



Explorer
para SCIEX OS
Tutorial



Este documento é fornecido aos clientes que compraram um equipamento SCIEX para uso na operação de tal equipamento. Este documento é protegido por direitos autorais e qualquer reprodução deste documento ou qualquer parte do mesmo é estritamente proibida, exceto quando houver autorização por escrito da SCIEX.

O software que pode ser descrito neste documento é fornecido sob um contrato de licença. É contra a lei copiar, modificar ou distribuir o software em qualquer meio de comunicação, exceto se permitido especificamente no contrato de licença. Além disso, o contrato de licença pode proibir o software de ser desmontado, passar por engenharia reversa ou decompilado para qualquer finalidade. As garantias são conforme definidas em tal documento.

Partes deste documento podem fazer referência a outros fabricantes e/ou os seus produtos, que podem conter peças cujos nomes estão registrados como marcas registradas e/ou funcionam como marcas registradas dos seus respectivos proprietários. Qualquer uso é destinado apenas para designar estes produtos do fabricante como fornecidos pela SCIEX para incorporação em seu equipamento e não implica em qualquer direito e/ou licença para usar ou permitir que outros usem tais nomes de produto seus e/ou do fabricante como marcas registradas.

As garantias da SCIEX estão limitadas a estas garantias expressas fornecidas no momento da venda ou licença de seus produtos e são representações, garantias e obrigações únicas e exclusivas da SCIEX. A SCIEX não oferece nenhuma outra garantia de nenhum tipo, expressa ou implícita, incluindo, entre outras, garantias de comercialização ou adequação para um propósito particular, decorrentes de um estatuto ou da lei, ou de uma negociação ou utilização comercial expressamente divulgada, e não assume nenhuma responsabilidade ou obrigação contingente, incluindo danos indiretos ou consequentes, para qualquer uso pelo comprador ou por quaisquer circunstâncias adversas decorrentes.

Produto destinado apenas para pesquisa científica. Não destinado ao uso em procedimentos diagnósticos.

A AB Sciex está fazendo negócios como SCIEX.

As marcas registradas mencionadas aqui são propriedade da AB Sciex Pte. Ltd. ou seus respectivos proprietários.

AB SCIEX™ está sendo usada sob licença.

© 2018 AB Sciex



AB Sciex Pte. Ltd.
Blk 33, n.º 04-06
Marsiling Ind Estate Road 3
Woodlands Central Indus. Estate.
SINGAPORE 739256

Conteúdo

1 Introdução.....	5
Instituição.....	5
Opções.....	6
Painéis.....	6
Barra de ferramentas genéricas do painel.....	7
Barra de ferramentas de dois painéis.....	10
Gráficos.....	12
Barra de ferramentas específicas do gráfico.....	13
Barra de ferramentas específicas do espectro.....	18
Sobreposições.....	18
Abrir arquivos.....	19
Abrir arquivo de amostra única.....	20
Abrir arquivos de várias amostras.....	21
Cromatogramas e espectros.....	21
Cromatograma de íons totais (TIC).....	22
Espectros.....	22
Cromatograma de Íon Extraído (XIC).....	23
Gráficos de contorno e mapas de calor.....	24
2 Trabalhar com cromatogramas e espectros.....	27
Abrir um arquivo de dados.....	27
Mostrar o TIC para um experimento.....	29
Mostrar um XIC para uma fórmula molecular conhecida.....	30
Gerar e interagir com um espectro.....	34
Usar um gráfico de contorno.....	40
Resumo.....	43
3 Trabalhar com o explorador de IDA.....	45
Mostrar e juntar espectros.....	45
Filtrar dados IDA.....	50
Usar um espectro de referência.....	51
Resumo.....	52
4 Trabalhar com ferramentas de estrutura.....	53
Vincular uma estrutura a um espectro MS/MS.....	53
Trabalhar com fragmentos.....	56
Incluir subestruturas em um espectro.....	61
Trabalhar com espectros de MS/MS relacionados.....	62
Resumo.....	65
5 Trabalhar com várias amostras.....	66
Trabalhar com duas amostras.....	66
Trabalhar com mais de duas amostras.....	72
Resumo.....	79

6 Trabalhar com o Kit de ferramentas biológicas.....	80
Sequência manual.....	80
Sequenciamento manual vinculado a fragmentos de peptídeo.....	86
Incluir e remover marcações incluídas de reconstrução manual.....	90
Digerir proteína.....	93
Barra de ferramentas.....	93
Digestão teórica de proteína.....	95
Reconstrução de peptídeo por LCMS.....	99
Barra de ferramentas.....	103
Reconstrução de peptídeos por LCMS com proteína digerida.....	105
Reconstrução de proteína.....	106
Resumo.....	110

Esse documento fornece uma visão geral de tutorial de algumas das ferramentas e funcionalidades disponíveis no software. Ele não fornece uma descrição detalhada de cada operação disponível, mas explica alguns dos fluxos de trabalho mais comuns que o software pode realizar.

Instituição

Enquanto algumas funções e operações são específicas a certas aplicações e fluxos de trabalho, a maioria é genérica e usada com frequência ao explorar dados qualitativos. Essa seção do documento fornece uma breve introdução aos conceitos do software e uma descrição de algumas das operações mais comuns e essenciais. As seções seguintes descrevem abordagens para fluxos de trabalho específicos e usam os arquivos de dados de amostra fornecidos com o software.

Os arquivos de amostra são distribuídos no DVD SCIEX OS, na pasta Extras/Example Project. Copie todo o projeto para a pasta D:\SCIEX OS DATA no computador. Os arquivos de amostra a seguir são usados como exemplo neste tutorial:

