i>
Da	Dalton
DC	do inglês, <i>Direct current</i>
DTIMS	do inglês, <i>Drift Time Ion Mobility Spectrometry</i>
EDTA	do inglês, <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EGTA	do inglês, <i>Ethyleneglycol tetraacetic acid</i>
ESI	do inglês, <i>Electrospray Ionization</i>
FAIMS	do inglês, <i>Field Assymmetric Ion Mobility Spectrometry</i>
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutâmico
HDMS	do inglês, <i>High Definition Mass Spectrometry</i>
His	Histidina
HPLC	do ingles, <i>High Performance Liquid Chromatography</i>

ICP OES	do inglês <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>
ICP-MS	do inglês, <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
ID	do inglês, <i>Isotope Dilution</i>
IMMS	do inglês, <i>Ion Mobility Mass Spectrometry</i>
IMS	do inglês, <i>Ion Mobility Spectrometry</i>
IRMM	do inglês, <i>Institute for Reference Materials and Measurements</i>
IUPAC	do inglês, <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
MALDI	do inglês, <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i>
Q	Quadrupolo, do inglês, <i>Quadrupole</i>
MS	do inglês, <i>Mass spectrometry</i>
MS/MS	do inglês, <i>Tandem mass spectrometry</i>
RF	Radiofrequência
SRIG	do inglês, <i>Stacked ring ion guides</i>
Thr	do inglês, <i>threonine</i>
ToF	Tempo de voo, do inglês, <i>time of flight</i>
TWIMS	do inglês, <i>Travelling Wave Ion Mobility Spectrometry</i>
Tyr	do inglês, <i>tyrosine</i>

Lista de Tabelas

Tabela 1. Isoformas de anidrase carbônica associadas às funções e localização celular.....	10
Tabela 2. Operação dos setores de TWIMS e modelos de experimentos.....	25
Tabela 3. Aplicações da <i>Travelling Wave Ion Mobility Spectrometry</i>	29
Tabela 4. Interferências comuns que afetam as medições dos isótopos de zinco.....	36
Tabela 5. Volumes empregados na avaliação da atividade enzimática.....	51
Tabela 6. Estimativa da porcentagem das estruturas secundárias para anidrase carbônica em tampão acetato de amônio 10,0 mmol L ⁻¹ , em pH 6,75 por meio do método K2D (neural network).....	64
Tabela 7. Distribuição de tempo de chegada da apo-enzima e da enzima ligada aos metais divalentes, obtidos por meio da extração do estado de carga +11, com velocidade de onda 300 m/s em diferentes condições de pH.....	74
Tabela 8. Distribuição de tempo de chegada da apo-enzima e da enzima ligada aos metais divalentes, obtidos por meio da extração do estado de carga +11, com velocidade de onda 300 m/s em diferentes tempos de incubação.....	76
Tabela 9. Condições iniciais de operação empregadas nas avaliações de precisão e exatidão das razões isotópicas, usando ICP-MS.....	89
Tabela 10. Condições de operação do ICP-MS após as otimizações.....	93
Tabela 11. Valores de razão isotópica de Zn em condições naturais.....	97
Tabela 12. Razão isotópica de zinco em amostras de anidrase carbônica.....	117

Tabela 13. Razões isotópicas para anidrase carbônica enriquecida com ^{67}Zn , ^{68}Zn e o material certificado IRMM-3702.....	118
--	-----

Lista de Figuras

Figura 1. Isoforma II da α -AC bovina. O Zn do sítio ativo está representado por uma esfera amarela. (a) Modelo mostrando o monômero da BCA. Notam-se os elementos estruturais secundários em vermelho (folha β), azul (α -hélice) e <i>coil</i> (cinza). (b) Representação do sítio ativo dos dois monômeros da BCA. As esferas vermelhas representam moléculas de água. As siglas Asn, Arg, His, Gln, Glu, Thr e Tyr representam respectivamente os amoninoácidos asparagina, arginina, histidina, glutamina, ácido glutâmico, treonina e tirosina (Adaptado de Saito, <i>et al.</i> , 2004).....	4
Figura 2. Mecanismo enzimático da anidrase carbônica. Os resíduos de histidina são representados por His, seguidos do número do aminoácido na sequência da proteína.....	6
Figura 3. O papel da anidrase e da hemoglobina no transporte de O ₂ e CO ₂ . Em azul, está representada a proteína transmembrana banda 3 e, em amarelo, a anidrase carbônica (Adaptado de Esbaugh e Tufts, 2006).....	13
Figura 4. Esquema da cela de TWIMS do Synapt HDMS, preenchida com gás N ₂ no IMS e argônio no <i>trap</i> e <i>transfer</i> (Adaptado de Pringle, <i>et al.</i> , 2007)...	23
Figura 5. Guia de íons responsável pelo funcionamento da técnica de TWIMS (Adaptado de Pringle, <i>et al.</i> , 2007).....	24
Figura 6. Movimento dos íons após o pulso elétrico (Adaptado de Pringle, <i>et al.</i> , 2007).....	26
Figura 7. Diagrama esquemático representando a análise de diluição isotópica do zinco. Nota-se que o isótopo ⁶⁷ Zn utilizado no enriquecimento possuía cerca de 33,32% de ⁶⁸ Zn.....	47

Figura 8. Diagrama esquemático do equipamento Synapt HDMS (adaptado de Pringle, <i>et al.</i> , 2007).....	41
Figura 9. Espectro de massas da apo-anidrase desnaturada (a). Distribuição por tempo de chegada (ATD) dos estados de carga +30, +21 e +12 (b).....	56
Figura 10. Espectro de massas tridimensional (ESI-TWIMS-MS) da anidrase carbônica em estado nativo em tampão acetato de amônio. As conformações 1 (CF 1) e 2 (CF 2), respectivamente, referem-se à conformação mais enovelada (CF 1) e à conformação mais desenovelada (CF 2) da anidrase.....	58
Figura 11. Distribuição por tempo de chegada dos estados de carga +11, na forma desnaturada (a) e na forma nativa (b) da enzima.....	59
Figura 12. Espectros de massa da anidrase carbônica sem tratamento (a) e após o tratamento com 1,10-fenantrolina (b). Espectros de massa deconvoluídos da enzima sem tratamento (c) e após o tratamento com 1,10-fenantrolina (d). O equipamento foi operado no modo positivo de <i>electrospray</i> , conforme descrito no item 1.2.5.....	61
Figura 13. Distribuição por tempo de chegada da anidrase carbônica (8,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) no estado de carga +11, na forma nativa adquirida comercialmente (a), na forma apo (b) e na forma apo-enzima acrescida de 4,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn (c)...	63
Figura 14. Espectro de dicroísmo circular para anidrase carbônica a 8,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na presença de tampão acetato de amônio 10,0 mmol L^{-1} . O eixo da ordenada é expresso em resíduos principais de elipticidade molar, sendo que o valor do branco (solução tampão acetato de amônio 10,0 mmol L^{-1} , em pH 7,0) foi previamente subtraído. As linhas do espectro referem-se à anidrase carbônica na sua forma: adquirida comercialmente (—), apo-enzima (—) e apo-enzima acrescida de 4,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn (—).....	64
Figura 15. Avaliação da atividade enzimática da anidrase carbônica nas formas apo, comercial e apo-enzima incubada com Zn.....	66

Figura 16. Avaliação da atividade enzimática da anidrase incubada com metais divalentes (a) e espécies empregadas na análise de especiação (b).....	67
Figura 17. Espectros de massas da enzima na presença de Ba ²⁺ (a), Cu ²⁺ (b), Pb ²⁺ (c) e Zn ²⁺ (d). O equipamento foi operado no modo positivo de <i>electrospray</i> , conforme descrito no item 1.2.8.....	69
Figura 18. Espectros de massas deconvoluídos da enzima na presença de Ba ²⁺ (a), Cu ²⁺ (b), Pb ²⁺ (c) e Zn ²⁺ (d). O equipamento foi operado no modo positivo de <i>electrospray</i> , conforme descrito no item 1.2.8.....	70
Figura 19. Avaliação da proporção metal e proteína, em função da intensidade apresentada nos espectros de massas da anidrase incubada com Ba (■), Pb (◆), Cu (▲) e Zn (▼).....	71
Figura 20. Intensidade de apo-BCA (■) e anidrase ligada a Ba (■), Pb (▨), Cu (≡) e Zn (■), no espectro de massas.....	73
Figura 21. Distribuição por tempo de chegada da apo-anidrase (—), e da enzima ligada aos metais divalentes, Ba (—), Pb (—), Cu (—) e Zn (—).....	75
Figura 22. Distribuição por tempo de chegada da apo-anidrase (a) e da enzima ligada às espécies Pb ²⁺ (b), Pb ⁴⁺ (c), Cu ⁺ (d) e Cu ²⁺ (e).....	78
Figura 23. Distribuição por tempo de chegada da apo-anidrase (a) e da enzima ligada às espécies Se ⁴⁺ (b) e Se ⁶⁺ (c) incubados individualmente e em uma mistura de Se ⁴⁺ (d) e Se ⁶⁺ (e).....	79
Figura 24. Intensidade relativa das conformações 1 (CF 1) e conformação 2 (CF 2) nos estados de carga +12 (■) e + 11 (■).....	80
Figura 25. Razões isotópicas de zinco em função da concentração, para as razões de (a) ⁶⁶ Zn/ ⁶⁴ Zn (■) e ⁶⁷ Zn/ ⁶⁴ Zn (●); e (b) ⁶⁸ Zn/ ⁶⁴ Zn (▲) e ⁷⁰ Zn/ ⁶⁴ Zn (◆). As linhas pontilhadas pretas indicam as razões isotópicas naturais e as linhas pontilhadas vermelhas indicam a condição eleita nesta otimização.....	98

Figura 26. Razões isotópicas de zinco em função da potência RF, para as razões de (a) $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (■) e $^{67}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (●); e (b) $^{68}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (▲) e $^{70}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (◆). As linhas pontilhadas pretas indicam as razões isotópicas naturais e as linhas pontilhadas vermelhas indicam a condição eleita nesta otimização....100

Figura 27. Razões isotópicas de zinco em função do tempo de residência, para as razões de (a) $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (■) e $^{67}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (●); e (b) $^{68}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (▲) e $^{70}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (◆). As linhas pontilhadas pretas indicam as razões isotópicas naturais e as linhas pontilhadas vermelhas indicam a condição eleita nesta otimização....103

Figura 28. Razões isotópicas de zinco em função do tempo de integração, para as razões de (a) $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (■) e $^{67}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (●); e (b) $^{68}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (▲) e $^{70}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (◆). As linhas pontilhadas pretas indicam as razões isotópicas naturais e as linhas pontilhadas vermelhas indicam a condição eleita nesta otimização....104

Figura 29. Razão isotópica normalizada $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (a), $^{67}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (b), $^{68}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (c) e $^{70}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (d) em função do valor de tempo morto de detector aplicado na correção dos resultados, empregando soluções empregando soluções de Zn a 3,8 (■), 7,6 (●), 11,4 (▲) e 15,2 (◆) $\mu\text{mol L}^{-1}$106

Figura 30. Razões isotópicas de zinco em função da voltagem da lente (V), para as razões de (a) $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (■) e $^{67}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (●); e (b) $^{68}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (▲) e $^{70}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (◆). As linhas pontilhadas pretas indicam as razões isotópicas naturais e as linhas pontilhadas vermelhas indicam a condição eleita.....108

Figura 31. Otimização da vazão de CH_4 (mL min^{-1}) da cela de reação e colisão, para os isótopos ^{64}Zn (a), ^{66}Zn (b), ^{67}Zn (c), ^{68}Zn (d) e ^{70}Zn (e). São apresentados (■) o sinal do interferente e (●) do isótopo.....110

Figura 32. Otimização da voltagem do quadrupolo da cela de reação e colisão, para os isótopos ^{64}Zn (a), ^{66}Zn (b), ^{67}Zn (c), ^{68}Zn (d) e ^{70}Zn (e). São apresentados (■) o sinal do interferente e (●) do isótopo.....112

Figura 33. Razões isotópicas de zinco avaliadas na discriminação de massas. São apresentadas as razões de $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ no material certificado (■) e em solução padrão de Zn (●), bem como as razões de $^{67}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ no material certificado (▲) em solução padrão de Zn (◆).....	114
Figura 34. Razões isotópicas de zinco avaliadas na discriminação de massas. São apresentadas as razões de $^{68}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ no material certificado (■) e em solução padrão de Zn (●), bem como as razões de $^{70}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ no material certificado (▲) em solução padrão de Zn (◆).....	115
Figura 35. Curva analítica dos isótopos ^{64}Zn (a), ^{66}Zn (b), ^{67}Zn (c), ^{68}Zn (d) e ^{70}Zn (e), empregando-se as concentrações de 0,15, 0,38, 0,76, 1,14, 1,56, 3,8 e 7,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$	116
Figura 36. Avaliação da atividade enzimática da anidrase carbônica (12,24 $\mu\text{mol L}^{-1}$) incubada com o material de referência certificado (IRMM-3702) e com os isótopos ^{67}Zn e ^{68}Zn (cada um a 6,12 $\mu\text{mol L}^{-1}$).....	121

1. Introdução

A determinação da composição total de elementos é exigida em todo mundo no controle ambiental e em avaliações clínicas de rotina. Entretanto, essa informação pode não ser suficiente para a compreensão da ação dos elementos químicos em um sistema biológico, uma vez que a biodisponibilidade, o metabolismo e a toxicidade dependerão da forma como a espécie química se apresenta (Wrobel, *et al.*, 2003; Michaelke, 2003).

Diante da necessidade de se conhecer a forma de uma espécie química, desenvolveu-se a análise de especiação, definida como atividade analítica de identificação e/ou medição da quantidade de uma ou mais espécies químicas individuais. O termo espécie química vem designar a forma específica como um elemento se apresenta, seja na forma de diferentes isótopos, estrutura molecular, complexo, estados eletrônicos ou de oxidação (Wrobel, *et al.*, 2003).

Diferentes campos da ciência (ambiental, biológico, clínico e analítico) têm aplicado à análise de especiação. Uma tendência atual nesta área tem sido a orientação em direção à aplicação bioinorgânica, particularmente na análise de especiação de biomoléculas com metais ou metalóides, com ênfase em proteínas contendo heteroátomos.

Metais e metalóides são co-fatores protéicos de grande importância para a bioquímica celular. Eles podem aumentar a estabilidade estrutural da proteína, por meio da ligação às cadeias laterais de aminoácidos, conferindo uma conformação adequada para a função biológica. Além disso, estes elementos químicos atuam em centros ativos na catálise enzimática, auxiliando grupos reativos a obterem orientação mais favorável para a ocorrência da reação (Liu e Xu, 2002).

A elucidação da espécie química de um elemento ligado a uma proteína ainda é uma tarefa analítica desafiadora, mesmo que sejam empregadas estratégias convencionais ou de alta resolução. Dentre as limitações encontradas, podem ser mencionadas a redução no estado de oxidação de um íon metálico durante o emprego da dissociação induzida por colisão e a falta de resolução na produção de uma distribuição isotópica de uma holo-proteína em estado nativo, mesmo quando é utilizada a técnica de ressonância ciclotônica de íons (Wright e Dyson, 1999; Kriwacki, *et al.*, 1996).

Assim, existe grande interesse em identificar a forma química de um metal ou metaloide ligado a uma proteína. Esta tese tem por objetivo apresentar duas estratégias analíticas alternativas que podem ser empregadas na análise de especiação.

A espectrometria de mobilidade iônica (IMS, do inglês, *ion mobility spectrometry*) é proposta para análise de especiação de metais e metaloides adicionados em diferentes estados de oxidação à proteína anidrase carbônica. Esta técnica tem sido amplamente empregada na avaliação da conformação de diferentes proteínas (Faull, *et al.*, 2009). Entretanto, a proposta apresentada nesta tese pode ser considerada inovadora, não tendo sido encontrado outro relato na literatura que utilize a mobilidade iônica na análise de especiação.

A segunda estratégia foi o emprego da diluição isotópica na análise de especiação envolvendo isótopos de zinco ligados à anidrase carbônica. Esta estratégia, em conjunto com a técnica de ICP-MS (do inglês, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*), é referida como o estado da arte das aplicações de espectrometria atômica, sendo altamente competitiva em virtude da detectabilidade, da ampla faixa dinâmica, da capacidade multielementar e da informação isotópica (Taylor, *et al.*, 2011).

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Anidrase carbônica

A literatura científica indica a existência de cinco classes distintas de anidrase carbônica: α , β , γ , δ e ζ . Apenas a classe δ ainda não possui estrutura definida por meio de cristalografia de raios-x. A elucidação da estrutura cristalina das demais classes (α , β , γ e ζ) revelou não haver homologia estrutural entre elas. Além disso, também foi observada a ausência de uma sequência homóloga entre elas, indicando uma convergência evolutiva desta função catalítica (Innocenti, 2008).

A proteína escolhida como modelo para este estudo é a isoforma II da alfa-anidrase carbônica (α -AC), obtida a partir de eritrócitos bovinos. Esta proteína apresenta características atraentes para o estudo entre proteínas e ligantes, tais como o baixo custo de aquisição e a grande estabilidade química em condições laboratoriais. Além disso, ela é a segunda proteína mais abundante dos eritrócitos, tornando-a fácil de purificar.

A estrutura da anidrase carbônica bovina (BCA) é mostrada na Figura 1a. Na região central da enzima, são observadas dez folhas β e o sítio ativo da enzima. Este sítio constitui-se como uma cavidade em forma de funil, com 13 Å de profundidade e um íon tetraédrico de Zn^{2+} (indicado por uma esfera amarela). O metal está coordenado com o grupo imidazol das cadeias laterais de três histidinas, situadas nas posições 93, 95 e 118. Além disso, observa-se a presença de um íon hidróxido, formando uma ligação de hidrogênio com a cadeia lateral do aminoácido treonina, na posição 197, o qual preenche a esfera de coordenação do íon zinco (Figura 1b). A caracterização estrutural da

isoforma II da BCA sugeriu a existência de dois monômeros muito semelhantes, que diferem entre si por apenas 0,11 Å (Saito, *et al.*,2013).

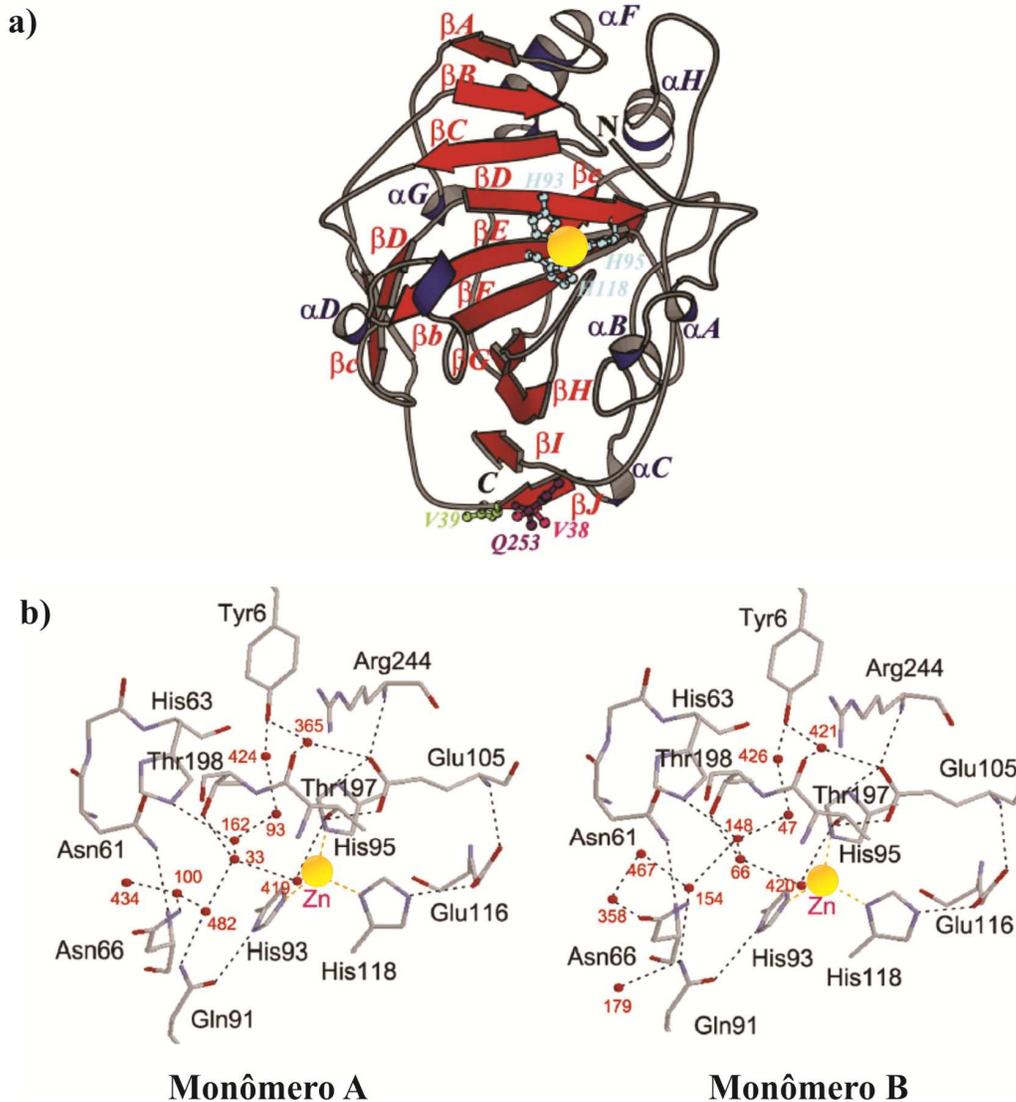


Figura 1. Isoforma II da α -AC bovina. O Zn do sítio ativo está representado por uma esfera amarela. (a) Modelo mostrando o monômero da BCA. Notam-se os elementos estruturais secundários em vermelho (folha β), azul (α -hélice) e *coil* (cinza). (b) Representação do sítio ativo dos dois monômeros da BCA. As esferas vermelhas representam moléculas de água. As siglas Asn, Arg, His, Gln, Glu, Thr e Tyr representam respectivamente os amoninoácidos asparagina, arginina, histidina, glutamina, ácido glutâmico, treonina e tirosina (Adaptado de Saito, *et al.*,2004).

2.1.1. Atividade enzimática

A anidrase catalisa a reação de conversão do CO_2 a HCO_3^- e prótons. Apesar da reação ocorrer espontaneamente na ausência de catalisadores, quase todos os organismos contêm anidrases, que catalisam estas reações. Tais enzimas são necessárias porque estas reações estão ligadas a processos rápidos, tais como processos de transporte. As enzimas mais ativas hidratam o CO_2 com velocidades de até $k_{\text{cat}} = 8,3 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ (Pocker e Bjorkquistl, 1977). A reação catalisada é aproximadamente 10^7 vezes mais rápida que a reação não catalisada (Radzicka e Wolfenden, 1995).

O mecanismo da reação catalisada pela BCA está descrito na Figura 2. O íon hidróxido ligado ao zinco está estabilizado devido à ligação de hidrogênio com um resíduo de treonina vizinha (Thr 197) que, por sua vez, faz uma ligação de hidrogênio com um grupo carboxilato de um resíduo de glutamina (Glu 105). Estas interações aumentam a nucleofilicidade da molécula de água ligada ao zinco, configurando a forma ativa da enzima (Figura 2a). O CO_2 se posiciona no local de ligação do substrato, compreendido por dois resíduos valina e uma leucina, aproximando-se do íon hidróxido ligado ao zinco, o que facilita a reação de hidratação (Figura 2b). Assim, o íon hidróxido promove o ataque nucleofílico ao CO_2 , produzindo o íon HCO_3^- (Figura 2c), o qual se difunde da cavidade do sítio ativo, dando lugar a uma molécula de água (Figura 2d). Com a molécula de água coordenada ao zinco, a enzima encontra-se na forma inativa para catálise. Para regenerar a forma ativa da enzima, ocorre uma reação de transferência do próton da água coordenada ao zinco para o resíduo de histidina na posição 63. A partir deste resíduo, o próton é projetado para a superfície da enzima (Saito, *et al.*, 2004; Supuran, 2008).

A enzima está adaptada para a catálise de hidratação do CO_2 . Entretanto, ela demonstra uma habilidade considerável de abrigar outros substratos. Assim, a BCA catalisa a hidrólise de ésteres, sulfonatos, haletos de sulfonilo e a hidratação dos aldeídos e ácido pirúvico (Sprigings e Hall, 2001)

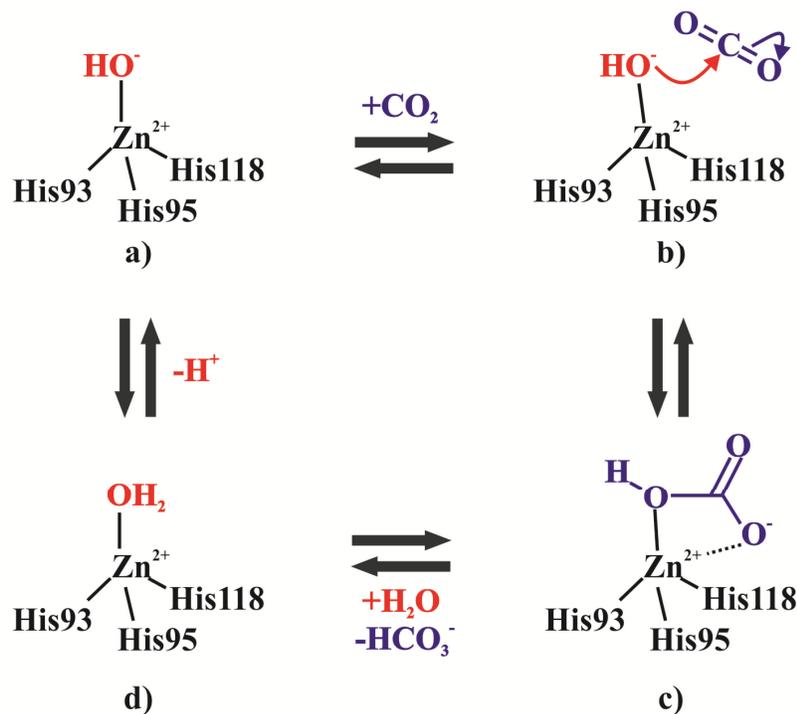


Figura 2. Mecanismo enzimático da anidrase carbônica. Os resíduos de histidina são representados por His, seguidos do número do aminoácido na sequência da proteína.

2.1.2. Aspectos Químicos

A anidrase carbônica bovina é uma proteína monomérica, de cadeia única, com peso molecular intermediário (29089 Da), apresentando um pI de 5,85. Além disso, grupos fosfato ou frações glicídicas não estão presentes em sua estrutura. A sequência de aminoácidos está disponível em banco de dados para a maioria das isoformas conhecidas. O preparo da enzima sem o íon

metálico (apo-enzima) requer procedimentos simples, o que permite o estudo da substituição do zinco por outros íons (Krishnamurthy, *et al.*, 2008).

A afinidade ao metal é determinada pelas interações entre os aminoácidos que se ligam ao metal e o íon metálico. A avaliação destas interações pode ser realizada por meio de mutagênese sítio direcionada. Nesta técnica, um oligonucleotídeo sintetizado quimicamente, contendo as alterações de bases nitrogenadas desejadas, hibridiza-se com o DNA da célula hospedeira. Esta célula hospedeira deve ser de fácil manipulação, crescimento rápido e constituição genética bem conhecida, podendo ser utilizadas bactérias, leveduras ou células de culturas de tecidos de mamíferos e insetos. Assim, o gene alterado será codificado junto com o genoma da célula hospedeira e cópias serão produzidas por ação da enzima DNA polimerase, oriunda da célula hospedeira. Após a expressão do segmento gênico alterado, a proteína contendo as modificações de aminoácidos desejadas pode ser purificada e posteriormente caracterizada empregando-se usualmente cromatografia líquida e cristalografia de raios-X (Voet, *et al.*, 2014).

Três fatores contribuem para a afinidade da anidrase carbônica ao metal: (I) a natureza dos ligantes do metal na enzima; (II) a rede de ligações de hidrogênio e (III) os resíduos hidrofóbicos ligados às histinas do sítio ativo (Hurst, *et al.*, 2010).

Grandes alterações na afinidade de metal ocorrem na mudança dos resíduos que constituem o sítio metálico. A substituição de histidina do sítio ativo por alanina diminui a afinidade da enzima pelo metal por, aproximadamente, 10^5 vezes (Hurst, *et al.*, 2010). Por outro lado, a criação de um quarto ligante na esfera de coordenação do metal na anidrase carbônica, substituindo a treonina (Thr 197) por glutamato, aumenta a afinidade ao metal em aproximadamente 200 vezes (Ippolito, *et al.*, 1995).

A mudança de um aminoácido pode alterar as ligações de hidrogênio entre os resíduos da proteína. Foi observado que a afinidade a zinco foi reduzida em 40 vezes, ao substituir a glutamina (Gln 91) e o ácido glutâmico (Glu 116) por alanina que fazem ligação de hidrogênio com duas histidinas do sítio ativo (His93 e His 95). Com esta modificação, a atividade enzimática é 2,5 vezes menor em comparação com a anidrase não mutada (Kiefer, *et al.*, 1995).

Alterações nos resíduos hidrofóbicos que se ligam às histidinas que coordenam o zinco diminuem a afinidade da anidrase pelo metal por aproximadamente 100 vezes. As alterações na estrutura da enzima são significativas de tal maneira que as cadeias laterais de histidina não são orientadas corretamente para se ligar de zinco (Cox, *et al.*, 2000).

Com a evolução, a estrutura da anidrase carbônica foi selecionada para ligar Zn^{2+} na presença de uma variedade de potenciais interferentes celulares, incluindo: Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} e Cu^{2+} . A afinidade entre metal e proteína segue a série de Irving-Williams, embora a afinidade do zinco aumente significativamente em comparação com os demais metais de transição (Hurst, *et al.*, 2010). O cobre poderia competir com o zinco pela ligação à anidrase carbônica, já que a afinidade deste metal pela enzima é 10 vezes maior do que o zinco. Porém, estima-se que a concentração de cobre no meio celular seja 1000 vezes menor do que a concentração de zinco (Finney e O'Halloran, 2003).

2.1.3. A importância biológica da anidrase

Nos mamíferos, foram identificadas 16 isoformas de α -AC, com diferentes funções, localização celular e distribuição tecidual (Tabela 1).

Existem 7 isoformas citosólicas (α -AC I, α -AC II, α -AC III, α -AC VII, α -AC VIII, α -AC X e α -AC XIII), 5 isoformas ligadas à membrana (α -AC IV, α -AC IX, α -AC XII, α -AC XIV, e α -AC XV), duas mitocondriais (α -AC VA e α -AC VB) e duas secretadas (α -AC VI e α -AC XI). As isoformas α -AC VIII, α -AC X e α -AC XI não realizam a catálise enzimática e suas funções fisiológicas permanecem desconhecidas (McDevitt e Lambert, 2011).

Tabela 1. Isoformas de anidrase carbônica associadas às funções e localização celular.

Isoforma	Função	Localização celular	Referência
CA I	Envolvida na respiração e na regulação da homeostase ácido-base nos rins. Envolvida na precipitação do cálcio nos ossos.	Citosol	Supuran <i>et al.</i> , 2003 e Chang, <i>et al.</i> , 2012
CA II	Envolvida na respiração, na regulação da homeostase ácido-base nos rins (troca de Cl^- por HCO_3^-) e no duodeno. Envolvida na reabsorção óssea e na produção de HCO_3^- no humor aquoso.	Citosol	Supuran <i>et al.</i> , 2003; Alvarez <i>et al.</i> , 2005 e Sterling <i>et al.</i> , 2001
CA III	Abundante nos tecidos musculares esqueléticos.	Citosol	Staunton <i>et al.</i> , 2005
CA IV	Envolvida na respiração e na regulação da homeostase ácido-base nos rins (troca de Cl^- por HCO_3^-). Envolvida na regulação entre Na^+ e HCO_3^- na região da retina.	Ligada à membrana	Supuran <i>et al.</i> , 2003; Sterling <i>et al.</i> , 2002 e Yang, <i>et al.</i> , 2002
CA VA	Abundante no fígado. Envolvida na neoglicogênese, fornecendo HCO_3^- no para a piruvato descarboxilase.	Mitocôndria	Nagao, <i>et al.</i> , 1993
CA VB	Abundante no pâncreas, rins, medula espinhal e glândulas salivares.	Mitocôndria	Adachi, <i>et al.</i> , 1999
CA VI	Presente nas lágrimas, saliva e leite materno.	Secretada	Pilka, <i>et al.</i> , 2012
CA VII	Abundante no cérebro. Envolvida nos estímulos neuronais de alta frequência.	Citosol	Ruusuvuori, <i>et al.</i> , 2004

Tabela 1. Continuação.

CA VIII	Presente em doenças como ataxia cerebelar e síndrome de desequilíbrio, causadas por mutações gênica.	Citosol	Türkmen, <i>et al.</i> , 2009
CA IX	Abundante em tumores renais, pulmonares e cervicais.	Ligada à membrana	Pastorekova e Zavada, 2004
CA X	Abundante no sistema nervoso central e medula espinhal.	Citosol	Taniuchi, <i>et al.</i> , 2002
CA XI	Abundante no cérebro, na medula espinhal e na tireóide.	Secretada	Taniuchi, <i>et al.</i> , 2002
CA XII	Abundante no endométrio, cólon e pâncreas. Abundante em tumores renais e pulmonares.	Ligada à membrana	Vullo, <i>et al.</i> , 2005 e Kobayashi, <i>et al.</i> , 2012
CA XIII	Abundante no cérebro, rins, pulmões, colo uterino e testículos.	Citosol	Lehtonen, <i>et al.</i> , 2004
CA XIV	Envolvida na regulação da acidificação renal e na transmissão sináptica.	Ligada à membrana	Kaunisto, <i>et al.</i> , 2002 e Parkkila, <i>et al.</i> , 2001
CA XV	Identificada em rins de ratos. Única isoforma que não é encontrada em humanos ou bovinos.	Ligada à membrana	Hilvo, <i>et al.</i> , 2005

Como se pode perceber por meio da Tabela 1, a anidrase carbônica é uma enzima onipresente nos tecidos dos mamíferos (Chegwidden, *et al.*, 2000). Tendo em vista as várias funções fisiológicas das 16 isoformas de anidrase, serão detalhadas, a seguir, as funções fisiológicas da isoforma II dos eritrócitos, a qual foi empregada neste trabalho.

A anidrase presente nos eritrócitos atua em duas funções respiratórias: o transporte de O_2 e o transporte de CO_2 durante a respiração. Os eventos de reação química e difusão no tecido são apresentados na Figura 3.

Na inspiração, a hemoglobina se liga ao oxigênio, sendo este transportado para os tecidos, os quais apresentam uma elevada necessidade de O_2 para realização de diversos processos metabólicos celulares. Durante esses processos, grandes teores de íons hidrogênio e CO_2 são gerados. Estas duas formas químicas potencializam a liberação de O_2 , uma vez que a afinidade de ligação entre hemoglobina e oxigênio é inversamente relacionada à acidez e a concentração de CO_2 (Efeito Bohr). Neste aspecto, a anidrase carbônica acelera a mudança de pH no citoplasma dos eritrócitos, aumentando a liberação de O_2 nos tecidos (Chegwidden, *et al.*, 2000).

O processo de transporte de CO_2 inicia-se com a difusão molecular do CO_2 , no sentido dos tecidos para os capilares sanguíneos e, subsequentemente, para os eritrócitos por meio do gradiente de pressão parcial do CO_2 . Nos eritrócitos, o CO_2 é hidratado em HCO_3^- , no processo catalisado pela AC. Os íons bicarbonatos produzidos são liberados para fora da célula, por meio da proteína transmembrana banda 3, enquanto o hidrogênio produzido pela reação se liga ao sítio ativo da hemoglobina. Estes processos de remoção dos produtos finais da hidratação do CO_2 permitem uma quantidade máxima de CO_2 a ser transportado pelo sangue (Esbaugh e Tufts, 2006).

A maior fração de CO_2 transferido ao sangue pelos tecidos e liberada nos alvéolos é transportada nos vasos sanguíneos na forma de bicarbonato, (aproximadamente 85%). O restante é transportado como CO_2 dissolvido (5%) ou ligado quimicamente à hemoglobina (10%) (Chegwidden, *et al.*, 2000).

