

Brasília, DF  
Dezembro, 2011

### Autor

**Patrícia Verardi Abdelnur**  
Química, doutora em  
Química Orgânica,  
Espectrometria de Massas,  
pesquisadora da Embrapa  
Agroenergia  
Brasília, DF, patricia.  
abdelnur@embrapa.br

## Metabolômica e Espectrometria de Massas

O Metaboloma é a composição de todas as pequenas moléculas presentes em um organismo. A tecnologia voltada para o fornecimento de uma visão geral compreensiva qualitativa e quantitativa dos metabólitos presentes em um organismo é denominada Metabolômica (HALL, 2006).

Metabolômica é um termo recente, introduzido nos anos 2.000 por Dr. Oliver Fiehn e colaboradores (FIEHN et al., 2000), e que vem sendo muito utilizado nesta era "OMICs", de genômica, transcriptômica, proteômica, dentre outras (Figura 1). Os experimentos de metabolômica fornecem resultados únicos para melhorar a compreensão das informações biológicas relacionadas ao metaboloma e mais comumente à genômica funcional. O tamanho do metaboloma varia muito, pois depende do organismo estudado *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, contém aproximadamente 600 metabólitos, identificados até o momento, enquanto as plantas têm, aproximadamente, 200.000 metabólitos primários e secundários (DUNN; ELLIS, 2005).

Os metabólitos constituem um conjunto diverso de arranjos atômicos quando comparados com proteoma e transcriptoma e isto proporciona uma ampla variação nas propriedades físicas e químicas. O grau de diversidade é indicado pelas análises de metabólitos orgânicos com baixo peso molecular, polares e voláteis, como etanol e isopreno, até análises de metabólitos com maiores pesos moleculares, polares (carboidratos) e não polares (terpenóides e lipídeos) (DUNN; ELLIS, 2005). Para caracterizar e quantificar estes compostos é necessário a utilização de metodologias e equipamentos específicos, de acordo com as características de cada classe. Portanto, a metabolômica engloba diversas tecnologias analíticas, que necessitam ser cuidadosamente selecionadas, de acordo com os metabólitos e a via metabólica de interesse, ou com a questão biológica a ser respondida.

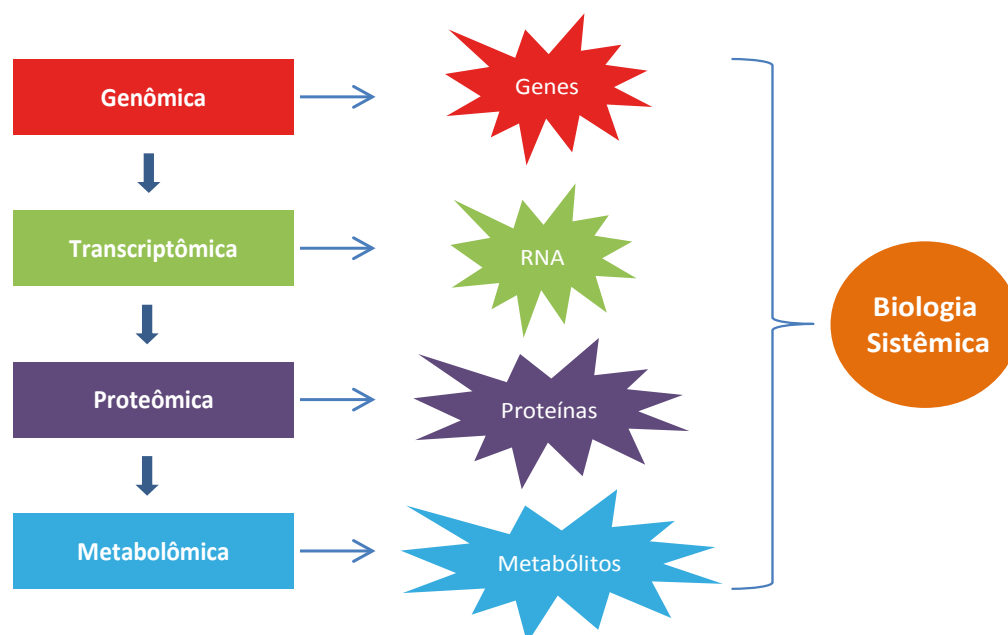


Figura 1. Esquema das plataformas "OMICs" e correlação com biologia sistêmica.

