

Imageamento químico por espectrometria de massas utilizando MALDI (MALDI Imaging Mass Spectrometry) aplicado a tecidos vegetais.

A espectrometria de massas (MS) é uma ferramenta analítica que detecta a razão m/z (massa sobre a carga) de partículas carregadas (íons). Os íons analisados são provenientes de uma fonte de ionização, a qual é capaz de gerar íons na fase gasosa, a partir de moléculas neutras ou de moléculas carregadas em solução ou na fase sólida. Há diversas fontes de ionização disponíveis atualmente, com métodos de ionização sob vácuo e, mais recentemente, à temperatura ambiente. As fontes mais comuns e mais utilizadas estão citadas no decorrer do texto.

As primeiras fontes de ionização desenvolvidas e utilizadas em MS foram denominadas ionização por impacto de elétrons (EI) (MARK; DUNN, 1985) e ionização química (CI) (MUNSON; FIELD, 1966), porém estas se limitavam a ionização de moléculas voláteis, uma vez que o processo de ionização ocorre sob vácuo. No final da década de 80 (FENN et al., 1989; TANAKA et al., 1988), a espectrometria de massas teve um grande avanço, pois macromoléculas passaram a ser ionizadas, ampliando assim, a faixa de massas de moléculas analisadas por MS, uma vez que as amostras não precisavam ser voláteis e termicamente estáveis para a inserção no espectrômetro de massas. Esta inovação publicada rendeu o prêmio Nobel, em 2002 (MARKIDES; GRASLUND, 2002), aos pesquisadores, John B. Fenn e Koichi Tanaka, pela aplicação da espectrometria de massas em macromoléculas biológicas, com o desenvolvimento das técnicas de ionização por *Electrospray* (ESI) e MALDI (Ionização/Dessorção por Laser Assistida por Matriz), respectivamente.

Resumidamente, a ionização por ESI gera íons a partir da protonação ou desprotonação de uma molécula neutra ($[M + H]^+$ e $[M - H]^-$) em solução ácida ou básica e, portanto, moléculas polares começaram a ser analisadas. O mecanismo de ionização por MALDI é diferente, este gera íons a partir da colisão de um laser em uma matriz, a qual transfere um ou mais prótons para a molécula, que está na forma sólida em contato com a matriz. Com o desenvolvimento do ESI e MALDI, foi possível, então, detectar moléculas de grande peso molecular, como por exemplo, proteínas e polímeros.

Outro marco importante no campo de espectrometria de massas foi o desenvolvimento da técnica de imageamento químico, na qual se obtém uma imagem bidimensional, uma "fotografia química", de moléculas presentes em uma superfície. O imageamento por espectrometria de massas (*Imaging Mass Spectrometry* - IMS), que consiste na combinação de análises da massa molecular e informação espacial, fornece a visualização de moléculas em superfícies complexas.

Caprioli et al. (1997) foi o pioneiro no imageamento químico em tecidos utilizando MALDI como fonte de ionização (CAPRIOLI et al., 1997). Após dois anos, houve um grande avanço na técnica de MALDI-IMS, uma vez que esta foi automatizada, passando a ser implementada na prática (STOECKLI et al., 1999). A inserção

Autor

Patrícia Verardi
Abdelnur

Química, Doutora em
química orgânica,
espectrometria
de massas,
pesquisadora da
Embrapa Agroenergia,
Brasília, DF,
patricia.abdelnur@
embrapa.br

de MALDI baseado em técnicas de IMS, então denominada MALDI-IMS, levou a um aumento em estudos nesta área e, conseqüentemente, em desenvolvimentos instrumentais e metodológicos e, portanto, nas aplicações de imageamento por MS. Desde então, estratégias de desenvolvimentos em IMS, tanto na parte instrumental quanto nas metodologias de análises, têm feito desta técnica, uma ferramenta poderosa na localização espacial e na identificação de fármacos, metabólitos, lipídeos, peptídeos e proteínas em tecidos biológicos complexos (HOVE et al., 2010).