Nos pulmões, a grande quantidade de O_2 no eritrócito reduz a capacidade da hemoglobina em se ligar a prótons, resultando no Efeito de Haldane, ou seja, o aumento da tendência do CO_2 deixar o sangue, conforme aumenta a saturação da hemoglobina pelo oxigênio. Os prótons liberados pela hemoglobina são consumidos na reação de desidratação da AC para liberação do CO_2 molecular (Esbaugh e Tufts, 2006).

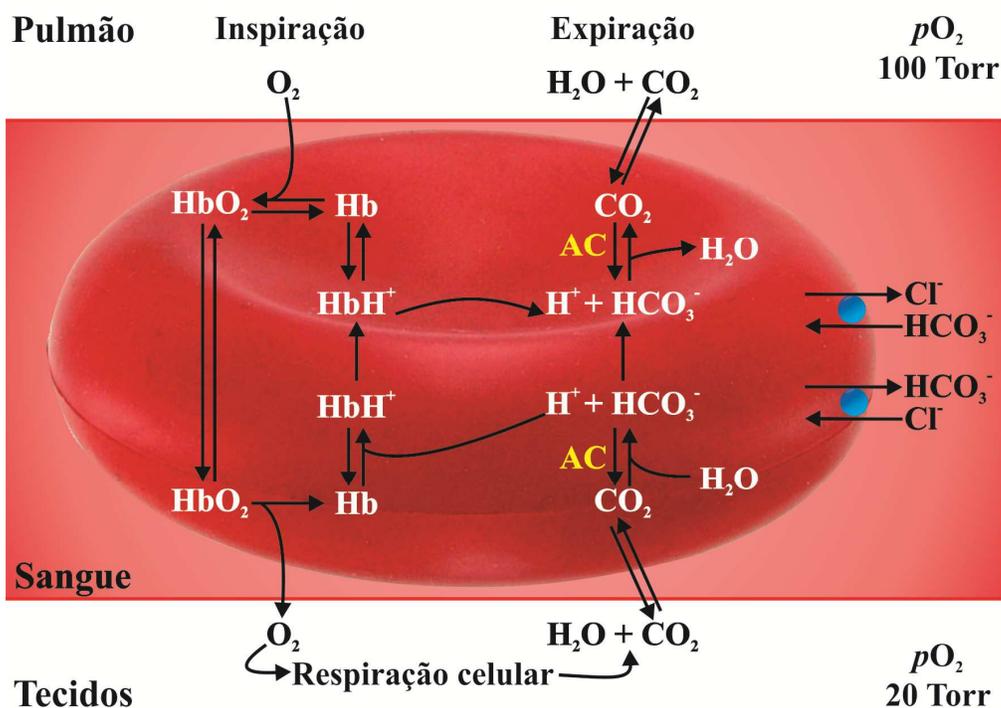


Figura 3. O papel da anidrase (BCA) e da hemoglobina (Hb) no transporte de O_2 e CO_2 . Em azul, está representada a proteína transmembrana banda 3, e, em amarelo, a anidrase carbônica (Adaptado de Esbaugh e Tufts, 2006).

2.2. Análise de especiação

O desenvolvimento da especiação na comunidade científica deu origem às seguintes definições, aprovadas pela União Internacional da Química Pura e Aplicada (IUPAC, do Inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*). A análise de especiação “*representa a atividade analítica de identificação e / ou medição da quantidade de uma ou mais espécies químicas individuais numa amostra*”. A espécie química faz inferência à “*forma específica de um elemento químico, definido como a composição isotópica, estado de oxidação ou eletrônico, e/ou estrutura molecular ou complexa*” (Templeton, *et al.*, 2000).

As aplicações bioinorgânicas são uma tendência atual em análise de especiação, particularmente na análise de especiação elementar de biomoléculas (Jitaru e Barnante, 2006). O principal foco destas aplicações são os estudos sobre proteínas que possuem como co-fatores metais ou metaloides, o que caracteriza estas biomoléculas como metaloproteínas. Estes co-fatores, em caráter especial, são fundamentais para metaloproteínas, porque podem determinar a estrutura ou influenciar a reatividade de uma biomolécula (Meermann e Sperling, 2012).

A importância biológica dos estudos de metais e metaloides ligados às biomoléculas é amplamente destacada na literatura científica. Para citar apenas um exemplo, cabe mencionar que metais desempenham uma função crucial no sistema nervoso central, estando envolvidos na manutenção e desenvolvimento da neurotransmissão, na atividade enzimática, na função mitocondrial, além da aprendizagem e memória (Duce e Bush, 2010). O desequilíbrio dos mecanismos homeostáticos que regulam os metais essenciais, e/ou a absorção de metais tóxicos sem função biológica conhecida

alteram o equilíbrio iônico e podem resultar em doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Alzheimer e Parkinson. Atualmente, sugere-se que os íons metálicos possam afetar a agregação de proteínas e a formação de fibrilas protéicas. Estes eventos são observados no enovelamento incorreto das proteínas em doenças neurodegenerativas (Breydo e Uversky, 2011). Assim, compreender as interações estruturais e funcionais dos íons metálicos ligados às biomoléculas demonstra ser um aspecto essencial na compreensão de determinadas patologias. Neste contexto, é fundamental ter uma visão clara da ação que os elementos químicos apresentam nos processos fisiológicos (Malgieri e Grasso, 2014).

Outro exemplo da aplicação da análise de especiação em processos fisiológicos é demonstrado na avaliação de espécies de selênio em amostras de urina, empregando-se a técnica de ICP-MS e hifenada com a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*). Com um preparo de amostra extremamente simples e eficiente, empregando-se apenas centrifugação, diluição em solução tampão e filtração, foi possível identificar e quantificar a espécie de selenocistina, após um período de ingestão de castanhas-do-pará de 15 dias. Este metabólito foi excretado de forma mais abundante na urina feminina, sendo 1,7 vezes superior ao observado na urina masculina. Os autores abrem perspectivas de trabalhos futuros que serão desenvolvidos para elucidar os mecanismos envolvidos na excreção de selênio (Silva, *et al.*, 2013).

Após destacar a importância biológica da análise de especiação, serão consideradas as questões analíticas sobre este assunto. Em primeiro lugar, cabe mencionar que o preparo de amostra é a etapa chave da análise de especiação, uma vez que as maiores perdas de analitos e/ou as modificações da forma como a espécie química se apresenta são verificadas nesta etapa,

levando a erros sistemáticos na determinação da concentração do analito (Zenkevich e Makarov, 2006).

Os métodos tradicionais de preparo de amostra podem utilizar a hidrodestilação, extração Soxhlet, extração líquido-líquido e extração em fase sólida. Além de consumir tempo, estes métodos possuem várias etapas que podem trazer prejuízos à recuperação de analitos e o uso de uma grande quantidade de solventes. Diante destes motivos, métodos com menor tempo na etapa de preparo de amostra e menor geração de resíduos vêm sendo investigados e introduzidos na literatura (Mester, *et al.*, 2001). Uma estratégia inovadora que emprega estes novos requisitos foi proposta no trabalho de Silva, *et al.* (2012), o qual emprega uma fibra de microextração em fase sólida acoplada ao forno de grafite de um espectrômetro de absorção atômica, sendo possível quantificar Se^{4+} em um espectrômetro de massas hifenado a um cromatógrafo à gás em amostras de água, plâncton e medicamentos.

Além do preparo de amostras, as abordagens mais aplicadas na análise de especiação envolvem três etapas: (I) a separação, por meio da cromatografia líquida e da eletroforese em gel ou capilar; (II) a identificação da biomolécula, por meio da ressonância magnética nuclear ou da espectrometria de massas com fontes de ionização dos tipos ESI (do inglês, *electrospray ionization*) ou MALDI (do inglês, *matrix ablation laser desorption ionization*); e (III) a detecção do metal, por meio das técnicas de ICP OES (do inglês, *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*) e ICP-MS (do inglês, *inductively coupled plasma mass spectrometry*) (Lobinski e Szpunar, 1999).

Destas três etapas, a separação pode ser considerada a condição limitante à compreensão da interação entre metais e biomoléculas (Barnett, *et al.*, 2012). A maioria dos metais está coordenada às proteínas, por meio de

aminoácidos que constituem os sítios de ligação, localizados em diferentes regiões da proteína. Assim, estes complexos protéicos de coordenação tornam-se muito lábeis e susceptíveis às mudanças nas conformações das proteínas (Deitrich, *et al.*, 2010).

Mesmo os métodos mais empregados atualmente para a análise de especiação, apresentam certas limitações, no tocante à avaliação de metais ligados a proteínas. Nas separações eletroforéticas, a principal limitação está nas condições físico-químicas de separação, as quais podem modificar a estrutura da proteína, levando à liberação do metal (Deitrich, *et al.*, 2010). Em separações cromatográficas, os problemas mais comumente enfrentados são a interconversão de espécies com diferentes estados de oxidação e a alteração da distribuição de íons metálicos, fracamente ligados às moléculas biológicas (Wolf, *et al.*, 2011; Lund, 1990). Assim, nota-se que existe uma demanda importante por técnicas analíticas capazes de enfrentar os problemas inerentes à análise de especiação.

Na presente tese, as potencialidades das técnicas de mobilidade iônica e ICP-MS foram exploradas para a análise de especiação de elementos com diferentes estados de oxidação e a avaliação de diferentes isótopos ligados à anidrase carbônica. As duas técnicas supracitadas serão discutidas a seguir.

2.3. Espectrometria de mobilidade iônica

A mobilidade de um íon em fase gasosa é medida por meio da velocidade com a qual este íon se move através de um gás inerte, sobre a influência de um campo elétrico. Esta separação é dependente da massa, da carga e seção de choque do íon (Cohen e Karasek, 1970).

2.3.1. Um breve histórico

Os primeiros relatos sobre a mobilidade iônica datam do início do século XX. Langevin (1903) foi um dos primeiros autores a descrever as interações entre íons e moléculas gasosas, e a influência do gás sobre a mobilidade do íon. Com base em sua teoria, descobria-se que íons poderiam ser separados por suas velocidades características, por meio de um campo elétrico em um meio preenchido por um gás. Cada íon se desloca a uma velocidade específica, de maneira que os íons possam ser separados em função das suas propriedades individuais e das propriedades do gás presente no meio.

A evolução da mobilidade iônica cresceu significativamente devido ao interesse no comportamento dos íons no ar, às pesquisas sobre poluição, às guerras e à exploração do espaço (Utrecht, *et al.*, 2010). Dentre os principais avanços da mobilidade iônica na primeira metade do século, destaca-se a introdução pulsada dos íons, na forma de pacotes discretos (Cravath, 1929).

Na década de 1950, McDaniel e Kebarle se notabilizaram por desenvolver as celas de difusão (*drift tube*) em baixo campo elétrico para estudar a separação de íons e pequenas moléculas na fase gasosa. Estes autores foram os primeiros a realizarem o acoplamento da mobilidade iônica com a espectrometria de massas em 1962 (McDaniel, *et al.*, 1962) e a difundirem a técnica de *Drift Time Ion Mobility Spectrometry* (DTIMS).

Além de possuir uma grande versatilidade analítica, excelentes limites de detecção, análises em tempo real e baixo custo, o desenvolvimento da espectrometria de mobilidade iônica (IMS, do inglês, *Ion Mobility Spectrometry*) atraiu grande interesse da comunidade científica até o início da década de 1970 (Karasek, *et al.*, 1976, Karasek, 1974).

Os espectrômetros de mobilidade sofreram grandes transformações, deixando de ser apenas grandes instrumentos de laboratório, passando a ser equipamentos portáteis de aplicações militares portáteis, na década de 1980. Além disso, espectrômetros de mobilidade para detecção de explosivos foram lançados a partir de 1990, sendo fundamentais para a segurança da aviação comercial (Eiceman, *et al.*, 2014).

A partir da década de 1990, a IMS tornou-se um método empregado em análises de rotina para detecção de drogas ilícitas na área forense (Dussy, *et al.*, 2008). Nesta década, observam-se avanços nas novas modalidades de mobilidade iônica, tais como a *Aspiration Ion Mobility Spectrometry* (AIMS) e *Field Assymmetric Ion Mobility Spectrometry* (FAIMS).

No início dos anos 2000, métodos empregando mobilidade iônica foram desenvolvidos para o uso em ambientes clínicos e laboratoriais. Estes analisadores forneceram informações oportunas e valiosas sobre as condições médicas e/ou progresso terapêutico. Esta inovação das aplicações da mobilidade iônica foi associada, acompanhada e estimulada pelo aumento da disponibilidade de instrumentação, incluindo alguns instrumentos projetados especificamente para atender a uma demanda crescente na pesquisa farmacêutica e biomolecular (Eiceman, *et al.*, 2014).

Outra característica marcante desta última década foi o aumento na comercialização de espectrômetros de mobilidade iônica, bem como na variedade de modelos instrumentais. Dezoito empresas já oferecem instrumentos baseados em mobilidade, eliminando uma das barreiras críticas para uma presença maciça de avaliações empregando mobilidade na química analítica moderna: um acesso adequado a esta tecnologia (Eiceman, *et al.*, 2014).

Durante os últimos anos, grande parte dos espectrômetros de mobilidade iônica foi comercializada para usos militares e de segurança, atraindo novas empresas interessadas em disponibilizar esta tecnologia. Algumas grandes empresas de instrumentos, com amplo reconhecimento na área de química analítica, começaram a oferecer instrumentos, incluindo um componente de mobilidade para complementar as avaliações empregando a espectrometria de massas. Este desenvolvimento alterou significativamente a visibilidade da mobilidade iônica dentro da química e de outras comunidades científicas (Eiceman, *et al.*, 2014).

O início desta nova tendência na comercialização pode ser atribuído ao acoplamento entre uma fonte de *electrospray*, com um espectrômetro do tipo FAIMS e um espectrômetro de massas (Guevremont e Purves, 1999). Este instrumento foi originalmente desenvolvido pela Ion Analytics, empresa posteriormente adquirida pela ThermoScientific. O FAIMS foi utilizado como um filtro de íons na identificação de produtos farmacêuticos e de metabólitos de drogas e comercializado em conjunto com um cromatógrafo líquido hifenado ao espectrômetro de massas (Kapron, *et al.*, 2005).

Outra grande empresa, a Waters Corporation, foi pioneira no desenvolvimento de um novo método de mobilidade iônica, denominado *travelling wave*, comercializado com um espectrômetro de massas por tempo de voo (ToF, do inglês, *Time of Flight*), modelo denominado como Synapt (Schenauer e Leary, 2009). Este instrumento teve um efeito surpreendente e benéfico sobre a espectrometria de mobilidade iônica, fornecendo novos recursos aos pesquisadores interessados em estudos envolvendo biomoléculas. A comercialização deste instrumento foi destinada ao mercado das empresas do ramo biomolecular e farmacêutica, bem como para a detecção de agentes de guerra química e explosivos. As versões seguintes dos espectrômetros de

movilidade iônica foram miniaturizadas, apresentando análises mais rápidas e seletivas do que os primeiros modelos comercializados (Eiceman, *et al.*, 2014).

Desenvolvida a partir de 2004, a modalidade de mobilidade iônica *Travelling Wave Ion Mobility Spectrometry* (TWIMS) foi utilizada neste trabalho e será discutida a seguir.

2.3.2. Princípios da TWIMS

Na IMS, um fluxo constante de íons dentro da série de pacotes de íons que foram trapeados percorre a cela de mobilidade iônica, a qual é preenchida com um gás inerte. Nesta cela, um campo elétrico uniforme e baixo é aplicado, de maneira que o processo de migração dos íons seja dominante. A velocidade dos íons (v_d , cm s⁻¹) é diretamente proporcional à intensidade do campo elétrico (E , V cm⁻¹), conforme a equação 1:

$$v_d = KE \quad \text{eq. 1}$$

onde K é a constante de mobilidade iônica (K , cm² s⁻¹ V⁻¹). Como as medidas de mobilidade ocorrem em função do tempo (t_d , s) que um íon leva para percorrer a cela de mobilidade (d , cm), a equação 1 pode ser rearranjada:

$$K = \frac{d}{t_d E} \quad \text{eq. 2}$$

A mobilidade é característica para cada íon e depende de vários fatores. A temperatura e pressão do gás devem ser uniformes e a densidade de espécies iônicas deve ser suficientemente baixa para que as repulsões coulômbicas sejam

ignoradas. Além disso, fatores como a densidade (N) e a massa do gás (m) influenciam na mobilidade iônica, bem como a massa (M), a carga (q) e a seção de choque do íon (Ω). Assim, a mobilidade iônica pode ser definida:

$$K = \frac{3q}{6N} \left(\frac{2\pi}{k_b T} \right)^{\frac{1}{2}} \left(\frac{m+M}{mM} \right)^{\frac{1}{2}} \frac{1}{\Omega} \quad \text{eq. 3}$$

onde k_b é a constante de Boltzmann e T é temperatura na cela de difusão.

2.3.3. Instrumentação da TWIMS

Instrumentos de mobilidade do tipo TWIMS estão comercialmente disponíveis nos modelos Synapt HDMS (Waters Co.). Nos primeiros trabalhos, a seção de TWIMS localizava-se entre a fonte de ionização e o quadrupolo de um espectrômetro de massas híbrido, do tipo Q-ToF (Thalassinos, *et al.*, 2004). Este desenho foi alterado pela Waters, de maneira que a seção de TWIMS ficasse posicionada entre o quadrupolo e o ToF. Esta configuração mostrou uma alta eficiência de transmissão de íons e um poder de separação comparável às celas de difusão convencionais (Pringle, *et al.*, 2007).

A cela de mobilidade iônica engloba três setores distintos (Figura 4). O primeiro setor atua como um *trap*, usado para acumular íons, e, em seguida, propelir a entrada pulsada de íons no próximo setor. O segundo setor constitui o espectrômetro de mobilidade iônica (IMS), preenchido com gás (geralmente N_2), no qual será realizada a separação das espécies. O terceiro setor, denominado *transfer*, é utilizado para transmitir os íons ao analisador por

tempo de voo, por meio de aceleração ortogonal. *Trap* e *transfer* são preenchidos com argônio, podendo ser usados na realização de experimentos nos quais os fragmentos de um íon (produzidos no *trap*) são separados por mobilidade ou, alternativamente, onde os íons separados por mobilidade iônica são posteriormente fragmentados no *transfer* (Pringle, *et al.*, 2007).

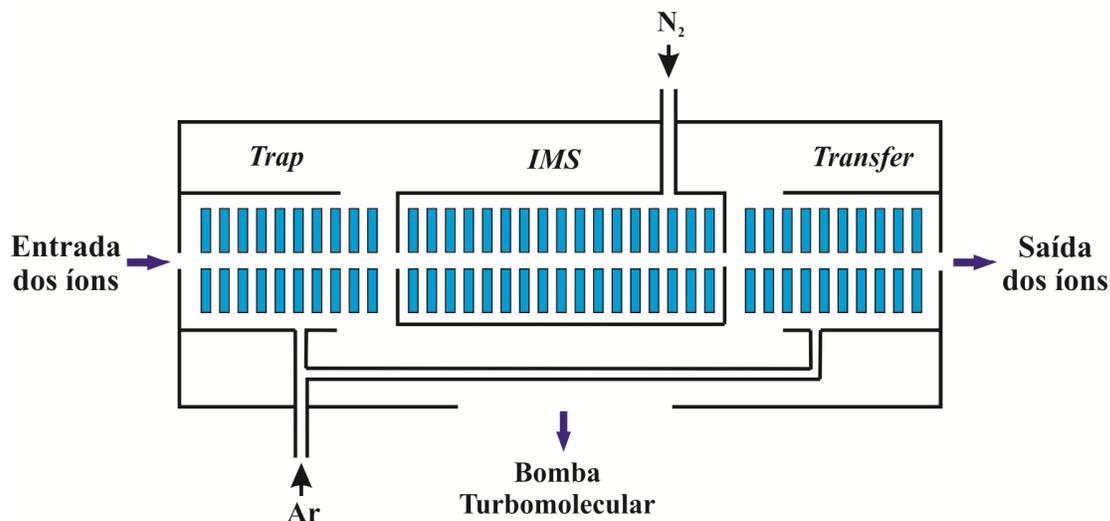


Figura 4. Esquema da célula de TWIMS do Synapt HDMS, preenchida com gás N₂ no IMS e argônio no *trap* e *transfer* (Adaptado de Pringle, *et al.*, 2007).

O TWIMS do Synapt é constituído por uma série de eletrodos planares em forma de anel (SRIG, do inglês, *stacked ring ion guides*), dispostos em um plano ortogonal ao eixo de transporte de íons. Assim, os íons passam pelo interior dos eletrodos (Figura 5), em movimento axial. Fases opostas de uma tensão de RF são aplicadas a eletrodos adjacentes e fornecem uma barreira de potencial efetiva de confinamento dos íons. Para propeler os íons, uma voltagem transiente DC é sobreposta à RF, aplicada a um par de eletrodos adjacentes numa sequência repetitiva ao longo da célula de mobilidade. A série

de potenciais gerados é posteriormente aplicada para o próximo par de eletrodos, em intervalos regulares de tempo fornecendo uma sequência contínua de *travelling waves*. Os SRIGs usados na cela de mobilidade tem aberturas de transmissão de íons de 5mm de diâmetro, 0,5 mm de espessura do eletrodo e um espaçamento de 1,5 mm. A tensão de RF é usada em uma frequência de 2,7 MHz e amplitude variável de até 400V (Giles, *et al.*, 2004).

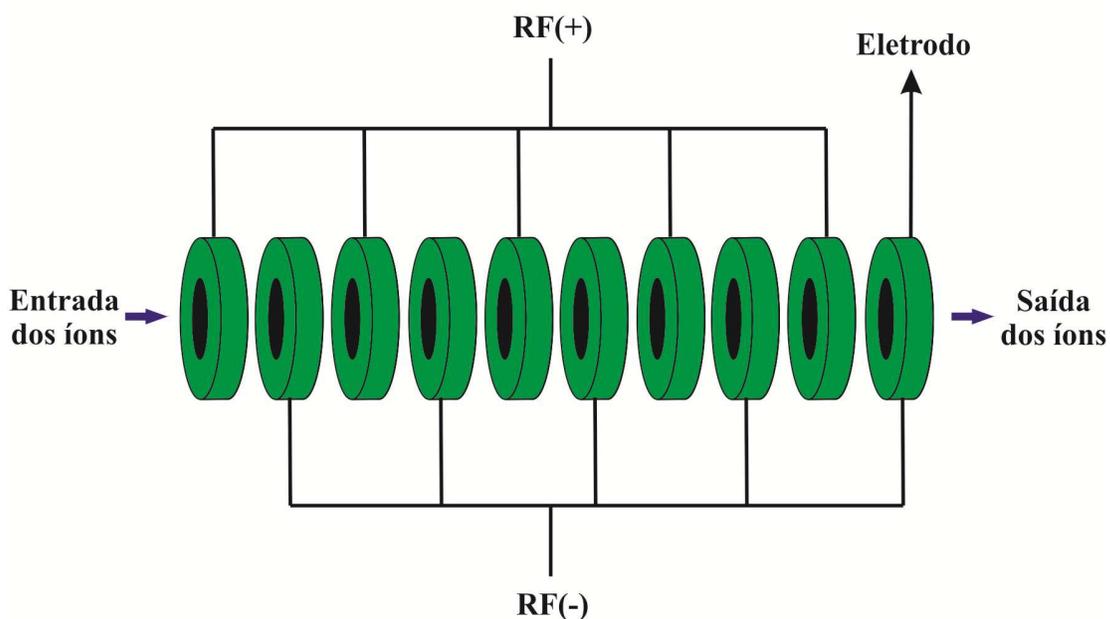


Figura 5. Guia de íons responsável pelo funcionamento da técnica de TWIMS (Adaptado de Pringle, *et al.*, 2007).

Uma vantagem do TWIMS é a possibilidade de promover a dissociação induzida por colisão (CID, do inglês *collision induced dissociation*), empregando-se argônio como gás de colisão. Uma grande possibilidade de experimentos pode ser realizada neste equipamento, tais como:

1. Separação por mobilidade iônica no TWIMS e fragmentação subsequente de esses íons no *transfer*;
2. Fragmentação de íons no *trap* e separação subsequente por mobilidade iônica de íons produtos nos TWIMS;
3. Fragmentação de íons no *trap*, separação por mobilidade dos fragmentos na cela de TWIMS, e uma segunda fragmentação no *transfer*.

Este último procedimento é semelhante ao de um experimento MS³, com a diferença de que todos os íons produtos (MS² e MS³) são registrados ao mesmo tempo (March e Todd, 2010). Os diferentes modos de operação do instrumento Synapt são resumidamente apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Operação dos setores de TWIMS e modelos de experimentos.

<i>Trap</i>	IMS	<i>Transfer</i>	Experimento
Fragmentação			MS/MS
		Fragmentação	MS/MS
	Mobilidade		Mobilidade
Fragmentação	Mobilidade		MS/MS - Mobilidade
	Mobilidade	Fragmentação	Mobilidade - MS/MS
Fragmentação	Mobilidade	Fragmentação	MS/MS - Mobilidade - MS/MS

Ao contrário dos equipamentos de mobilidade iônica convencionais, nos quais um campo elétrico contínuo é aplicado em toda cela de difusão, no

TWIMS, um campo elétrico RF é aplicado em par de eletrodos planares, como um segmento, e sequencialmente arrastado pela cela de mobilidade por meio da sobreposição de um potencial de corrente direta (DC). Assim um campo elétrico em forma de *travelling wave* é gerado, no qual os íons podem acompanhar este potencial, reduzindo o seu tempo de residência na célula. Assim, a separação dos mesmos ocorrerá por mobilidade iônica devido ao choque com o gás (Pringle, *et al.*, 2007). Na Figura 6, os íons com maior carga (representado com carga 2+) migram mais rápido do que íons com menor carga (1+). Além disso, é possível observar a influência do volume do íon sobre a mobilidade das espécies, uma vez que íons menos volumosos (identificados por esferas pretas e vermelhas) apresentam migram mais rápido pela cela de mobilidade que íons mais volumosos (esferas azuis).

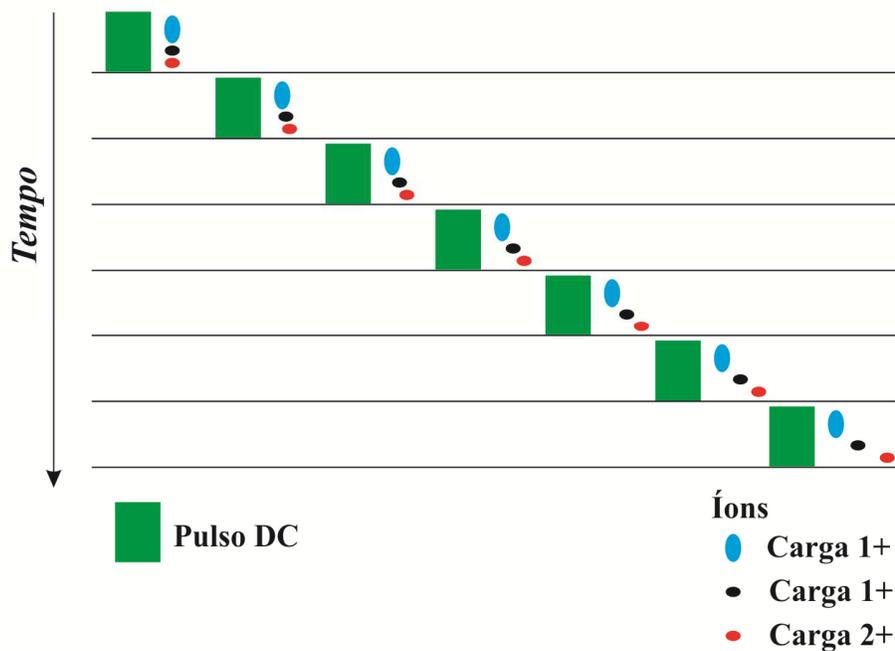


Figura 6. Movimento dos íons após o pulso elétrico (Adaptado de Pringle, *et al.*, 2007).

2.3.4. Algumas aplicações da TWIMS

O acoplamento entre a mobilidade iônica e a espectrometria de massas, muitas vezes denominado como IMMS (do inglês, *Ion Mobility Mass spectrometry*), apresenta-se como uma ferramenta analítica muito útil na identificação, elucidação estrutural e separação de compostos isoméricos. Sua principal característica é acrescentar uma dimensão adicional para separar misturas de compostos químicos, isômeros, e, mais recentemente, proteínas ou peptídeos (Utrecht, *et al.*, 2010).

Uma recente aplicação da TWIMS ocorre na área da Biologia Estrutural, especialmente na investigação das propriedades estruturais das proteínas e/ou conjuntos de proteínas. Nesta área, o principal objetivo das pesquisas é a manutenção da proteína na sua forma intacta e sua interação com outras proteínas (Heck, e Van Den Heuvel, 2004; 26, Ruotolo, *et al.*, 2005).

Um exemplo é observado no trabalho de Smith, *et al.* (2007), no qual a TWIMS foi empregada com êxito na análise de isômeros conformacionais de proteínas que diferem em secção transversal. A proteína β_2 -microglobulina (β_2m) atrai grande interesse por ser a responsável pela amiloidose. Esta doença é caracterizada pelo acúmulo de fibrilas em vários tecidos, originadas pelo desenovelamento da proteína, seguido de auto-agregação. Uma titulação da β_2m na faixa de pH entre 2 e 7 permitiu a identificação e separação dos isômeros durante todo o processo de desnaturação. Em pH 6,23, apenas a forma enovelada da proteína, a qual não está relacionada a doença, foi identificada. Em pH 4,28, observou-se a forma parcialmente enovelada da β_2m , enquanto que a forma desenovelada foi verificada em pH 2,6. Ambos isômeros, parcialmente enovelado e desenovelado, podem estar envolvidos na formação de fibrilas e na agregação das proteínas. Os resultados deste trabalho

mostram que a técnica de TWIMS pode auxiliar a descoberta dos mecanismos de enovelamento de proteínas envolvidas em doenças.

Para destacar as potencialidades da técnica, a Tabela 3 apresenta trabalhos que utilizam a TWIMS para diversas finalidades e para uma grande variedade de analitos. Ainda que a grande maioria dos trabalhos publicados envolva proteínas e peptídeos, são observadas aplicações na separação de lipídeos, carboidratos e ácidos nucléicos. O interesse econômico sobre esta técnica também é ressaltada, por meio da sua aplicação em diferentes setores industriais como o farmacêutico, o bélico e o químico.

Tabela 3. Aplicações da *Travelling Wave Ion Mobility Spectrometry*.

Aplicações	Analitos	Objetivos	Referência
<i>Proteômica</i>			
	Amilina	Separar peptídeos por meio da seção de choque	Young, <i>et al.</i> , 2013
	Proteína do ciclo de Calvin (CP12)	Separar dois isômeros conformacionais com diferentes propriedades redox	Kaaki, <i>et al.</i> , 2013
	Capsídeos virais	Reunir informação estrutural sobre os oligômeros que compõem o capsídeo do vírus	Uetrech, <i>et al.</i> , 2011
	Transtirretina e componente amilóide P	Avaliar a compactação e dissociação de complexos protéicos	Hall, <i>et al.</i> , 2012
	Receptor Toll	Avaliar as mudanças conformacionais do receptor como resposta ao ligante Spätzle	Gangloff, <i>et al.</i> , 2008
<i>Outras biomacromoléculas</i>			
<i>Lipídeos</i>	Produtos da fragmentação de triglicerídeos	Quantificação e elucidação estrutural de lipídeos	Shah, <i>et al.</i> , 2013

Tabela 3. Continuação.

<i>Carboidratos</i>	Ácido oligogalacturônico	Identificar estruturas isoméricas	Huang, et al., 2013
<i>Nucleosídeos</i>	ATP, ADP e AMP	Avaliar a distribuição espacial dos oligonucleotídeos	Blatherwick, et al., 2013
<i>Demais aplicações</i>			
<i>Formulações Farmacêuticas</i>	2-OH-carbamazepina, 3-OH-carbamazepina e carbamazepina	Identificação estrutural de metabólitos de drogas	Cuyckens, et al., 2011
<i>Polímeros sintéticos</i>	Irganox 1010 (C ₇₃ H ₁₀₈ O ₁₂), Irganox 1076 (C ₃₅ H ₆₂ O ₃) e Irganox PS 802 (C ₄₂ H ₈₂ O ₄ S)	Separar a sobreposição dos íons dos agentes estabilizadores do polipropileno	Barrere, et al., 2012
<i>Petrolêômica</i>	Ácido linoléico, ácido oléico e éster metílico de ácido graxo	Separar compostos polares de combustíveis e aditivos	Fasciotti et al., 2013
<i>Armas químicas</i>	Sarin, soman, tabun e ciclohexilsarin	Separar a mistura dos compostos	D'Agostino e Chenier, et al., 2010

2.4. ICP-MS

Apesar da sua ampla faixa analítica, a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado tem sido usada para determinação de elementos em baixas concentrações, mesmo quando outras técnicas espectroscópicas podem ser utilizadas, tais como a absorção atômica com chama e/ou eletrotérmica e ICP OES (Thomas, 2008; Montaser, 1982).

O crescente interesse por esta técnica pode ser atribuído ao alto poder de resolução, à seletividade, à rapidez nas análises e a boa precisão. Além disso, cabe ressaltar a robustez da análise multi-elementar, a qual permite avaliar a maioria dos elementos químicos da tabela periódica em uma única varredura com precisões comparáveis à determinação mono-elementar. Os baixos limites de detecção obtidos e a capacidade de fornecer resultados a cerca da composição isotópica tornam esta técnica ainda mais atraente para identificação e quantificação de espécies (Oliveira, 2006).

A técnica se baseia na medida da razão massa/carga (m/z) dos íons produzidos em um plasma. A elevada temperatura deste plasma (aproximadamente 10000 K) é responsável pela dessolvatação, vaporização, atomização e ionização dos constituintes de uma amostra, que pode ser sólida, líquida ou gasosa. Os íons formados são transferidos para uma região de alto vácuo e focalizados em um feixe por meio de lente iônica. Assim, os íons atingem o analisador de razão massa/carga (m/z), onde são separados, e, posteriormente, seguem em direção ao detector (Broekaert, 2002).

Os elementos detectados por ICP-MS podem estar sob qualquer forma, desde íons livres em solução até complexos de coordenação com proteínas, ácidos húmicos e carboidratos (Sanz Medel, *et al.*, 2003). São encontrados vários exemplos na literatura em que o ICP-MS é empregado na detecção e

quantificação de íons metálicos ligados a biomoléculas. Neste aspecto, um grande desafio é a produção de biomoléculas marcadas com diferentes isótopos, como opção para a quantificação absoluta das proteínas (Vanhaecke e Degryse, 2012).

Como exemplo desta abordagem, pode-se citar a medição exata da transferrina deficiente em carboidratos (TDC), a qual é necessária na calibração de analisadores clínicos. Esta proteína está diretamente relacionada ao consumo crônico de álcool. Frequentemente, os resultados dos ensaios enzimáticos atuais de quantificação das TDCs são descartados, porque as TDCs podem não são obtidas quando amostras de soro sofrem enzimólise. Uma alternativa mais útil para a análise quantitativa exata e precisa é a análise de diluição isotópica. Com este propósito, o padrão sintetizado de transferrina, marcado com ^{57}Fe , foi desenvolvido e o método de diluição isotópica forneceu uma rápida quantificação de cinco isoformas de transferrina, em soro humano, com excelente precisão, exatidão, sensibilidade e seletividade (Busto, *et al.*, 2006).

2.4.1 Diluição isotópica

A diluição isotópica (ID, do inglês, *isotope dilution*) é empregada em análises que demandam elevado grau de precisão e exatidão, como, por exemplo, a certificação dos materiais de referência, e no contexto da tecnologia nuclear. A ID é aceita internacionalmente como um "método primário de medição", sendo que as possíveis fontes de erro são bem conhecidas e geralmente estão sob controle (De Bievre, 1994).

Na análise por ID, uma amostra com concentração desconhecida do analito e composição isotópica natural conhecida é misturada com uma

quantidade conhecida de um dos isótopos do analito. Quando a mistura atinge o equilíbrio, a mesma apresenta uma nova razão isotópica. Esta abordagem requer que o elemento a ser determinado tenha, ao menos, dois isótopos mensuráveis por ICP-MS. Para elementos como o zinco, que apresentam cinco isótopos estáveis, apenas dois isótopos podem ser selecionados para análise por ID, sendo um isótopo de referência e um enriquecido. Um exemplo desta abordagem é mostrado esquematicamente na Figura 7, na qual o isótopo ^{67}Zn é enriquecido e o isótopo ^{68}Zn é utilizado como referência (Vanhaecke e Degryse, 2012). No exemplo hipotético desta figura, a amostra original apresentou uma razão $^{67}\text{Zn}/^{68}\text{Zn}$ igual a 0,3332, e, após o enriquecimento, a razão $^{67}\text{Zn}/^{68}\text{Zn}$ foi igual a 1.