A metabolômica foi desenvolvida na década de 80, e os trabalhos iniciais reportam o uso de espectrometria de massas com ionização branda (Soft Ionization Mass Spectrometry – SIMS) (VANDERGREEF, 1986), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) (TANAKA; HINE, 1982) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) (NICHOLSON et al., 1983). Atualmente, a metabolômica possui potencial de expansão mundial devido à importância, aplicabilidade e respostas obtidas pelos experimentos. Diferentemente do transcriptoma e proteoma, a identificação molecular dos metabólitos não pode ser deduzida a partir da informação genômica (LEI et al., 2011). Então, a identificação e quantificação dos metabólitos necessitam de uma instrumentação sofisticada, como espectrometria de massas (MS), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) e fluorescência induzida por laser (LIF). A seleção otimizada dos metabólitos depende dos objetivos do estudo e é normalmente o ajuste entre sensibilidade, seletividade e rapidez. A NMR é altamente seletivo, não destrutivo, porém possui baixa sensibilidade (LINDON; NICHOLSON, 2008); já o LIF é a mais sensível das técnicas, mas não possui seletividade química, o que é essencial para a identificação estrutural. Em contraste, MS oferece uma boa combinação de seletividade e sensibilidade (LEI et al., 2011).

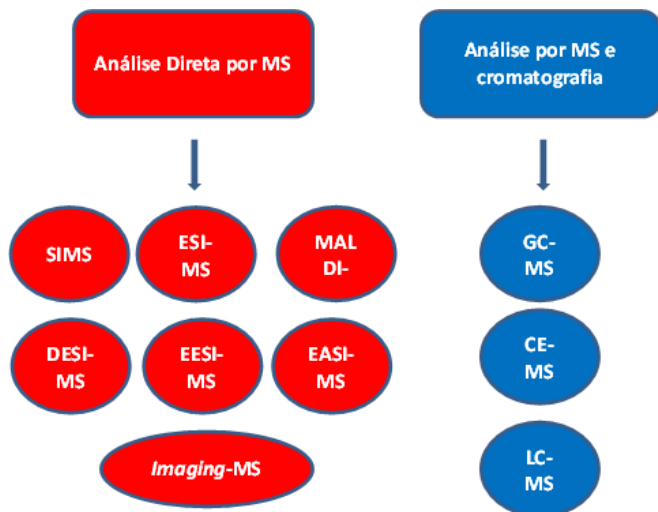
Estratégias por espectrometria de massas (MS) vêm sendo consideradas componente crítico em metabolômica e tem sido as mais comumente utilizadas (BEDAIR; SUMNER, 2008; LEI et al., 2011). Isso porque as técnicas de metabolômica baseadas em MS oferecem excelente combinação de sensibilidade e seletividade, e são, portanto, uma plataforma indispensável em biologia (LEI et al., 2011). Além disso, devido ao desenvolvimento de equipamentos altamente sensíveis, seletivos e com alta precisão, as técnicas analíticas empregadas em metabolômica tem se diversificado consideravelmente, podendo-se citar desde análises por cromatografia líquida de ultra-alta pressão a análises diretas (ABDELNUR et al., 2008) e imagem química por espectrometria de massas (Imaging MS) (YANG et al., 2009; LI et al., 2008; ABDELNUR, 2010, 2011).

Resumidamente, a espectrometria de massas (MS) é uma técnica que detecta a razão massa sobre

a carga ( $m/z$ ) de íons, os quais são provenientes de uma fonte de ionização. Esta fonte gera íons na fase gasosa, a partir de moléculas neutras ou de moléculas carregadas. Com o decorrer dos anos, a espectrometria de massas vem obtendo grandes avanços, nos campos instrumentais e de aplicação. Um grande marco na evolução da MS foi o desenvolvimento de novas fontes de ionização, como ESI (Electrospray Ionization) e MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization), que não necessitam de vácuo para gerar os íons, como o EI (ionização por elétron) e CI (ionização química), sendo métodos de ionização à temperatura ambiente (ABDELNUR, 2011). Essa descoberta rendeu o Prêmio Nobel em Química aos cientistas John Fenn e Koichi Tanaka em 2002 (FENN et al., 1989; TANAKA et al., 1988; MARKIDES; GRASLUND, 2002).