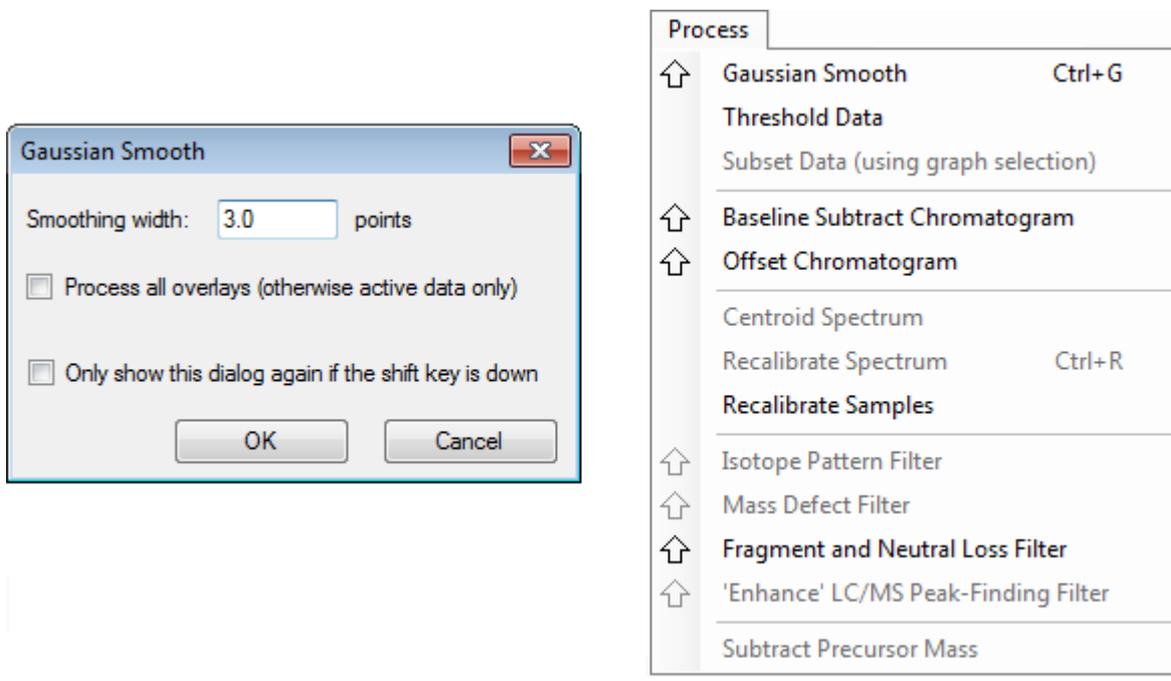
- Bromocrip_IDA-DBS alone_T=1.wiff
- Bromocrip_IDA-DBS em plasma_T=0.wiff
- Bromocrip_IDA-DBS em plasma_T=1.wiff
- DataSET61.wiff
- DataSET62.wiff
- DataSET63.wiff
- DataSET64.wiff
- DataSET65.wiff
- DataSET66.wiff
- RP_digests.wiff
- RP_Intact.wiff
- Bromocriptine.mol

Os arquivos de bromocriptina são de análises IDA de modo negativo de uma incubação com microssomas de fígado de rato. Bromocrip_IDA-DBS alone_T=1.wiff foi obtido do momento de uma hora, enquanto os outros dois são para os momentos de zero e de uma hora injetados no plasma. O arquivo Bromocriptine.mol contém a estrutura molecular da bromocriptina. DataSET61 até DataSET66 são arquivos coletados de loratadina e suas impurezas. Os diferentes conjuntos de dados representam diferentes níveis de concentração. O arquivo RP_Intact.wiff é de uma análise de mioglobina intacta. O arquivo RP_digests.wiff é de uma análise de mioglobina tipicamente digerida.

Opções

O software fornece várias opções para filtrar a forma como os comandos se comportam. Algumas, mostradas na [Figura 1-1](#), fornecem uma caixa de verificação que permite que o diálogo seja mostrado somente se a tecla **Shift** estiver pressionada. Isso eliminará a necessidade de interagir com a caixa de diálogo se não forem necessárias alterações nos parâmetros. O menu para esses comandos contém uma seta apontando para cima.

Figura 1-1 Opções



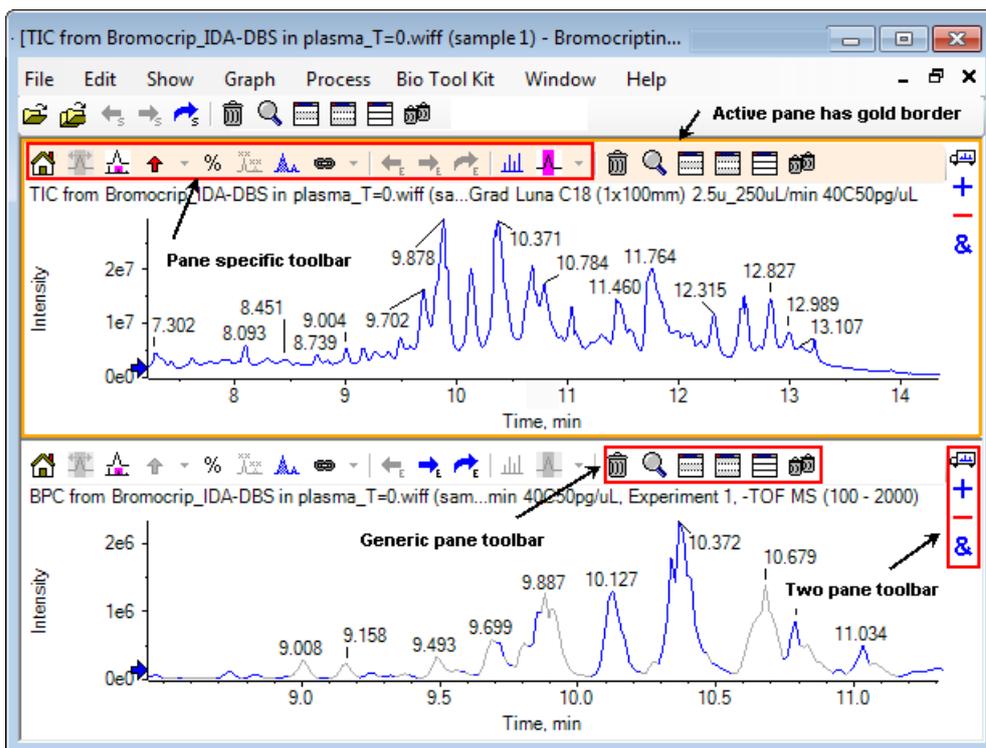
Painéis

Enquanto o software usa janelas para expor e receber informações, o componente básico da interface do usuário é um painel. Uma janela pode conter um ou mais painéis, mas somente um painel por vez pode estar ativo. Os painéis recebem comandos de menus e barras de ferramentas. Os menus e as barras de ferramentas fornecem meios de manipular os painéis ou os dados contidos.

Os painéis podem conter gráficos como espectros e cromatogramas, mapas de calor ou tabelas, assim como visualizações mais específicas. Operações de processamento comuns criam painéis para mostrar informações ou trabalham nos dados mostrados dentro de um painel. Cada painel contém ferramentas genéricas de um e dois painéis. A maioria dos painéis tem ferramentas adicionais que são específicas ao tipo de painel. As ferramentas adicionais fornecem acesso aos comandos mais comuns.