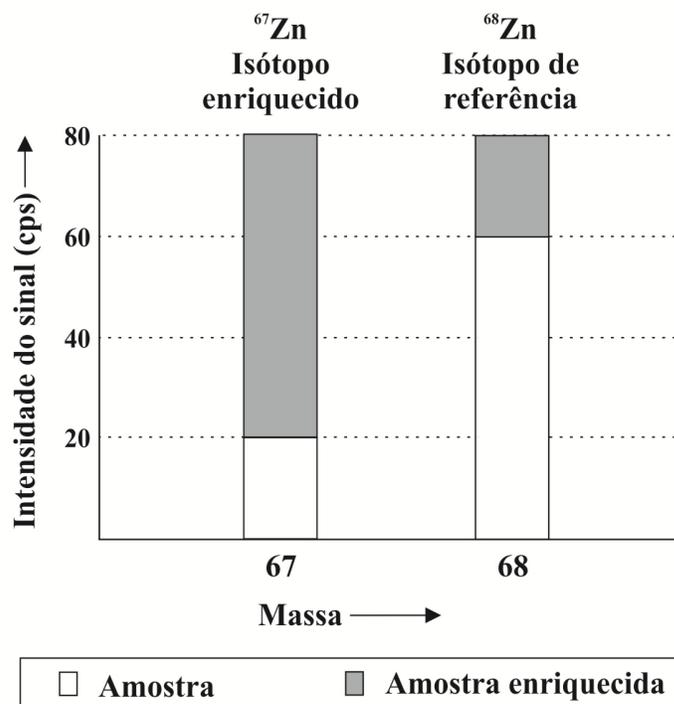


Figura 7. Diagrama esquemático representando a análise de diluição isotópica do zinco. Nota-se que o isótopo ^{67}Zn utilizado no enriquecimento possuía cerca de 33,32% de ^{68}Zn .

A técnica de ID permite a medição de uma razão isotópica (R). Esta razão isotópica da amostra não é significativamente alterada por processos de separação química subsequentes no pré-tratamento da amostra. Assim, mesmo que a ocorra a perda de amostra durante o procedimento, o resultado analítico na ID não é afetado (Fassett e Paulsen, 1989).

A medida da razão isotópica permite a determinação da concentração do analito (Ca) na amostra, uma vez que as demais variáveis são conhecidas, por meio da equação:

$$Ca = Ce \frac{Me}{Ma} \times \frac{MMa}{MMe} \times \frac{Ae}{Aa} \times \frac{Rm-Re}{1-Rm Ra} \quad \text{eq. 4}$$

onde Ce é a concentração do elemento enriquecido; Me e Ma são as massas utilizadas para o enriquecimento e da amostra, respectivamente; MMA e MMe são as massas molares do analito na amostra e do isótopo enriquecido, respectivamente; Ae é a abundância do isótopo enriquecido mais leve; Aa é a abundância do isótopo mais pesado na amostra; Rm e Re são a razão isotópica do isótopo mais pesado pelo mais leve na mistura e enriquecido, respectivamente; Ra é a razão isotópica do isótopo mais leve pelo mais pesado na amostra (Rodríguez-Gonzalez, *et al.*, 2005).

Uma condição importante para determinação dos elementos por meio de ID é o equilíbrio entre o elemento na amostra e o isótopo enriquecido. Este pré-requisito é mais facilmente obtido no caso de soluções. Amostras sólidas precisam ser completamente digeridas e, posteriormente, passam pelo equilíbrio com o isótopo enriquecido, geralmente adicionado na forma de uma

solução aquosa. (Giné e Packer, 2010). Por outro lado, se a condição de equilíbrio não é obtida, a análise pode estar sujeita ao fracionamento do isótopo enriquecido em processos de separação da amostra, produzindo resultados incorretos (Vanhaecke e Degryse, 2012).

Apesar das vantagens apresentadas, a ID está sujeita às interferências poliatômicas e isobáricas, as quais podem dificultar a medição do isótopo em um analisador de m/z quadrupolar. Assim, as interferências precisam ser cuidadosamente verificadas e contornadas. O emprego da cela de reação é uma alternativa viável para a resolução deste problema (Yip e Sham, 2007).

2.4. 2. Interferências em isótopos de zinco

A principal dificuldade na determinação de zinco é a presença de interferências isobáricas e poliatômicas (Wolf, *et al.*, 2009; Vanhaecke e Degryse, 2012). Íons moleculares de argônio, que estão sempre presentes, podem causar interferências nas medições dos isótopos de Zinco, especialmente para o isótopo ^{68}Zn , o qual está sujeito a interferência de $^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}_2^+$ e $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^{16}\text{O}^+$. Além disso, amostras contendo altos teores de enxofre podem contribuir para a formação de outros íons moleculares, os quais também podem trazer problemas à determinação (Wolf, *et al.*, 2009). Na Tabela 4, são apresentadas as principais interferências sofridas pelos cinco isótopos estáveis de zinco e os gases utilizados na cela dinâmica de reação e colisão, segundo as recomendações da PerkinElmer. Para ressaltar a dificuldade na determinação dos isótopos de zinco, foram apresentados os valores de resolução necessários para separar sinais das interferências e dos analitos, baseados nos valores de massa isotópica estabelecidos pela IUPAC (Audi, *et al.*, 2003).

Tabela 4. Interferências comuns que afetam as medições dos isótopos de zinco.

Isótopos	Massa dos isótopos de Zn	Interferências	Massa isotópica das interferências	Resolução estimada	Gases recomendados
⁶⁴Zn	63,929147	⁶⁴ Ni ⁺	63,927970	54315	NH ₃ e CH ₄
		³² S ¹⁶ O ₂ ⁺	63,961901	1952	
		³² S ₂ ⁺	63,944142	4263	
		⁴⁰ Ar ²⁴ Mg ⁺	63,947425	3498	
⁶⁶Zn	65,926037	⁴⁰ Ar ²⁶ Mg ⁺	65,944976	3481	NH ₃ , CH ₄ e H ₂
		³⁴ S ¹⁶ O ₂ ⁺	65,957697	2082	
⁶⁷Zn	66,927131	³⁴ S ¹⁶ O ₂ H ⁺	66,965522	1743	NH ₃ e H ₂
		³⁵ Cl ¹⁶ O ₂ ⁺	66,958683	2121	
⁶⁸Zn	67,924848	¹³⁶ Ba ²⁺	67,952285	2476	NH ₃ , CH ₄ e H ₂
		⁴⁰ Ar ¹⁴ N ₂ ⁺	67,968531	1555	
		⁴⁰ Ar ¹² C ¹⁶ O ⁺	67,957298	2093	
⁷⁰Zn	69,925325	⁷⁰ Ge ⁺	69,924250	65047	
		³⁵ Cl ₂ ⁺	69,937706	5648	
		¹⁴⁰ Ce ²⁺	69,952717	2553	
		⁴⁰ Ar ¹⁴ N ¹⁶ O ⁺	69,960372	1995	

Várias estratégias têm sido desenvolvidas para eliminar, estas interferências sofridas pelo zinco, tais como, o uso do plasma frio, celas de reação e colisão, equipamentos de alta resolução, equações de correção e a cromatografia de troca iônica. O plasma frio, por exemplo, foi empregado por Botha *et al.* (2005) para avaliar a razão $^{66}\text{Zn}/^{67}\text{Zn}$ em materiais certificados de gnaiss e norito. A redução da temperatura do plasma foi empregada para reduzir as interferências espectrais causadas pelos íons moleculares de argônio, porém, os isótopos que sofrem as maiores interferências não foram incluídos nesta avaliação.

Uma cela dinâmica de reação empregando CH_4 e NH_3 foi utilizada por Balcaen *et al.* (2008) para eliminar as interferências causadas pelos íons moleculares nos isótopos ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{67}Zn e ^{68}Zn . Assim, foi possível quantificar zinco em algas e crustáceos usando um ICP-MS equipado com um quadrupolo. Makishima e Nakamura (2013) desenvolveram um método para determinação da composição isotópica de zinco em meteoritos. Este método baseou-se na separação do zinco e eliminação de interferentes como o magnésio, por meio do emprego de uma resina aniônica. Além disso, um ICP-MS de alta resolução garantiu maior exatidão das medidas dos isótopos de zinco.

2.4.3 Fontes de variação na composição isotópica

Em uma primeira observação, pode-se acreditar que todos os elementos possuem uma composição isotópica invariável quando presentes na natureza (Faure e Mensing, 2007). Há, no entanto, várias razões pelas quais os elementos podem apresentar variações em sua composição isotópica natural. O uso de diluição isotópica e experimentos traçadores são baseados em medir

as mudanças induzidas na composição isotópica de um elemento. A adição de um marcador isotópico estável em um sistema natural induz uma mudança na composição isotópica de um elemento alvo.

Além das condições experimentais produzidas intencionalmente em estudos científicos, outras formas de variação na composição isotópica são (I) o decaimento radioativo; (II) a contribuição de materiais extraterrestres, como meteoritos; (III) a interação entre raios cósmicos e o material terrestre; (IV) a produção de urânio enriquecido como combustível para reatores nucleares; (V) e o fracionamento isotópico. Neste último caso, têm sido observado que diferentes isótopos de um mesmo elemento podem participar de reações bioquímicas com eficiências cinéticas ou termodinâmicas diferentes (Vanhaecke e Degryse, 2012).

As variações nas abundâncias isotópicas de Zn na natureza são amplamente exploradas e confirmadas na literatura (Cloquet, *et al.*, 2008). Grande parte destas investigações têm focado principalmente amostras geológicas e ambientais, incluindo plantas (Arnold, *et al.*, 2010; Moynier, *et al.*, 2009).

No tocante aos experimentos considerando modelos animais, cabe ressaltar o trabalho de Balter, *et al.* (2010). Foram analisados vários tecidos de ovelhas para avaliação da composição isotópica de zinco. Os resultados mostraram um enriquecimento por isótopos mais pesados nos ossos, músculos, soro e urina. Por outro lado, as fezes, as hemácias, os rins e o fígado apresentaram enriquecimento dos isótopos mais leves. O local do fracionamento isotópico entre a dieta e o soro é desconhecido, mas sugere-se que ocorra, provavelmente, no trato digestivo. Os autores deste trabalho listam dois fatores que podem atuar de forma sinérgica na distribuição heterogênea dos isótopos: (I) a presença de inibidores de absorção de Zn na dieta, tais

como o fitato (inositol hexaquisfosfato). A enzima fitase é produzida por micro-organismos do rúmen e permite aos ruminantes utilizar o fitato. A liberação parcial do Zn para o lúmen pode ser associado com os processos de fracionamento de isótopos, muito provavelmente devido à deficiência catalítica da fitase. (II) O segundo fator considera os transportadores de zinco. A cinética de absorção de zinco é realizada por meio de transporte ativo, envolvendo transportadores que facilitam a passagem de zinco pela membrana basolateral do enterócito para a circulação do sistema porta hepático (Liuzzi e Cousins, 2004). A ligação preferencial de isótopos de zinco aos transportadores também pode ocorrer, justificando a diferença isotópica entre dieta e soro. No entanto, a distribuição heterogênea de isótopos zinco entre órgãos e fluidos corporais pode ser resultado da complexação do metal por ligantes fortes. A formação de complexos com uma ampla faixa de forças de ligação, bem como alterações na coordenação do zinco, pode induzir fracionamento isotópico (Schauble, *et al.*, 2001). Assim deve ser ressaltado que mais investigações são necessárias para elucidar quais fatores podem determinar as variações observadas na composição isotópica de zinco.

Com relação a estudos envolvendo humanos, o principal alvo das pesquisas que buscam detectar variações isotópicas de zinco é o sangue (Marechal, *et al.*, 1999; Stenberg, *et al.*, 2004; Ohno, *et al.*, 2005). Ainda podem ser observadas abordagens que envolvem a avaliação de sêmen e cabelo (Marechal, *et al.*, 1999; Stenberg, *et al.*, 2004). Estes estudos têm por finalidade avaliar como as variações na composição isotópica podem ser usadas na avaliação da cinética e metabolismo de zinco.

CAPÍTULO 1

Análise de especiação de metais e metalóides ligados à anidrase carbônica empregando Mobilidade Iônica

1.1. Objetivo

Identificar e separar as espécies da isoforma II da α -anidrase carbônica bovina ligada a Ba^{2+} , Zn^{2+} , Cu^+ , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Pb^{4+} , Se^{4+} e Se^{6+} por meio da espectrometria de mobilidade iônica do tipo *travelling wave*.

Objetivos específicos:

- Avaliar as alterações na conformação da estrutura da proteína em condições nativas e desnaturadas;
- Avaliar uma metodologia de remoção do zinco, empregando 1,10-fenantrolina, bem como verificar o efeito desta remoção por meio da espectrometria de mobilidade iônica;
- Comparar os resultados de mobilidade iônica no procedimento de remoção de zinco com a técnica de dicroísmo circular;
- Aplicar um procedimento de atividade enzimática, verificando o efeito da adição de diferentes elementos na função catalítica;
- Identificar as espécies divalentes ligadas à enzima por espectrometria de massas, discutindo a influência da proporção metal/proteína;
- Verificar a influência do pH na ligação da enzima a metais divalentes por espectrometria de massas e mobilidade iônica, bem como o efeito do tempo de incubação;
- Empregar a mobilidade iônica para análise de especiação, separando as espécies com diferentes estados de oxidação, tais como Cu^+ , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Pb^{4+} , Se^{4+} e Se^{6+} .

1.2. Parte experimental

1.2.1. Equipamentos e acessórios

Abaixo, seguem os equipamentos e acessórios utilizados neste capítulo.

- Agitador de tubos tipo vortex, modelo M-37600 (Thermolyne, EUA);
- Balança analítica, modelo 260 (Mettler, EUA);
- Centrífuga de tubos Eppendorf, modelo 5804R (Westbury, NY, E.U.A.);
- Espectrofotômetro UV/Visível, modelo B582 (Micronal, Brasil);
- Espectrômetro de massas com fonte de ionização *electrospray* e um sistema de analisadores de m/z sequencial, modelo Synapt HDMS (Waters, Milford, E.U.A.);
- Potenciômetro para medidas de pH, modelo DM20 (Digimed, Brasil);
- Sistema de filtração em microtubos (Microcon e Amicon Ultra; Millipore, França);
- Sistema de purificação de água Milli-Q, modelo QuantumTM cartridge (Millipore, França).

1.2.2. Gases, reagentes e soluções

Abaixo, seguem os gases, reagentes e soluções utilizados neste capítulo.

- Gás Ar e N₂ com pureza de 99,999%;
- Ácido acético glacial, 98% (J. T. Baker);
- Ácido fórmico, 88% (J. T. Baker);
- Ácido malônico, 99% (Sigma-Aldrich);

- Acetato de *p*-nitrofenila, (Sigma);
- Acetato de sódio, (J. T. Baker);
- Acetona, (J. T. Baker);
- Acetonitrila, 99,95% (J. T. Baker);
- Anidrase carbônica, (Sigma);
- Solução de 1,10-fenantrolina, 1,0 mmol L⁻¹ (Merck);
- Solução de acetato de amônio, 10,0 mmol L⁻¹ (J. T. Baker);
- Solução de acetato de zinco, 1,0 mmol L⁻¹ (J. T. Baker);
- Solução de acetato de bário, 1,0 mmol L⁻¹ (Sigma-Aldrich);
- Solução de acetato de cobre I, 1,0 mmol L⁻¹ (Aldrich);
- Solução de acetato de cobre II, 1 mmol L⁻¹ (Aldrich)
- Solução de acetato de chumbo II, 1,0 mmol L⁻¹ (Sigma-Aldrich);
- Solução de acetato de chumbo IV, 1,0 mmol L⁻¹ (Sigma-Aldrich);
- Solução de hidróxido de amônio, 1,0 mol L⁻¹ (Sigma-Aldrich);
- Solução de hidróxido de sódio, 2,0 mol L⁻¹ (Sigma-Aldrich);
- Solução de selenato de sódio, 1,0 mmol L⁻¹ (Sigma-Aldrich);
- Solução de selenito de sódio, 1,0 mmol L⁻¹ (Sigma).

1.2.3. Parâmetros de TWIMS-MS

É mostrado na Figura 8 um diagrama esquemático de um espectrômetro de massas híbrido quadrupolo / espectrômetro de mobilidade iônica (IMS) / ToF.

O instrumento foi operado no modo positivo do *electrospray*. A infusão foi realizada pela injeção de 200 µL da amostra. Foi obtida a resolução de *m/z* do ToF igual a 7500. Foram realizados o controle do equipamento, bem como a aquisição dos dados, utilizando o software MassLinx. Foi empregada uma

pressão de 0,5 mbar de N₂, no espectrômetro por mobilidade iônica, e 0,025 mbar de Ar no *trap*. A amplitude de RF usada no guia de íons e no espectrômetro de mobilidade foi 370 V, voltagem DC de + 7,0 e + 10,0V e velocidade de onda igual a 300 m/s.

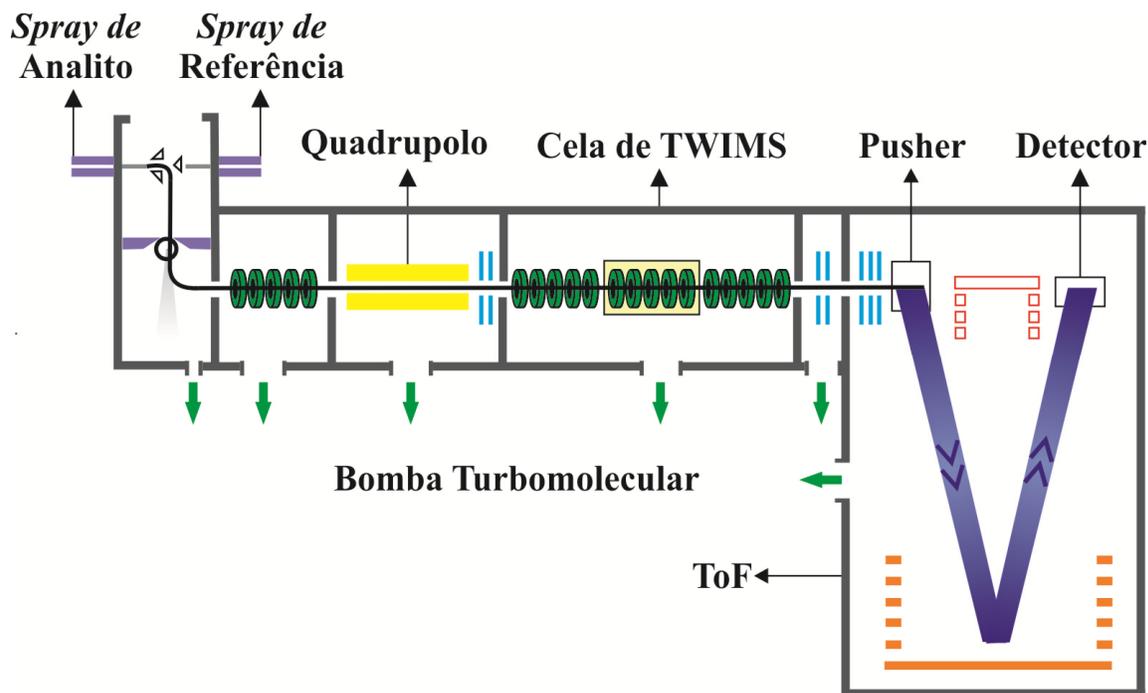


Figura 8. Diagrama esquemático do equipamento Synapt HDMS (adaptado de Pringle *et al.*, 2007).

Para o tratamento dos resultados, os valores de distribuição por tempo de chegada (ATD, do inglês, *arrival time distribution*) da proteína foram determinados para cada estado de carga do íon. Os dados de mobilidade iônica foram previamente extraídos por meio do programa DriftScope, o que permitiu: (I) predefinir a região de extração de ATD e (II) selecionar e extrair cada estado de carga separadamente. Cada relação m/z foi exportada para o

programa MassLynx, e o valor experimental de ATD foi determinado por meio da identificação da posição centróide.

1.2.4. Avaliação das condições nativas e desnaturantes

Para avaliação das condições desnaturantes, a enzima foi incubada com uma solução água, acetonitrila e ácido fórmico, numa proporção 50:49:1, diluindo-se 2,5 mg da enzima em 10 mL desta solução. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12857 g, a 4° C, por 10 min e o sobrenadante foi posteriormente injetado no espectrômetro de massas. As razões m/z situaram-se na faixa de 400 a 4000.

No caso das condições nativas, 2,5 mg da enzima foram solubilizados em 10 mL da solução tampão acetato de amônio 10 mmol L⁻¹, em pH 6,75. As amostras foram centrifugadas conforme mencionado para as condições desnaturantes, e o sobrenadante foi injetado para identificação no espectrômetro de massas, avaliando-se a mesma faixa de m/z .

1.2.5. Preparo de apo-anidrase carbônica

Antes de avaliar a afinidade da enzima a diferentes elementos químicos, foi removido o metal ligado à enzima, utilizando-se 1,10-fenantrolina. Assim, qualquer elemento químico adicionado teria disponível o sítio metálico para se ligar à enzima. Com isso, as diferenças observadas nos experimentos de mobilidade iônica poderiam ser atribuídas às modificações estruturais da proteína provocadas pela adição dos elementos químicos.

Para tanto, 6,0 mg de anidrase carbônica bovina foram solubilizados em 2,0 mL de tampão acetato ácido acético 50,0 mmol L⁻¹, em pH 5,0. Foram

adicionados 2,0 mL de 1,10-fenantrolina, 1,0 mmol L⁻¹, diluída na mesma solução tampão. A solução foi mantida a 4° C, por 120 h (Lindskog e Nyman, 1964). Após esse período, a solução foi submetida à ultrafiltração, empregando filtros de exclusão por peso molecular de 10000 Da (Microcon e Amicon Ultra, Millipore). A solução foi centrifugada a 7232 g por 15 min em tubos com capacidade de 4,0 mL. Para garantir a eficiência da remoção do complexo Zn-fenantrolina, a solução foi submetida a cinco etapas de limpeza com acetato de amônio 10,0 mmol L⁻¹. A enzima foi ressuspensa para 1,0 mL.

Após o procedimento de remoção do metal, a concentração final da proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), sendo igual a 151 ± 0,2 µmol L⁻¹. Entretanto, apenas 8,5 µmol L⁻¹ de anidrase carbônica foram necessários para identificação por espectrometria de massas.

O monitoramento das formas de apo e holo-enzima foi realizado por meio da mobilidade iônica para avaliar os efeitos da remoção do Zn na estrutura da enzima. A adição de Zn à apo-enzima foi procedida para avaliar a influência desta adição na estrutura da enzima. Para tanto, foram preparadas três soluções: (I) uma solução da enzima comercial a 8,5 µmol L⁻¹, (II) uma solução da apo-enzima a 8,5 µmol L⁻¹, e (III) uma solução da apo-enzima 8,5 µmol L⁻¹, contendo 4,25 µmol L⁻¹ de Zn. Esta adição do metal baseou-se no trabalho de Hagege, *et al.*, (2004). o qual indica uma proporção entre metal:proteína igual a 1:2.

1.2.6. Análises de dicroísmo circular

A técnica de dicroísmo circular tem sido amplamente empregada na avaliação de substâncias com atividade óptica. Dentre estas substâncias, destaca-se a aplicação para a análise de proteínas, a qual permite a avaliação

do enovelamento das mesmas, suas estruturas e interações com outras moléculas protéicas (Hirst, *et al.*, 2003; Chen, *et al.*; 1974). No presente trabalho, a técnica de dicroísmo circular foi empregada para avaliar alterações na estrutura da anidrase carbônica devido à remoção de zinco.

Para as análises de dicroísmo circular, utilizou-se a solução de anidrase comercial a $8,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ diluída em tampão acetato de amônio $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$, sendo esta a situação em que a proteína estaria na sua conformação nativa. As soluções da enzima após o processo de remoção do metal, e após a adição de $4,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn, foram empregadas como teste para avaliar se a remoção e a adição dos metais trariam consequências significativas à estrutura da proteína. Além disso, esta técnica foi utilizada como referência em comparação com a técnica de mobilidade iônica.

A solução tampão de acetato de amônio $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foi utilizada como solução do branco, sendo submetida aos mesmos procedimentos das soluções de anidrase carbônica. Cerca de $300 \mu\text{L}$ de amostra foram introduzidos em uma cela de quartzo com caminho óptico de $1,0 \text{ cm}$ de um espectropolarímetro marca JASCO, modelo J-720 (Tóquio, Japão). Alguns parâmetros para realização das análises foram fixados, dentre eles a temperatura no compartimento da cela de 20°C , detectabilidade de 100 mdeg. , e resolução de 1 nm (Silva e Arruda, 2009). O software Dicroprot 2000 foi utilizado para obtenção dos dados referentes à porcentagem das estruturas que compõe a enzima.

1.2.7. Avaliação da atividade enzimática

O método de avaliação da atividade enzimática se baseia na hidrólise da ligação éster do acetato de *p*-nitrofenila, mediada pela anidrase carbônica

(Lindskog e Nyman, 1964). No ensaio colorimétrico empregando este reagente, o principal produto a ser detectado é o *p*-nitrofenol, o qual possui coloração intensamente amarela e absorção máxima em um comprimento de onda de 400 nm.

O acetato de *p*-nitrofenila foi preparado imediatamente antes das análises, protegido da luz, dissolvido inicialmente com 300 µL de acetona e posteriormente avolumado com água, numa concentração de 30 µmol L⁻¹. Visando minimizar variações nos valores de pH, foi empregado o tampão de ácido malônico 0,1 mol L⁻¹, em pH 8,5, ajustado com hidróxido de sódio 2,0 mol L⁻¹.

A enzima, o substrato e o tampão foram dispostos em cubeta de quartzo, conforme demonstrado na Tabela 5, e a absorbância foi aferida após um intervalo de 3 minutos, em 400 nm (Armstrong, *et al.*, 1966).

Tabela 5. Volumes empregados na avaliação da atividade enzimática.

Amostra	Água (µL)	Ácido malônico (µL)	Amostra (µL)	Acetato de <i>p</i> - nitrofenila (µL)
Branco	1132	202	0	666
Amostra	1130	202	2	666
Amostra	1128	202	4	666
Amostra	1124	202	8	666
Amostra	1116	202	16	666
Amostra	1100	202	32	666

Neste capítulo, a atividade enzimática foi avaliada em duas situações. Na primeira abordagem, foram comparadas as atividades da anidrase na sua forma comercial; na forma de apo-enzima; e na forma de apo-enzima

adicionada a $15,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn. Para tanto, empregou-se $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ como concentração ótima de anidrase carbônica para este experimento, diluída em uma solução tampão de ácido malônico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, em pH 8,5. Na segunda abordagem, foram avaliadas as atividades da anidrase, adicionando-se individualmente os elementos estudados neste capítulo, ou seja, Ba^{2+} , Cu^+ , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Pb^{4+} , Se^{4+} e Se^{6+} . Nesse caso, foram adicionados $15,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cada elemento a $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de anidrase.

1.2.8. Avaliação da adição dos metais

A avaliação da adição dos metais divalentes foi realizada, empregando-se, inicialmente, a enzima a $8,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e os metais a $85,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ para facilitar a identificação dos elementos químicos. Os metais divalentes estudados neste trabalho foram incubados com a enzima individualmente, em solução de acetato de amônio $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em pH 6,75. As soluções da anidrase incubada com cada íon metálico foram injetadas individualmente para identificação por espectrometria de massas. A massa exata da proteína foi estimada utilizando o programa MassLinx, para confirmar a adição do metal à estrutura da proteína.

A escolha dos metais baseou-se nos seguintes critérios: (I) o elemento que exerce papel fundamental na função catalítica da enzima (zinco); (II) o elemento que apresenta a maior constante de associação com a proteína (cobre); (III) o elemento com constante de associação conhecida, mas reconhecido como inibidor da atividade enzimática (chumbo); e (IV) um elemento com baixa afinidade pela enzima, cuja presença seria um indicativo das condições brandas de análise (bário).

A influência da concentração dos metais sobre a mobilidade iônica das espécies foi avaliada em cinco níveis de concentração. Para tanto, os metais foram adicionados a $8,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de anidrase carbônica nas concentrações de 4,25; 8,5; 17,0, 42,5; e $85,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. As soluções de cada íon metálico foram injetadas individualmente, assim como a aquisição da mobilidade dos íons de anidrase carbônica foi procedida individualmente para cada íon.

1.2.9. Avaliação do efeito do pH e do tempo de incubação

As soluções de apo-anidrase carbônica e da enzima na presença dos íons metálicos divalentes (Ba, Cu, Pb e Zn) foram incubadas em soluções de acetato de amônio, adicionando-se $85,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ dos íons metálicos divalentes a $8,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de apo-anidrase carbônica. Nesta etapa, buscou-se manter a concentração da solução de acetato de amônio a 10mmol L^{-1} , para garantir que as diferenças na mobilidade iônica não sofressem influência da força iônica e, ao mesmo tempo, evitar qualquer supressão de sinal na ionização por *electrospray*. Os valores de pH avaliados foram 6,0, 7,0, 8,0 e 9,0, sendo ajustados com o auxílio de um pHmetro por meio da adição de ácido acético glacial ou hidróxido de amônio, ambos em soluções diluídas.

Os tempos de incubação da apo-enzima e da anidrase ligada aos metais divalentes foram avaliados, utilizando-se as mesmas concentrações empregadas na avaliação do efeito do pH. Para tanto, foram monitoradas as mobilidades nos tempos de 0 h, 4 h e 24 h. O teste *t* pareado foi empregado para verificar possíveis diferenças na mobilidade das espécies, considerando a ATD da apo-enzima como referência, na comparação com cada metal avaliado.

1.2.10. Análise de especiação

Após a otimização das condições experimentais, empregou-se o tempo de incubação de 4 h e pH 9,0. Na análise de especiação realizada neste capítulo, avaliou-se a ligação de elementos químicos em diferentes estados de oxidação à anidrase carbônica. Para tanto, sais de acetato das espécies Cu^+ , Cu^{2+} , Pb^{2+} e Pb^{4+} foram solubilizados em tampão acetato de amônio $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$, bem como as espécies de selenito e selenato na forma de sais de sódio. Nas identificações por espectrometria de massas e na separação por mobilidade iônica, as espécies com diferentes estados de oxidação a $85,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ foram incubadas com a enzima a $8,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$

Para a identificação das diferentes conformações da anidrase carbônica, foi utilizado o programa computacional DriftScope para a aquisição das ATDs, seguindo as indicações da literatura (Michaevlevski, *et al.*, 2010). Os resultados foram expressos por meio da razão entre a conformação 1 (CF 1) e 2 (CF2) para as soluções de apo-enzima e da anidrase incubada com os metais divalentes.

1.3. Resultados e Discussão

1.3.1. Avaliação de condições nativas e desnaturantes

A avaliação das condições nativas e desnaturantes baseou-se na influência do pH sobre o estado de enovelamento da proteína. Sabe-se que a anidrase carbônica mantém sua estrutura nativa em pH 4,4 e abaixo de pH 3,6 esta enzima se apresenta na forma desnaturada (Nabuchi, *et al.*, 2007). Assim, a mobilidade iônica foi empregada para avaliar os estados de enovelamento da proteína nas condições de pH 3,0 e 6,75 para as formas desnaturadas e nativas, respectivamente.

A adição de ácido fórmico 1% (v/v) às amostras reduziu o valor do pH para 3,0, fornecendo um espectro de massas cujas razões m/z variaram de 400 a 4000. Uma ampla distribuição no estado de carga e uma elevada densidade de carga, características de uma proteína desnaturada e desenovelada, são observados na Figura 9a. A evidência para o desenovelamento da proteína é reforçada, uma vez que as m/z detectadas são atribuídas à enzima livre de zinco, ou seja, cadeias de apo-proteínas (Chowdhury, *et al.*, 1990; McLean, *et al.*; 2005). A anidrase carbônica pode estar desenovelada, uma vez que as interações requeridas para a manutenção do zinco dentro do sítio metálico de ligação foram perdidas. Na Figura 9b, estão representadas as ATDs dos estados de carga +30, +21 e +12. Conforme o esperado, a mobilidade iônica foi maior para íons com os maiores estados de carga, seguindo a ordem: +30 > +21 > +12.

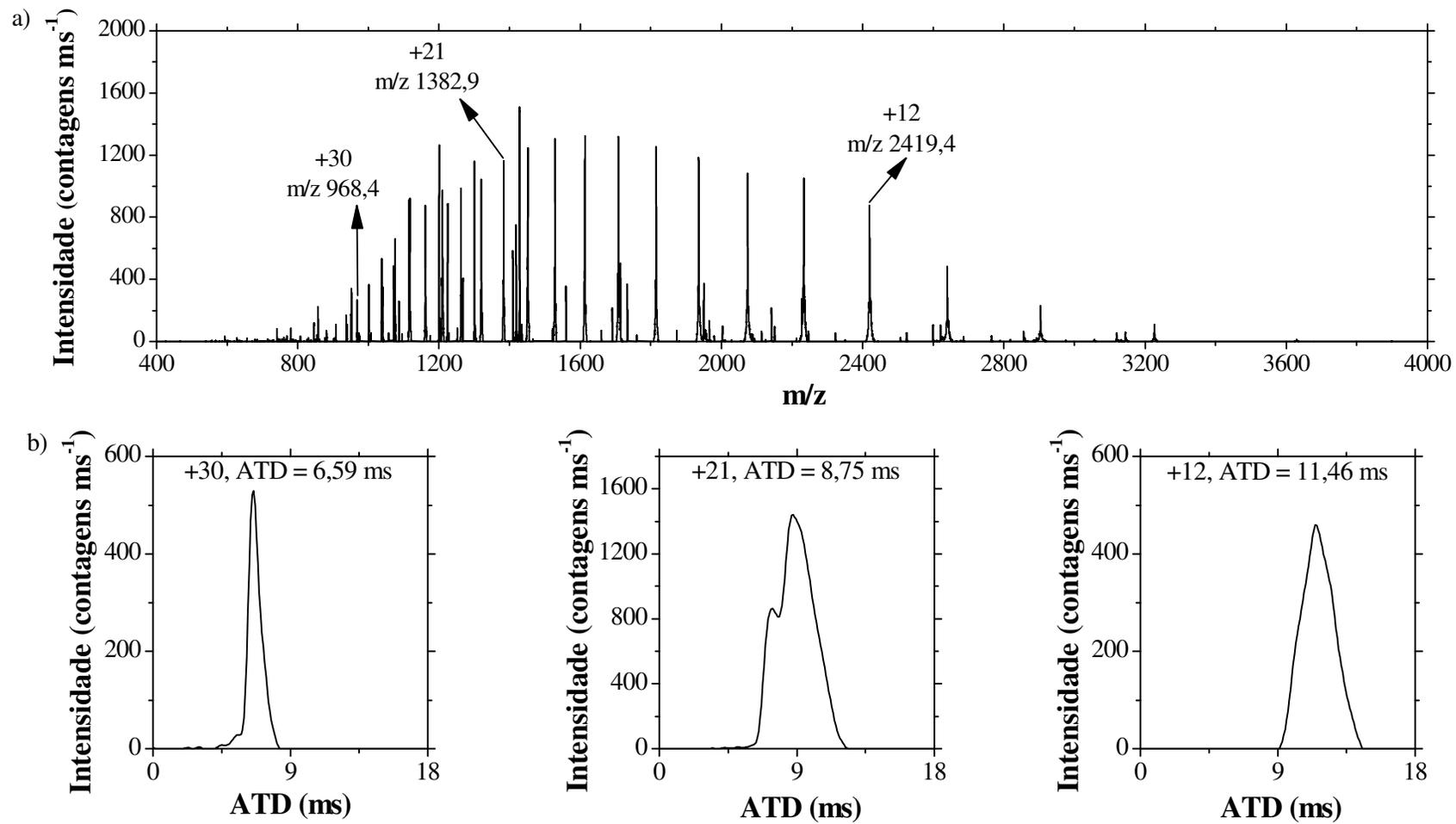


Figura 9. Espectro de massas da apo-anidrase desnaturada (a). Distribuição por tempo de chegada (ATD) dos estados de carga +30, +21 e +12 (b).