A partir do desenvolvimento destes novos métodos de ionização à temperatura ambiente, uma ampla faixa de compostos químicos passou a ser analisada por espectrometria de massas, desde pequenas moléculas polares até macromoléculas. Até então, somente compostos pequenos, voláteis e estáveis à temperatura ambiente eram analisados por um espectrômetro de massas. Este desenvolvimento possibilitou o acoplamento de MS com outros sistemas de separação, como cromatografia líquida, como ESI e APCI (Atmospheric-Pressure Chemical Ionization), e impulsionou o uso de MS para a detecção de diversas moléculas.

Existem duas estratégias baseadas em MS para metabolômica: análise direta por MS e análise por MS acoplado a técnicas de separação, como, por exemplo, cromatografia e eletroforese capilar, para análises de metaboloma quimicamente complexo (BEDAIR; SUMMER, 2008; LEI, 2011). As análises diretas não necessitam de separação cromatográfica e podem ser realizadas por infusão direta por ESI, MALDI, e por técnicas recentes de pressão atmosférica como DESI (Desorption Electrospray Ionization), ESSI (Electro-Sonic Spray Ionization), EASI (Easy Ambient Sonic-Spray Ionization), e mais recentemente por Imaging MS. As análises que necessitam de pré-separação são realizadas por GC-MS (Gas Chromatography – Mass Spectrometry), LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) e CE-MS (Capillary electrophoresis - Mass Spectrometry) (Figura 2).

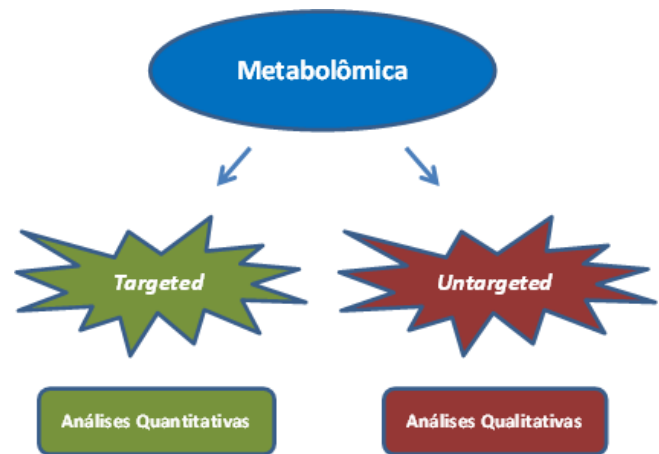


**Figura 2.** Diferentes técnicas baseadas em espectrometria de massas utilizadas em Metabolômica: análises direta por MS e análises por MS com separação prévia.

A melhor estratégia é definida a partir do tipo e complexidade da amostra.

A Metabolômica também pode ser dividida em duas categorias: “Targeted” (DUDLEY et al., 2010) e “Untargeted” (DE VOS et al., 2007), ou “Non-Targeted” (LIN et al., 2011); sendo que na primeira a análise é direcionada para moléculas alvos, que já são previamente conhecidas, enquanto que na segunda se faz um perfil (“profiling”) total dos metabólitos presentes no sistema. Por fim, existe ainda, a Metabolômica Quantitativa, em que os metabólitos são detectados e quantificados, sendo o método mais utilizado na “Targeted Metabolomics”; e a Metabolômica Qualitativa, em que um perfil dos mesmos é detectado, sendo este o método mais utilizado na “Untargeted Metabolomics” (Figura 3). Cada uma destas estratégias tem sua importância e deve ser cuidadosamente escolhida antes da realização de um experimento, para que não ocorram erros de análise de interpretação.