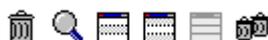
Um exemplo de janela comum é mostrado na [Figura 1-2](#). A janela contém dois painéis, com o painel ativo e o cromatograma, identificados pela borda colorida e pela barra de ferramentas.

Figura 1-2 Exemplo de painéis dentro de uma janela



As operações comuns do painel estão resumidas em [Barra de ferramentas genéricas do painel](#) e [Barra de ferramentas de dois painéis](#). As operações específicas do painel são resumidas em [Gráficos](#).

Barra de ferramentas genéricas do painel



Clique em um ícone para usar as operações genéricas do painel único.

Tabela 1-1 Ícones da barra de ferramentas genéricas do painel

Ícone	Nome (dica de ferramenta)
	Excluir esse painel
	Expandir o painel ativo para preencher a janela
	Ocultar esse painel
	Ocultar todos os outros painéis

Tabela 1-1 Ícones da barra de ferramentas genéricas do painel (continuação)

Ícone	Nome (dica de ferramenta)
	Mostrar todos os painéis ocultos atualmente
	Excluir todos os outros painéis (mantenha pressionada a tecla Ctrl para excluir somente os painéis depois deste)

Nota: Ícones semelhantes também estão disponíveis na barra de ferramentas principal, localizados abaixo da barra de menu. Clicar em um dos ícones na barra de ferramentas principal terá o mesmo efeito de clicar nos ícones do painel ativo. Esta barra de ferramentas poderá ser útil se o painel ativo tiver sido redimensionado e alguns dos ícones não estiverem visíveis.

Excluir esse painel

Se houver vários painéis abertos, use esse ícone para excluir o painel correspondente. Se houver apenas um painel aberto, esse ícone não estará disponível.

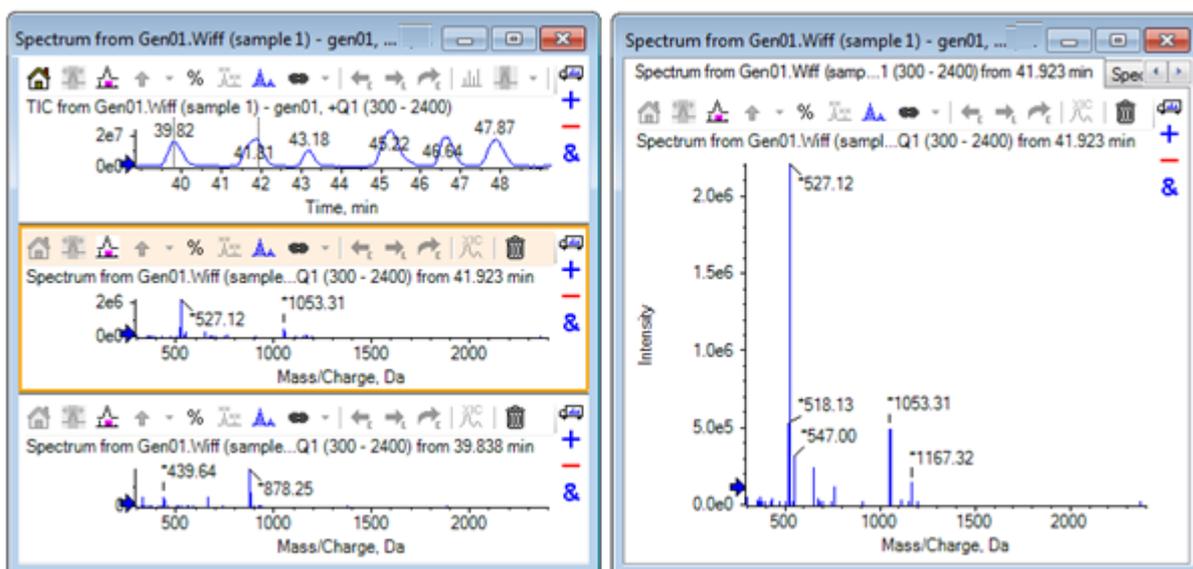
Expandir o painel ativo para preencher a janela

Use esse ícone para expandir o painel para preencher a janela inteira ou para retornar ao tamanho original do painel. Se a janela contiver diversos painéis, esse ícone permanecerá temporariamente sobre um deles.

Uma aba separada é mostrada na parte superior da janela para cada painel. Clique na aba adequada para alternar entre os painéis

Nota: Se os títulos dos painéis forem longos, nem todas as guias serão visíveis. Use os botões de seta à direita das guias para rolar por elas. Clique no ícone novamente para retornar à visualização original, mostrando todos os painéis.

Figura 1-3 Exemplo de painel expandido



Ocultar esse painel

Use esse ícone para esconder o painel de forma que outros painéis na janela preencham o espaço disponível. Esse ícone é útil quando o usuário quer visualizar um subconjunto de painéis, mas não quer excluir permanentemente os outros painéis.

Ocultar todos os outros painéis

Use esse ícone para ocultar todos os painéis, exceto o painel correspondente. O resultado é, de certa forma, semelhante ao clicar no ícone **Expandir o painel ativo para preencher a janela**, porque, nos dois casos, somente o painel correspondente permanece e preenche o espaço disponível. A diferença é aparente quando outro painel é criado na sequência. No caso do painel expandido, esse novo painel se torna ativo e preenche o espaço disponível. No caso de painéis ocultos, os dois painéis (o painel ativo original e o novo) ficam visíveis.

Mostrar todos os painéis ocultos atualmente

Use esse ícone para mostrar todos os painéis que foram ocultos.

Excluir todos os outros painéis

Se a tecla Ctrl não estiver pressionada, esse ícone excluirá todos os painéis na janela, exceto o painel correspondente. Essa opção é útil para limpeza e reprocessamento da amostra. Qualquer painel atualmente oculto também é excluído.

Se a tecla Ctrl estiver pressionada, somente os painéis que estão depois do painel correspondente serão excluídos. Essa opção é útil quando há vários painéis abertos e somente alguns dos iniciais são necessários. Nesse caso, os painéis ocultos não são excluídos.

Barra de ferramentas de dois painéis



Arraste o ícone para usar as operações de dois painéis (a disponibilidade depende do tipo de painel). O painel de origem é aquele que contém o ícone selecionado, e o segundo painel é o de destino.