A Figura 10 mostra o espectro de massas da anidrase carbônica na faixa de razão m/z de 400 a 4000, em solução de acetato de amônio. A ausência de íons detectados nas regiões de m/z entre 400 e 1500, e entre 3000 e 4000, permitiu que apenas as razões m/z situadas entre 1500 e 3000 fossem monitoradas. Esta ausência de íons nas regiões de menor m/z permite indicar que as condições de análise foram suaves o suficiente para evitar a fragmentação da proteína.

O pico dominante (+11) pode ser visualizado com relativa facilidade, refletindo o ambiente suave proporcionado pela fonte de ionização *electrospray*. Ele corresponde à holo-enzima, com uma estreita distribuição do estado de carga e baixa densidade de carga. Este fato é esperado para holo-proteínas que demonstram preservação estrutural suficiente do estado nativo de enovelamento. O formato da holo-anidrase pode abrigar aproximadamente 12 cargas positivas no estado enovelado, segundo a estimativa proposta por Mora (2000). Este resultado corrobora com o maior estado de carga observado experimentalmente, fornecendo uma evidência de que o estado nativo foi mantido na fase gasosa. Assim, as interações não-covalentes necessárias para a manutenção do zinco na estrutura da proteínas foram preservadas.

No estado nativo, a enzima gera somente três picos demonstrados pelos estados de carga +12, +11 e +10 (Figura 10), corroborando com trabalhos prévios apresentados na literatura (Lomeli, *et al.*, 2009). As ATDs dos estados de carga da anidrase sugerem que a mesma razão m/z pode revelar duas conformações distintas. Nos estados de carga +12 e +11, as moléculas da proteína apresentam diferentes conformações (CF 1 e CF 2), conforme indicado na Figura 10. A existência de duas conformações da anidrase carbônica foi demonstrada por cristalografia de raios-X (Saito, *et al.*, 2000).

O tamanho e a forma das proteínas são discriminados pela mobilidade iônica, bem como o estado de enovelamento das proteínas. Proteínas desenoveladas apresentam uma estrutura tridimensional mais aberta do que proteínas enoveladas (Chowdhury, et al., 1990; Clemmer, et al., 1995). Baseado neste princípio, pode-se sugerir que as conformações com maior mobilidade iônica (CF 1) referem-se a um estado mais enovelado, enquanto que conformações marcadas com menor mobilidade iônica (CF 2) são atribuídos a um estado menos enovelado da proteína.

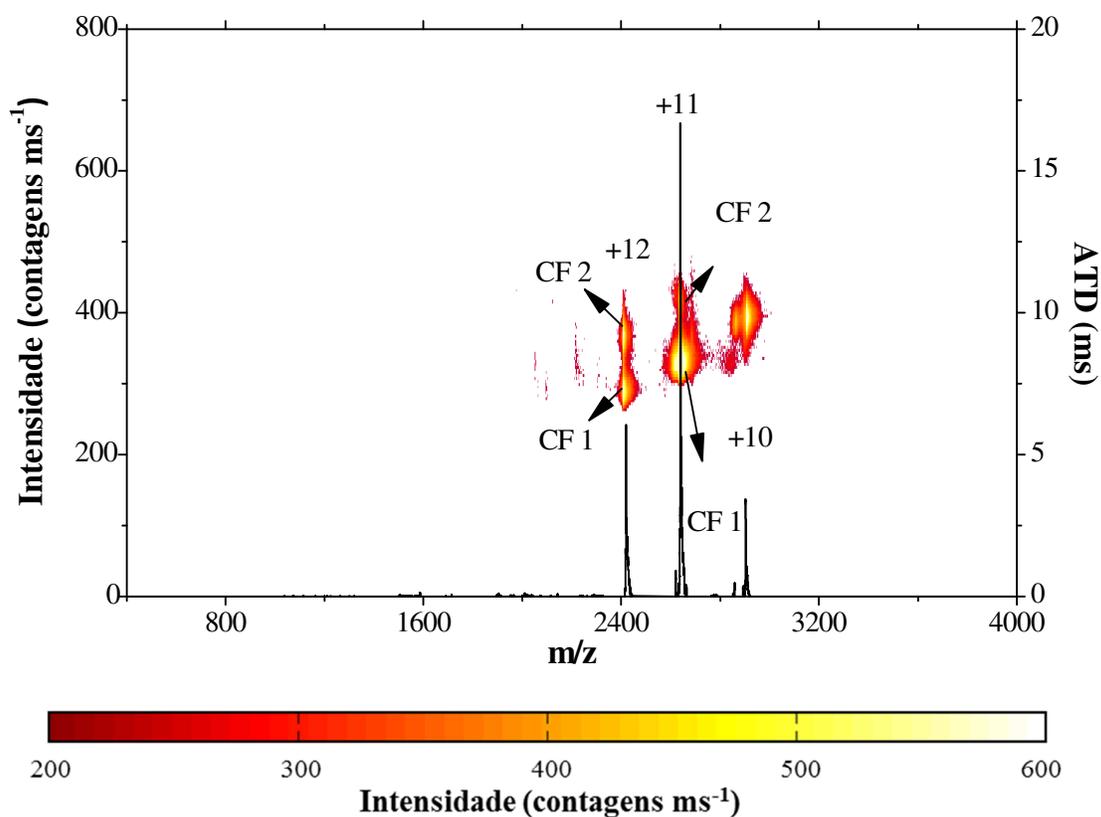


Figura 10. Espectro de massas tridimensional (ESI-TWIMS-MS) da anidrase carbônica em estado nativo em tampão acetato de amônio. As conformações 1 (CF 1) e 2 (CF 2), respectivamente, referem-se à conformação mais enovelada (CF 1) e à conformação mais desenovelada (CF 2) da anidrase.

A espectrometria de mobilidade iônica foi útil para indicar alterações na estrutura da enzima, quando a proteína foi submetida a diferentes condições de pH. Na Figura 11, a ATD do estado de carga +11 é apresentada nas condições nativa e desnaturada da proteína. Na condição desnaturada, a enzima apresenta ATD de 13,63 ms (Figura 11a), refletindo uma estrutura com maior seção de choque e desenovelada. Por outro lado, a enzima no estado nativo apresenta uma ATD de 7,22 ms (Figura 11b), e sua estrutura se mantém preservada em uma forma mais compacta, uma vez que a condição de pH do meio é favorável à manutenção das ligações de hidrogênio que estabelecem seu enovelamento. Como a mesma razão m/z foi comparada nas duas ocasiões, as diferenças observadas nas mobilidades da enzima podem ser atribuídas ao seu estado de enovelamento.

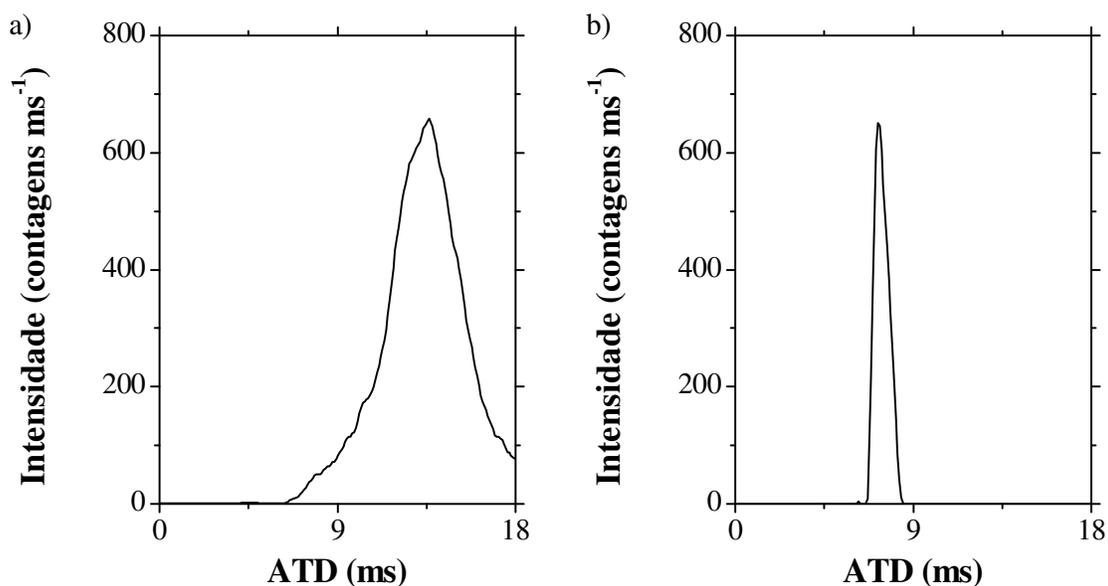


Figura 11. Distribuição por tempo de chegada dos estados de carga +11, na forma desnaturada - ATD = 13,63 ms (a) e na forma nativa - ATD = 7,22 ms (b) da enzima.

1.3.2. Preparo da apo-anidrase carbônica

A segunda etapa deste trabalho consistiu na remoção do zinco presente na anidrase carbônica. Este procedimento foi realizado para garantir que os metais adicionados à solução pudessem se ligar ao sítio metálico da enzima e garantir que as diferenças observadas, especialmente na mobilidade iônica, pudessem ser atribuídas a cada metal adicionado.

Co-fatores metálicos de proteínas podem ser removidos de proteínas por meio do emprego de agentes quelantes, i. e., EDTA, EGTA, 1,10-fenantrolina e ácido dipicolínico (Hurst, *et al.*, 2010). Neste trabalho, o agente quelante 1,10-fenantrolina foi usado para remoção do zinco.

A perda do zinco é demonstrada por meio da comparação entre os espectros de massas adquiridos antes e após o tratamento da anidrase carbônica com o agente quelante. Antes do tratamento, a anidrase apresentava razão m/z igual a 2645,1 (Figura 12a) e, após o tratamento, m/z de 2639,3 (Figura 12b). A diferença entre elas (5,8) multiplicada pelo estado de carga (+11) fornece a diferença de 63,8. Este é um forte indício de uma perda de zinco, uma vez que a massa do metal é 63,9291422 (Coplen, *et al.*, 2002).

Além disso, essa remoção se torna ainda mais evidente quando as massas exatas da proteína são comparadas (Figuras 12c e 12d). O espectro de massas deconvoluído da anidrase sem tratamento mostra uma massa exata de 29085 Da (Figura 12c), enquanto que a enzima obtida após tratamento apresenta uma massa exata de 29021 Da (Figura 12d), indicando uma diferença de massa de 64,0 Da, sugerindo a perda de zinco.

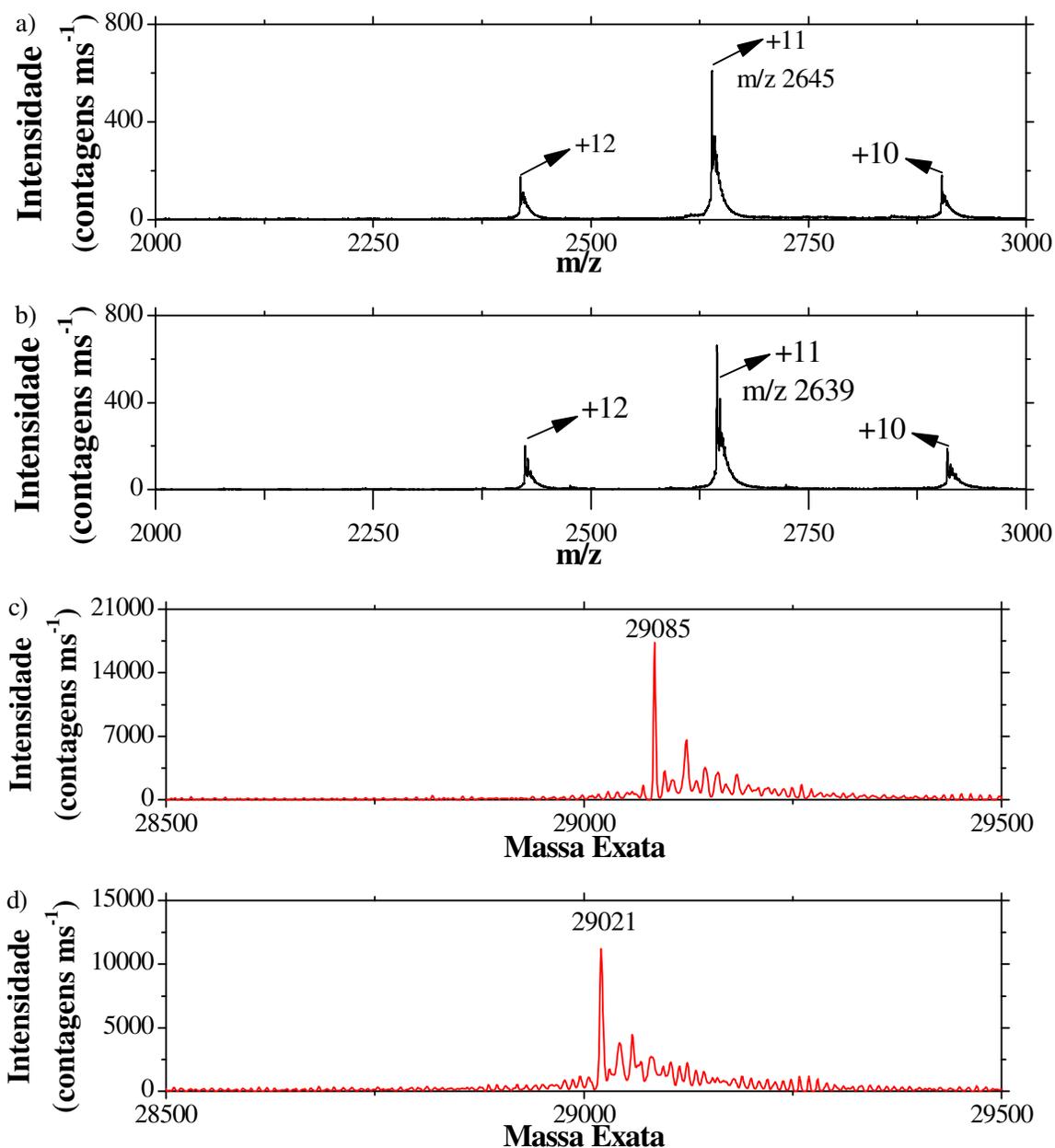


Figura 12. Espectros de massa da anidrase carbônica sem tratamento (a) e após o tratamento com 1,10-fenantrolina (b). Espectros de massa deconvoluídos da enzima sem tratamento (c) e após o tratamento com 1,10-fenantrolina (d). O equipamento foi operado no modo positivo de *electrospray*, conforme descrito no item 1.2.5.

Após a confirmação das espécies de apo e holo-enzima, foi realizada a adição de Zn à apo-enzima para comparar as mobilidades das formas de apo e

holo-enzima. Como se observa na Figura 13a, a ATD da anidrase comercial foi 7,22 ms, enquanto a apo-enzima apresentou ATD de 7,40 ms (Figura 13b), para o mesmo estado de carga (+11). Considerando estes valores e, comparando-os com os resultados obtidos em condições nativas e desnaturadas (apresentados na Figura 11), pode-se sugerir que a apo-enzima se apresenta em uma forma nativa, uma vez que a ATD da apo-enzima aproxima-se mais desta condição do que a ATD apresentada pela forma desnaturada (13,63 ms). Estes dados corroboram com os resultados observados no trabalho realizado por Gudiksen, *et al.* (2004), no qual é sugerido que a perda de Zn poderia afetar a posição dos aminoácidos do sítio ativo.

Na avaliação da adição de Zn, pode-se observar que a apo-enzima contendo $4,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn (Figura 13c) apresentou o mesmo valor de ATD da enzima comercial. Como os mesmos valores de ATD foram observados nestas duas condições, pode-se sugerir que a simples adição do metal pode restaurar a mobilidade original da anidrase carbônica, permitindo inferir um alto grau de similaridade a nível estrutural da proteína entre a enzima comercial e a apo-enzima contendo Zn.

Estes resultados suscitam outros dois experimentos: (I) a comparação dos resultados obtidos com outras técnicas de elucidção estrutural de proteínas e (II) a avaliação da atividade enzimática das duas formas da holo-enzima.

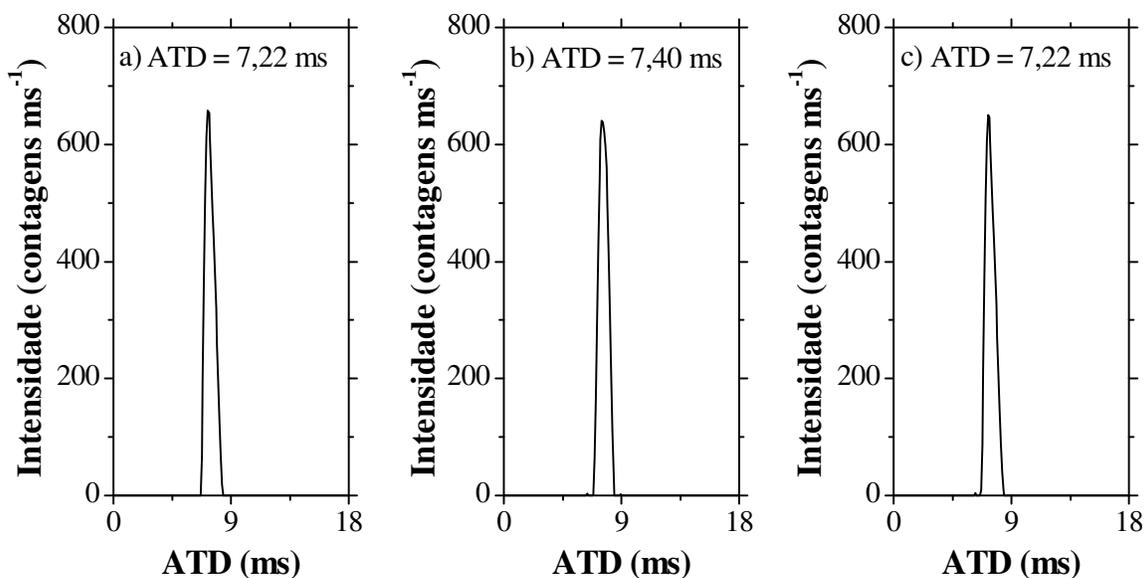


Figura 13. Distribuição por tempo de chegada da anidrase carbônica ($8,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) no estado de carga +11, na forma nativa adquirida comercialmente (a), na forma apo (b) e na forma apo-enzima acrescida de $4,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn (c).

1.3.3. Análises de dicroísmo circular

Para comparar os resultados obtidos por meio da técnica de mobilidade iônica com outra técnica de elucidação estrutural de proteínas, foi realizado um experimento empregando a técnica de dicroísmo circular, abrangendo a região de comprimento de onda entre 200 e 250 nm.

Na Figura 14, está representado o espectro obtido para as três soluções de anidrase carbônica, diluídas em tampão acetato de amônio a $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em pH 6,75, conforme descrito no item 1.2.6.

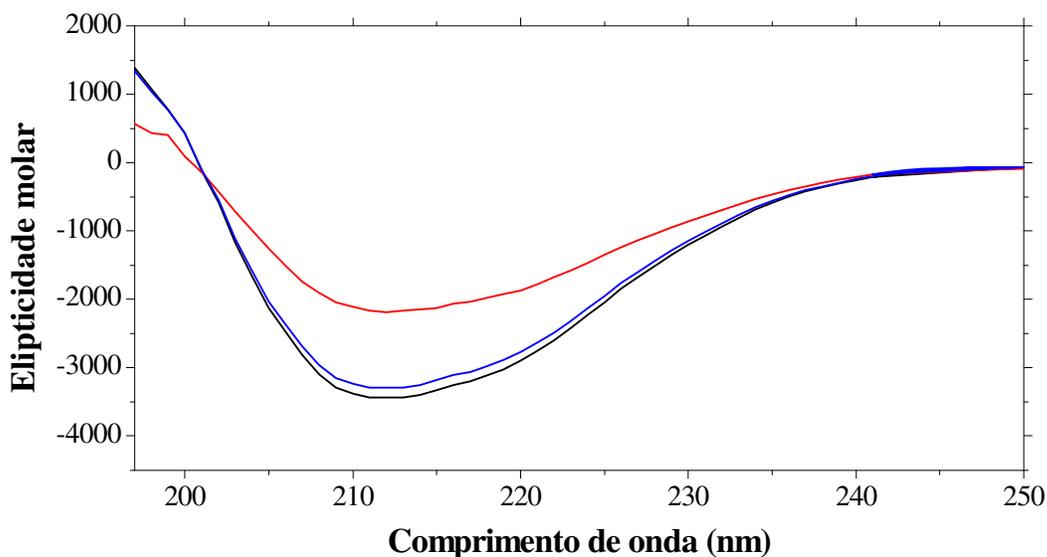


Figura 14. Espectro de dicroísmo circular para anidrase carbônica a $8,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ na presença de tampão acetato de amônio $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$. O eixo da ordenada é expresso em resíduos principais de elipticidade molar, sendo que o valor do branco (solução tampão acetato de amônio $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em pH 7,0) foi previamente subtraído. As linhas do espectro referem-se à anidrase carbônica na sua forma: adquirida comercialmente (—), apo-enzima (—) e apo-enzima acrescida de $4,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn (—).

O cálculo da porcentagem das estruturas secundárias da proteína foi realizado com o emprego do software Dicroprot 2000, por meio dos dados obtidos experimentalmente para a construção da Figura 14. A porcentagem das estruturas secundárias é apresentada na Tabela 6.

Tabela 6. Estimativa da porcentagem das estruturas secundárias para anidrase carbônica em tampão acetato de amônio $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em pH 6,75 por meio do método K2D (neural network).

Estrutura	Estruturas %		
	α -hélice	Folha β	<i>Random coil</i>
Anidrase comercial	$12,1 \pm 0,6$	40 ± 3	48 ± 4
Apo-enzima	$8,1 \pm 0,5$	40 ± 4	52 ± 5
Apo-enzima + Zn	$11,3 \pm 0,6$	41 ± 3	48 ± 4

A enzima comercial apresentou porcentagem de α -hélices e folhas β de 12,1% e 40%, respectivamente. Este resultado apresenta-se coerente com valores encontrados na literatura, que se situam em torno de 3 a 12 % para as estruturas de α -hélices e 31 e 44 % para as estruturas de folhas β (Manavalan e Johnson, 1987).

Comparando-se os resultados obtidos, pode-se observar que a porcentagem de α -hélices decresce de 12,1% na solução de anidrase comercial para 8,1 % na solução da apo-enzima. A adição do Zn à solução da apo-enzima foi suficiente para alterar a porcentagem de α -hélices, aumentando-a para 11,3 % das estruturas secundárias da proteína. Assim, pode-se sugerir que a adição do metal poderia alterar a estrutura da enzima no sentido de tornar a estrutura da apo-enzima similar à conformação original, observada na solução da anidrase comercial (Borén e Freskgard, 1996).

Além disso, os resultados obtidos pela técnica de dicroísmo circular apresentam-se coerentes com os resultados obtidos pela técnica de mobilidade iônica. No experimento de dicroísmo, a remoção do metal resulta em um aumento da porcentagem da estrutura do tipo *random coil*, sendo esta caracterizada como uma classe de conformações que indica a ausência de estrutura secundária regular. O aumento deste tipo de estrutura poderia ser responsável pela ligeira queda na mobilidade iônica da apo-enzima, a qual variou de 7,22 ms na forma comercial para 7,40 ms na forma da apo. Como a estrutura *random coil* é caracterizada por ser irregular, a proteína na sua forma apo poderia apresentar maior seção de choque do que a proteína contendo Zn, refletindo uma diminuição da mobilidade iônica. Assim, fica destacado que o emprego em conjunto das duas técnicas supracitadas é responsável por trazer informações complementares a cerca da estrutura da anidrase, além de fornecer mais subsídios à compreensão dos resultados.

1.3.4. Avaliação da atividade enzimática

Nesta primeira avaliação, buscou-se comparar a atividade enzimática da apo-enzima, com as formas de holo-enzima, por meio da produção de *p*-nitrofenol (Figura 15). A apo-enzima apresenta uma baixa produção de *p*-nitrofenol, apresentando uma concentração de $0,67 \text{ nmol L}^{-1}$.

Na comparação da atividade das holo-enzimas, foi observado a maior concentração de *p*-nitrofenol para a anidrase comercial do que para a apo-enzima adicionada ao zinco, sendo os valores de intervalo de confiança iguais a $39 \text{ nmol L}^{-1} \pm 1$ e $37 \text{ nmol L}^{-1} \pm 1$, respectivamente. Entretanto, cabe destacar que as formas da holo-enzima apresentaram atividades enzimáticas significativamente semelhantes, empregando-se o teste *t* pareado, com um nível de confiança de 95 %. Assim, fica claro que após o processo de remoção do zinco, a simples adição do mesmo é suficiente para que a enzima recupere a sua atividade, sugerindo a manutenção da integridade estrutural da anidrase. Além disso, é possível sugerir que o metal encontra-se coordenado no sítio ativo da enzima, uma vez que a atividade enzimática foi restabelecida.

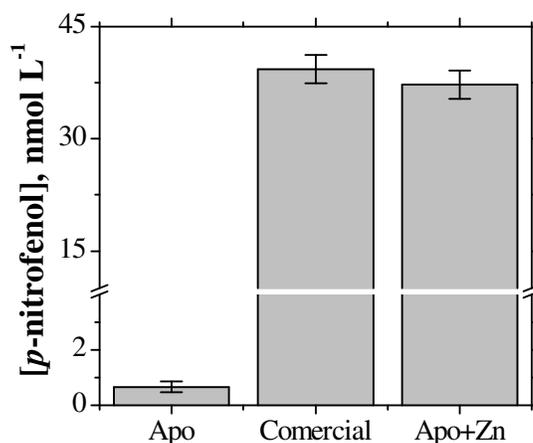


Figura 15. Avaliação da atividade enzimática da anidrase carbônica a $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ nas formas apo, comercial e apo-enzima incubada com Zn.

Na avaliação da anidrase incubada com metais divalentes e das espécies empregadas na análise de especiação, foram verificadas concentrações de *p*-nitrofenol inferiores a 1,0 nmol L⁻¹. Apenas a enzima incubada com Cu²⁺ apresentou uma atividade enzimática superior à observada para a apo-enzima. Entretanto, a concentração *p*-nitrofenol é cerca de 31 vezes menor do que a observada para a enzima incubada com zinco.

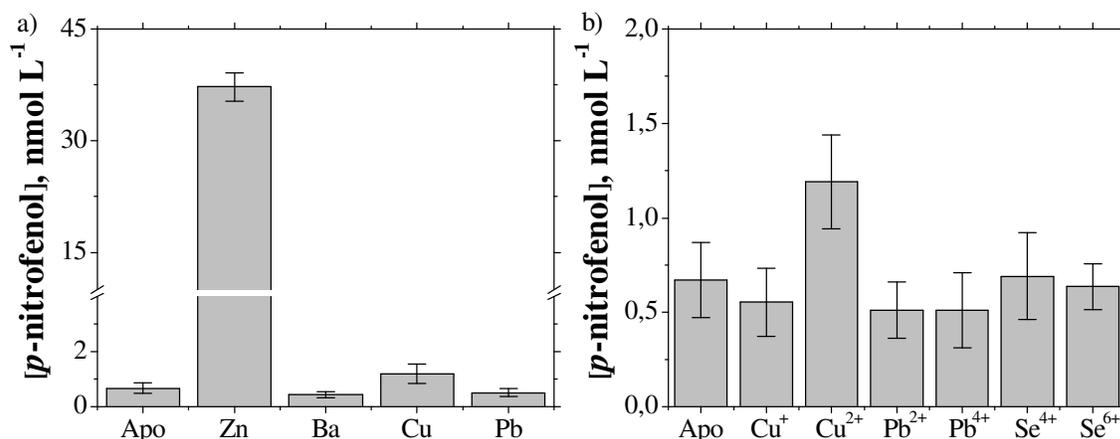


Figura 16. Avaliação da atividade enzimática da anidrase carbônica incubada com metais divalentes (a) e espécies empregadas na análise de especiação (b).

1.3.5. Avaliação da adição de metais divalentes à enzima

Na avaliação da ligação de metais divalentes à anidrase carbônica, empregou-se a enzima a uma concentração de 8,5 μmol L⁻¹ e os metais a 85,0 μmol L⁻¹. Este excesso de metal foi adicionado com o intuito de facilitar a identificação das metalo-espécies (Figura 17). A faixa de *m/z* monitorada restringiu-se a 2000 e 3000, visando aumentar a detecção dos íons.

A enzima pode se ligar, ao menos, a um átomo de um elemento químico, como no caso da adição de Ba e Pb, indicado no espectro de massas

pelas setas nas m/z 2651,8 e 2658,2, respectivamente. Levando em consideração a diferença destas m/z para a apo-enzima e o estado de carga +11, observamos as adições de 137,5 e 207,9 Da na massa da apo-enzima.

Além disso, é verificada a adição de dois átomos de metal para Zn e Cu^{2+} , sendo a primeira adição identificada com m/z 2645,1 e 2645,0, e a segunda com m/z 2650,9 e 2650,7, respectivamente. Em comparação com os valores de m/z da apo-enzima, observam-se as diferenças de 5,8 e 5,7, as quais sugerem uma adição de 63,8 e 62,7 Da na massa da apo-enzima, considerando o estado de carga +11. Cabe mencionar que apenas no caso do Zn não foi possível identificar a enzima na sua forma apo, quando incubada com o metal, mostrando que toda apo-enzima liga-se prontamente ao metal.

Os valores de m/z foram utilizados na extração dos dados por meio da mobilidade iônica, sendo as m/z 2651,8, 2658,2, 2645,1 e 2645,0 atribuídas, respectivamente, a Ba^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+} .

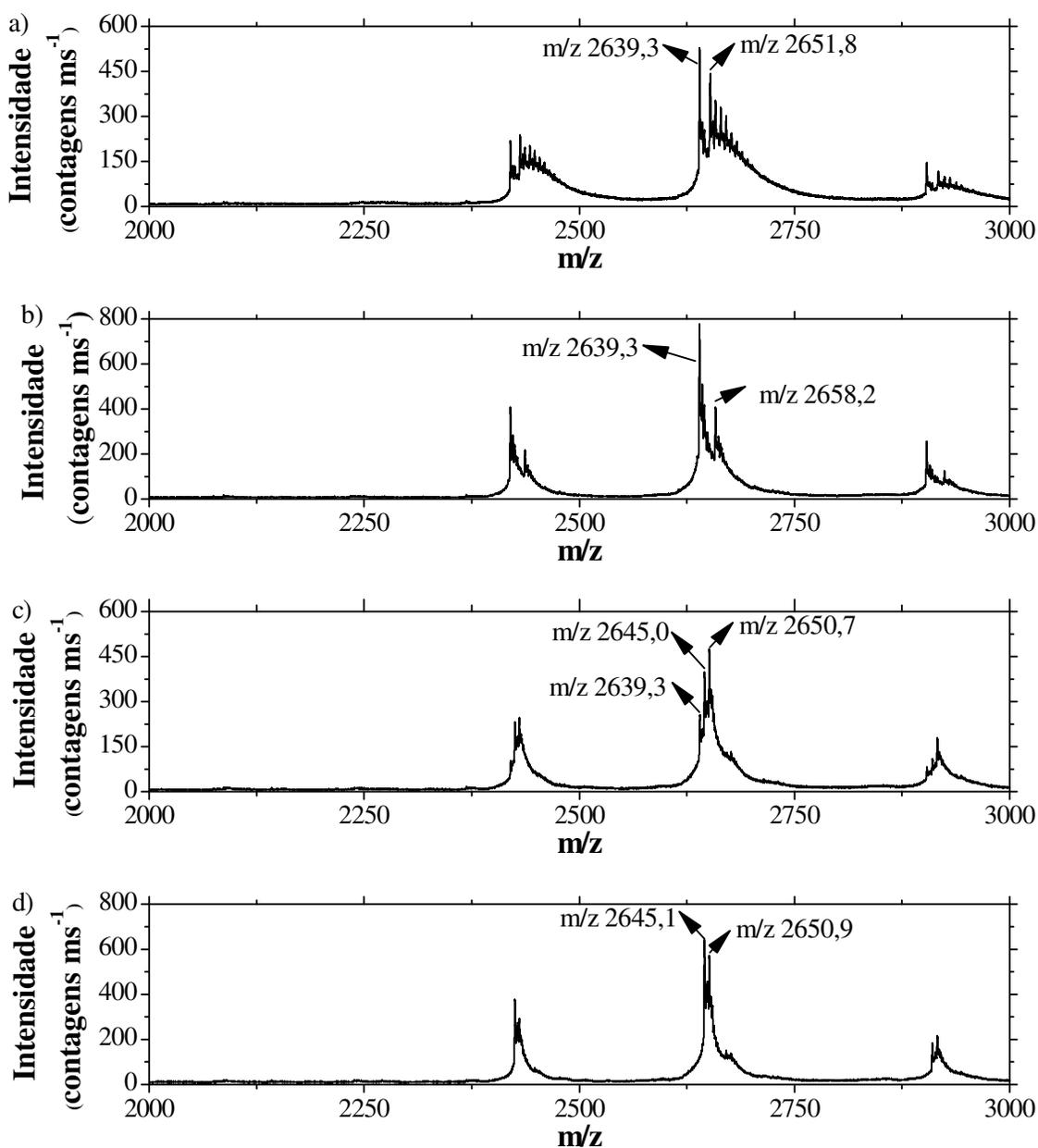


Figura 17. Espectros de massas da enzima na presença de Ba^{2+} (a), Cu^{2+} (b), Pb^{2+} (c) e Zn^{2+} (d). O equipamento foi operado no modo positivo de *electrospray*, conforme descrito no item 1.2.8.

Além disso, a deconvolução do espectro de massas apresenta mais nitidamente a adição do metal à enzima (Figura 18). A partir da massa da apo-enzima (29021 Da), podem ser verificadas diferenças de 138, 208, 64 e 63 Da, indicativas da adição de Ba, Pb, Cu e Zn, respectivamente.

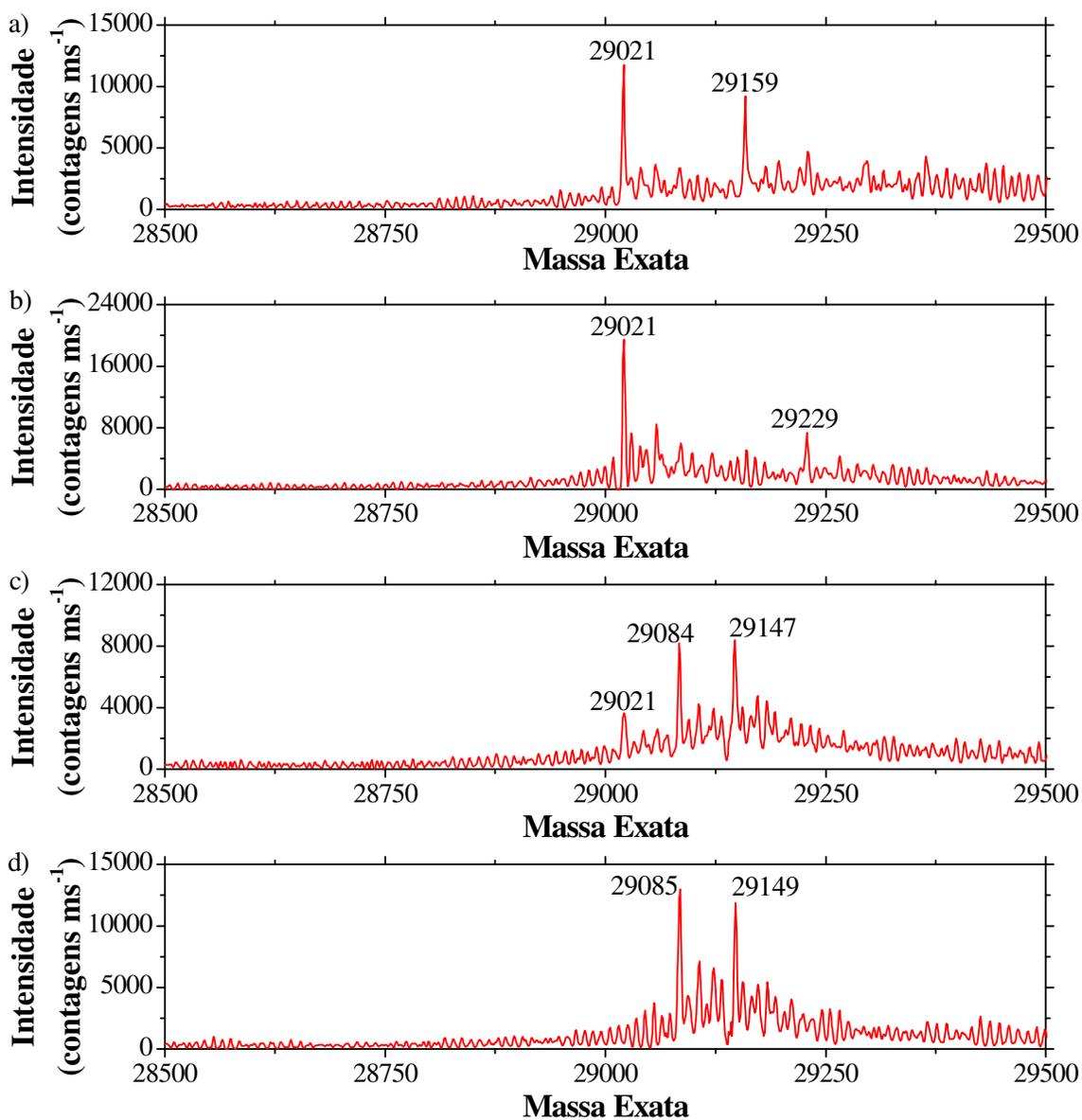


Figura 18. Espectros de massas deconvoluídos da enzima na presença de Ba^{2+} (a), Cu^{2+} (b), Pb^{2+} (c) e Zn^{2+} (d). O equipamento foi operado no modo positivo de *electrospray*, conforme descrito no item 1.2.8.