MALDI-IMS é uma derivação da técnica MALDI, porém neste caso a amostra aderida na placa de MALDI é movida nos eixos x/y e cada posição da amostra é analisada. Então, a partir do armazenamento do espectro de massas de cada posição, uma imagem bidimensional do perfil metabólico da amostra pode ser obtida (Figura 1) (ABDELNUR, 2010). Ou seja, o MALDI-IMS nada mais é do que a somatória de várias aquisições pontuais geradas por MALDI, processadas por

um software (STOECKLI et al., 1999; BURREL et al., 2007), fornecendo uma imagem química da superfície total analisada. Estudos recentemente publicados demonstraram a possibilidade de se obter um perfil de massas de compostos presentes na superfície de um tecido com uma resolução espacial de 25 μm (GOTO-INOUE et al., 2010), o que resulta em imagens com alta resolução. Imagens tridimensionais de peptídeos e proteínas presentes em cérebro de rato foram descritas na literatura (ANDERSON et al., 2008), demonstrando o potencial de imagens 3D e não apenas de imagens bidimensionais, as quais são normalmente obtidas.

Uma das vantagens mais atrativas do imageamento por MALDI é a visualização de moléculas individuais, presentes nas superfícies de seções de tecidos sem a necessidade da utilização de anticorpos, coloração, ou etapas demoradas de pré-tratamentos. Portanto, esta técnica fornece a análise pontual das moléculas e não é necessário a homogeneização de todo tecido, havendo uma mistura de várias moléculas presentes em toda

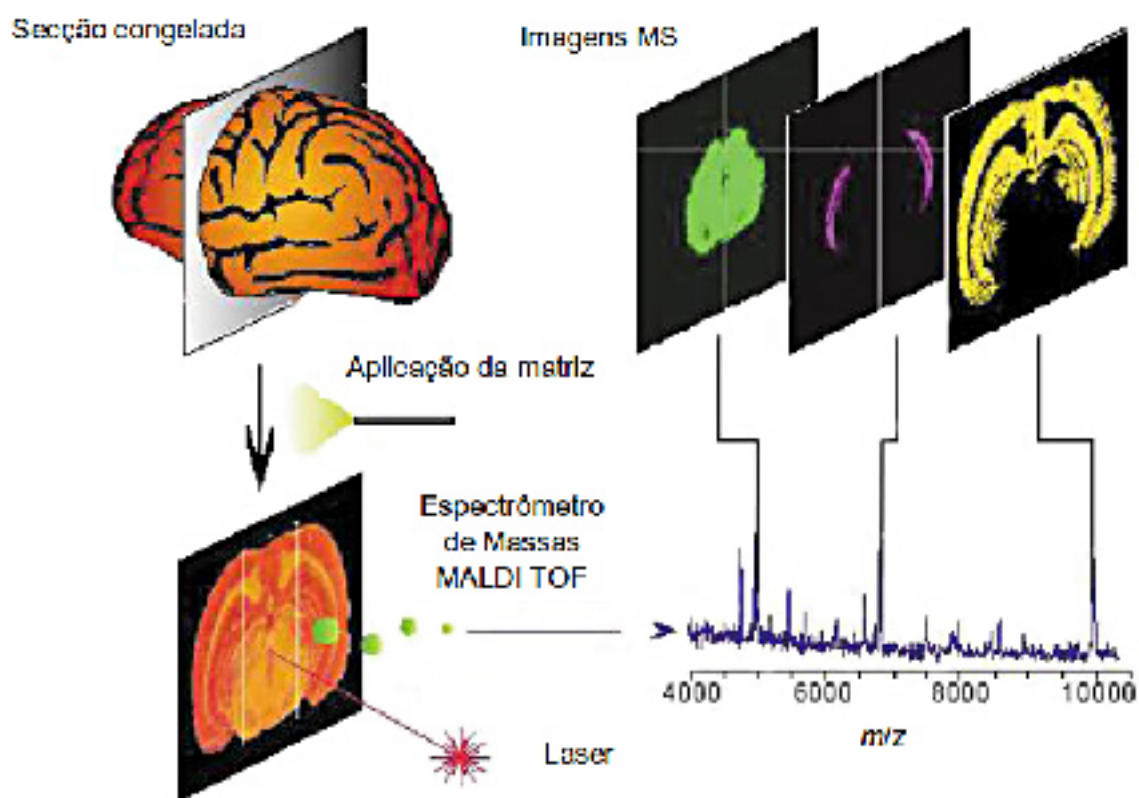


Figura 1. Fluxograma geral de um experimento de *MALDI Imaging* em tecido.

superfície, por exemplo, como é realizado nos métodos tradicionais de proteoma utilizando eletroforese em gel (1D e 2D) e cromatografia líquida.