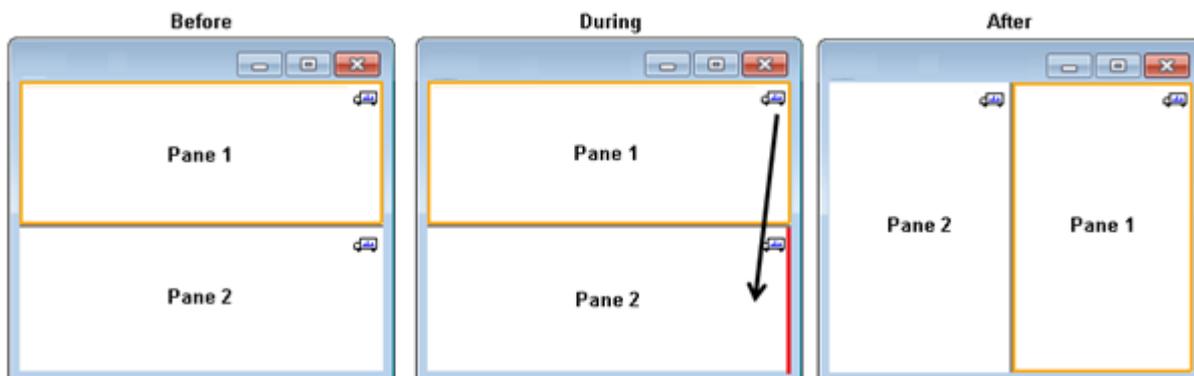
Tabela 1-2 Ícones da barra de ferramenta de dois painéis

Ícone	Nome (dica de ferramenta)
	Arrastar e soltar para reorganizar os painéis.
	Arrastar para outro gráfico para incluir os dados ativos nos dados ativos do gráfico de destino (Mantenha pressionada a tecla Ctrl para adicionar os dados ativos a todos os conjuntos de dados no outro gráfico.)
	Arrastar para outro gráfico para subtrair os dados ativos dos dados ativos do gráfico de destino (Mantenha pressionada a tecla Ctrl para subtrair todos os conjuntos de dados do destino. Segure a tecla Shift para manter os valores negativos.)
	Arrastar para outro gráfico para sobrepor os dados ativos no gráfico de destino. (Mantenha pressionada a tecla Ctrl para sobrepor todos os conjuntos de dados, não apenas o ativo.)

Arrastar e soltar para reorganizar os painéis

Esse ícone é mostrado no canto superior direito de cada painel e é usado para alterar as posições relativas dos painéis. Clique no ícone em um painel e arraste-o para a parte superior, inferior, esquerda ou direita de um segundo painel. Dependendo de onde o ícone for liberado, o primeiro painel mudará a posição em relação ao segundo. Conforme o cursor é arrastado, um lado do segundo painel é realçado em vermelho para indicar onde o primeiro painel será colocado. A [Figura 1-4](#) mostra o resultado de arrastar esse ícone do painel superior para a parte direita do painel inferior.

Figura 1-4 Resultado de arrastar o ícone do painel superior para a parte direita do painel inferior



Nota: É possível arrastar os painéis de uma janela para outra.

Arrastar para outro gráfico para incluir os dados ativos nos dados ativos do gráfico de destino

Use esse ícone para somar dois conjuntos de dados, ponto a ponto. Os dados de origem (do painel que foi clicado originalmente) são incluídos aos dados de destino (o painel sobre o qual o ícone é liberado). O título dos dados é atualizado para indicar que foi modificado.

Nota: É possível adicionar ao mesmo tempo somente dois conjuntos de dados do mesmo tipo. Por exemplo, um espectro não pode ser adicionado a um cromatograma.

Nota: Se o gráfico de destino contém mais de um traço sobreposto, então, por padrão, os dados de origem são incluídos somente aos dados de destino ativos. Se a tecla Ctrl estiver pressionada, a origem será incluída a todos os conjuntos de dados no destino.

Arrastar para outro gráfico para subtrair os dados ativos dos dados ativos do gráfico de destino

Use esse ícone para subtrair os dados de origem dos dados de destino. Este ícone é útil para subtrair a linha de base de um espectro de massa.

Nota: Se o gráfico de destino contém mais de um traço sobreposto, então, por padrão, os dados de origem são subtraídos somente dos dados de destino ativos. Se a tecla Ctrl estiver pressionada, a origem será subtraída de todos os conjuntos de dados no destino.

Dica! Normalmente, quaisquer pontos de dados para os quais a intensidade na origem for maior que no destino não são mantidos. Isso significa que os valores negativos de y são descartados. Se a tecla Shift estiver pressionada, os pontos com intensidade negativa serão mantidos.

Arrastar para outro gráfico para sobrepor os dados ativos no gráfico de destino

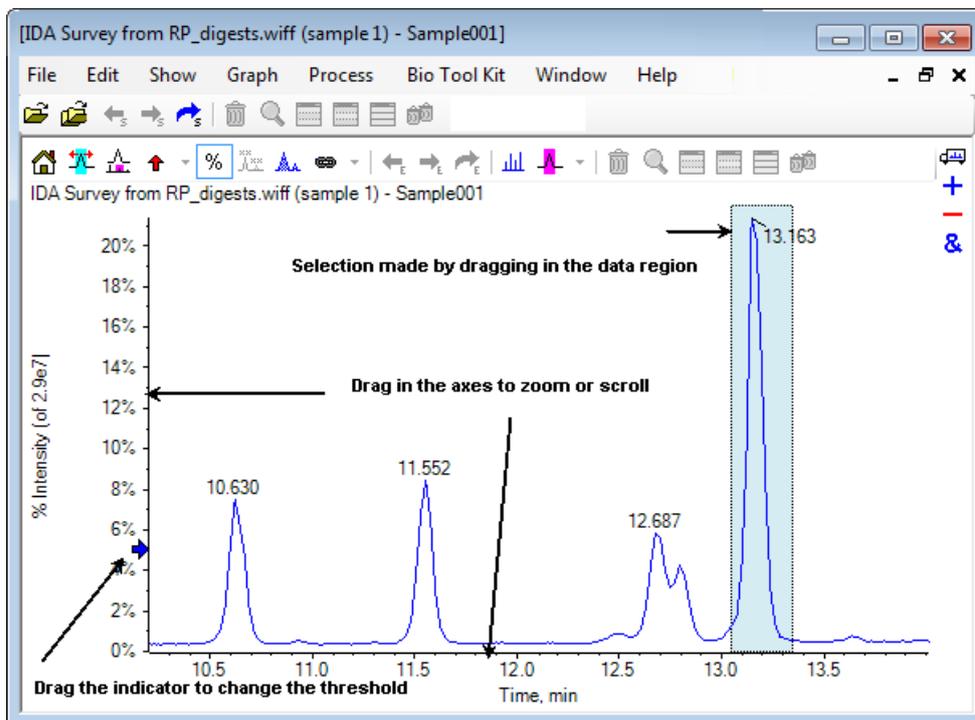
Use esse ícone para sobrepor os dados ativos do gráfico de origem ao gráfico de destino. Depois que a operação for concluída, o gráfico de destino conterá uma nova série com uma cópia dos dados de destino.