A avaliação da proporção entre metal e proteína permitiu identificar a condição de maior intensidade nos espectros de massas, o que resulta em maior detecção de íons nos experimentos de mobilidade iônica. Foram avaliadas as concentrações de 4,25; 8,50; 17,0; 42,5 e 85,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para 8,5

$\mu\text{mol L}^{-1}$ de enzima, resultando nas proporções de metal/proteína de 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 e 10,0, como apresentado na Figura 19.

Metais como Ba, Pb e Zn apresentaram uma tendência crescente de aumento dos valores de sinal analítico para as m/z 2651,8, 2658,2, 2645,1 e 2645,0 atribuídas, respectivamente, a Ba^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+} . Foi observado que a intensidade dos íons aumenta à medida que uma maior concentração destes metais é empregada. Somente para íons Cu^{2+} , observam-se valores de intensidade constantes a partir da proporção metal:proteína 2:1. Este resultado pode ser atribuído à formação de um novo íon, a anidrase carbônica ligada a um segundo íon Cu^{2+} (em m/z 2650,7), o qual se tornou o íon mais intenso no espectro de massas na proporção 10:1.

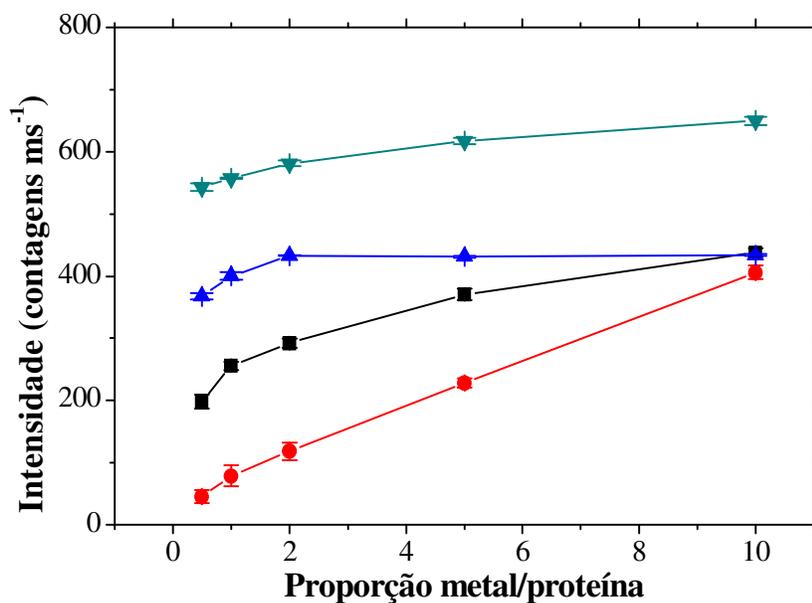


Figura 19. Avaliação da proporção entre metal e proteína, em função da intensidade apresentada nos espectros de massas da anidrase carbônica incubada com Ba (■), Pb (●), Cu (▲) e Zn (▼).

Quanto à mobilidade iônica, observou-se que o aumento da concentração do metal não influencia a ATD das espécies divalentes ligadas à anidrase, uma vez que o tempo de chegada das espécies manteve-se constante com o incremento de concentração do metal.

1.3.6. Avaliação do efeito do pH por espectrometria de massas e mobilidade iônica

A espectrometria de massas foi empregada na avaliação do efeito do pH sobre a carga líquida da proteína. A carga da proteína é mantida, independente da variação do pH, produzindo apenas os estados de carga +12, +11 e +10. A própria apo-enzima apresentou os mesmos estados de carga nas diferentes condições de pH. Esta semelhança na carga tem sido atribuída a uma protonação no sítio ativo quando ocorre a perda do zinco (Gudiksen, *et al.*, 2004). Além disso, observou-se que os espectros de massas foram similares aos apresentados na Figura 17, sendo observadas diferenças nos valores de intensidade inferiores a 2,4% nas razões m/z 2651,8, 2658,2, 2645,1 e 2645,0 atribuídas às adições de Ba^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+} .

A ligação do metal à proteína foi avaliada por meio das intensidades das razões m/z supracitadas, em diferentes condições (Figura 20). A apo-enzima apresentou valores de intensidade que aumentam com o incremento nos valores de pH, de tal maneira que os maiores valores de intensidade são verificados na condição de pH igual a 9,0. As espécies ligadas aos metais chumbo, cobre e zinco também apresentam maiores valores de intensidade na condição de pH igual a 9,0. À medida que se aumenta a basicidade do meio, menor é a competição entre prótons e íons metálicos, favorecendo a ligação destes metais (Barnett, *et al.*, 2012). Embora o pH 7,0 seja preferível por

mimetizar a maioria das condições fisiológicas, optou-se por trabalhar com o pH 9,0 por ser esta a condição em que se verificam os maiores valores de intensidade para a maioria das espécies de anidrase carbônica avaliadas.

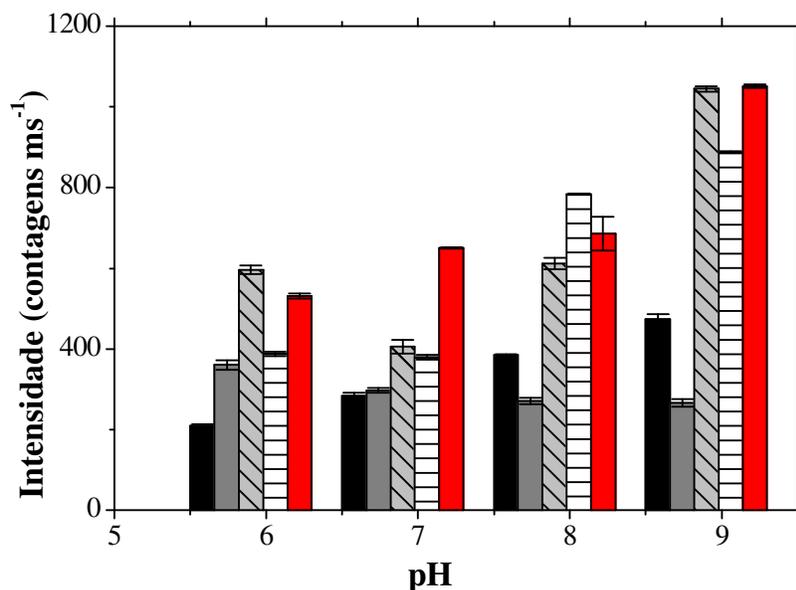


Figura 20. Intensidade de apo-BCA (■) e ligada a Ba (■), Pb (▨), Cu (≡) e Zn (■), no espectro de massas.

A mobilidade iônica foi empregada para avaliar o efeito do pH na ligação dos metais à proteína, bem como monitorar alterações na estrutura da proteína. Além disso, o estudo do pH permite escolher uma condição que permita diferenciar as espécies de anidrase ligadas aos metais da apo-enzima, uma vez que a mudança do pH poderia conduzir a uma alteração das ligações de hidrogênio entre as cadeias laterais de aminoácidos, que constituem a estrutura tridimensional da proteína.

Todos os metais podem alterar a mobilidade de proteína a um pH específico (Tabela 7). A ATD de cada metal foi comparada individualmente a apo-enzima, sendo esta utilizada como valor de referência no emprego do teste

t pareado. A mobilidade de chumbo ligado a anidrase carbônica foi significativamente diferente da apo-enzima em todas as condições de pH, a um nível de confiança de 95%. Espécies de chumbo são prontamente responsáveis pela modificação da mobilidade da proteína, mesmo nos menores valores de pH avaliados, tais como 6,0 e 7,0. Cobre, zinco e bário apresentaram mobilidades significativamente diferentes da apo-enzima apenas em pH 9,0. Estes resultados sugerem que a adição de metal na enzima pode resultar em alterações estruturais significativas, uma vez que a secção transversal da molécula na fase gasosa foi modificada. Além disso, também se pode sugerir que a adição destes íons dirige o enovelamento da proteína para um estado mais enovelado, uma vez que as espécies de anidrase carbônica ligada a íons divalentes apresentaram menores valores de ATD do que a apo-enzima. Assim, a condição de pH 9,0 foi considerada como a mais favorável na separação entre as espécies de anidrase ligadas a metais da apo-enzima.

Tabela 7. Distribuição de tempo de chegada da apo-enzima e da enzima ligada aos metais divalentes, obtidos por meio da extração do estado de carga +11, com velocidade de onda 300 m/s em diferentes condições de pH.

pH	Apo-BCA	BCA+Ba ²⁺	BCA+Pb ²⁺	BCA+Cu ²⁺	BCA+Zn ²⁺
6,0	7,4 ± 0,1*	7,5 ± 0,3	7,1 ± 0,1	7,3 ± 0,4	7,1 ± 0,4
7,0	7,4 ± 0,1	7,4 ± 0,3	7,2 ± 0,1	7,4 ± 0,2	7,2 ± 0,2
8,0	7,4 ± 0,1	7,4 ± 0,3	7,1 ± 0,1	7,2 ± 0,3	7,1 ± 0,4
9,0	7,5 ± 0,1	7,2 ± 0,3	7,1 ± 0,2	7,2 ± 0,3	7,2 ± 0,2

*Valores apresentados como intervalo de confiança (média $\pm \frac{ts}{\sqrt{n}}$), com $\alpha=0,05$, (n=3).

Na Figura 21, está representada a ATD da enzima ligada aos metais divalentes, na condição de pH 9,0. Nesta condição, a mobilidade da anidrase carbônica varia com o metal ao qual se liga, sendo que a apo-enzima apresenta

menor mobilidade iônica que as espécies ligadas a metais. Nesse caso, pode-se considerar que o desenovelamento da proteína seja influenciado tanto pela ausência do metal quanto pela repulsão eletrostática das cadeias laterais dos resíduos do sítio metálico (Faull, *et al.*, 2009; Shirran e Barran, *et al.*, 2009). A maior mobilidade foi verificada para anidrase ligada ao chumbo, enquanto que a menor mobilidade foi observada para anidrase ligada ao zinco.

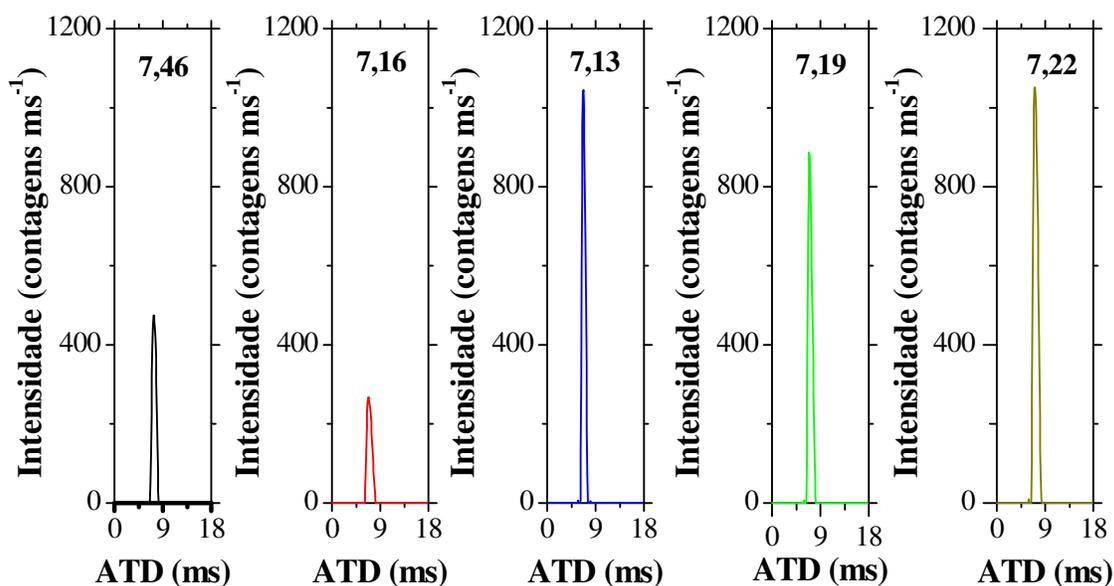


Figura 21. Distribuição por tempo de chegada da apo-anidrase (—), e da enzima ligada aos metais divalentes Ba (—), Pb (—), Cu (—) e Zn (—).

O tempo de incubação foi avaliado como um fator que poderia tornar a mobilidade iônica das espécies de anidrase ligada aos metais mais facilmente separáveis da apo-enzima. No tempo de incubação igual 0 h, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre a apo-enzima e as espécies de anidrase ligadas aos metais divalentes (Tabela 8). No entanto, foram observadas diferenças significativas em tempos de incubação de 4 h e

24 h. Observou-se que as proteínas podem sofrer modificações conformacionais de forma dependente do tempo, uma vez que a mobilidade iônica foi alterada com o tempo. Este resultado corrobora com o trabalho de Nabuchi, *et al.*, (2007). A mobilidade de todas as espécies monitoradas decresce ao longo do tempo, sugerindo que a seção de choque das mesmas aumenta com o tempo. A mobilidade da apo-enzima atinge seu maior valor de ATD em 4 h, permanecendo constante até 24 h. As espécies de anidrase ligadas a Ba²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺ e Zn²⁺ atingiram os maiores valores de ATD em 24 h, aumentando a seção de choque com maiores tempos de análise.

Tabela 8. Distribuição de tempo de chegada da apo-enzima e da enzima ligada aos metais divalentes, obtidos por meio da extração do estado de carga +11, com velocidade de onda 300 m/s em diferentes tempos de incubação.

Tempo (h)	Apo-BCA	BCA+Ba²⁺	BCA+Pb²⁺	BCA+Cu²⁺	BCA+Zn²⁺
0	7,4 ± 0,1	6,9 ± 0,1	7,1 ± 0,1	7,07 ± 0,05	7,1 ± 0,2
4	7,42 ± 0,07	7,07 ± 0,06	7,2 ± 0,1	7,2 ± 0,1	7,1 ± 0,1
24	7,42 ± 0,07	7,49 ± 0,03	7,56 ± 0,07	7,50 ± 0,02	7,51 ± 0,04

Valores apresentados como intervalo de confiança (média ± $\frac{ts}{\sqrt{n}}$), com $\alpha = 0,05$, (n = 3).

Em relação à escolha do melhor tempo de incubação, 4 h foi eleito como o melhor compromisso entre a detecção de diferentes mobilidades e atenção com a interconversão das espécies. Com esta condição, pode-se observar que a mobilidade apo-enzima foi significativamente menor do que a mobilidade das espécies de anidrase ligadas aos metais, empregando-se o teste *t* pareado, com um nível de confiança de 95%. Além disso, o menor tempo é desejado para evitar a interconversão das espécies, sendo esta considerada uma fonte de introdução de erros em análise de especiação.

1.3.7. Análise de especiação

A análise de especiação foi avaliada sob dois aspectos: (I) os diferentes estados de oxidação das espécies de cobre, chumbo e selênio ligadas à anidrase; e (II) a ligação do metal a diferentes conformações da proteína. Em ambos os casos, a identificação da interação entre biomoléculas e metais é amplamente desejável, devendo ser consideradas a influência de parâmetros como pH, polaridade e temperatura.

A aplicação da espectrometria de mobilidade iônica para a análise de especiação de proteínas ligadas a espécies metalo-orgânicas é observada desde 2005, com o emprego da modalidade DTIMS (Guo, *et al.*, 2005). No presente trabalho, avaliou-se a análise de especiação, considerando as diferenças na mobilidade iônica causadas somente pelas diferenças proporcionadas pelo estado de oxidação dos metais.

Na análise de especiação de chumbo, a anidrase ligada a Pb^{4+} apresentou mobilidade menor do que a enzima ligada a Pb^{2+} (Figuras 22b e 22c). Considerando a especiação de cobre, a anidrase ligada a Cu^+ demonstrou uma mobilidade maior do que a anidrase ligada a Cu^{2+} (Figuras 22d e 22e). Em todos os casos, a mobilidade das espécies ligadas a metais foram maiores do que a apo-enzima (Figura 22a), sugerindo que o metal pode ser importante para o enovelamento da proteína. Como as espécies ligadas a metais apresentaram maior mobilidade do que a apo-enzima, pode-se sugerir que as metalo-espécies possuem uma estrutura tridimensional ligeiramente mais enovelada.

É importante salientar que o mesmo estado de carga da proteína foi comparado para as diferentes espécies ligadas a metais, mostrando que a mobilidade da proteína foi influenciada somente pelo estado de oxidação do

metal. A mesma tendência foi observada para as espécies de cobre e chumbo, *i.e.*, espécies com maior estado de oxidação mostraram menor mobilidade iônica.

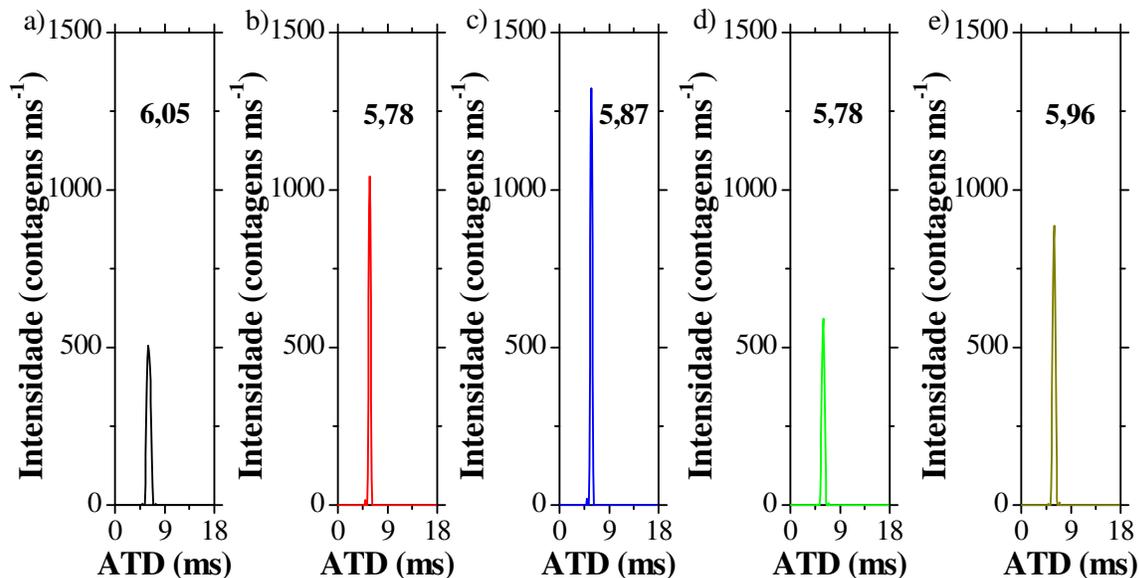


Figura 22. Distribuição por tempo de chegada da apo-anidrase (a) e da enzima ligada às espécies Pb^{2+} (b), Pb^{4+} (c), Cu^{+} (d) e Cu^{2+} (e).

Uma mistura de espécies em diferentes estados de oxidação foi feita para expandir as capacidades da espectrometria de mobilidade iônica para análise de especiação. Neste caso, as espécies de selênio foram incubadas individualmente e em uma mistura como mostrado na Figura 23. A ATD da anidrase incubada apenas com Se^{4+} foi 5,79 ms (Figura 23b), enquanto BCA ligada a Se^{6+} mostrou uma ATD igual 5,95 ms (Figura 23c). Quando estas espécies foram adicionadas à solução de enzima em uma mistura, a mobilidade das espécies de selênio permaneceu inalterada (Figuras 23d e 23e). A identificação de Se^{4+} e Se^{6+} ligados à anidrase foi possível por meio da IMS, até mesmo na mistura, uma vez que o tempo de chegada foi diferente entre as

espécies e se manteve na mistura. Como observado anteriormente para as espécies de chumbo e cobre, o maior estado de oxidação apresentou menor mobilidade. Este resultado aponta para a potencialidade da técnica de mobilidade iônica, uma vez que foi possível a identificação da interação entre a proteína intacta e espécies com diferentes estados de oxidação na mesma solução.

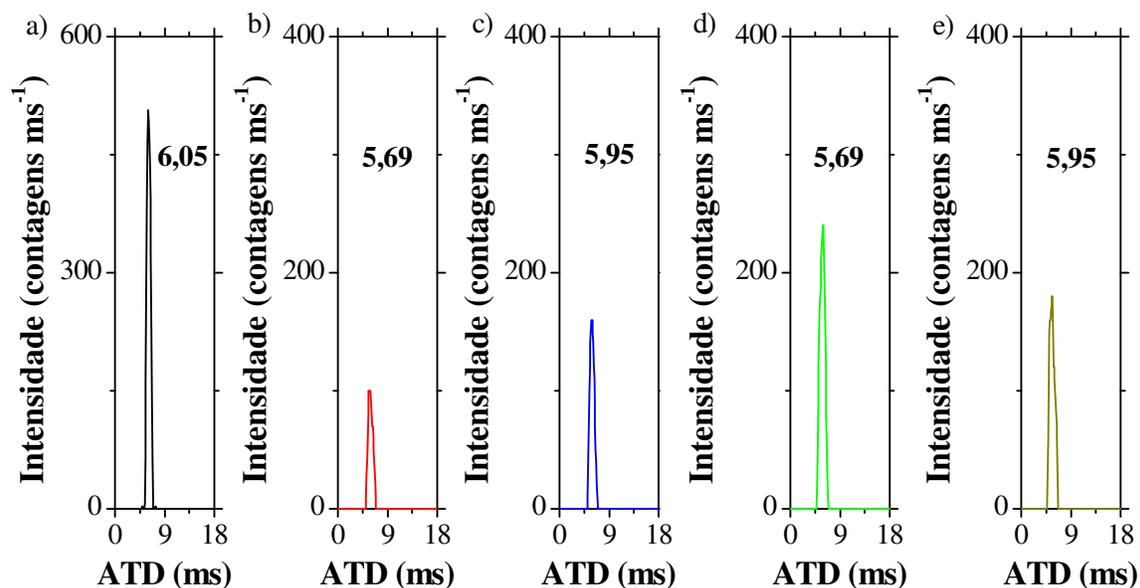


Figura 23. Distribuição por tempo de chegada da apo-anidrase (a) e da enzima ligada às espécies Se^{4+} (b) e Se^{6+} (c) incubados individualmente e em uma mistura de Se^{4+} (d) e Se^{6+} (e).

Diferentes conformações e padrões de proteínas têm sido evidenciados na literatura (Barnett, *et al.*, 2012; Li, *et al.*, 1993). Estudos sobre estruturas de proteínas e sobre o processo de enovelamento podem auxiliar na elucidação da função biológica (Hendrickson, *et al.*, 1998). Neste contexto, a mobilidade iônica pode ser uma ferramenta útil, uma vez que esta técnica adiciona uma

nova dimensão na análise de espectrometria de massas, permitindo a separação de íons com mesma m/z baseada no tempo de chegada dos íons.

O espectro de massas bidimensional (Figura 10) mostrou a existência de dois íons de anidrase carbônica com mesma razão m/z , em diferentes estados de enovelamento, e a ligação diferencial do metal à anidrase foi avaliada por meio da intensidade da proteína ligada ao metal em cada conformação (Figura 24). A apo-anidrase apresentou menor razão entre as diferentes conformações da proteína, mostrando que a ausência do metal não direciona a estrutura da enzima em um único estado de enovelamento (Figura 24). Além disso, a incubação do metal com a enzima aumentou a intensidade da conformação 1, resultando em maiores razões para as espécies ligadas ao metal. Como a conformação 1 é aquela que apresenta maior mobilidade, pode-se inferir que a adição dos íons metálicos divalentes (Ba^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+}) pode dirigir o enovelamento da proteína para o estado mais enovelado.

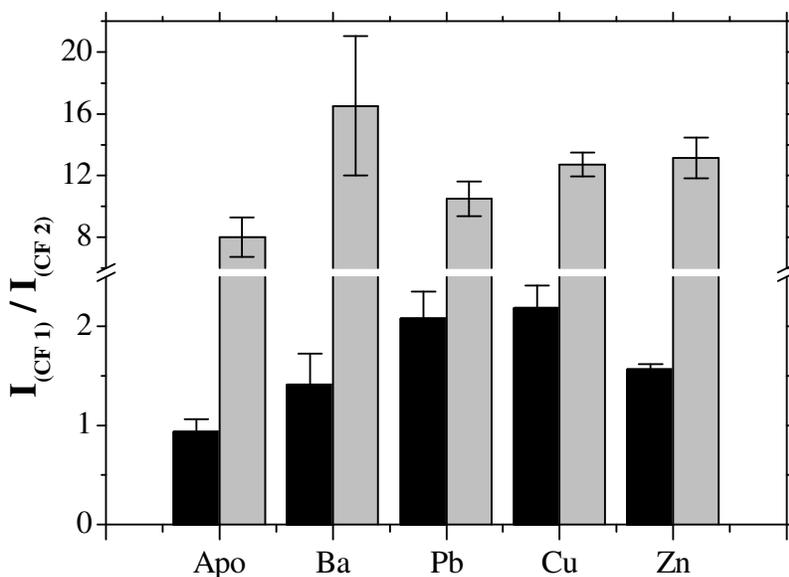


Figura 24. Intensidade relativa das conformações 1 (CF 1) e conformação 2 (CF 2) nos estados de carga +12 (■) e +11 (■).

1.4. Conclusões parciais

A abordagem da análise de especiação foi aplicada com êxito, empregando-se a espectrometria de mobilidade iônica. Pela primeira vez, foram identificadas e separadas espécies com diferentes estados de oxidação interagindo com uma proteína no estado nativo em uma mistura. Assim, pode-se considerar que este trabalho abre novas perspectivas de pesquisa no tocante à análise de especiação envolvendo biomoléculas que interagem com metais ou metalóides.

Com esta técnica, foi possível identificar alterações na estrutura da proteína, em condições favoráveis e desfavoráveis à manutenção da integridade da proteína, sem a necessidade de qualquer outra etapa de separação prévia. Esta abordagem caracterizou-se como um método direto de análise, requerendo apenas um processo de ultrafiltração para produzir, identificar e separar as espécies de interesse.

Cabe ressaltar que os resultados obtidos por meio da mobilidade iônica são coerentes com os obtidos por outra técnica de elucidação estrutural de proteínas, o dicróismo circular. Além disso, o procedimento adotado é capaz de restaurar a função catalítica da enzima com a simples adição de zinco.

As condições otimizadas de pH e tempo de incubação permitiram diferenciar a mobilidade iônica da apo-enzima para as demais espécies de metais ou metalóides ligados à anidrase. Nesse caso, as condições mais favoráveis foram pH 9,0 e tempo de incubação de 4 h.

Ressalta-se ainda o potencial desta técnica para a identificação, em uma única injeção (de apenas 2 min), de apo e/ou holo-formas, sob condições nativas ou desnaturadas, na presença de metais ligados à proteína, mesmo em diferentes estados de oxidação.

Quanto às perspectivas deste primeiro capítulo, cabe ressaltar a possibilidade de aplicação desta abordagem para amostras de interesse clínico. Citações na literatura sugerem que o nosso trabalho seja destinado à investigação de metaloproteinases de zinco envolvidas em doenças neurodegenerativas. Assim, mesmo que este seja apenas o princípio de nossos estudos, um grande potencial de aplicação pode ser projetado para estudos futuros, devendo-se buscar explicações sobre como os íons metálicos afetam a atividade e as conformações de proteínas envolvidas em condições patológicas.

CAPÍTULO 2

Análise de especiação de isótopos de zinco ligados à anidrase carbônica empregando diluição isotópica

2.1. Objetivo

Realizar um estudo de diluição isotópica de zinco ligado a anidrase carbônica usando ICP-MS.

Objetivos específicos:

- Avaliar o efeito da concentração de zinco total sobre as razões isotópicas, bem com o efeito da potência de radiofrequência (RF);
- Otimizar o tempo de residência e o tempo de integração das medidas, parâmetros de aquisição que podem afetar a precisão das medidas;
- Realizar a correção do tempo morto do detector para minimizar a imprecisão das medidas;
- Avaliar a voltagem da lente de extração na exatidão e precisão das razões isotópicas de zinco;
- Otimizar as voltagens da cela de reação e o vazão de gás para remoção de interferentes;
- Determinar o teor de zinco ligado à proteína comercial;
- Determinar o fator de correção adequadamente para avaliar o efeito da discriminação de massas, por meio do uso de material de referência certificado de razão isotópica;
- Avaliar o enriquecimento da anidrase carbônica incubada com os isótopos ^{67}Zn e ^{68}Zn , empregando como controle das condições naturais o material certificado;
- Determinação da atividade enzimática da anidrase incubada com os isótopos ^{67}Zn e ^{68}Zn .

2.2. Parte Experimental

Os equipamentos e acessórios utilizados neste capítulo são listados abaixo.

2.2.1. Equipamentos e acessórios

- Agitador de tubos tipo vortex, modelo M-37600 (Thermolyne, EUA);
- Balança analítica, modelo 260 (Mettler, EUA);
- Centrífuga de tubos Eppendorf, modelo 5804R (Westbury, NY, E.U.A.);
- Destilador de ácidos, modelo Distillacid (Berghof, Alemanha);
- Espectrofotômetro UV/Visível, modelo B582 (Micronal, Brasil);
- Espectrômetro de massas por plasma indutivamente acoplado Elan, modelo DRC-e, PerkinElmer (Norwalk, CT, EUA.);
- Potenciômetro para medidas de pH, modelo DM20 (Digimed, Brasil);
- Sistema de filtração em microtubos (Microcon e Amicon Ultra; Millipore, França);
- Sistema de purificação Milli-Q, modelo QuantumTM cartridge (Millipore, França).

2.2.2. Gases, reagentes e soluções

Os gases, reagentes e soluções utilizados neste capítulo são listados abaixo.

- Ácido nítrico sub-destilado (Merck);
- Ácido malônico, 99% (Sigma-Aldrich);

- Acetato de *p*-nitrofenila, (Sigma);
- Acetato de sódio, (J. T. Baker);
- Acetona, (J. T. Baker);
- Anidrase carbônica, (Sigma);
- Argônio líquido com pureza de 99,999%;
- Gás metano com pureza de 99,99%;
- Material certificado de razão isotópica de zinco IRMM-3702, (*Institute for Reference Materials and Measurements*);
- Óxido de zinco 67, (Cambridge Isotope Laboratories);
- Óxido de zinco 68, (Cambridge Isotope Laboratories);
- Solução de 1,10-fenantrolina, 1,0 mmol L⁻¹ (Merck);
- Solução de hidróxido de sódio, 2,0 mol L⁻¹ (Sigma-Aldrich);
- Solução de sulfato de amônio, 0,1 mol L⁻¹, (J. T. Baker);
- Solução padrão de zinco, 1000 15,2 mmol L⁻¹, (Merck);
- Sulfato de amônio, 99% (Merck).

2.2.3. Preparo das soluções e limpeza dos materiais

As soluções empregadas neste capítulo foram preparadas utilizando reagentes de grau analítico e ácido nítrico (Merck, Darmstadt, Alemanha) subdestilado. A água deionizada ($\geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) foi obtida a partir de um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, USA).

Para reduzir possíveis problemas relacionados à contaminação, foram empregados tubos de polipropileno na quantificação de Zn e na avaliação das razões isotópicas de Zn por ICP-MS. As soluções foram preparadas em capela de fluxo laminar. Todos os materiais foram lavados com água e mantidos em banho ácido (ácido nítrico 10% v/v) por no mínimo 24 horas, após o uso.

2.2.4. Avaliação da concentração de Zn

As condições iniciais de operação do ICP-MS são mostradas na Tabela 9. Todas as medições do ICP-MS foram realizadas em sala limpa classe 10000.

O efeito da concentração de Zn sobre a precisão e exatidão das razões isotópicas foi avaliado, considerando o isótopo de ^{64}Zn como referência para obtenção das razões. Para tanto, foram utilizadas soluções de 0,038, 0,38, 0,76, 1,5, 30 e 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn, diluídas em ácido nítrico 0,2% (v/v).

Tabela 9. Condições iniciais de operação empregadas nas avaliações de precisão e exatidão das razões isotópicas, por ICP-MS.

Parâmetros	
Nebulizador	Meinhard
Câmara de nebulização	Ciclônica
Potência de radiofrequência	1240 W
Vazão do gás nebulizador - Ar	0,9 L min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar - Ar	1,2 L min ⁻¹ (otimizado diariamente)
Medidas	
Modo de aquisição	Peak hopping
Modo do detector	Pulse
Tempo de residência	50 ms
Tempo de integração	2500 ms
Tempo morto do detector	60 ns
Replicatas	5
Voltagem da lente iônica	5,5 V
Razões m/z monitoradas	^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{67}Zn , ^{68}Zn e ^{70}Zn

2.2.5. Avaliação da potência de RF

A avaliação da potência de RF é aplicada com o intuito de minimizar as interferências poliatômicas baseadas, especialmente, em espécies de argônio (Botha, *et al.*, 2005). Dessa maneira, uma solução com $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de Zn foi analisada, variando-se a potência de RF (900, 1000, 1100, 1200, 1300 e 1400 W) para avaliar sua influência sobre a intensidade dos isótopos de Zn, e, em especial, sobre a exatidão e precisão das razões isotópicas de Zn.

2.2.6. Otimização das condições de aquisição do ICP-MS

Uma solução de $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de zinco foi utilizada para avaliação do tempo de residência e do tempo integração. O intervalo de tempo de residência estudado foi 10 e 50 ms, para um valor de tempo de integração fixado em 2500 ms. Já o tempo de integração foi avaliado entre 2500 e 10000 ms, com um valor de tempo de residência fixado em 10 ms.

2.2.7. Correção do tempo morto do detector

O tempo morto do detector foi determinado de acordo com o método proposto por Russ (1987). As razões isotópicas de zinco foram medidas com o tempo morto do detector igual a zero para soluções padrão com concentrações situadas entre 3,8 e $15,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ de zinco. Os resultados do tempo morto do detector foram apresentados como razões isotópicas normalizadas. Para tanto, as razões observadas foram divididas pelas razões isotópicas naturais (IUPAC) para todas as concentrações de zinco.

2.2.8. Avaliação da voltagem da lente iônica na exatidão e precisão das razões isotópicas de Zn

Para avaliar a influência a voltagem da lente sobre a exatidão e precisão das razões isotópicas de Zn, uma solução com $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de Zn foi analisada, variando-se a voltagem da lente em intervalos de 0,5 V na faixa de voltagem situada entre 5,5 e 7,5 V. Para tanto, os demais parâmetros otimizados foram tempo morto do detector (50 ns), tempo de residência (10 ms) e tempo de integração (10000 ms).

2.2.9. Otimização das condições da cela de reação e colisão

A vazão de gás e a voltagem da cela de reação e colisão (*RPq*) foram avaliadas de maneira univariada para minimizar as interferências poliatômicas, e, em caráter especial, as provocadas pelo enxofre. Assim, optou-se por iniciar pela avaliação da vazão do gás metano, variada entre e 0,4 e $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, em intervalos de $0,1 \text{ mL min}^{-1}$. As condições operacionais do ICP-MS são apresentadas na Tabela 9.

Soluções de $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn e $180 \mu\text{mol L}^{-1}$ de S foram injetadas separadamente. Esta proporção entre analito e interferente foi empregada, considerando-se o número de resíduos contendo grupos tióis na anidrase carbônica.