A análise direta da seção do tecido por MALDI-IMS permite a identificação de um amplo espectro de massas correspondentes a biomoléculas, como lipídeos, glicolipídeos, aminoácidos, peptídeos, e proteínas, bem como medicamentos administrados. Em teoria, MALDI-IMS pode ser aplicado para análise direta de todas as seções biológicas, porém, metodologias de análise de diferentes superfícies biológicas ainda não estão estabelecidas e precisam ser desenvolvidas de acordo com a superfície analisada (ZAIMA et al., 2010).

As pesquisas pioneiras e atuais realizadas por Caprioli e colaboradores, bem como as pesquisas realizadas por pesquisadores do mundo todo, inclusive do Brasil, na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) (BRAND et al., 2006; MAGALHÃES et al., 2008), têm resultado no sucesso do imageamento e perfil proteico de proteínas a partir de tecidos biológicos.

Mais recentemente, as técnicas de imageamento foram também aplicadas na detecção e imagem de pequenas moléculas orgânicas em superfícies de tecidos biológicos. No entanto, apenas em 2005 Mullen e colaboradores aplicaram a detecção e imageamento de compostos em superfície de uma folha de planta e dentro do pedúnculo da planta utilizando MALDI-IMS (MULLEN et al., 2005).

Este primeiro trabalho publicado (MULLEN et al., 2005) relata a detecção espacial dos fungicidas e herbicidas disponíveis comercialmente, azoxistrobina e mesotriona, na superfície das folhas de soja e da azoxistrobina nos ramos da soja, a partir da técnica de imageamento. O que demonstra o grande potencial de MALDI-IMS na investigação do mapeamento de agroquímicos em plantas. Resumidamente, a técnica de preparo de amostra para análise por MALDI-IMS de tecidos de plantas, em geral, consiste, inicialmente, no corte de seções de tecidos congelados, os quais são posteriormente fixados na placa de MALDI por filmes adesivos, e somente então a placa é inserida no espectrômetro de massas MALDI para análise dos compostos químicos (ZAIMA et al., 2010).

Um levantamento bibliográfico foi realizado no *"ISI Web of Knowledge"*, utilizando a combinação das palavras *"imaging mass spectrometry, mass spectrometry imaging and plant, agriculture, leaves, seeds, plant tissue"* e foram encontrados apenas 13 artigos relacionados à MALDI-IMS e tecido de planta (GOTO-INOUE et al., 2010; ZAIMA et al., 2010; MULLEN et al., 2005; CHA et al., 2009), sendo três referentes a utilização de colóide de prata como matriz. A partir destas publicações foi possível identificar apenas 4 laboratórios no mundo que trabalham nesta área, sendo um laboratório localizado em cada região descrita: Reino Unido, Alemanha, Japão e Estados Unidos da América. Outra pesquisa foi realizada em um site de acesso gratuito na internet, designado ao público com interesse em MALDI-IMS (MSIMAGING, 2010), no entanto, nenhum artigo diferente dos encontrados pela pesquisa anterior foi detectado.