Nota: Se o gráfico de origem contiver mais de um traço sobreposto, então, por padrão, somente uma cópia de seus dados ativos será movida para o gráfico de destino. Se a tecla Ctrl for pressionada, uma cópia de todos os conjuntos de dados no gráfico de origem será sobreposta no gráfico de destino.

Gráficos

Os gráficos são painéis que permitem visualização e interação de dados. Várias operações são comuns a todos os gráficos, enquanto outras dependem do tipo de dado mostrado.

Figura 1-5 Gráficos



Os comandos genéricos são resumidos da seguinte forma:

- O zoom e a rolagem são realizados ao arrastar o cursor na região do eixo x ou y do gráfico. Clicar duas vezes reconfigura o eixo à faixa original e clicar no eixo enquanto pressiona a tecla **Shift** reverte o gráfico à visualização anterior (desfaz o zoom e a rolagem).
- Um indicador de limite pode ser posicionado ao arrastá-lo. O limite geralmente determina quais picos são rotulados e, às vezes, é usado para determinar quais picos são processados.

- As seleções são feitas arrastando a região de dados. As seleções são usadas para definir uma parte dos dados a serem usados ou processados. Selecione várias regiões pressionando a tecla **Shift** enquanto arrasta. Pressione a tecla **Ctrl** para fazer seleções no eixo x e no y.

Barra de ferramentas específicas do gráfico



Tabela 1-3 Ícones da barra de ferramentas específicas do gráfico

Ícone	Nome (dica de ferramenta)
	Retornar o gráfico com zoom para a visualização inicial
	Selecionar zoom para visualização completa
	Mostrar gráfico de "zoom" (para rastrear o zoom atual). Consulte a Figura 1-6 .
	Incluir setas marcadoras para picos selecionados
	Usar o eixo y com valor em porcentagem
	Rotular todos os traços sobrepostos
	Preencher os picos
	Vincular o eixo x do gráfico a outros (com as mesmas unidades) na janela (Segure a tecla Control para aplicar a todos os gráficos atuais)
	Alterar os dados para usar no experimento anterior
	Alterar os dados para usar no próximo experimento
	Alterar os dados para usar um experimento selecionado
	Exibir um espectro para seleção
	Configurar o intervalo de subtração do ruído de fundo

Nota: Os últimos seis ícones nessa barra de ferramentas, começando com o ícone Excluir esse painel, estão descritos em [Barra de ferramentas genéricas do painel](#).

Retornar o gráfico com zoom para a visualização inicial

Se o gráfico estiver com zoom, então use esse ícone para retornar à visualização inicial, ou seja, à tela na qual tanto o eixo x quanto o eixo y mostram suas faixas predefinidas e todos os dados disponíveis estão visíveis. Clicar duas vezes no eixo x retorna o gráfico à visualização inicial. Clicar duas vezes no eixo y retorna somente esse eixo à sua faixa completa.

Selecionar zoom para visualização completa

Use esse ícone para dar zoom no gráfico para que a região selecionada preencha inteiramente o espaço disponível. Antes de selecionar esse ícone, clique e arraste o cursor para fazer uma seleção. Você também pode aumentar o zoom arrastando diretamente no eixo X (ou Y) do gráfico.

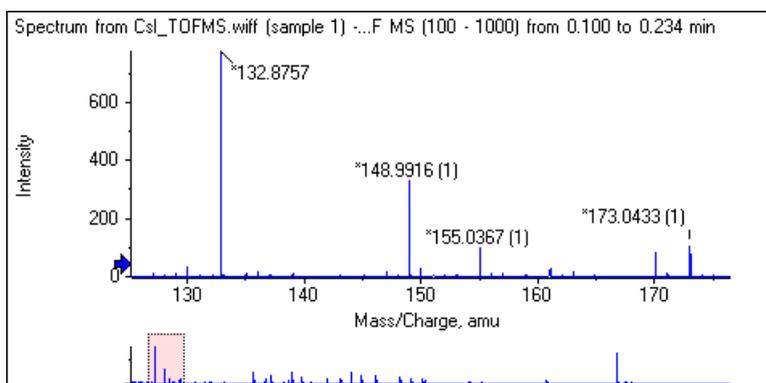
Mostrar gráfico de "zoom" (para rastrear o zoom atual)

Use esse ícone para mostrar uma pequena cópia do gráfico abaixo do gráfico principal conforme mostrado na [Figura 1-6](#). Esse gráfico de visão panorâmica sempre mostra a faixa total disponível e indica região de zoom do gráfico principal selecionado com uma marcação de cor rosa. Como o gráfico principal está ampliado, esta seleção será atualizada na mesma proporção.

Se a seleção de pico for arrastada para um novo local, o gráfico principal será deslocado, conforme necessário. Arrastar a seleção perto da extremidade esquerda ou direita da seleção ajustará sua largura. Nesse caso, o gráfico principal aumenta, conforme necessário.

Essa funcionalidade é útil para espectro de massas de alta resolução, porque geralmente é necessário ampliar muito o gráfico para ver os detalhes desejados. O gráfico de visão geral ainda permite ao usuário rastrear onde a região ampliada está localizada, com referência à faixa de massas inteira.

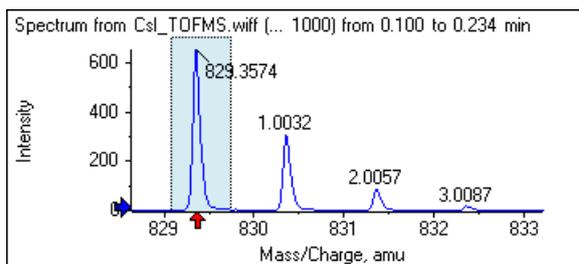
Figura 1-6 Mostrando o gráfico de visão geral



Incluir setas marcadoras para picos selecionados

Use esse ícone para incluir um marcador de seta ao maior pico dentro da região selecionada no gráfico. A [Figura 1-7](#) mostra o resultado de clicar nesse ícone quando o pico 829 (aproximadamente) estiver selecionado como mostrado.