As intensidades dos cinco isótopos de Zn foram monitoradas em função do aumento da vazão do gás metano na cela de reação, bem como as razões sinal/ruído para Zn/S, mantendo-se fixos os parâmetros *RPa* e *RPq* do quadrupolo da cela dinâmica de reação em 0 e 0,4 V, respectivamente. Estes

parâmetros representam os termos a e q na equação de Mathieu, que descreve as regiões de estabilidade dos íons em campos quadrupolares.

Após a otimização da vazão de gás metano ($0,4 \text{ mL min}^{-1}$), o parâmetro RPq foi avaliado, variando-o entre 0,4 e 0,8 V, em intervalos de 0,1 V. Para tanto, as intensidades dos cinco isótopos de Zn foram monitoradas em função do aumento do RPq , bem como as razões sinal/ruído para Zn/S, com as mesmas condições operacionais usadas no estudo anterior (Tabela 9).

2.2.10. Avaliação da discriminação de massas

Para avaliar a exatidão do método proposto, no tocante à determinação das razões isotópicas naturais, foi utilizado o material de referência de razões isotópicas naturais de Zn (IRMM-3702) do *Institute for Reference Materials and Measurements*.

Uma alíquota do material de referência foi diluída adequadamente para obtenção de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de Zn. Esta solução foi analisada por ICP-MS de acordo com as condições previamente otimizadas, o tempo morto do detector (50 ns), os parâmetros de medida (tempo de residência de 10 ms e tempo total de integração de 10000 ms) e a voltagem da lente (6,0 V).

A partir dos valores obtidos de razão isotópica para o material de referência, foram calculados os fatores de correção, por meio da razão entre a razão certificada e a razão medida. Além da correção, o fator compensa os efeitos de discriminação de massas sofridos por uma solução de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de Zn. O sistema utilizado na correção de discriminação de massas é o conhecido como “*Bracketing*” em que o padrão certificado é medido antes e depois de um conjunto de amostras (Vanhaecke e Degryse, 2012).

2.2.11. Determinações por ICP-MS

As condições usadas nas determinações de zinco estão descritas na Tabela 10. Curvas analíticas para ^{64}Zn e ^{66}Zn foram construídas em ICP-MS no intervalo de concentração entre 10,0 e 500,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para tanto, empregou-se CH_4 na cela de reação.

Tabela 10. Condições de operação do ICP-MS após as otimizações.

Parâmetros	
Nebulizador	Meinhard
Câmara de nebulização	Ciclônica
Potência de radiofrequência	1200 W
Vazão do gás nebulizador - Ar	0,9 L min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar - Ar	1,2 L min ⁻¹ (otimizado diariamente)
Medidas	
Modo de aquisição	Peak hopping
Modo do detector	Pulse
Tempo de residência	10 ms
Tempo de integração	10000 ms
Tempo morto do detector	50 ns
Replicatas	5
Voltagem da lente	6,0 V
Razões m/z monitoradas	^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{67}Zn , ^{68}Zn e ^{70}Zn
Condições da cela dinâmica de reação	
Gás empregado	CH_4
<i>RPq</i>	0,4 V
Vazão de gás	0,4 L min ⁻¹

As medições de razão isotópicas de Zn por ICP-MS foram realizadas de acordo com as condições previamente otimizadas: tempo morto do detector (50 ns), parâmetros de medida (tempo de residência de 10 ms, tempo total de integração de 10000 ms) e voltagem da lente (6,0 V).

2.2.12. Avaliação da ligação dos isótopos ^{67}Zn e ^{68}Zn à anidrase carbônica

Os materiais enriquecidos com ^{67}Zn e ^{68}Zn são constituídos por óxido de zinco enriquecido em ^{67}Zn (61,9 mg) e óxido de zinco enriquecido em ^{68}Zn (30,9 mg). Os materiais foram inicialmente solubilizados em ácido nítrico concentrado, e, posteriormente, avolumados para 25 mL com água deionizada, com concentração final do ácido igual a 4% (v/v). As soluções estoque dos isótopos foram armazenadas a 4 °C. Em seguida, foram preparadas soluções intermediárias a partir de diluições das soluções estoques, obtendo-se soluções com $153 \mu\text{mol L}^{-1}$ de zinco. O pH das soluções foi ajustado para 7,0, adicionando-se gotas de NH_4OH , por meio de um potenciômetro.

Os materiais enriquecidos e certificado foram incubados a 25 °C individualmente com a apo-enzima, preparada como descrito no capítulo anterior (item 1.2.5.). A proporção metal/proteína seguiu a proporção estequiométrica de 0,5 (Hagege, *et al.*, 2004).

As soluções enriquecidas de ^{67}Zn e de ^{68}Zn foram preparadas pela adição de 232 e 195 μL das soluções intermediárias dos isótopos, respectivamente. A concentração dos isótopos no enriquecimento foi $6,129 \mu\text{mol L}^{-1}$ adicionados a $12,24 \mu\text{mol L}^{-1}$ da apo-enzima.

Para simular o efeito da adição de zinco à anidrase carbônica nas condições de razão isotópica naturais, preparou-se uma solução intermediária com $15,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ de zinco a partir da solução de IRMM-3702. Em seguida,

foram adicionados uma alíquota da solução intermediária, de maneira que $6,129 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn fossem adicionados a $12,24 \mu\text{mol L}^{-1}$ da apo-enzima.

Após o período de incubação com a apo-enzima, o excesso de metal foi removido por ultrafiltração, empregando filtros de exclusão por peso molecular de 10000 Da (Microcon e Amicon Ultra, Millipore). A solução foi centrifugada a 7232 g por 15 min em tubos com capacidade de 4,0 mL. Para garantir a eficiência da remoção do excesso de zinco, as soluções foram submetidas a cinco etapas de limpeza com acetato de amônio $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 7,0. A enzima, incubada com isótopos e material de referência, foi recuperada em um volume final de 10,0 mL, em ácido nítrico 0,2 % (v/v).

As razões isotópicas foram determinadas por ICP-MS, empregando as condições da Tabela 10. As razões isotópicas foram determinadas após adição de uma alíquota do material certificado IRMM-3702. Também foram preparados brancos dos procedimentos empregados da mesma forma.

2.2.12. Avaliação da atividade enzimática da anidrase incubada com os isótopos ^{67}Zn e ^{68}Zn

O efeito da adição dos isótopos ^{67}Zn e ^{68}Zn sobre a atividade enzimática foi avaliado, empregando-se o método da hidrólise do acetato de *p*-nitrofenila, conforme descrito no Capítulo 1, item 1.2.7. Para tanto, a absorvância das soluções foi medida em 400 nm, após um intervalo de 3 minutos, observando-se os volumes de enzima, tampão, água e acetato de *p*-nitrofenila empregados na Tabela 5.

Foram monitoradas as atividades da apo-enzima a $12,24 \mu\text{mol L}^{-1}$ e da mesma enriquecida com os isótopos ^{67}Zn e ^{68}Zn , individualmente, a $6,12 \mu\text{mol L}^{-1}$. Além disso, a apo-enzima foi incubada com $6,12 \mu\text{mol L}^{-1}$ da solução de

IRMM-3702 para simular o efeito da adição de zinco à anidrase nas condições de razão isotópica naturais, sendo este grupo considerado um grupo controle deste experimento.

2.3. Resultados e Discussão

2.3.1. Avaliação da concentração de Zn

Os critérios de escolha das condições na otimização dos parâmetros foram a maior precisão dos resultados, expressa como desvio padrão, e valores de razão isotópica mais próximos da abundância natural. A IUPAC adota os valores de razão isotópica de Zn publicados por Ponzevera, *et al.*, 2006 (Tabela 11). Estes autores utilizaram um ICP-MS com analisador de m/z do tipo duplo setor magnético e elétrico, dotado de um sistema multicoletor de íons composto por doze copos de Faraday. Os valores de razão isotópica obtidos por Ponzevera, *et al.* (2006) são também considerados como valores de referência do material certificado IRMM-3702 (Berglund e Wieser, 2011).

Tabela 11. Valores de razão isotópica de Zn em condições naturais.

Razão isotópica	Valores de referência segundo a IUPAC
$^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$	$0,56397 \pm 0,00030$
$^{67}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$	$0,082166 \pm 0,00035$
$^{68}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$	$0,37519 \pm 0,00016$
$^{70}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$	$0,012418 \pm 0,000023$

A influência da concentração de Zn (de 2,5 a 400 $\mu\text{g L}^{-1}$) sobre a precisão e a exatidão das razões isotópicas foi o primeiro parâmetro avaliado. Esta faixa de concentração foi similar a empregada por Suzuki, *et al.*, (2004), adicionando-se, neste trabalho, a concentração de 400 $\mu\text{g L}^{-1}$. Como se observa na Figura 25, a precisão melhorou com o aumento da concentração de

Zn. Com $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de Zn, foram obtidas precisões de 1,1 % para $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$; 4,1 % para $^{67}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$; 3,0 % para $^{68}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ e 1,6 % para $^{70}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$. Esta condição apresentou maior precisão e valores mais próximos às razões naturais de Zn, sendo eleita para otimização das demais condições experimentais, corroborando com os resultados de Suzuki, *et al.*, (2004).

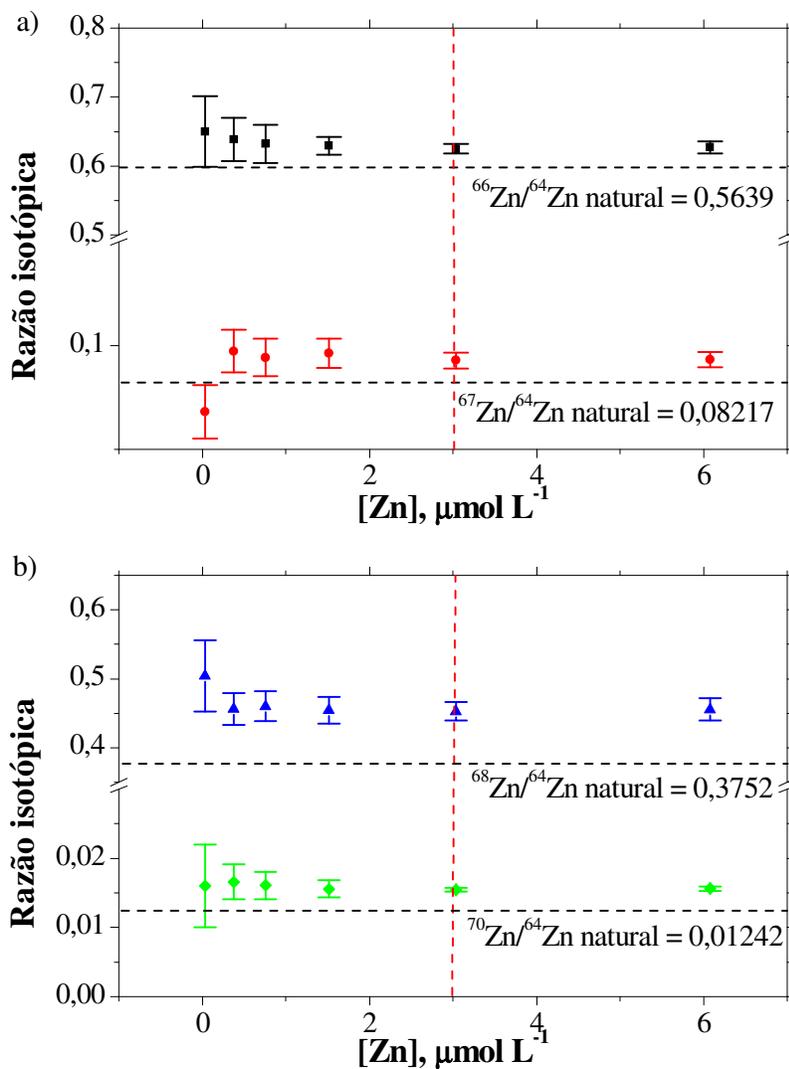


Figura 25. Razões isotópicas de zinco em função da concentração, para as razões de (a) $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (■) e $^{67}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (●); e (b) $^{68}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (▲) e $^{70}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (◆). As linhas pontilhadas pretas indicam as razões isotópicas naturais e as linhas pontilhadas vermelhas indicam a condição eleita nesta otimização.

2.3.2. Avaliação da potência RF

As condições mais baixas de potência RF foram empregadas com o intuito de minimizar possíveis interferências causadas pelas espécies presentes na atmosfera gasosa do argônio. Em condições de plasma frio, tais moléculas interferentes podem não ser completamente atomizadas, tentando-se evitar ou reduzir estas interferências (Vanhaecke e Degryse, 2012). Entretanto, foram observadas os piores valores de razão isotópica nos menores valores de RF, especialmente para as razões $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ e $^{68}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$. A principal razão para este resultado pode estar na redução da eficiência de ionização do isótopo ^{64}Zn e na formação de outros tipos de íons poliatômicos.

A avaliação da potência de RF sobre a razão isotópica é mostrada na Figura 26. Observam-se valores de razão isotópica mais próximas das razões naturais na potência de 1200 W, exceto para a razão $^{70}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$. Para esta última razão, a potência de RF que proporciona razão mais próxima da natural é 1100 W. Entretanto, a potência RF de 1100 W aumenta as razões de $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ e $^{68}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$, em 1,7 e 3,1%, respectivamente, prejudicando a exatidão destas medidas. Além disso, a potência RF de 1200 W apresentou os menores valores de desvio padrão, resultando na maior precisão entre as condições avaliadas, sendo esta condição eleita como ótima neste experimento.

Acredita-se que a potência de RF pode influenciar a razão isotópica, tanto na distribuição dos íons dos isótopos, quanto pela geração dos íons na fonte de plasma (Suzuki, *et al.*, 2004). Ambos os fatores podem influenciar os resultados aqui apresentados, de maneira que a potência de 1200 W foi aquela que proporcionou melhor distribuição dos íons para a maioria das razões avaliadas.

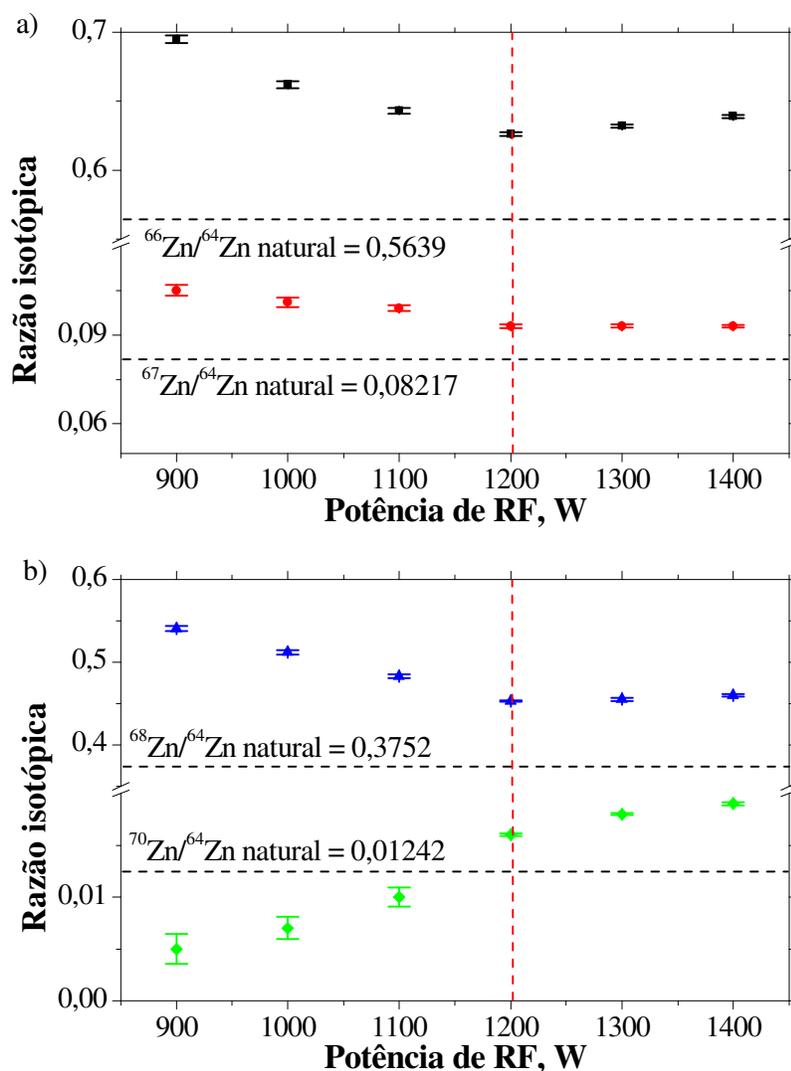


Figura 26. Razões isotópicas de zinco em função da potência RF, para as razões de (a) $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (■) e $^{67}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (●); e (b) $^{68}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (▲) e $^{70}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (◆). As linhas pontilhadas pretas indicam as razões isotópicas naturais e as linhas pontilhadas vermelhas indicam a condição eleita nesta otimização.

2.3.3. Otimização das condições de aquisição do ICP-MS

Durante uma análise em ICP-MS, alguns fenômenos relacionados com a etapa de introdução da amostra ou com as etapas de transmissão e detecção do íon e processamento do sinal podem ocorrer individualmente ou

simultaneamente, afetando a exatidão, a repetibilidade e a reprodutibilidade da determinação (Nelms, *et al.*, 2001). Os principais parâmetros de aquisição de dados do ICP-MS que são otimizados em estudos de razão isotópica são o tempo de integração e o tempo de residência. Estes parâmetros influenciam, em caráter particular, a precisão dos resultados. A precisão das medidas de razão isotópica pode ser estatisticamente diferente, dependendo da quantidade de tempo em que cada isótopo será medido (Nelms, *et al.*, 2001).

Para a avaliação do tempo de residência e de integração, empregou-se 200 µg L⁻¹ de Zn e potência de 1200 W. Até o presente momento, foram utilizadas as condições de aquisição de dados pré-estabelecidas para experimentos de rotina e quantificação do teor total dos elementos químicos. Assim, tempo de residência e integração iguais a 50 ms e 2500 ms, respectivamente. Nestas condições, as razões entre ⁶⁶Zn/⁶⁴Zn, ⁶⁷Zn/⁶⁴Zn, ⁶⁸Zn/⁶⁴Zn e ⁷⁰Zn/⁶⁴Zn e suas precisões foram 0,626 ± 0,001 (0,2 %), 0,0933 ± 0,0006 (0,7 %), 0,4533 ± 0,0008 (0,2 %) e 0,016±0,001 (0,7 %), respectivamente. Comparando as razões deste trabalho com as naturais (Tabela 11), verifica-se que as mesmas são maiores que 6,2 %, 1,1 %, 7,8 % e 0,4 % para as razões ⁶⁶Zn/⁶⁴Zn, ⁶⁷Zn/⁶⁴Zn, ⁶⁸Zn/⁶⁴Zn e ⁷⁰Zn/⁶⁴Zn, respectivamente. As interferências poliatômicas causadas por espécies de argônio podem ser um dos motivos que contribuem para as diferenças observadas nas razões medidas, as quais podem afetar a discriminação de massas, bem como a exatidão das medidas.

O primeiro parâmetro utilizado foi o tempo de residência, ou seja, o período de tempo em que cada razão massa/carga é medida. Os resultados das razões isotópicas de zinco e suas precisões são apresentados na Figura 27, nos intervalos de tempo de residência entre 10 e 50 ms. Pode-se observar que quanto maior a frequência das medidas, maior será a precisão. Isso pode ser

evidenciado pelo desvio padrão das medidas, uma vez que o tempo de residência de 10 ms apresentou maior precisão, corroborando com o trabalho de Balcaen, *et al.* (2008). Este resultado está de acordo com a teoria de razão isotópica, uma vez que quanto mais simultâneas forem as medidas, melhor será a precisão (Vanhaecke, *et al.*, 2012). Esta observação é baseada no fato de que os melhores parâmetros de precisão para a razão isotópica são obtidos com analisadores do tipo duplo setor magnético e elétrico, dotado de um sistema multicoletor de íons composto de copos de Faraday, os quais são considerados de natureza simultânea. Portanto, a melhor forma de aproximar um dispositivo de exploração rápida, tal como um quadrupolo, à medição simultânea é a utilização de tempos de residência mais curtos, resultando em um maior período de varredura por período de medição (Thomas, 2008).

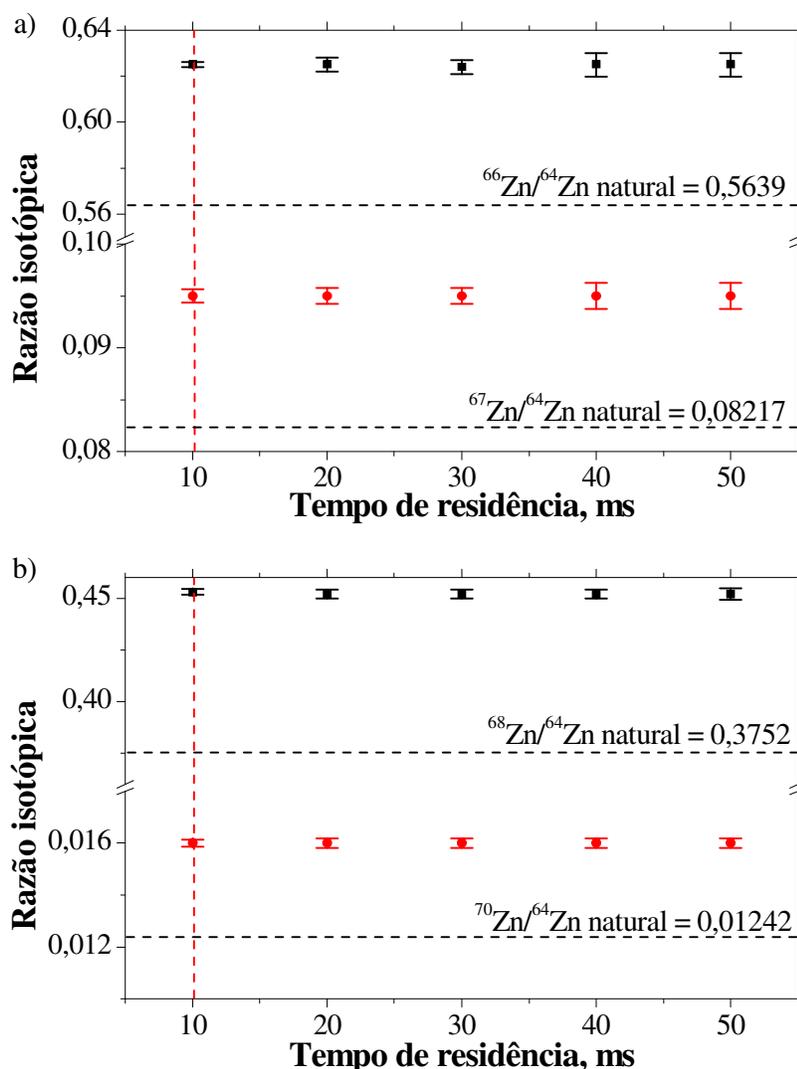


Figura 27. Razões isotópicas de zinco em função do tempo de residência, para as razões de (a) $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (■) e $^{67}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (●); e (b) $^{68}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (▲) e $^{70}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (◆). As linhas pontilhadas pretas indicam as razões isotópicas naturais e as linhas pontilhadas vermelhas indicam a condição eleita nesta otimização.

O tempo de integração corresponde ao tempo de residência em cada razão massa/carga multiplicado pelo número de vezes que cada m/z é medida. As razões isotópicas, bem como suas respectivas precisões estão apresentadas na Figura 28. Foi verificada maior precisão à medida que o tempo de integração foi aumentado. Em teoria, observa-se que a precisão pode aumentar

em altas intensidades, ao se usar um tempo longo de aquisição. Tempos de análise da ordem de 5 a 10 min são usuais em medidas de razão isotópica (Thomas, 2008).

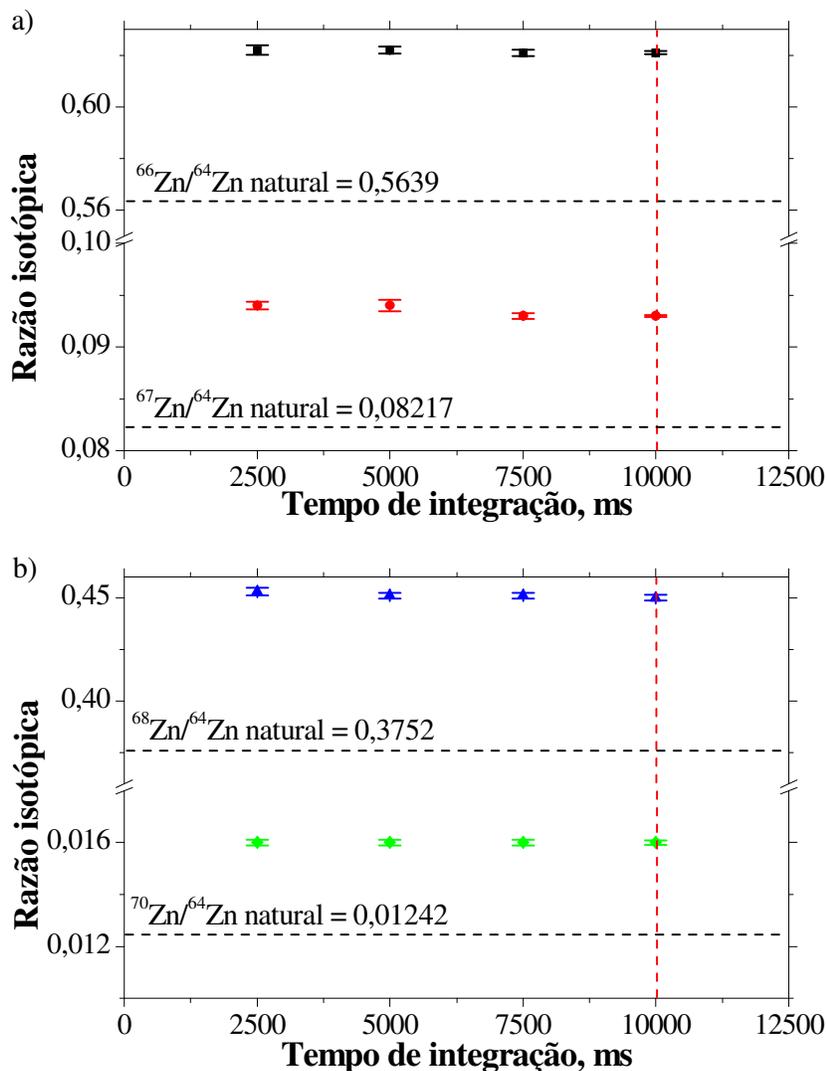


Figura 28. Razões isotópicas de zinco em função do tempo de integração, para as razões de (a) $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (■) e $^{67}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (●); e (b) $^{68}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (▲) e $^{70}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (◆). As linhas pontilhadas pretas indicam as razões isotópicas naturais e as linhas pontilhadas vermelhas indicam a condição eleita nesta otimização.

2.3.4. Correção do tempo morto do detector

O tempo morto do detector é o tempo requerido para a detecção e contagem do pulso iônico (Vanhaecke, *et al.*, 2012). Quando um íon chega à superfície do detector, um tempo mínimo é requerido para detectar um segundo íon. Caso o segundo íon chegue ao detector antes deste tempo mínimo, o segundo íon não será detectado, e, portanto, as contagens por segundo (cps) observadas serão menores que as reais.

O tempo morto é uma limitação fundamental da eletrônica do detector, e situa-se entre 30 e 50 ns, dependendo do sistema de detecção (Thomas, 2008). Além disso, a falta de correção do tempo morto do detector pode levar a razões isotópicas inexatas e aumentar a discriminação de massas. A correção ocorre por meio da seguinte equação:

$$I_r = \frac{I_0}{1 - I_0 \tau (s)} \quad \text{eq. 5}$$

onde I_r representa a contagem corrigida para perdas de tempo morto, τ é o tempo morto do sistema de detecção, em segundos, e I_0 é a contagem obtida sem a correção do tempo morto (isto é, o tempo morto ~ 0 ns).

As diferentes curvas correspondendo a cada concentração de zinco apresentam um ponto de interseção único, permitindo determinação visual do tempo morto. Para as razões $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$, $^{67}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$, $^{68}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ e $^{70}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$, o tempo morto obtido foi 50 ns (Figura 29).

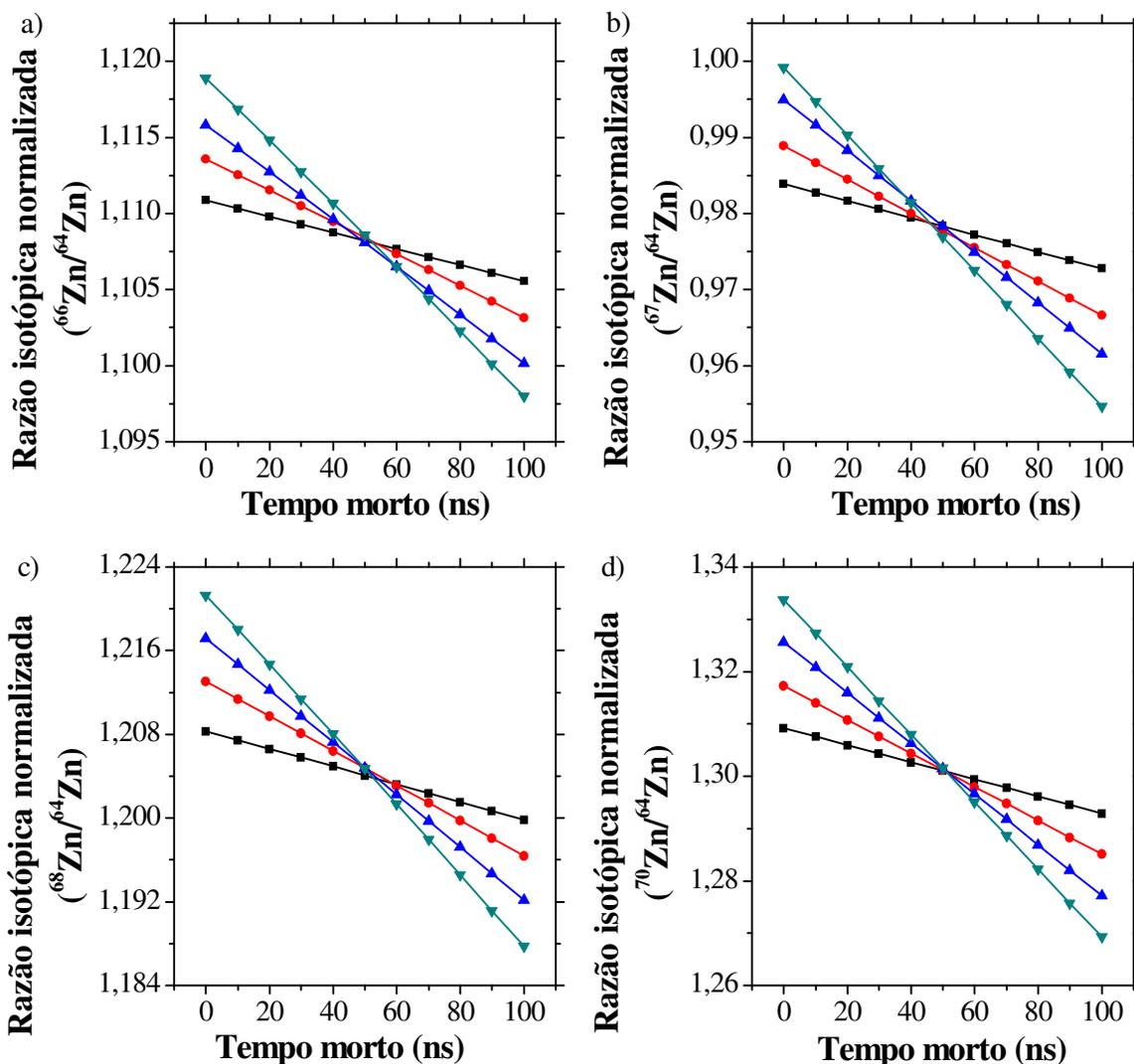


Figura 29. Razão isotópica normalizada $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (a), $^{67}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (b), $^{68}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (c) e $^{70}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (d) em função do valor de tempo morto de detector aplicado na correção dos resultados, empregando soluções de Zn a 3,8 (■), 7,6 (●), 11,4 (▲) e 15,2 (★) $\mu\text{mol L}^{-1}$.

2.3.5. Avaliação da voltagem da lente iônica na exatidão e precisão das razões isotópicas de Zn

O feixe de íons que passa pela abertura do cone *skimmer* é dominado por átomos neutros de argônio. A lente de extração, carregada negativamente,

atrai seletivamente íons positivos, repelindo íons com carga negativa e elétrons, os quais são removidos pelo sistema de vácuo, bem como as partículas neutras, as quais não estão sujeitas à atração ou repulsão proporcionadas pela lente. Além disso, íons positivos que formam o feixe podem repelir-se uns aos outros, resultando na mudança da composição e/ou na perda de foco do feixe de íons (Tanner, 2002). Como íons leves e pesados movem-se com a mesma velocidade, sua energia cinética depende da massa. Assim, a probabilidade de remoção do feixe, como resultado da repulsão mútua, é maior para um íon mais leve do que para um íon mais pesado, fenômeno conhecido como efeito espaço-carga. Assim, um viés entre a razão medida e o valor verdadeiro pode ser observado, o qual precisa ser corrigido.

Nesta avaliação, foi empregada uma solução de $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn e potencial aplicado à lente iônica entre 5,5 e 7,5 V. As razões mais afetadas pela voltagem da lente foram $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ e $^{68}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (Figura 30), diminuindo em aproximadamente 1,8% e 0,4% na voltagem da lente igual a 6,0 V, em comparação com a condição pré-estabelecida do equipamento (5,5 V). Assim, a melhora para estas razões pode estar relacionada à menor perda do isótopo de ^{64}Zn , uma vez que esta condição preservou a trajetória do isótopo mais leve no feixe de íons. As demais razões não sofreram mudanças significativas na exatidão das razões. No tocante a precisão, não foram observadas diferenças em relação aos valores obtidos no experimento anterior, mantendo-se os valores similares de desvio padrão.

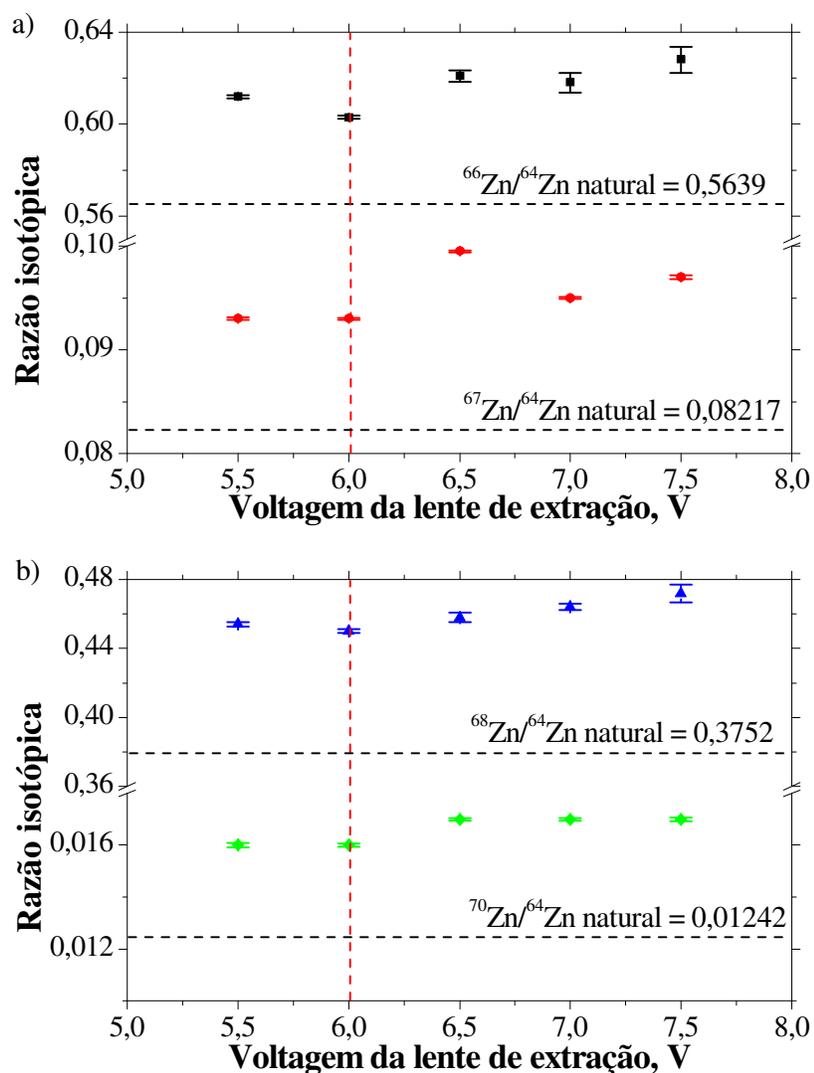


Figura 30. Razões isotópicas de zinco em função da voltagem da lente (V), para as razões de (a) $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (■) e $^{67}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (●); e (b) $^{68}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (▲) e $^{70}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (◆). As linhas pontilhadas pretas indicam as razões isotópicas naturais e as linhas pontilhadas vermelhas indicam a condição eleita.