As aplicações de MALDI-IMS em tecidos de plantas publicadas estão relacionadas à determinação de compostos agroquímicos em soja (MULLEN et al., 2005), no mapeamento de metabólitos em plantas (BURREAL et al., 2007), na localização de carboidratos solúveis em água em trigo (ROBINSON et al., 2007), na distribuição de glucosinolatos em plantas (SHROFF et al., 2008), na distribuição de nicosulfuronas e translocação de herbicidas sulfonilureia em girassol (ANDERSON et al., 2009; ANDERSON et al., 2010), na análise de arroz (ZAIMA et al., 2010), na análise de celulose em choupo (JUNG et al., 2010), na visualização da distribuição de ácido γ -aminobutírico em berinjela (GOTO-INOUE et al., 2010) e no imageamento de lipídeos em insetos e plantas (VRKOSLAV et al., 2010). Estes trabalhos mostram o quão promissora é a técnica na análise de tecidos vegetais, e que ainda há vários campos a serem explorados. Algumas imagens químicas obtidas e citadas em uma das publicações mencionadas acima (GOTO-INOUE et al., 2010) estão ilustradas a seguir, sendo imagens de amostras de berinjela (Fig. 2 e 3).

Como perspectiva para a técnica de IMS para todas as moléculas, desde pequenas a macromoléculas, os desenvolvimentos recentes, da instrumentação ao preparo de amostra, têm aumentado a sensibilidade, resolução espacial, aumentando, portanto, a capacidade de identificação por MS a partir de MALDI. Estes desenvolvimentos estão ampliando o

campo de aplicações de imageamento por MS para lipídeos, peptídeos e identificação de biomarcadores protéicos, bem como imageamento de drogas e metabólitos. A combinação de imageamento por MS, a identificação química por MS/MS (método em que se seleciona o íon de interesse, o qual colide com gás e se fragmenta, fornecendo informações estruturais da molécula) direto no tecido, e protocolos bioanalíticos padrões (LC-MS/MS e eletroforese) permitirá a identificação de compostos relevantes e a localização dos mesmos em células e tecidos (HOVE et al., 2010).

Além destas aplicações, investigações recentes têm evidenciado que MALDI-IMS tem grande potencial como uma técnica analítica para detectar a absorção foliar e radicular de compostos químicos e para revelar suas distribuições através da planta uma vez absorvidos. No entanto, há muito trabalho

necessário para o refino da técnica para a detecção de compostos em plantas. Estima-se que no futuro, pesquisas no desenvolvimento da técnica de imageamento por espectrometria de massas sejam realizadas a fim de torná-la uma ferramenta analítica quantitativa, além de qualitativa, para a atribuição de novas entidades químicas desenvolvidas no material da planta. Atualmente o MALDI-IMS está sendo mais utilizado em análises clínicas, mas há uma grande perspectiva de aplicação nas análises biológicas em tecidos de plantas, para melhor entendimento dos compostos químicos presentes nestas superfícies, *in natura*, após o contato com um predador, sob condição de estresse, por exemplo, ou até mesmo, após a adição de algum agrotóxico. Enfim, há várias vertentes ainda não exploradas e de grande interesse para a sociedade e pesquisadores, o que torna um desafio instigante para um futuro próximo.