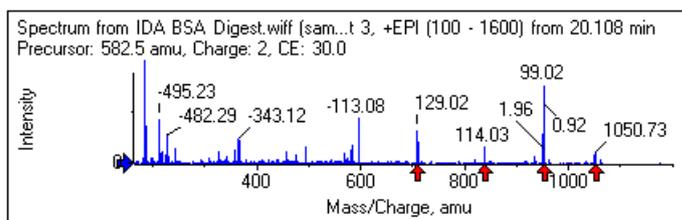
Figura 1-7 Incluindo marcador de seta única



As setas agem como pontos de referência nos dados. Por padrão, os picos que não estão próximos de uma seta são rotulados com a distância da seta mais próxima. O pico próximo da seta com o maior valor de X é rotulado com seu valor real de X. Os picos próximos a outras setas, diferentes da última, são rotulados com relação à seta com o valor mais alto de x. Na [Figura 1-7](#), o pico em aproximadamente 829 Da é rotulado com seu valor em m/z real e os picos do isótopo são rotulados com suas distâncias desse pico. Os picos à esquerda da seta (não mostrados) teriam valores rotulados negativos.

As setas geralmente são usadas em espectros de massas e fornecem uma forma conveniente de buscar diferenças de massa esperadas, como isótopos, perdas neutras em espectros MS/MS e assim por diante. A [Figura 1-8](#) mostra um espectro MS/MS de um peptídeo no qual as setas foram incluídas a valores correspondentes a perdas neutras de resíduos de aminoácidos. Por exemplo, o pico rotulado 99,02 pode ser uma perda de valina do pico em 1050,73 Da, o próximo rotulado 114,03 pode ser uma perda adicional de asparagina, e assim por diante. O pico rotulado -113,08 pode ser uma perda de leucina ou isoleucina do pico rotulado 129,02 (com valor real de m/z próximo de 709 Da).

Figura 1-8 Incluindo várias setas marcadoras



Se essa rotulação relativa de pico não for utilizada, desmarque o item no menu **Use Arrows for Relative Peak Labeling** que aparece na [Figura 1-9](#). Nesse caso, as setas serão usadas para marcar os picos de interesse particular.

Figura 1-9 Menu Add Arrow Marker



Os usuários podem arrastar uma seta para um novo local. Se ela for arrastada para a área do gráfico, isso cancelará a operação de arraste. Se o usuário arrastar a seta para fora do gráfico, a seta será excluída. É possível excluir todas as setas, selecionando **Remove All Arrows** do menu mostrado na [Figura 1-9](#).

Usar o eixo Y com valor em porcentagem

Esse ícone modifica a escala absoluta do eixo y em porcentagem. Quando selecionado, os traços sobrepostos são escalados para que o valor máximo para cada traço esteja a 100%. Usar o eixo y com valores percentuais é conveniente se as magnitudes absolutas dos traços sobrepostos forem muito diferentes.

Rotular todos os traços sobrepostos

Por padrão, quando vários traços são sobrepostos, somente o traço ativo é rotulado. Clique nesse ícone para rotular todos os traços. Clique no ícone novamente para remover todos os rótulos e depois voltar à visualização original.

Preencher os picos

Clique nesse ícone para preencher os picos para os dados ativos, usando preenchimentos alternados entre escuros e claros. Este recurso é útil para visualizar o início e o término exatos dos picos. Clique no ícone novamente para remover todo o preenchimento e voltar à visualização original.

Vincular o eixo X do gráfico a outros (com as mesmas unidades) na janela

Os eixos de dois ou mais gráficos podem ser vinculados a um eixo de um gráfico ampliado para se ajustarem automaticamente ao mesmo. Este recurso pode ser útil para comparar os dados nesses gráficos. Uma alternativa é sobrepor os conjuntos de dados no mesmo gráfico. No entanto, nem sempre isso é desejado.

Clique no ícone **Vincular o eixo X do gráfico a outros (com as mesmas unidades) na janela** em cada gráfico a ser vinculado. Se a tecla **Ctrl** for pressionada enquanto se clica no ícone, todos os gráficos atuais com as mesmas unidades do eixo X e na mesma janela do gráfico ativo serão vinculados. Por exemplo, se houver três espectros visíveis e **Ctrl** + o ícone **Vincular o eixo X do gráfico a outros (com as mesmas unidades) na janela** forem clicados sobre um deles, todos os três espectros serão vinculados uns aos outros.

Nota: Nesse exemplo, se um novo espectro for gerado posteriormente, ele não é vinculado aos outros. Para vincular o novo espectro, clique no ícone **Vincular o eixo X do gráfico a outros (com as mesmas unidades) na janela**.

Por padrão, somente o eixo x dos gráficos são vinculados. Nesse caso, quando um gráfico for ampliado manualmente, os outros automaticamente serão ajustados no eixo y para que os picos dentro da visualização preencham o espaço disponível.

Para desvincular um gráfico vinculado, clique no ícone **Vincular o eixo X do gráfico a outros (com as mesmas unidades) na janela** no gráfico desejado. Pressionar a tecla **Ctrl** enquanto faz isso desvinculará todos os gráficos com as mesmas unidades do eixo x na mesma janela.

Alterar os dados para usar no próximo experimento

Se os dados ativos para o gráfico estiverem associados a um experimento específico diferente do último, esse ícone substituirá os dados por dados do mesmo tipo, mas para o próximo experimento.

Por exemplo, se o TIC para o experimento 2 estiver ativo, clique nesse ícone para alternar para o TIC do experimento 3. Se um espectro de um determinado tempo estiver ativo para o experimento 2, clique nesse ícone para alternar para um espectro do mesmo tempo para o experimento 3.

Alterar os dados para usar no experimento anterior

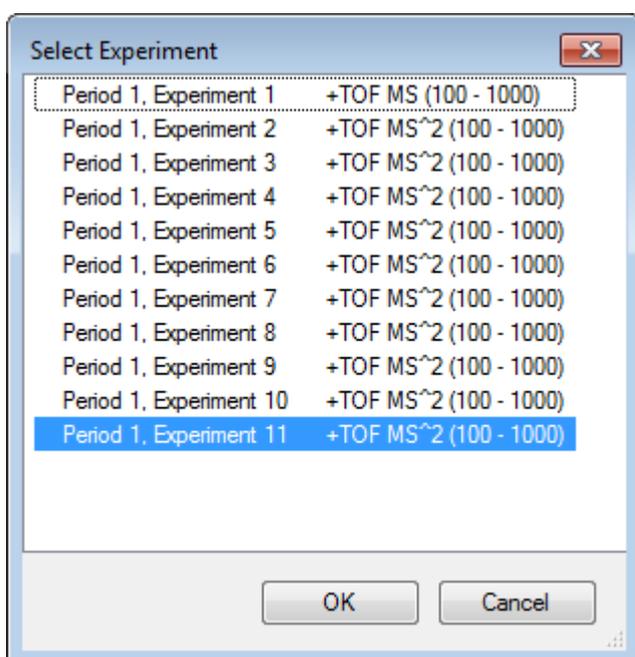
Se os dados ativos para o gráfico estiverem associados a um experimento específico diferente do primeiro, esse ícone substituirá os dados por dados do mesmo tipo, mas para o experimento anterior.