2.3.6. Otimização da cela dinâmica de colisão e reação

O uso da cela dinâmica de colisão e reação é a estratégia adotada para a remoção de interferências quando são realizadas determinações de elementos químicos, empregando um instrumento de ICP-MS com resolução unitária.

Nesta tese, a aplicação da cela foi proposta por remover adequadamente várias espécies iônicas, uma vez que materiais biológicos podem conter grandes quantidades de carbono, nitrogênio e enxofre.

A otimização da vazão de gás (CH_4) na cela de reação e colisão foi avaliada na faixa de 0,4 a 1,0 mL min^{-1} . A Figura 31 apresenta as intensidades obtidas para as soluções de 30,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn e 180,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de S, em função da vazão de gás metano, para valores fixos de RPq de 0,4 V. Foi observado que a intensidade dos cinco isótopos de Zn decresce gradativamente à medida que a vazão de gás aumenta na cela. A intensidade de sinal entre as condições de 0,4 e 1,0 mL min^{-1} diminuiu aproximadamente 2,7 vezes para o isótopo ^{64}Zn , 2,5 vezes para ^{66}Zn , 2,5 vezes para ^{67}Zn , 2,4 vezes para ^{68}Zn e 2,8 vezes para ^{70}Zn . Esta queda na intensidade do sinal dos isótopos de Zn pode ser atribuída à ocorrência de colisões não reativas com o metano. No tocante às interferências poliatômicas baseadas nas espécies de enxofre (mais provavelmente, S_2 e SO_2), observa-se uma queda da intensidade do sinal, a qual pode ocorrer tanto por colisões com o metano, quanto pela reação dos interferentes com íons moleculares oriundos do metano (C_2H_3^+ e C_2H_5^+), os quais são bons doadores de prótons, e podem converter as espécies de enxofre em espécies neutras ou com m/z diferente do analito. Entretanto, a queda de sinal do interferente foi menor do que a observada para o analito. À medida que a vazão de gás aumenta, menores valores para a razão sinal/ruído foram observados, obtendo-se a maior razão sinal/ruído para a condição de 0,4 mL min^{-1} . Considerando-se as razões isotópicas de Zn em cada vazão de metano, foi verificado que as mesmas diminuíram de 0,603 para 0,592 ($^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$), de 0,450 para 0,426 ($^{68}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$) e 0,015 para 0,011 ($^{70}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$), aproximando-se das razões isotópicas naturais.

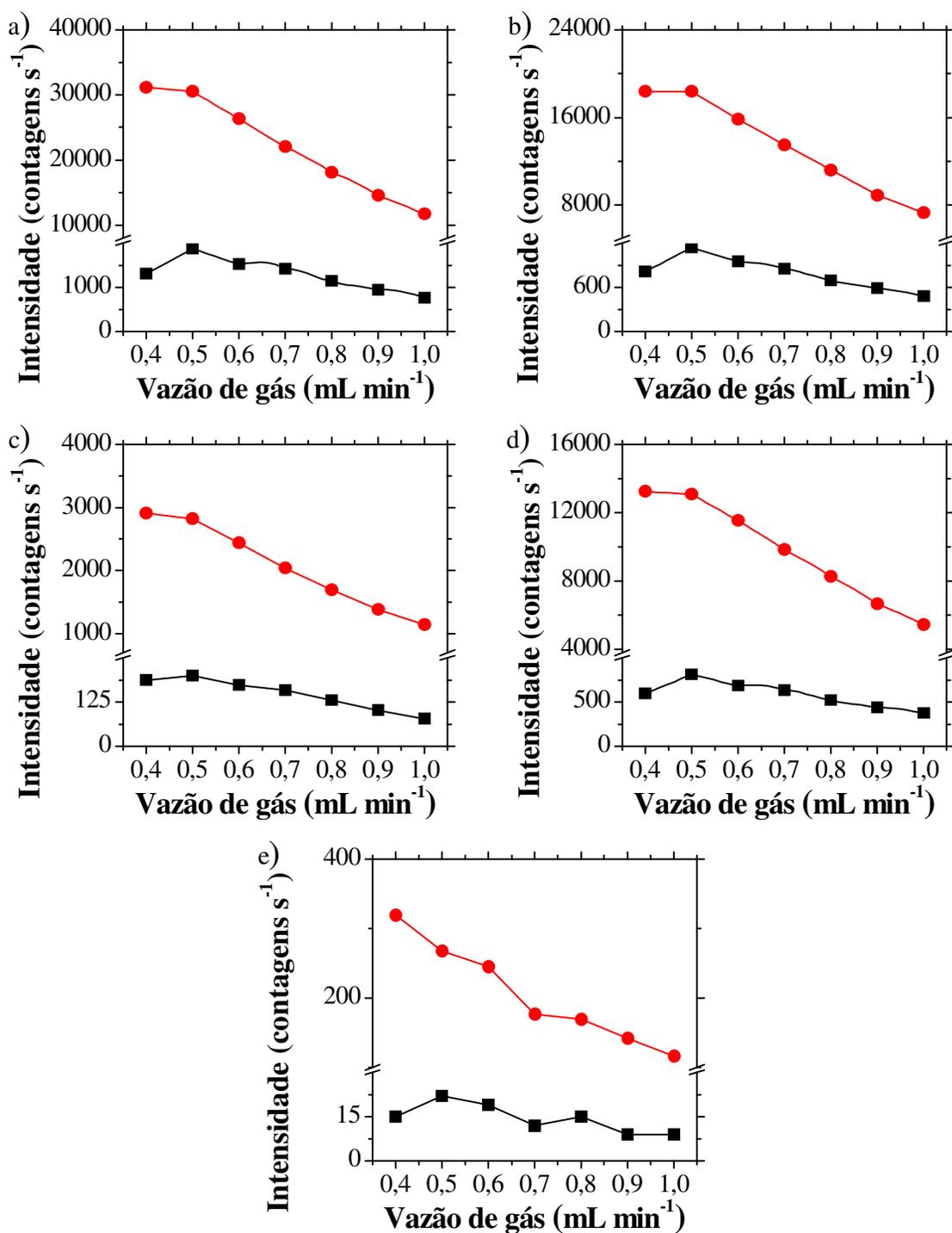


Figura 31. Otimização da vazão de CH₄ (mL min⁻¹) da cela de reação e colisão, para os isótopos ⁶⁴Zn (a), ⁶⁶Zn (b), ⁶⁷Zn (c), ⁶⁸Zn (d) e ⁷⁰Zn (e). São apresentados (■) o sinal do interferente e (●) do isótopo.

A otimização da voltagem do quadrupolo na cela de reação e colisão (RPq) foi avaliada na faixa de 0,4 a 0,8 V, visando maximizar a transmissão dos íons até o quadrupolo analítico, e, conseqüentemente, até o detector. A Figura 32 apresenta as intensidades obtidas para as soluções de $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn e $180 \mu\text{mol L}^{-1}$ de S, em função da voltagem, para a vazão de gás de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$. A intensidade dos cinco isótopos de Zn decresce significativamente com o aumento do valor de RPq . A intensidade de sinal entre as condições de 0,4 e 0,8 V diminuiu aproximadamente 3,3 vezes para o isótopo ^{64}Zn , 3,2 vezes para ^{66}Zn , 3,2 vezes para ^{67}Zn , 3,2 vezes para ^{68}Zn e 2,8 vezes para o isótopo ^{70}Zn , sugerindo uma menor estabilidade na trajetória dos íons com o aumento do RPq . Para as espécies interferentes de S, foi verificada queda da intensidade de aproximadamente 1,2 vezes para m/z 64, 1,2 para m/z 66, 1,1 para m/z 67, 1,1 para m/z 68 e 0,3 para m/z 70.

Nesta avaliação, a relação sinal/ruído oscilou ao longo das voltagens aplicadas. Para os isótopos ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{67}Zn e ^{68}Zn , a maior razão sinal/ruído foi observada em 0,4 V, enquanto ^{70}Zn apresentou maior razão sinal/ruído em 0,8 V. Dessa maneira, foi necessário estabelecer uma condição de compromisso para que todos os isótopos pudessem ser englobados em uma única análise, mesmo que nem todas as melhores condições individuais fossem contempladas. Assim, o parâmetro RPq escolhido foi 0,4 V, considerando-se a razão sinal/ruído da maioria dos isótopos e as maiores intensidades para todos os isótopos. Além disso, o aumento de RPq de 0,4 V para 0,8 V resultou em razões isotópicas de Zn mais distantes das razões naturais, sendo verificado que as mesmas aumentaram de 0,592 para 0,620 ($^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$), de 0,093 para 0,105 ($^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$), de 0,426 para 0,448 ($^{68}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$) e 0,011 para 0,015 ($^{70}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$). Este foi mais um motivo para a escolha da condição de 0,4 V para os experimentos posteriores.

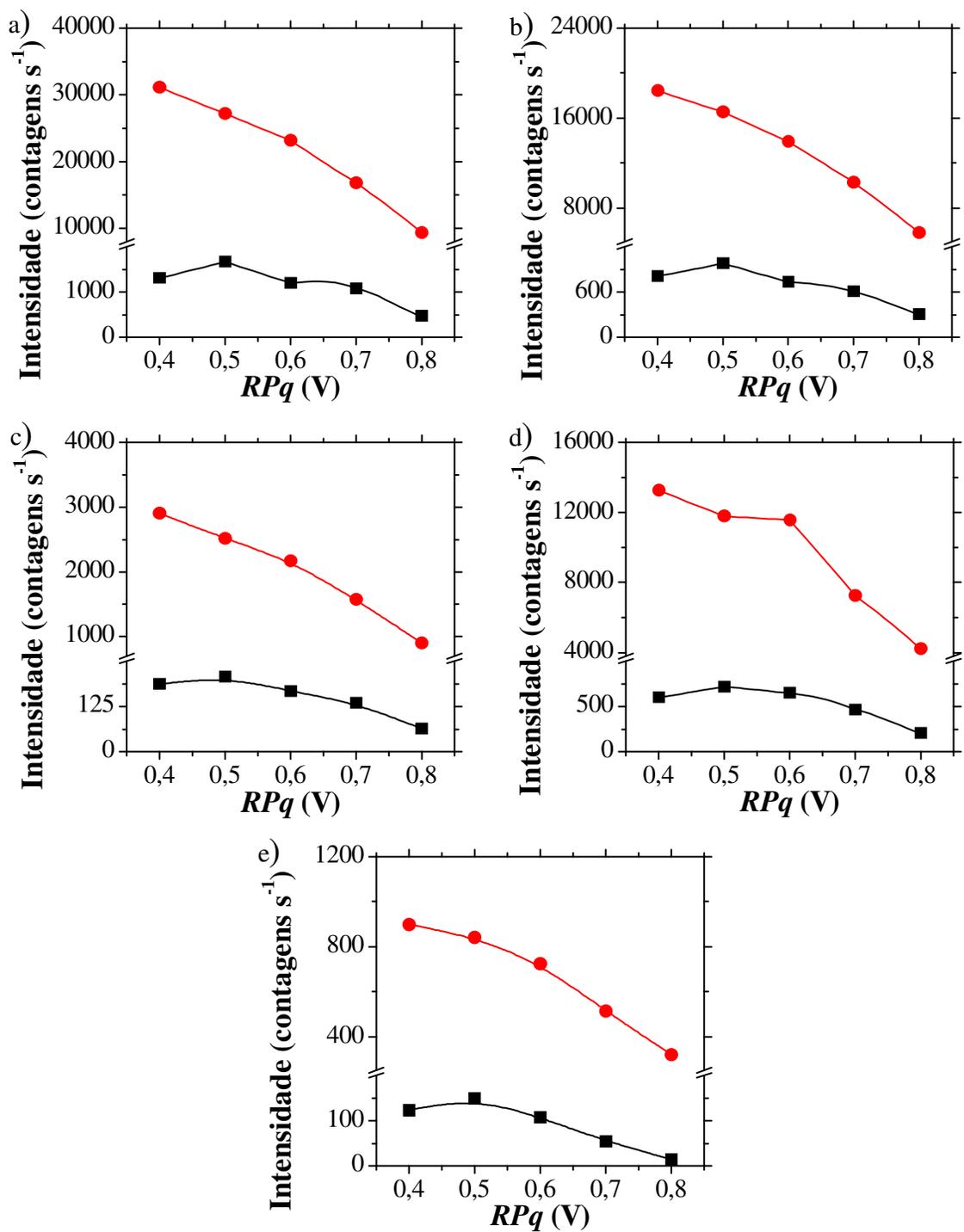


Figura 32. Otimização da voltagem do quadrupolo da cela de reação e colisão, para os isótopos ⁶⁴Zn (a), ⁶⁶Zn (b), ⁶⁷Zn (c), ⁶⁸Zn (d) e ⁷⁰Zn (e). São apresentados (■) o sinal do interferente e (●) do isótopo.

2.3.7. Avaliação da discriminação de massas

Comparando as razões obtidas antes e após as otimizações, foi observada uma aproximação das razões medidas das razões naturais de Zn, resultando na queda de $0,625 \pm 0,007$ (1,1%) para $0,592 \pm 0,0006$ (0,1%) na razão $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$, de $0,093 \pm 0,004$ (4,1%) para $0,093 \pm 0,00009$ (0,1%) na razão $^{67}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$, de $0,0453 \pm 0,01$ (3,0%) para $0,426 \pm 0,001$ (0,3%) na razão $^{68}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ e de $0,015 \pm 0,0002$ (1,6%) para $0,011 \pm 0,00003$ (0,2%) na razão $^{70}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$. Em todos os casos, percebe-se um aumento significativo na precisão para a maioria das razões isotópicas. Deve-se destacar que a precisão obtida situa-se dentro da faixa de desvio padrão observada em experimentos empregando o mesmo tipo de analisador de m/z (Heumann, 1998). Entretanto, percebe-se que ainda existem diferenças entre as razões medidas e as razões naturais de Zn (Tabela 11). Após o período de otimização, compreende-se que estas diferenças, conhecidas como discriminação de massas, podem ser atribuídas ao efeito espaço-carga. Outro fator que pode contribuir para a discriminação é a expansão na região de extração dos íons, ocasionada pelas colisões entre as partículas do feixe de íons e pelo fato de que apenas a fração central do feixe passa pela abertura do cone *skimmer* (Thomas, 2008, Vanhaecke, *et al.*, 2012). Estes eventos resultam na perda maior dos isótopos mais leves, resultando nas razões isotópicas medidas mais elevadas do que as observadas em condições naturais.

A discriminação foi avaliada a partir da medição da razão dos isótopos, empregando-se um material de referência certificado (IRMM-3702), cuja composição isotópica é conhecida e certificada. Para adequar as medidas de razão isotópica, um fator de correção foi calculado para compensar os efeitos de discriminação sobre as amostras por meio da razão entre o valor certificado

e a razão isotópica medida. Este fator foi posteriormente utilizado para correção das razões isotópicas das amostras de anidrase carbônica incubada com os isótopos. Nas Figuras 33 e 34, são apresentadas as medidas da solução de Zn e a solução de material certificado, ambas a $30 \mu\text{mol L}^{-1}$. Foi observado que a razão medida do IRMM-3702 foi aproximadamente 2,9%, 0,7 %, 4,5 % e 0,3 % maior que o valor certificado, para as razões $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$, $^{67}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$, $^{68}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ e $^{70}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$, respectivamente. Após a correção, as razões isotópicas da solução de Zn são significativamente mais próximas das razões naturais de zinco, sendo iguais a $0,5629 \pm 0,0008$ (0,1%), $0,0861 \pm 0,0002$ (0,2%), $0,379 \pm 0,001$ (0,2%) e $0,00923 \pm 0,00001$ (0,1%), para as razões $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$, $^{67}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$, $^{68}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ e $^{70}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$, respectivamente.

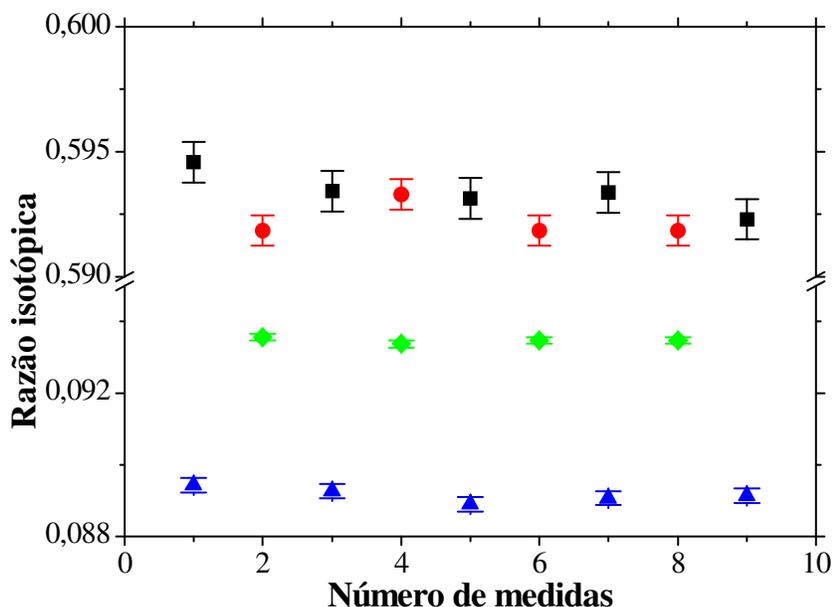


Figura 33. Razões isotópicas de zinco avaliadas na discriminação de massas. São apresentadas as razões de $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ no material certificado (■) e em solução padrão de Zn (●), bem como as razões de $^{67}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ no material certificado (▲) em solução padrão de Zn (◆).

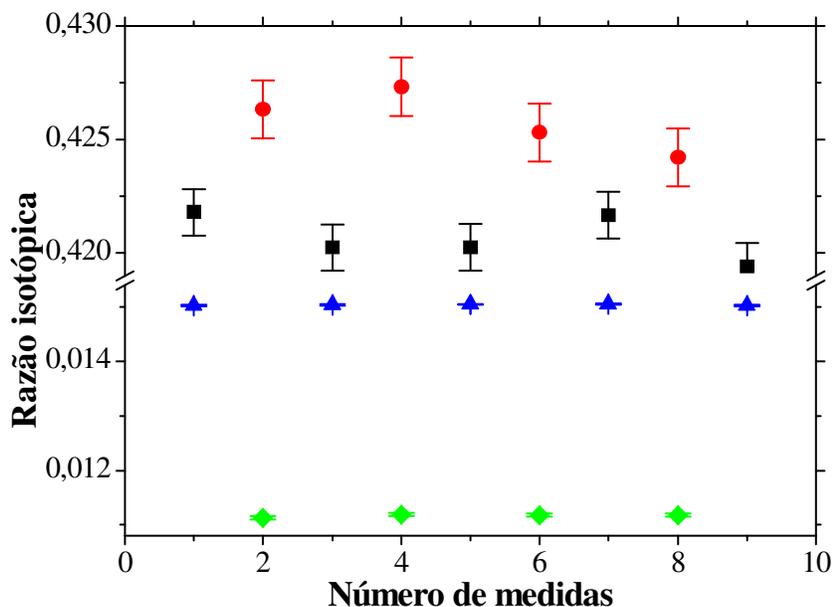


Figura 34. Razões isotópicas de zinco avaliadas na discriminação de massas. São apresentadas as razões de $^{68}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ no material certificado (■) e em solução padrão de Zn (●), bem como as razões de $^{70}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ no material certificado (▲) em solução padrão de Zn (◆).

2.3.8. Determinação do Zn total

Empregando-se as condições da Tabela 10, foram obtidas curvas analíticas para os isótopos de zinco, obtendo-se um coeficiente de correlação superior a 0,999 para todos os isótopos, bem como a linearidade obtida para a faixa de concentração de 0,15 a 7,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 35). As amostras de anidrase carbônica apresentaram concentrações da ordem de $65,6 \pm 0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$. Confrontando este resultado com a quantificação de proteína, no qual a concentração da proteína foi $151 \pm 0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$, pode-se estimar a relação proteína/metal sendo aproximadamente 0,5.

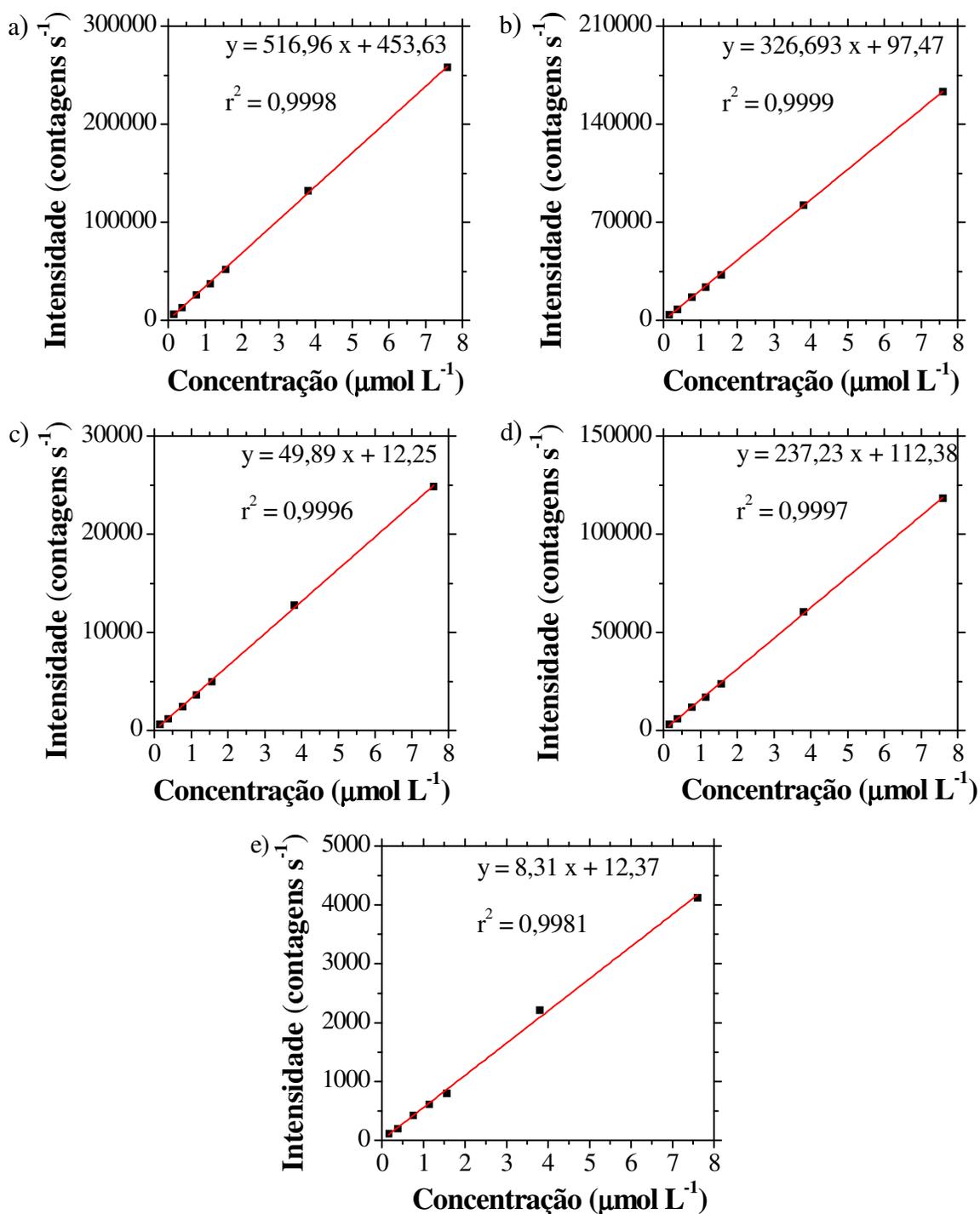


Figura 35. Curva analítica dos isótopos ⁶⁴Zn (a), ⁶⁶Zn (b), ⁶⁷Zn (c), ⁶⁸Zn (d) e ⁷⁰Zn (e), empregando-se as concentrações de 0,15, 0,38, 0,76, 1,14, 1,56, 3,8 e 7,6 μmol L⁻¹.

Considerando as condições otimizadas como satisfatórias (Tabela 10), foram avaliados os isótopos de zinco ligados à anidrase carbônica comercial. Para tanto, foi empregado o fator de correção obtido na discriminação de massas.

Como pode ser observado na Tabela 12, foram obtidas razões isotópicas distintas das observadas para os níveis naturais para ^{66}Zn , ^{67}Zn , ^{68}Zn e ^{70}Zn , indicando que a própria anidrase carbônica comercial apresenta valores de razões isotópicas diferentes da abundância natural. Como esta enzima é obtida a partir de eritrócitos bovinos, as diferenças observadas podem estar sujeitas a processos de fracionamento isotópico causado pelo metabolismo do zinco. Esta hipótese é reforçada, uma vez que a composição isotópica de zinco pode ser influenciada pela dieta. Pela avaliação do sangue humano, foi verificado que pessoas vegetarianas apresentam maior δ para o ^{67}Zn , enquanto pessoas com hábitos onívoros apresentam maior δ para o ^{66}Zn (Heghe, *et al.*, 2012). Os autores deste trabalho sugerem que novos trabalhos serão necessários para elucidar os mecanismos envolvidos no metabolismo do zinco, para explicar as diferenças observadas para a composição isotópica de zinco.

Tabela 12. Razão isotópica de zinco em amostras de anidrase carbônica.

Razão isotópica	Amostras de anidrase	Razão de referência da IUPAC
$^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$	$0,5715 \pm 0,0006$	$0,56397 \pm 0,00030$
$^{67}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$	$0,0877 \pm 0,0001$	$0,082166 \pm 0,00035$
$^{68}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$	$0,388 \pm 0,001$	$0,37519 \pm 0,00016$
$^{70}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$	$0,01190 \pm 0,00004$	$0,012418 \pm 0,000023$

Razões naturais de Zn: $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (0,56397), $^{67}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (0,082166), $^{68}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (0,37519) e $^{70}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (0,012418).

2.3.9. Avaliação da ligação dos isótopos ^{67}Zn e ^{68}Zn à anidrase carbônica

As razões isotópicas de Zn obtidas para anidrase enriquecida com os isótopos de Zn estão apresentadas na Tabela 13. Pode ser observado que o método proposto foi eficiente na remoção das interferências poliatômicas contendo espécies de enxofre, bem como no emprego das otimizações prévias. No tocante ao material de referência certificado, foram determinadas razões isotópicas que se aproximaram das abundâncias naturais, empregando o fator de correção para discriminação de massas. Entretanto, diferenças como as observadas em estudos de fracionamento isotópico não são aplicadas a este trabalho, uma vez que o equipamento utilizado possui baixa resolução, e, assim, a exatidão e precisões requeridas não podem ser obtidas (Guelke-Stelling e Blanckenburg, 2012).

Tabela 13. Razões isotópicas para anidrase carbônica enriquecida com ^{67}Zn , ^{68}Zn e o material certificado IRMM-3702.

Razão isotópica	Anidrase + IRMM-3702	Anidrase + ^{67}Zn	Anidrase + ^{68}Zn
$^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$	$0,5631 \pm 0,0003$	$0,5631 \pm 0,0003$	$0,5633 \pm 0,0004$
$^{67}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$	$0,0831 \pm 0,0001$	$1,099 \pm 0,001$	$0,4074 \pm 0,0002$
$^{68}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$	$0,3808 \pm 0,0007$	$0,549 \pm 0,002$	$0,9830 \pm 0,001$
$^{70}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$	$0,00978 \pm 0,00002$	$0,00671 \pm 0,00002$	$0,00717 \pm 0,00004$

Razões naturais de Zn: $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (0,56397), $^{67}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (0,082166), $^{68}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (0,37519) e $^{70}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (0,012418).

Cabe destacar que a proposta deste trabalho, ou seja, o preparo da anidrase carbônica enriquecida com isótopos de Zn foi obtido com sucesso. Podem ser observadas as razões isotópicas significativamente diferentes da

anidrase incubada com os isótopos de Zn nas razões naturais (IRMM-3702), demonstrando que o procedimento de ultrafiltração empregado foi eficiente na produção de uma proteína enriquecida, bem como o método de determinação foi eficiente na avaliação das razões. Pode ser observado que as razões de ^{67}Zn e ^{68}Zn aumentaram, respectivamente, em 13,2 e 2,6 vezes, quando comparadas às razões observadas no material certificado IRMM-3702. Como os isótopos foram incubados nas mesmas concentrações e proporções entre metal e proteína, pode-se levantar a hipótese da preferência da anidrase por ^{67}Zn , uma vez que a maior razão foi observada para este isótopo do que para ^{68}Zn . Este fato seria possível de ocorrer, uma vez que é atualmente sugerido que determinados isótopos de zinco podem ligar-se preferencialmente aos transportadores proteicos presentes na membrana basolateral de enterócitos (Balter, *et al.*, 2010). Para confirmar este resultado, outros trabalhos de pesquisa podem ser desenvolvidos, utilizando a dopagem da enzima com os cinco isótopos de Zn nas mesmas proporções, empregando para isso, um equipamento de maior resolução.

A enzima enriquecida poderia ser utilizada como um marcador específico em ensaios clínicos, uma vez que a anidrase está envolvida em diversas patologias em seres humanos, tais como o glaucoma e a síndrome recessiva de anidrase carbônica II. Neste último caso, o indivíduo portador desta doença pode desenvolver quadro de osteoporose, acidose tubular renal e calcificação cerebral (Lotan, *et al.*, 2006). Ainda pode ser destacado que métodos foram desenvolvidos e patenteados, utilizando a anidrase carbônica, como um biomarcador de hemólise, baseando-se na sua quantificação amostras de sangue (Kline e Zagorski, 2014). Assim, fica evidente tanto o interesse analítico quanto o biológico em estudos envolvendo anidrase carbônica.

A proteína enriquecida poderia ser utilizada como um padrão, e as amostras de interesse clínico seriam sujeitas a um procedimento de extração e separação de maneira a obter-se a anidrase carbônica. Posteriormente, a enzima purificada poderia ser enriquecida com o isótopo de ^{67}Zn . Assim, a concentração da enzima, bem como o teor de ^{67}Zn , poderiam ser determinados por diluição isotópica e relacionados a uma condição patológica.

2.3.10. Avaliação da atividade enzimática da anidrase incubada com os isótopos de ^{67}Zn e ^{68}Zn

Nesta avaliação, foi realizada a comparação da atividade enzimática da apo-anidrase carbônica incubada com o material certificado IRMM-3702 e da proteína enriquecida com os isótopos ^{67}Zn e ^{68}Zn . Para tanto, empregou-se o método baseado na produção de *p*-nitrofenol. Os resultados são apresentados na Figura 36. Cabe destacar que a mesma solução utilizada no procedimento anterior, na avaliação da ligação dos isótopos à enzima, foi empregada neste procedimento.

As atividade enzimática da anidrase incubada com o material certificado IRMM-3702, enriquecida com ^{67}Zn e com ^{68}Zn pode ser considerada estatisticamente semelhante, para os valores de intervalo de confiança $13,2 \text{ nmol L}^{-1} \pm 0,4$, $12,2 \text{ nmol L}^{-1} \pm 0,6$ e $12,9 \text{ nmol L}^{-1} \pm 0,5$, respectivamente empregando-se o teste *t* pareado, com um nível de confiança de 95 %. Apesar do maior enriquecimento observado para anidrase ligada a ^{67}Zn , não ocorreu maior produção de *p*-nitrofenol, indicando que não ocorreu favorecimento na atividade enzimática quando este isótopo esteve presente em maior abundância do que a observada em condições naturais. Este resultado pode ser

atribuído ao fato de que a concentração total de Zn foi mantida constante nas três amostras avaliadas.

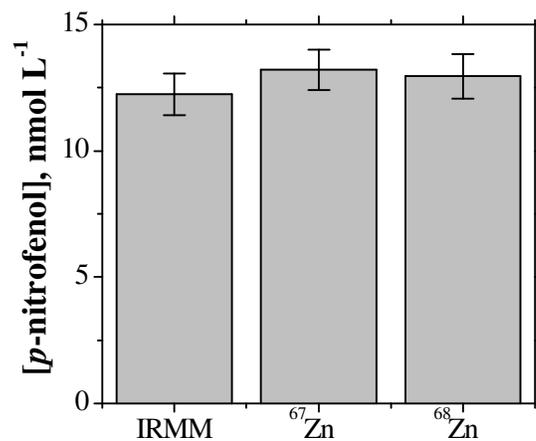


Figura 36. Avaliação da atividade enzimática da anidrase carbônica ($12,24 \mu\text{mol L}^{-1}$) incubada com o material de referência certificado (IRMM-3702) e com os isótopos ^{67}Zn e ^{68}Zn (cada um a $6,12 \mu\text{mol L}^{-1}$).

2.4. Conclusões parciais

O método proposto para avaliação da ligação entre a proteína anidrase carbônica e isótopos de zinco foi otimizado, considerando-se os parâmetros de aquisição que influenciam na exatidão e precisão das medidas em ICP-MS do tipo quadrupolo. Após esta otimização, foi observada a melhora na exatidão em 3,3, 2,7 e 4,0 % para as razões isotópicas $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$, $^{68}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ e $^{70}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$, respectivamente. A voltagem da lente de extração e a vazão de gás na cela de reação e colisão foram os parâmetros que influenciaram mais significativamente na melhora das exatidões das razões.

Ao mesmo tempo, a precisão foi significativamente aprimorada, uma vez que os desvios padrão decresceram 11, 41, 10 e 8 vezes para as razões $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$, $^{67}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$, $^{68}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ e $^{70}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$, respectivamente. Os parâmetros de aquisição, tempo de residência e tempo de integração foram os principais fatores que favoreceram a maior precisão. Mesmo considerando que o equipamento empregado possui baixa resolução, a exatidão e a precisão obtidas corroboram com os resultados da literatura para o mesmo tipo de analisador m/z .

O material de referência certificado forneceu o do fator de correção para minimizar o efeito de discriminação de massas. Com isso, os resultados razão isotópica de uma solução de Zn a $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ aproximou-se das razões isotópicas naturais.

O enriquecimento da anidrase carbônica com os isótopos de zinco forneceu resultados de grande interesse com relação à ligação diferencial dos isótopos. Este resultado, em particular, pode gerar novos estudos que busquem estabelecer a preferência da ligação entre metais e biomoléculas. Preferivelmente, este estudo deve estar vinculado a uma função biológica, e,

neste trabalho, a função biológica avaliada foi a atividade enzimática. Neste aspecto não foram observadas diferenças significativas quanto à atividade da enzima incubada com os diferentes isótopos.

3. Considerações Finais

A espectrometria de massas é a técnica mais utilizada na análise de especiação, devido à capacidade de identificação de espécies por meio da sua modalidade molecular (ESI-MS), bem como em elevada capacidade de quantificação, na sua modalidade elementar (ICP-MS). Esta combinação tem se tornado o estado da arte na análise de especiação.

O uso da técnica de mobilidade iônica acoplada à espectrometria de massas é uma proposta pioneira deste grupo de pesquisa. Sua aplicação para análise de especiação envolvendo biomoléculas e elementos químicos em diferentes estados de oxidação foi bem sucedida na separação das espécies, sem utilização de nenhuma outra técnica de separação, mesmo quando colocados em uma mistura destas espécies. Esta afirmação pode ser confirmada na incubação da anidrase carbônica com selenito e selenato.

A mobilidade iônica permitiu a separação de conformações diferentes da proteína, levantando a possibilidade do uso desta técnica para a análise de especiação. Além disso, foi possível avaliar o estado de enovelamento da proteína em condições nativas e desnaturantes. Os resultados obtidos corroboraram com a técnica de dicroísmo circular, indicando a potencialidade da TWIMS.