É evidente que a metabolômica, apesar de uma área nova, possui grande impacto futuro, principalmente, no entendimento global de um sistema biológico. As aplicações da metabolômica tem se expandido amplamente, assim como as técnicas genômicas, proteômicas e transcriptômicas fizeram nos últimos anos. A utilização dessas técnicas tem impulsionado a análise de vias metabólicas de diferentes organismos.



**Figura 3.** Estratégias utilizadas em Metabolômica: análise direcionada (targeted metabolomic) e análise não direcionada (untargeted metabolomic).

## 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.
- ABDELNUR, P. V.; EBERLIN, L. S.; de SA, G. F.; SOUZA, V.; EBERLIN, M. N. Single-Shot biodiesel analysis: Nearly instantaneous typification and quality control solely by ambient mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 80, p. 7882–7886, 2008.
- ABDELNUR, P. V. **Imageamento químico por espectrometria de massas utilizando MALDI (MALDI Imaging Mass Spectrometry) aplicado a tecidos vegetais.** Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2011. 6 p. (Embrapa Agroenergia. Circular técnica, 006).
- BEDAIR, M.; SUMMER, L. W. Current and emerging mass-spectrometry technologies for metabolomics. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 27, p. 238-250, 2008.
- DE VOS, R. C. H.; MOCO, S.; LOMMEN, A.; KEURENTJES, J. J. B.; BINO, R. J.; HALL, R. D. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 2, p. 778-791, 2007.
- DUDLEY, E.; YOUSEF, M.; WANG, Y.; GRIFFITHS, W. J. Targeted metabolomics and mass spectrometry. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, Amsterdam, v. 80, p. 45 - 83, 2010.

DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 24, p. 285-294, 2005.

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.

FIGEN, O.; KOPKA, J.; DORMANN, P.; ALTMANN, T.; TRETHEWEY, R. N.; WILLMITZER, L. Metabolite profiling for plant functional genomics. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, p. 1157-1161, 2000.

HALL, R. D. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. **New Phytologist**, Cambridge, v. 169, p. 453-468, 2006.

LEI, Z.; HUHMANN, D. V.; SUMMER, L. W. Mass spectrometry strategies in metabolomics. **JBC Papers in Press**, Published on June 1, 2011 as Manuscript R111.238691.

LI, Y.; SHRESTHA, B.; VERTES, A. Atmospheric pressure infrared MALDI imaging mass spectrometry for plant metabolomics. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 80, p. 407-420, 2008.

LIN, S.; YANG, Z.; SHEN, Y.; CAI, Z. LC/MS-based non-targeted metabolomics for the investigation of general toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in C57BL/6J and DBA/2J mice. **International Journal of Mass Spectrometry**, Amsterdam, v. 301, p. 29-36, 2011.

LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K. Analytical technologies for metabolomics and metabolomics, and multi-omic information recovery. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 27, p. 194-205, 2008.

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.

NICHOLSON, J. K.; BUCKINGHAM, M. J.; SADLER, P. J. High resolution <sup>1</sup>H n.m.r. studies of vertebrate blood and plasma. **The Biochemical Journal**, London, v. 211, p. 605-615, 1983.

TANAKA, K.; HINE, D. G. Compilation of gas chromatographic retention indices of 163 metabolically important organic acids, and their use in detection of patients with organic acidurias. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 239, p. 301-322, 1982.

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.

VANDERGREEF, J. Field desorption mass spectrometry in bioanalysis. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 5, p. 241, 1986.

YANG, Y. L.; XU, Y.; STRAIGHT, P.; DORRESTEIN, P. C. Translating metabolic exchange with imaging mass spectrometry. **Nature Chemical Biology**, v. 5, p. 885-887, 2009.

### Circular Técnica, 10

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](mailto:sac.cnepae@embrapa.br)

**Embrapa**

Ministério de  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento

GOVERNO FEDERAL  
**BRASIL**  
PAIS BICO E PAIS SEM FOMEZ

1ª edição  
Versão eletrônica (2011)

### Comitê de publicações

Presidente: *José Manuel Cabral de Sousa Dias.*  
Secretária-Executiva: *Anna Leticia M. T. Pighinelli.*  
Membros: *Alice Medeiros de Lima, Larissa Andreani,*  
*Leonardo Fonseca Valadares.*

### 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.*