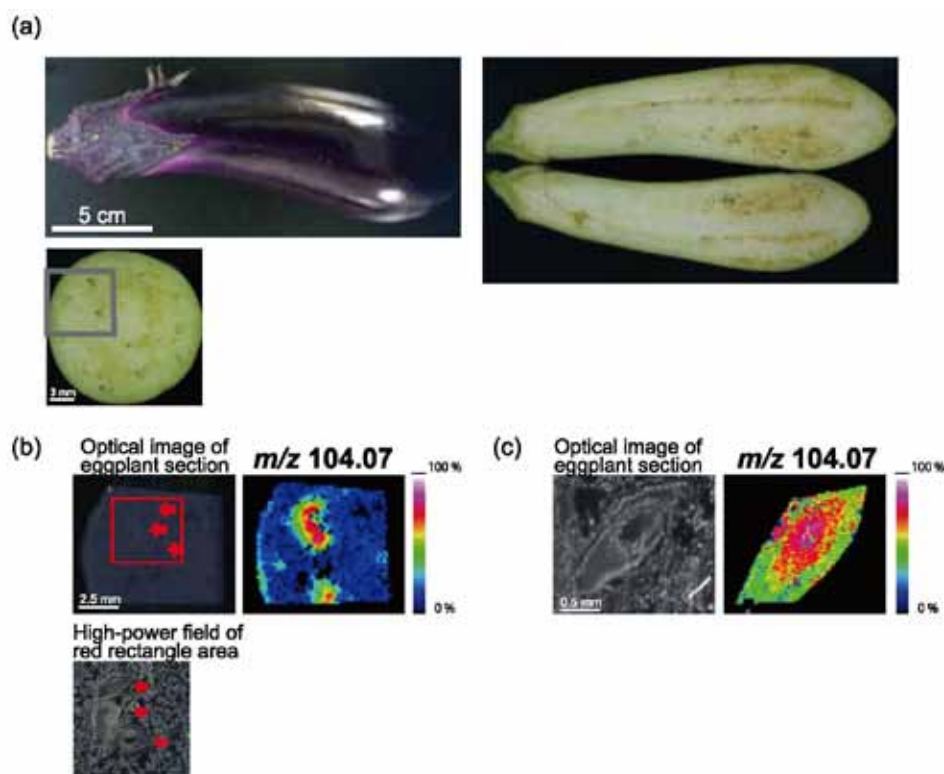


Figura 2. Imagens óticas da berinjela, resultados de análises por IMS e tandem. (a) Imagem ótica da berinjela, secções transversal e longitudinal da berinjela. Um retângulo cinza na imagem transversal mostra a região analisada por IMS. (b) Imagem ótica da seção de berinjela e a imagem do íon de m/z 104,07. As setas vermelhas na imagem ótica mostram a localização das sementes. Escala: 2,5 mm. Reprodutibilidade foi confirmada ($n = 3$). (c) Imagem ótica da seção de berinjela e imagem do íon de m/z 104,07 com resolução espacial de $25 \mu\text{m}$ em uma semente. Escala: 0,5 mm.

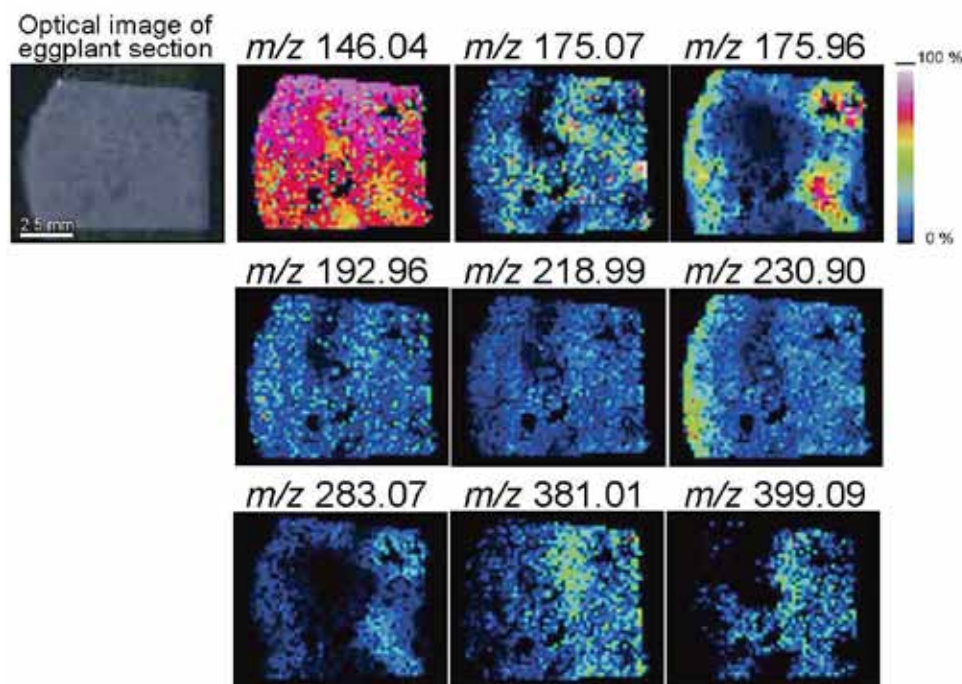


Figura 3. Distribuição dos carboidratos e outros aminoácidos. Imagens correspondentes aos íons de m/z 146,04, 175,07, 175,96, 192,96, 218,99, 230,90, 283,07, 381,01 e 399,09, no modo positivo.