Esta tese também é relevante para estudos de razão isotópica de zinco ligado a biomoléculas, por meio da técnica de ICP-MS. O maior desafio nesta abordagem foi minimizar os efeitos de discriminação de massas e interferências poliatômicas em um equipamento com baixa resolução.

Esta pesquisa pode contribuir com informações importantes a respeito do enriquecimento de biomoléculas ligadas a zinco. Cabe ressaltar que se buscou dar uma informação biológica ao enriquecimento observado,

considerando a avaliação da atividade enzimática. A proteína enriquecida pode ser explorada no sentido da sua utilização em ensaios clínicos. A proteína marcada poderia ser utilizada como padrão e, após a extração da proteína contida em amostras de interesse clínico (obtidas de pacientes portadores de glaucoma ou de síndrome recessiva da anidrase carbônica II), seriam determinadas a concentração da proteína e de ^{67}Zn por diluição isotópica, mediante a adição de uma alíquota do referido isótopo. Assim, deve-se buscar uma correlação entre o estado patológico e o teor de anidrase carbônica em uma amostra.

Referências Bibliográficas

Adachi, K. F.; Nishimori, I.; Taguchi, T.; Onishi, S. Human mitochondrial carbonic anhydrase VB. *J. Biol. Chem.*, 274, 21228 - 21233, **1999**.

Alvarez, B. V.; Vilas, G. L.; Casey, J. R. Metabolon disruption: a mechanism that regulates bicarbonate transport. *Embo J.*, 24, 2499 - 2511, **2005**.

Armstrong, D.; Myers, D.; Verpoorte, J. A.; Edsall, J. T. Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrases. *J. Biol. Chem.*, 241, 5137 - 5149, **1966**.

Arnold, T.; Schonbachler, M.; Rehkamper, M.; Dong, S.; Zhao, F. J.; Kirk, G. J. D.; Coles, B. J.; Weiss, D. J. Measurement of zinc stable isotope ratios in biogeochemical matrices by double-spike MC-ICP-MS and determination of the isotope ratio pool available for plants from soil. *Anal. Bioanal. Chem.*, 398, 3115 - 3125, **2010**.

Audi, G.; Wapstra, A. H.; Thibault, C. The AME2003 atomic mass evaluation (II). Tables, graphs and references. *Nuclear Physics A.*, 729, 337 - 676, **2003**.

Balcaen, L. I. L.; Schampelaere, K. A. C.; Janssen, C. R.; Moens L.; Vanhaecke, F. Development of a method for assessing the relative contribution of waterborne and dietary exposure to zinc bioaccumulation in *Daphnia magna* by using isotopically enriched tracers and ICP-MS detection. *Anal. Bioanal. Chem.*, 390, 555 - 569, **2008**.

Balter, V.; Zazzo, A.; Moloney, A. P.; Moynier, F.; Schmidt, O.; Monahan, F. J.; Albarede, F. Bodily variability of zinc natural isotope abundances in sheep. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 24, 605 - 612, **2010**.

Barnett, J. P.; Scanlan, D. J.; Blindauer, C. A. Protein fractionation and detection for metalloproteomics: challenges and approaches. *Anal. Bioanal. Chem.*, 402, 3311 - 3322, **2012**.

Barrere, C.; Maire, F.; Afonso, C.; Giusti, P. Atmospheric solid analysis probe-ion mobility mass spectrometry of polypropylene. *Anal. Chem.*, 84, 9349 - 9354, **2012**.

Berglund, M.; Wieser, M. E. Isotopic compositions of the elements 2009 (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, 83, 397 - 410, **2011**.

Blatherwick, E. Q.; Svensson, C. I.; Frenguella, B. G.; Scrivens, J. H. Localization of adenine nucleotides in heat-stabilised mouse brains using ion

mobility enabled MALDI imaging. *Int. J. Mass Spectrom.*, 345 - 347, 19 - 27, **2013**.

Boren, K.; Freskgard, P. O. A comparative CD study of carbonic anhydrase isoenzymes with different number of tryptophans: Impact on calculation of secondary structure content. *Protein Scien.*, 5, 2484 - 2496, **1996**.

Botha, A.; Barzev, A. I.; Linsky, S. M.; Fischer, J. L. A case study for the provision of measurement traceability and measurement uncertainty for the South African reference materials. *J. Anal. At. Spectrom.*, 20, 1044 - 1050, **2005**.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248 - 254, **1976**.

Breydo, L.; Uversky, V. N. Role of metal ions in aggregation of intrinsically disordered proteins in neurodegenerative diseases. *Metallomics.*, 3, 1163 - 1180, **2011**.

Broekaert, J. A. C. *Analytical atomic spectrometry with flames and plasmas*. Wiley-VCH, Weinheim, **2002**, 375p.

Busto, M. E. C.; Montes-Bayon, M.; Sanz-Medel. A. Accurate determination of human serum transferrin isoforms: exploring metal-specific isotope dilution analysis as a quantitative proteomic tool. *Anal. Chem.*, 78, 8218 - 8226, **2006**.

Chang, X.; Zheng, Y.; Yang, Q.; Wang, L.; Pan, J.; Xia, Y.; Yan, X.; Han, J. Carbonic anhydrase I (CA1) is involved in the process of bone formation and is susceptible to ankylosing spondylitis. *Arthritis Res. Ther.* 14, R176, 1 - 14, **2012**.

Chegwidden, W. R.; Carter, N. D.; Edwards, Y. H. *The carbonic anhydrases: New horizons*, Springer, Basel, **2000**, 619p.

Chen, Y. H.; Yang, T. J. T.; Chaus, A. K. H. Determination of the helix and p form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. *Biochemistry.*, 13, 3350 - 3359, **1974**.

Chowdhury, S. K.; Katta, V.; Chait, B. T. Probing conformational changes in proteins by mass spectrometry. *J Am Chem Soc.*, 112, 9012 - 9013, **1990**.

Clemmer, D. E.; Hudgins, R. R.; Jarrold, M. F. Naked protein conformations: cytochrome c in the gas phase. *J Am Chem Soc.*, 117, 10141 - 10142, **1995**.

Cloquet, C.; Carignan, J.; Lehmann, M. F.; Vanhaecke, F. Variation in the isotopic composition of zinc in the natural environment and the use of zinc

isotopes in biogeosciences: a review. *Anal. Bioanal. Chem.*, 390, 451 - 463, **2008**.

Cohen, M. J.; Karasek, F. W. Plasma chromatography-a new dimension for gas chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr. Science.*, 8, 330 - 337, **1970**.

Coplen, T. B.; Böhlke, J. K.; Bièvre, P.; Ding, T.; Holden, N. E.; Hopple, J. A.; Krouse, H. R.; Lamberty, A.; Peiser, H. S.; Révész, K.; Rieder, S. E.; Rosman, K. J. R.; Roth, E.; Taylor, P. D. P.; Vocke, Jr., R. D.; Xiao, Y. K. Isotope-abundance variations of selected elements (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, 74, 1987 - 2017, **2002**.

Cox, J. D.; Hunt, J. A.; Compher, K. M.; Fierke, C. A.; Christianson, D. W. Structural influence of hydrophobic core residues on metal binding and specificity in carbonic anhydrase II. *Biochemistry.*, 39, 13687 - 13694, **2000**.

Cravath, A. M. The rate of formation of negative ions by electron attachment. *Phys. Rev.*, 33, 605 - 613, **1929**.

Cuyckens, F.; Wassvik, C.; Mortishire-Smith, R. J., Tresadern, G.; Campuzano, I.; Claereboudt, J. Product ion mobility as a promising tool for assignment of positional isomers of drug metabolites. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 25, 3497 - 3503, **2011**.

D'Agostino, P. A.; Chenier, C. L. Desorption electrospray ionization mass spectrometric analysis of organophosphorus chemical warfare agents using ion mobility and tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 24, 1617 - 1624, **2010**.

De Bièvre, P. Stable isotope dilution: an essential tool in metrology. *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 350, 277 - 283, **1994**.

Deitrich, C. L.; Braukmann, S.; Raab, A.; Munro, C.; Pioselli, B.; Krupp, E. M.; Thomas-Oates, J. E.; Feldmann, J. Absolute quantification of superoxide dismutase (SOD) using species-specific isotope dilution analysis. *Anal Bioanal Chem.*, 397, 3515 - 3524, **2010**.

Duce, J. A.; Bush, A. I. Biological metals and Alzheimer's disease: implications for therapeutics and diagnostics. *Prog. Neurobiol.*, 92, 1 - 18, **2010**.

Dussy, F. E.; Berchtold, C.; Briellmann, T. A.; Lang, C.; Steiger, R.; Bovens, M. Validation of an ion mobility spectrometry (IMS) method for the detection of heroin and cocaine on incriminated material. *Forensic Sci. Int.*, 177, 105 - 111, **2008**.

- Eiceman, G. A.; Karpas, A.; Hill Jr., H. H. *Ion mobility spectrometry*, CRC Press, Boca Raton, **2014**, 400p.
- Esbaugh, A. J.; Tufts, B. L. The structure and function of carbonic anhydrase isozymes in the respiratory system of vertebrates. *Respir Physiol Neurobiol.* 154, 185 - 198, **2006**.
- Fasciotti, M.; Lalli, P. M.; Klitzke, C. F.; Corilo, Y. E.; Pudenzi, M. A.; Pereira, R. C. L.; Bastos, W.; Daroda, R. J.; Eberlin, M. N. Petroleomics by traveling wave ion mobility-mass spectrometry using CO₂ as a drift gas. *Energy Fuels.*, 27, 7277 - 7286, **2013**.
- Fassett, J. D.; Paulsen, P. J. Isotope dilution mass spectrometry for accurate elemental analysis. *Anal. Chem.*, 61, 643 - 649, **1989**.
- Faull, P. A.; Korkeila, K. E.; Kalapothakis, J. M.; Gray, A.; Barran, P. E. Gas-phase metalloprotein complexes interrogated by ion mobility-mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.*, 283, 140 - 148, **2009**.
- Faure, G.; Mensing, T. M. *Introduction to Planetary Science – the Geological Perspective*, Springer, Berlin, **2007**, 532p.
- Finney, L. A.; O'Halloran, T. V. Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. *Science.*, 300, 931 - 936, **2003**.
- Gangloff, M.; Murali, A.; Xiong, J.; Arnot, C. J.; Weber, A. N.; Sandercock, A. M.; Robinson, C. V.; Sarisky, R.; Holzenburg, A.; Kao, C.; Gay, N. J. Structural insight into the mechanism of activation of the toll receptor by the dimeric ligand spätzle. *J. Biol. Chem.*, 283, 14629 - 14635, **2008**.
- Giles, K.; Pringle, S. D.; Worthington, K. R.; Little, D.; Wildgoose, J. L.; Bateman, R. H. Applications of a travelling wave-based radio-frequency only stacked ring ion guide. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 18, 2401 - 2414, **2004**.
- Giné, M. F.; Packer, A. P. Online isotope dilution and inductively coupled plasma mass spectrometry: from elemental to species quantification. *J. Braz. Chem. Soc.*, 21, 575 - 589, **2010**.
- Gudiksen, K. L.; Urbach, A. R.; Gitlin, I.; Yang, J.; Vazquez, J. A.; Costello, C. E.; Whitesides, G. M. Influence of the Zn(II) cofactor on the refolding of bovine carbonic anhydrase after denaturation with sodium dodecyl sulfate. *Anal. Chem.*, 76, 7151 - 7161, **2004**.

Guelke-Stelling, M.; Blanckenburg, F. V. Fe isotope fractionation caused by translocation of iron during growth of bean and oat as models of strategy I and II plants. *Plant Soil.*, 352, 217 - 231, **2012**.

Guevremont, R.; Purves, R. W. High field asymmetric waveform ion mobility spectrometry-mass spectrometry: an investigation of leucine enkephalin ions produced by electrospray ionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 10, 492 - 501, 1999.

Guo, Y.; Ling, Y.; Thomson, B. A.; Siu, K. W. M. Combined ion-mobility and mass-spectrometry investigations of metallothionein complexes using a tandem mass spectrometer with a segmented second quadrupole. *J Am Soc Mass Spectrom.*, 16, 1787 - 1794, **2005**.

Hagege, A. S.; Baldinger, T.; Martin-Jouet, M.; Zal, F.; Leroy, M.; Leize, E.; Van Dorsselaer, A. Assessment of the contribution of inductively coupled plasma mass spectrometry to metalloprotein analysis: a novel approach for studies of multiproteic complexes. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 18: 735 - 738, **2004**.

Hall, Z.; Politis, A.; Bush, M. F.; Smith, L. J.; Robinson, C. V. Charge-state dependent compaction and dissociation of protein complexes: insights from ion mobility and molecular dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 3429 - 3438, **2012**.

He, F.; Hendrickson, C. L.; Marshall, A. G. Unequivocal determination of metal atom oxidation state in naked heme proteins: Fe(III)myoglobin, Fe(III)cytochrome c, Fe(III)cytochrome b5, and Fe(III)cytochrome b5 L47R. *J Am Soc Mass Spectrom.*, 11, 120 - 126, **2000**.

Heck, A. J.; Van Den Heuvel, R. H. Investigation of intact protein complexes by mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.*, 23, 368 - 389, **2004**.

Heghe, L. V.; Engstrom, E.; Rodushkin, I.; Cloquet, C.; Vanhaecke, F. Isotopic analysis of the metabolically relevant transition metals Cu, Fe and Zn in human blood from vegetarians and omnivores using multi-collector ICP-mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 27, 1327 - 1334, **2012**.

Heumann, K. G.; Gallus, S. M.; Radlinger, G.; Vogl J. Precision and accuracy in isotope ratio measurements by plasma source mass spectrometry. *J Anal At Spectrom.*, 13, 1001 - 1008, **1998**.

Hilvo, M.; Tolvanen, M.; Clark, A.; Shen, B.; Shah, G. N.; Waheed, A.; Halmi, P.; Hänninen, M.; Hämäläinen, J M.; Vihinen, M.; Sly, W. S.; Parkkila, S. Characterization of CA XV, a new GPI-anchored form of carbonic anhydrase. *Biochem. J.* 392, 83 - 92, **2005**.

- Hirst, J. D.; Colella, K.; Gilbert, A. T. B. Electronic circular dichroism spectra of proteins from first principles calculations. *J. Phys. Chem. B.*, 107, 11813 - 11819, **2003**.
- Huang, J. H.; Bakx, E. J.; Gruppen, H.; Schols, H. A. Characterisation of 3-aminoquinoline-derivatised isomeric oligogalacturonic acid by travelling-wave ion mobility mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 27, 2279 - 2285, **2013**.
- Hurst, T. K.; Wang, D.; Thompson, R. B.; Fierke, C. A. Carbonic anhydrase II-based metal ion sensing: advances and new perspectives. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics.*, 1804, 393 - 403 **2010**.
- Innocenti, A.; Zimmerman, S. A.; Scozzafava, A.; Ferry, G. J.; Supuran, C. T. Carbonic anhydrase activators: activation of the archaeal β -class (Cab) and γ -class (Cam) carbonic anhydrases with amino acids and amines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18, 6194 - 6198, **2008**.
- Ippolito, J. A.; Baird, T. T.; Mcgee, S. A.; Christianson, D. W.; Fierke C. A. Structure-assisted redesign of a protein-zinc-binding site with femtomolar affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92, 5017 - 5021, **1995**.
- Jitaru, P.; Barnante, C. Elemental speciation analysis, from environmental to biochemical challenge. *J. Phys. IV France.*, 139, 269 - 294, **2006**.
- Kaaki, W.; Woudstra, M.; Gontero, B.; Halgand, F. Exploration of CP12 conformational changes and of quaternary structural properties using electrospray ionization traveling wave ion mobility mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 27, 179 - 186, **2013**.
- Kapron, J. T.; Jemal, M.; Duncan, G.; Kolakowski, B.; Purves, R. Removal of metabolite interference during liquid chromatography/tandem mass spectrometry using high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19, 1979 - 1983, **2005**.
- Karasek, F. W. Plasma chromatography. *Anal Chem.*, 46, 710A - 720A, **1974**.
- Karasek, F. W.; Kim, S. H.; Hill, H. H. Mass identified mobility spectra of p-nitrophenol and reactant ions in plasma chromatography. *Anal Chem.*, 48, 1133 - 1137, **1976**.
- Kaunisto, K.; Parkkila, S.; Rajaniemi, H.; Waheed, A.; Grubb, J.; Sly, W. S. Carbonic anhydrase XIV: luminal expression suggests key role in renal acidification. *Kidney Int.*, 61, 2111 - 2118, **2002**.

Kiefer, L. L.; Paterno, S. A.; Fierke, C. A. Hydrogen bond network in the metal binding site of carbonic anhydrase enhances zinc affinity and catalytic efficiency. *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 6831 - 6837, **1995**.

Kline, J. A.; Zagorski, J. Method of using carbonic anhydrase to detect hemolysis. Disponível em: <http://www.faqs.org/patents/app/20110124019>. Acesso em: 05 de junho de 2014.

Kobayashi, M.; Matsumoto, T.; Ryuge, S.; Yanagita, K.; Nagashio, R.; Kawakami, Y.; Goshima, N.; Jiang, S. X.; Saegusa, M.; Iyoda, A.; Satoh, Y.; Masuda, N.; Sato, Y. CAXII is a sero-diagnostic marker for lung cancer. *Plos One.*, 7, e33952, 1 - 9, **2012**.

Krishnamurthy, V. M.; Kaufman, G. K.; Urbach, A. R.; Gitlin, I.; Gudiksen, K. L.; Weibel, D. B.; Whitesides, G. M. Carbonic anhydrase as a model for biophysical and physical-organic studies of proteins and protein-ligand binding. *Chem. Rev.*, 108, 946 - 1051, **2008**.

Kriwacki, R. W.; Hengst, L.; Tennant, L.; Reed, S. I.; Wright, P. E. Structural studies of p21^{W^{al}CiPI/S^{dil}} in the free and Cdk2-bound state: conformational disorder mediates binding diversity. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 93, 11504 - 11509, **1996**.

Langevin, P. L'ionization des gaz. *Ann. Chim. Phys.*, 28, 289 - 384, **1903**.

Lehtonen, J.; Shen, B.; Vihinen, M.; Casini, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T.; Parkkila, A. K.; Saarnio, J.; Kivelä, A. J.; Waheed, A.; Sly, W. S.; Parkkila, S. Characterization of CA XIII, a novel member of the carbonic anhydrase isozyme family. *J. Biol. Chem.*, 279, 2719 - 2727, **2004**.

Li, Y. T., Hsieh, Y. L., Henion, J. D., Ganem, B. Studies on heme binding in myoglobin, hemoglobin, and cytochrome c by ion spray mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.*, 4, 631 - 637, **1993**.

Lin, C. T.; Lin, K. L.; Yang, C. H.; Chung, I. F.; Huang, C. D.; Yang, Y. S. Protein metal binding residue prediction based on neural networks. *Int. J. Neur. Syst.*, 15, 71 - 84, **2005**.

Lindskog, S.; Nyman, P. O. Metal-binding properties of human erythrocyte carbonic anhydrases. *Biochim. Biophys. Acta.*, 85, 462 - 474, **1964**.

Liu, C.; Xu, H. The metal site as a template for the metalloprotein structure formation. *J. Inorgan. Biochem.*, 88, 77 - 86, **2002**.

Liuzzi, J. P.; Cousins, R. J. Mammalian zinc transporters. *Annu. Rev. Nutr.*, 24, 151 - 172, **2004**.

Lobinski, R.; Szpunar, J. Biochemical speciation analysis by hyphenated techniques. *Anal. Chim. Acta.*, 400, 321 - 332, **1999**.

Lomeli, S. H.; Yin, S.; Ogorzalek Loo, R. R.; Loo, J. A. Increasing charge while preserving noncovalent protein complexes for ESI-MS. *J Am Soc Mass Spectrom.*, 20, 593 - 596, **2009**.

Lotan, D.; Eisenkraft, A.; Jacobsson, J. M.; Bar-Yosef, O.; Kleta, R.; Raviv-Zilka, N. G. L.; Gore, H.; Anikster, Y. Clinical and molecular findings in a family with the carbonic anhydrase II deficiency syndrome. *Pediatr Nephrol.*, 21, 423 - 426, **2006**.

Lund, W. Speciation analysis - why and how? *Fresenius J Anal Chem.*, 337, 557 - 564, **1990**.

Makishima, A.; Nakamura, E. Low-blank chemistry for Zn stable isotope ratio determination using extraction chromatographic resin and double spike-multiple collector-ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.*, 28, 127 - 133, **2013**.

Malgieri, G.; Grasso, G. The clearance of misfolded proteins in neurodegenerative diseases by zinc metalloproteases: an inorganic perspective. *Coord. Chem. Rev.*, 260, 139 - 155, **2014**.

Manavalan, P.; Johnson Jr., W. C. Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Anal. Biochem.*, 167, 76 - 85, **1987**.

March, R. E.; Todd, J. F. J. *Practical aspects of trapped ion mass spectrometry*, CRC Press, Boca Raton, **2010**, 950p.

Marechal, C.; Telouk, P.; Albarede, F. Precise analysis of copper and zinc isotopic compositions by plasma-source mass spectrometry. *Chem. Geol.*, 156, 251 - 273, **1999**.

McDaniel, E. W.; Martin, D. W.; Barnes, W. S. Drift tube mass spectrometer for studies of low energy ion molecule reactions. *Rev. Sci. Instrum.*, 33, 2 - 7, **1962**.

McDevitt, M. E.; Lambert, L. A. Molecular evolution and selection pressure in alpha-class carbonic anhydrase family members. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics.*, 1814, 1854 - 1861, **2011**.

McLean, J. A.; Ruotolo, B. T.; Gillig, K. J.; Russell, D. H. Ion mobility-mass spectrometry: a new paradigm for proteomics. *Int. J. Mass Spectrom.*, 240, 301 - 315, **2005**.

Meermann, B.; Sperling, M. Hyphenated techniques as tools for speciation analysis of metal-based pharmaceuticals: developments and applications. *Anal. Bioanal. Chem.*, 403, 1501 - 1522, **2012**.

Mester, Z.; Sturgeon, R.; Pawliszyn, J. Solid phase microextraction as a tool for trace element speciation. *Spectrochim. Acta B.*, 56, 233 - 260, 2001.

Michaevlevski, I.; Eisenstein, M.; Sharon, M. Gas-phase compaction and unfolding of protein structures. *Anal. Chem.*, 82, 9484 - 9491, **2010**.

Michaelke, B. Element speciation definitions, analytical methodology, and some examples. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 56, 122 - 139, **2003**.

Montaser, A. *Inductively coupled plasma mass spectrometry*. Wiley-VCH, New York, **1992**, 1004p.

Mora, J. F. Electrospray ionization of large multiply charged species proceeds via Dole's charged residue mechanism. *Anal Chim Acta.*, 406, 93 - 104, 2000.

Moynier, F.; Pichat, S.; Pons, M. L.; Fike, D.; Balter, V.; Albarede, F. Isotopic fractionation and transport mechanisms of Zn in plants. *Chem. Geol.*, 267, 125 - 130, **2009**.

Nabuchi, Y.; Murao, N.; Asoh, Y.; Takayama, M. Probing the unfolding and refolding processes of carbonic anhydrase 2 using electrospray ionization mass spectrometry combined with pH jump. *Anal. Chem.*, 79, 8342 - 8349, **2007**.

Nagao, Y.; Platero, J. S.; Waheed, A.; Sly, W. S. Human mitochondrial carbonic anhydrase: cDNA cloning, expression, subcellular localization, and mapping to chromosome 16. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90, 7623 - 7627, **1993**.

Nelms, S. M.; Quetel, C. R.; Prohaska, T.; Vogl J.; Taylor P. D. P. Evaluation of detector dead time calculation models for ICP-MS. *J Anal At Spectrom.*, 16, 333 - 338, **2001**.

Ohno, T.; Shinohara, A.; Chiba, M.; Hirata, T. Precise Zn isotopic ratio measurements of human red blood cell and hair samples by multiple collector ICP mass spectrometry. *Anal. Sci.*, 21, 425 - 428, **2005**.

Oliveira, A. P. Determinação de Cu, Zn e Se em soro humano por ICP-MS. *Rev. Analytica.*, 25, 76 - 83, **2006**.

Parkkila, S.; Parkkila, A. K.; Rajaniemi, H.; Shah, G. N.; Grubb, J. H.; Waheed, A.; Sly, W. S. Expression of membrane-associated carbonic

- anhydrase XIV on neurons and axons in mouse and human brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98, 1918 - 1923, **2001**.
- Pastorekova, S.; Zavada, J. Carbonic anhydrase IX (CA IX) as a potential target for cancer therapy. *Cancer Ther.*, 2, 245 - 262, **2004**.
- Pilka, E. W.; Kochan, G.; Oppermann, U.; Yue, W. W. Crystal structure of the secretory isozyme of mammalian carbonic anhydrases CA VI: implications for biological assembly and inhibitor development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 419, 485 - 489, **2012**.
- Pocker, Y.; Bjorkquist, D. W. comparative studies of bovine carbonic anhydrase in H₂O and D₂O. Stopped-flow studies of the kinetics of interconversion of CO₂ and HCO₃⁻. *Biochemistry.*, 16, 5698 - 5707, **1977**.
- Ponzevera, E.; Quérel, C. R.; Berglund, M.; Taylor, P. D. P. Mass discrimination during MC-ICPMS isotopic ratio measurements: investigation by means of synthetic isotopic mixtures (IRMM-007 series) and application to the calibration of natural-like zinc materials (including IRMM-3702 and IRMM-651). *J Am Soc Mass Spectrom.*, 17, 1412 - 1427, **2006**.
- Pringle, S. D.; Giles, K.; Wildgoose, J. L.; Williams, J. P.; Slade, S. E.; Thalassinou, K.; Bateman, R. H.; Bowers, M. T.; Scrivens, J. H. An investigation of the mobility separation of some peptide and protein ions using a new hybrid quadrupole/travelling wave IMS/oa-ToF instrument. *Int. J. Mass Spectrom.*, 261, 1 - 12, **2007**.
- Radzicka, A.; Wolfenden, R. A proficient enzyme. *Science.*, 267, 90 - 93, **1995**.
- Rodriguez-Gonzalez, P.; Marchante-Gayon, J. M.; Garcia Alonso, J. I.; Sanz-Medel, A. Isotope dilution analysis for elemental speciation: a tutorial review. *Spectrochim. Acta Part B.*, 60, 151 - 207, **2005**.
- Ruotolo, B. T.; Giles, K.; Campuzano, I.; Sandercock, A. M.; Bateman, R. H.; Robinson, C. V. Evidence for macromolecular protein rings in the absence of bulk water. *Science.*, 310, 1658 - 1661, **2005**.
- Russ III, G. P. Isotope ratio measurements using ICP-MS. In: Date, A. R.; Gray, A. L. (Org.). *Applications of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*. Chapman and Hall, London, 90 - 114, **1987**.
- Ruusuvuori, E.; Li, H.; Huttu, K.; Palva, J. M.; Smirnov, S.; Rivera, C.; Kaila, K.; Voipio, J. Carbonic anhydrase isoform VII acts as a molecular switch in the development of synchronous gamma-frequency firing of hippocampal CA1 pyramidal cells. *J. Neurosci.*, 24, 2699 - 2707, **2004**.

- Saito, R.; Sato, T.; Ikai, A.; Tanaka, N. Structure of bovine carbonic anhydrase II at 1.95 Å resolution. *Acta Crystal D.*, 60, 792 - 795, **2004**.
- Sanz-Mendel, A.; Montes-Bayón, M.; Sánchez, M. L. F. Trace element speciation by ICP-MS in large biomolecules and its potential for proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.*, 377, 236 - 247, **2003**.
- Schauble, E. A.; Rossman, G. R.; Taylor, H. P. Theoretical estimates of equilibrium Fe-isotope fractionations from vibrational spectroscopy. *Geochim. Cosmochim. Acta.*; 65, 2487 - 2498, **2001**.
- Schenauer, M. R.; Leary, J. A. An ion mobility-mass spectrometry investigation of monocyte chemoattractant protein-1. *Int. J. Mass Spectrom.*, 287, 70 - 76, **2009**.
- Shah, V.; Castro-Perez, J. M.; McLaren, D. G.; Herath, K. B.; Previs, S. F.; Roddy, T. P. Enhanced data-independent analysis of lipids using ion mobility-TOFMS^E to unravel quantitative and qualitative information in human plasma. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 27, 2195 - 2200, **2013**.
- Shirran, S. L.; Barran, P. E. The Use of ESI-MS to probe the binding of divalent cations to calmodulin. *J Am Soc Mass Spectrom.*, 20, 1159 - 1171, **2009**.
- Silva, E. G.; Augusto, F.; Arruda, M. A. Z. Determination of Se using a solid-phase micro-extraction device coupled to a graphite furnace and detection by gas chromatography-mass spectrometry. *Analyst.*, 137, 3841 - 3846, **2012**.
- Silva, E. G.; Mataveli, L. R. V.; Arruda, M. A. Z. Speciation analysis of selenium in plankton, Brazil nut and human urine samples by HPLC-ICP-MS. *Talanta.*, 110, 53 - 57, **2013**.
- Silva, M. A. O.; Arruda, M. A. Z. An aqueous two-phase system as a strategy for serum albumin depletion. *Talanta.*, 77, 985 - 990, **2009**.
- Smith, D. P; Giles, K.; Bateman, R. H.; Radford. S. E.; Ashcroft, A. E. Monitoring copopulated conformational states during protein folding events using electrospray ionization-ion mobility spectrometry-mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 18, 2180 - 2190, **2007**.
- Sprigings, T. G.; Hall, C. D. A simple carbonic anhydrase model which achieves catalytic hydrolysis by the formation of an 'enzyme-substrate'-like complex. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 2, 2063 - 2067, **2001**.
- Staunton, L.; Zweyer, M.; Swandulla, D.; Ohlendieck, K. Mass spectrometry-based proteomic analysis of middle-aged vs. aged *vastus lateralis* reveals

increased levels of carbonic anhydrase isoform 3 in senescent human skeletal muscle. *Int J Mol Cell Med.*, 30, 723 - 733, **2005**.

Stenberg, A.; Andren, H.; Malinovsky, D.; Engstrom, E.; Rodushkin, I.; Baxter, D. C. Isotopic variations of Zn in biological materials. *Anal. Chem.*, 76, 3971 - 3978, **2004**.

Sterling, D.; Alvarez, B. V.; Casey, J. R. The extracellular component of a transport metabolon: extracellular loop 4 of the human AE1 Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger binds carbonic anhydrase iv. *J. Biol. Chem.*, 277, 25239 - 25246, **2002**.

Sterling, D.; Reithmeier, R. A. F.; Casey, J. R. A Transport Metabolon: functional interaction of carbonic anhydrase II and chloride/bicarbonate exchangers. *J. Biol. Chem.*, 276, 47886 - 47894, **2001**.

Supuran, C. T. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov.*, 7, 168 - 181, **2008**.

Supuran, C. T.; Scozzafava, A.; Casini A. Carbonic anhydrase inhibitors. *Med. Res. Rev.*, 23, 146 - 189, **2003**.

Suzuki, T.; Kanzaki, C.; Nomura, M.; Fujii, Y. Zinc isotope discrimination effect in inductively coupled plasma mass spectrometer. *Rev. Sci. Instrum.*, 75, 1931 - 1933, **2004**.

Taniuchi, K.; Nishimori, I.; Takeuchi, A. T.; Fujikawa-Adachi, B. K.; Ohtsukib, A. Y.; Onishia, S. Developmental expression of carbonic anhydrase-related proteins VIII, X, and XI in the human brain. *Neuroscience.*, 112, 93 - 99, **2002**.

Tanner, S. D. Space charge in ICP-MS: calculation and implications. *Spectrochim. Acta B.*, 47, 809 - 823, **1992**.

Taylor, A.; Branch, S.; Day, M. P.; Patriarca, M.; White, M. Atomic spectrometry update. Clinical and biological materials, foods and beverages. *J Anal At Spectrom.*, 26, 653 - 692, **2011**.

Templeton, D. M.; Ariese, F.; Cornelis, R.; Danielsson, L.; Muntau, H.; Leeuwen, H. P. V.; Lobinski, R. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC recommendations 2000). *Pure Appl. Chem.*, 72, 1453 - 1470, **2000**.

Thalassinos, K.; Slade, S. E.; Jennings, K. R.; Scrivens, J. H.; Giles, K.; Wildgoose, J.; Hoyes, J.; Bateman, R. H.; Bowers, M. T. Ion mobility mass

spectrometry of proteins in a modified commercial mass spectrometer. *Int. J. Mass Spectrom.*, 236, 55 - 63, **2004**.

Thomas, R. *Practical guide to ICP-MS: a tutorial for beginners*. 2^a ed. CRC Press, Boca Raton, **2008**, 324p.

Türkmen, S.; Guo, G.; Garshasbi M.; Hoffmann, K.; Alshalah, A. J.; Mischung, C.; Kuss, A.; Humphrey, N.; Mundlos, S.; Robinson, P. N. CA8 mutations cause a novel syndrome characterized by ataxia and mild mental retardation with predisposition to quadrupedal gait. *Plos Genet.* 5, e1000487, 1 - 8, **2009**.

Utrecht, C.; Barbu, I. M.; Shoemaker, G. K.; Van Duijn, E.; Heck, A. J. R. Interrogating viral capsid assembly with ion mobility-mass spectrometry. *Nature Chemistry.*, 3, 126 - 132, **2011**.

Utrecht, C.; Rose, R. J.; Duijn, E.; Lorenzen K.; Heck, A J. R. Ion mobility mass spectrometry of proteins and protein assemblies. *Chem. Soc. Rev.*, 39, 1633 - 1655, **2010**.

Vanhaecke, F.; Balcaen, L.; Malinovsky, D. Use of single-collector and multi-collector ICP-mass spectrometry for isotopic analysis. *J. Anal. At. Spectrom.*, 24, 863 – 886, **2012**.

Vanhaecke, F.; Degryse, P. *Isotopic Analysis: fundamentals and applications using ICP-MS*. Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, 529p.

Voet, D.; Voet, J.; Pratt, C. *Fundamentos de Bioquímica: a vida em nível molecular*. 4 ed. Artmed, Porto Alegre, **2014**, 1264p.

Vullo, D.; Innocenti, A.; Nishimori, I.; Pastorek, J.; Scozzafava, A.; Pastorekova, S.; Supuran, C. T. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the transmembrane isozyme XII with sulfonamides-a new target for the design of antitumor and antiglaucoma drugs? *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 963 - 969, **2005**.

Wolf, C.; Wenda, N.; Richter, A.; Kyriakopoulos, A. Alteration of biological samples in speciation analysis of metalloproteins. *Anal Bioanal Chem.*, 389, 799 - 810, **2007**.

Wolf, R. E.; Todd, A. S.; Brinkman, S.; Lamothe, P. J.; Smith, K. S.; Ranville, J. F. Measurement of total Zn and Zn isotope ratios by quadrupole ICP-MS for evaluation of Zn uptake in gills of brown trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Talanta.*, 80, 676 - 684, **2009**.

Wright, P. E.; Dyson, H. J. Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J Mol Biol.*, 293, 321 - 331, **1999**.

Wrobel, K.; Kannamkumarath, S.; Wrobel, K.; Caruso, J. A. Environmentally friendly sample treatment for speciation analysis by hyphenated techniques. *Green Chem.*, 5, 250 - 259, **2003**.

Yang, Z.; Alvarez, B. V.; Chakarova, C.; Jiang, L.; Karan, G.; Frederick, J. M.; Zhao, Y.; Sauve, Y.; Li, X.; Zrenner, E.; Wissinger, B.; Den Hollander, A. I.; Katz, B.; Baehr, W.; Cremers, F. P.; Casey, J. R.; Bhattacharya, S. S.; Zhang, K. Mutant carbonic anhydrase 4 impairs pH regulation and causes retinal photoreceptor degeneration. *Hum. Mol. Genet.*, 14, 255 - 265, **2005**.

Yip, Y.; Sham, W. Applications of collision/reaction cell technology in isotope dilution mass spectrometry. *Trends Anal. Chem.*, 26, 727 - 743, **2007**.

Young, L.; Ndlovu, H.; Knapman, T. W.; Harris, S. A.; Radford, S. E.; Ashcroft, A. E. Monitoring oligomer formation from self-aggregating amylin peptides using ESI-IMS-MS. *Int. J. Ion Mobil. Spec.*, 16, 29 - 39, **2013**.

Zenkevich, I. G.; Makarov, E. D. Chromatographic quantitation at losses of analyte during sample preparation. Application of the modified method of double internal standard. *J. Chromatogr. A.*, 1150, 117 - 123, **2006**.