Por exemplo, se o TIC para o experimento 3 estiver ativo, clique nesse ícone para alternar para o TIC do experimento 2. Se um espectro de um determinado tempo estiver ativo para o experimento 3, clique nesse ícone para alternar para um espectro do mesmo tempo para o experimento 2.

Alterar os dados para usar um experimento selecionado

Use este ícone para selecionar um experimento específico em vez de passar por todos individualmente. Clique no ícone para abrir uma caixa de diálogo que lista todos os experimentos disponíveis. A amostra ativa é destacada. Clique em um experimento na lista para selecioná-lo e depois clique em **OK**. Consulte a [Figura 1-10](#).

Figura 1-10 Caixa de diálogo Select Experiment



Exibir um espectro para seleção

Use esse ícone para gerar um espectro de massas médio sobre o intervalo de tempo da seleção atual no gráfico. O mesmo resultado pode ser alcançado clicando duas vezes dentro da seleção.

Configurar o intervalo de subtração do ruído de fundo

Use esse ícone para executar a subtração automática do ruído de fundo para espectros gerados a partir do cromatograma.

Barra de ferramentas específicas do espectro



Tabela 1-4 Ícones da barra de ferramentas específicas do espectro

Ícone	Nome (dica de ferramenta)
	Exibir um XIC para a seleção

Nota: Os primeiros onze ícones nessa barra de ferramentas, começando com o ícone Retornar o gráfico com zoom para a visualização inicial, estão descritos em [Barra de ferramentas específicas do gráfico](#).

Nota: Os últimos seis ícones nessa barra de ferramentas, começando com o ícone Excluir esse painel, estão descritos em [Barra de ferramentas genéricas do painel](#).

Exibir um XIC para seleção

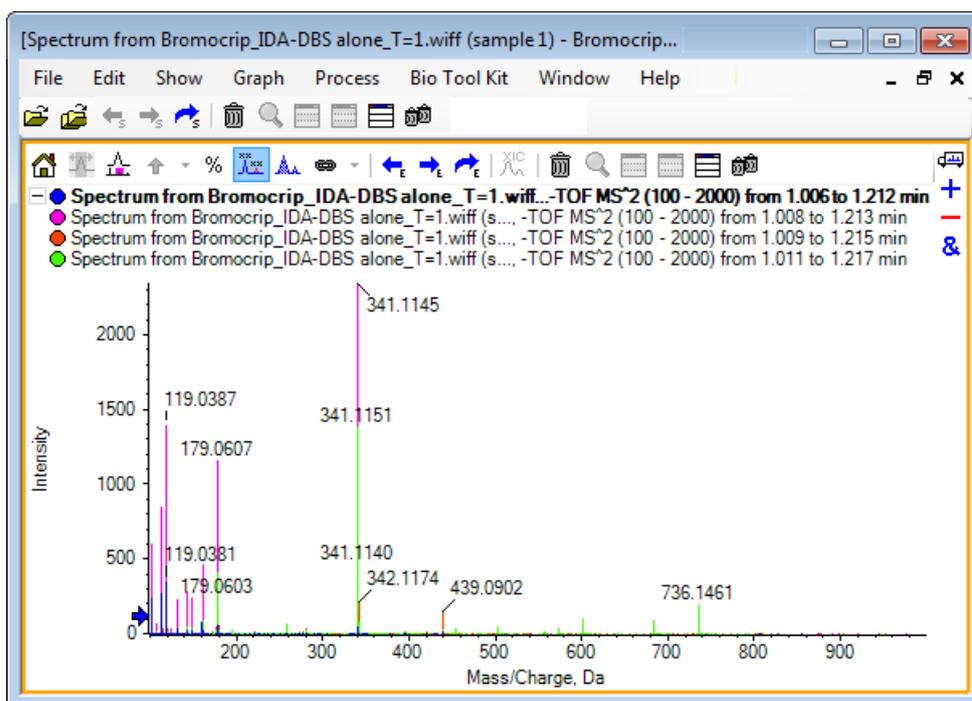
Use esse ícone para gerar um cromatograma de íon extraído (XIC) somada ao longo da faixa de massas da seleção atual no gráfico.

Sobreposições

Os gráficos podem conter diferentes traços sobrepostos que compartilham os mesmos eixos para que possam ser facilmente comparados. Eles podem ser gerados arrastando o ícone de dois painéis (o ícone **Arrastar para outro gráfico para sobrepor os dados ativos no gráfico de destino** e são produzidos automaticamente por alguns comandos de criação de painel. Consulte a [Cromatogramas e espectros](#).

Na [Figura 1-11](#), o gráfico contém quatro espectros com o ícone **Rotular todos os traços sobrepostos** selecionado. A região do cabeçalho do gráfico mostra os títulos para os quatro espectros e círculos coloridos indicando a cor do traço. O traço ativo é mostrado em negrito. O traço em negrito será a base para qualquer operação de processamento, como limite da linha de base, alisamento do espectro, entre outros, e normalmente será o único a ser rotulado. Clicar no ícone à esquerda do título fará com que somente o título do traço ativo seja mostrado. Este recurso é útil quando existem muitas sobreposições. Clique no ícone novamente para reverter o processo. Se existem vários traços e o cursor for movido sobre os títulos, o cursor mudará para uma seta de duas pontas e agirá como uma barra de rolagem quando arrastado para que todos os títulos possam ser acessados.