Referências

- ABDELNUR, P. V. **A espectrometria de massas e as bio-moléculas:** Relação estrutura/reactividade de peptídeos por reações íon/molécula e mobilidade de íons e busca de novos biomarcadores em clínica médica por imageamento químico-seletivo de tecidos. 2010. 188 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- ANDERSON, D. M. G.; CAROLAN, V. A.; CROSLAND, S.; SHARPLES, K. R.; CLENCH, M. R. Examination of the distribution of nicosulfuron in sunflower plants by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 23, p. 1321-1327, 2009.
- ANDERSON, D. M. G.; CAROLAN, V. A.; CROSLAND, S.; SHARPLES, K.; CLENCH, M. R. Examination of the translocation of sulfonylurea herbicides in sunflower plants by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 24, p. 3309-3319, 2010.
- ANDERSSON, M.; GROSECLOSE, M. R.; DEUTCH, A. Y.; CAPRIOLI, R. M. Imaging mass spectrometry of proteins and peptides: 3D volume reconstruction. **Nature Methods**, New York, v. 5, n. 1, p. 101-108, 2008.
- BRAND, G. D.; KRAUSE, F. C.; SILVA, L. P.; LEITE, J. R. S. A.; MELO, J. A. T.; PRATES, M. V.; PESQUERO, J. B.; SANTOS, E. L.; NAKAIE, C. R.; COSTA-NETO, C. M.; BLOCH JUNIOR, C. Bradykinin-related peptides from *Phyllomedusa hypochondrialis*. **Peptides**, New York, v. 27, p. 2137-2146, 2006.
- BRAND, G. D.; LEITE, J. R. S. A.; MANDELA, S. M. S.; MESQUITA, D. A.; SILVA, L. P.; PRATES, M. V.; BARBOSA, E. A.; VINECKY, F.; MARTINS, G. R.; GALASSO, J. H.; KUCKELHAUS, S. A. S.; SAMPAIO, R. N. R.; FURTADO JUNIOR, J. R.; ANDRADE, A. C.; BLOCH JUNIOR, C. Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 347, p. 739-746, 2006.
- BURREL, M. M.; EARNSHAW, C. J.; CLENCH, M. R. Imaging Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry: a technique to map plant metabolites within tissues at high spatial resolution. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 4, p. 757-763, 2007.
- CAPRIOLI, R. M.; FARMER, T. B.; GILE, J. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 69, p. 4751, 1997.
- CHA, S.; SONG, Z.; NIKOLAU, B. J.; YEUNG, E. S. Direct Profiling and Imaging of Epicuticular Waxes on *Arabidopsis thaliana* by Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Using Silver Colloid as a Matrix. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 81, p. 2991-3000, 2009.
- CHA, S.; ZHANG, H.; ILARSLAN, H. I.; WURTELE, E. S.; BRACHOVA, L.; NIKOLAU, B. J.; YEUNG, E. S. Direct profiling and imaging of plant metabolites in intact tissues by using colloidal graphite-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. **The Plant Journal**, v. 55, p. 348-360, 2008.
- FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, Washington, v. 246, n. 4926, p. 64-71, 1989.

GOTO-INOUE, N.; SETOU, M.; ZAIMA, N. Visualization of Spatial Distribution of γ -aminobutyric Acid in Eggplant (*Solanum melongena*) by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Imaging Mass Spectrometry. **Analytical Sciences**, Tokyo, v. 26, p. 821-825, 2010.

HOVE, E. R. A. van; SMITH, D. F.; HEEREN, R. M. A. A concise review of mass spectrometry imaging. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, p. 3946-3954, 2010.

JUN, J. H.; SONG, Z.; LIU, Z.; NIKOLAU, B. J.; YEUNG, E. S.; LEE, Y. J. High-Spatial and High-Mass Resolution Imaging of Surface Metabolites of *Arabidopsis thaliana* by Laser Desorption Mass Spectrometry Using Colloidal Silver. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 82, p. 3255-3265, 2010.

JUNG, S.; CHEN, Y.; SULLARDS, M. C.; RAGAUSKAS, A. J. Direct analysis of cellulose in poplar stem by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 24, p. 3230-3236, 2010.

MAGALHÃES, B. S.; MELO, J. A. T.; LEITE, J. R. S. A.; SILVA, L. P.; PRATES M. V.; VINECKY, F.; BARBOSA, E. A.; VERLY, R. M.; MEHTA, A.; NICOLI, J. R.; BEMQUERER, M. P.; ANDRADE, A. C.; BLOCH JUNIOR, C. Post-secretory events alter the peptide content of the skin secretion of *Hypsiboas raniceps*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 377, p. 1057-1061, 2008.

MARK, T. D.; DUNN, G. H. **Electron Impact Ionization**. Vienna: Springer Verlag, 1985.

MARKIDES, K.; GRASLUND, A.. **Advanced information on the Nobel Prize in Chemistry 2002**. Disponível em: <<http://nobelprize.org/chemistry/laureates/2002/chemadv02.pdf>>. Acesso em: 25 jan. 2011.

MSIMAGING. Disponível em: <<http://www.maldi-msi.org/>>. Acesso em: 05 dez. 2010.

MULLEN, A. K.; CLENCH, M. R.; CROSLAND, S.; SHARPLES, K. R. Determination of agrochemical compounds in soya plants by imaging matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 19, p. 2507-2516, 2005.

MUNSON, M. S. B.; FIELD, F. H. Chemical ionisation mass spectrometry. I. General introduction. **Journal of The American Chemical Society**, Easton, v. 88, p. 2621, 1966.

PERDIAN, D. C.; LEE, Y. J. Imaging MS Methodology for More Chemical Information in Less Data Acquisition Time Utilizing a Hybrid Linear Ion Trap-Orbitrap Mass Spectrometer. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 82, p. 9393-9400, 2010.

ROBINSON, S.; WARBURTON, K.; SEYMOUR, M.; CLENCH, M.; THOMAS-OATES, J. Localization of water-soluble carbohydrates in wheat stems using imaging matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. **New Phytologist**, Cambridge, v. 173, p. 438-444, 2007.

SHROFF, R.; VERGARA, F.; MUCK, A.; SVATOS, A.; GERSHENZON, J. Nonuniform distribution of glucosinolates in *Arabidopsis thaliana* leaves has important consequences for plant defense. **Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, n. 16, p. 6196-6201, 2008.

STOECKLI, M.; FARMER, T. B.; CAPRIOLI, R. M. Automated mass spectrometry imaging with a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight instrument. **Journal of The American Society for Mass Spectrometry**, New York, v. 10, p. 67-71, 1999.

TANAKA, K.; WAKI, H.; IDO, S.; AKITA, S.; YOSHIDA, Y.; YOSHIDA, T. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 2, p. 151, 1988.

VRKOSLAV, V.; MUCK, A.; CVAVKA, J.; SVATOS, A. MALDI Imaging of Neutral Cuticular Lipids in Insects and Plants. **Journal of The American Society for Mass Spectrometry**, New York, v. 21, p. 220-231, 2010.

ZAIMA, N.; GOTO-INOUE, N.; HAYASAKA, T.; SETOU, M. Application of imaging mass spectrometry for the analysis of *Oryza sativa* rice. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 24, p. 2723-2729, 2010.

Circular Técnica, 06

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agroenergia
Endereço: Parque Estação Biológica - PqEB s/n,
Brasília, DF
Fone: (61) 3448-4246
Fax: (61) 3448-1589
E-mail: sac.cnepae@embrapa.br

1ª edição
Versão eletrônica (2011)



Comitê de publicações

Presidente: Bruno Galveas Laviola.
Secretária-Executiva: Rachel Leal da Silva.
Membros: Betânia Ferraz Quirino, Daniela Garcia Collares, Esdras Sundfeld.

Expediente

Supervisão editorial: José Manuel Cabral de Sousa Dias.
Revisão de texto: José Manuel Cabral de Sousa Dias.
Editoração eletrônica: Maria Goreti Braga dos Santos.
Normalização bibliográfica: Maria Iara Pereira Machado.