Figura 1-11 Gráfico contendo quatro espectros com o ícone Rotular todos os traços sobrepostos selecionado



Existem várias formas de alternar o traço ativo:

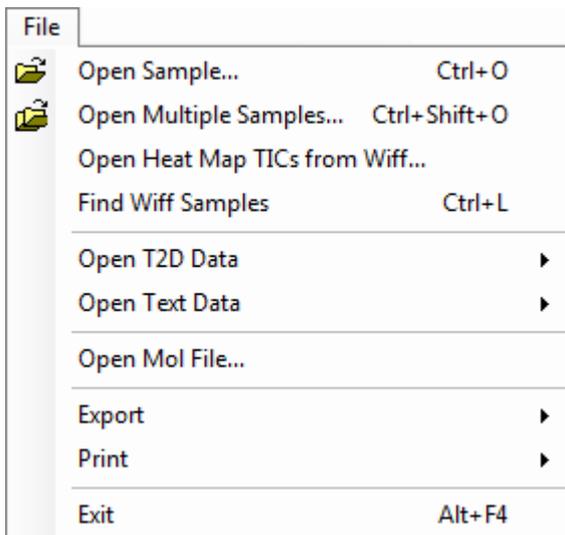
- Clique no círculo colorido ao lado do título
- Clique no próprio título
- Clique em um ponto de dados no traço (não no próprio traço)

Clicar com o botão direito em um gráfico com sobreposições mostrará um menu contendo comandos que podem ser usados para editar visualmente os traços mostrados. As opções **Remove Active Trace** e **Remove All Traces Except Active** serão mostradas.

Abrir arquivos

Conforme mostrado na [Figura 1-12](#), o software pode abrir diferentes tipos de arquivos de dados e possui comandos para abrir uma ou várias amostras.

Figura 1-12 Menu de arquivos

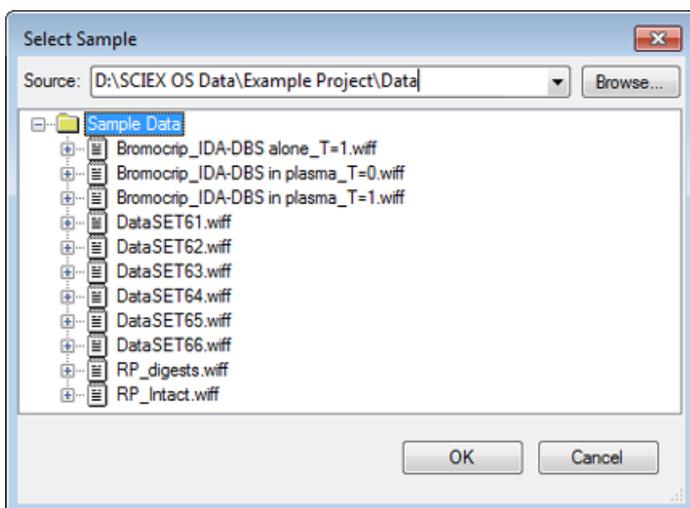


Abrir arquivo de amostra única

A opção **Open Sample** abre a caixa de diálogo **Select Sample**. Consulte a [Figura 1-13](#).

Essa caixa de diálogo permite que um único arquivo seja selecionado. A visualização resultante depende do comando selecionado, com um único arquivo .scan mostrando um espectro ou um Cromatograma de íons totais (TIC), e arquivos de várias varreduras .wiff mostrando o TIC (a soma de todos os experimentos se houver mais de um).

Figura 1-13 Caixa de diálogo Select Sample



Clique no ícone à esquerda do arquivo .wiff para mostrar todas as amostras dentro do arquivo e depois selecione o nome do arquivo desejado. Se houver apenas uma amostra dentro do arquivo, selecione o nome do arquivo e clique em **OK**.

Abrir arquivos de várias amostras

As opções **Open Multiple Samples** e **Open Heat Map TICs from Wiff** abrem a caixa de diálogo **Select Samples**. Consulte a [Figura 1-14](#).

O painel esquerdo corresponde à caixa de diálogo **Open** que permite que as pastas sejam navegadas e os arquivos sejam especificados, e o painel direito indica os arquivos que serão abertos quando **OK** for clicado. As amostras podem ser transferidas da esquerda para a direita, como a seguir:

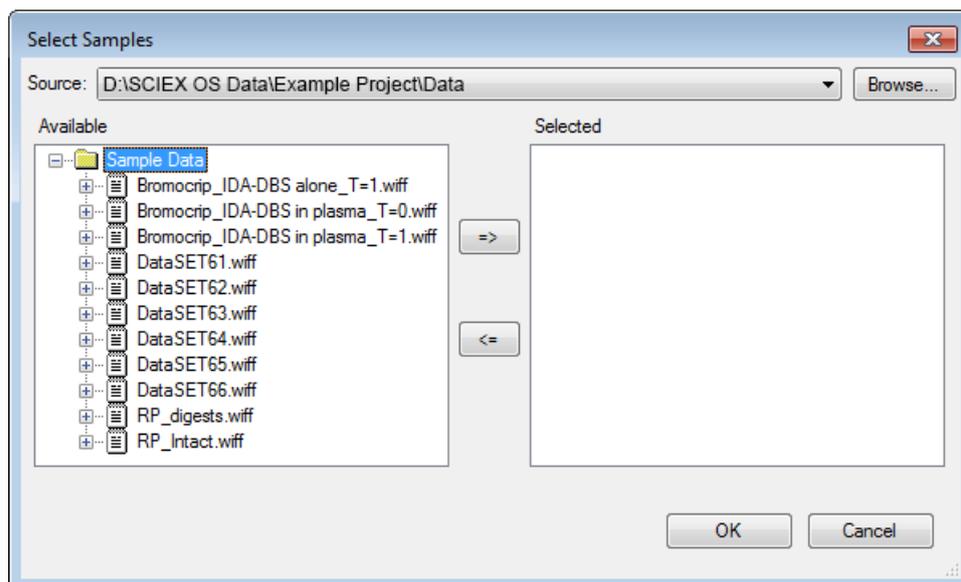
- Expanda o arquivo wiff, selecione a amostra e clique na seta apontando para a direita.
- Expanda o arquivo wiff, selecione a amostra e depois arraste-a para o painel direito.
- Expanda o arquivo wiff e depois dê dois cliques na amostra.

Se o arquivo contiver várias amostras, todas elas poderão ser transferidas selecionando o arquivo wiff e clicando na seta apontando para a direita ou selecionando o arquivo .wiff e arrastando-o para o painel direito.

As amostras podem ser transferidas da direita para a esquerda, como a seguir:

- Expanda o arquivo wiff, selecione a amostra e depois clique na seta apontando para a esquerda.
- Expanda o arquivo wiff, selecione a amostra e depois arraste-a para o painel esquerdo.
- Clique duas vezes na amostra.

Figura 1-14 Caixa de diálogo Select Samples



Cromatogramas e espectros

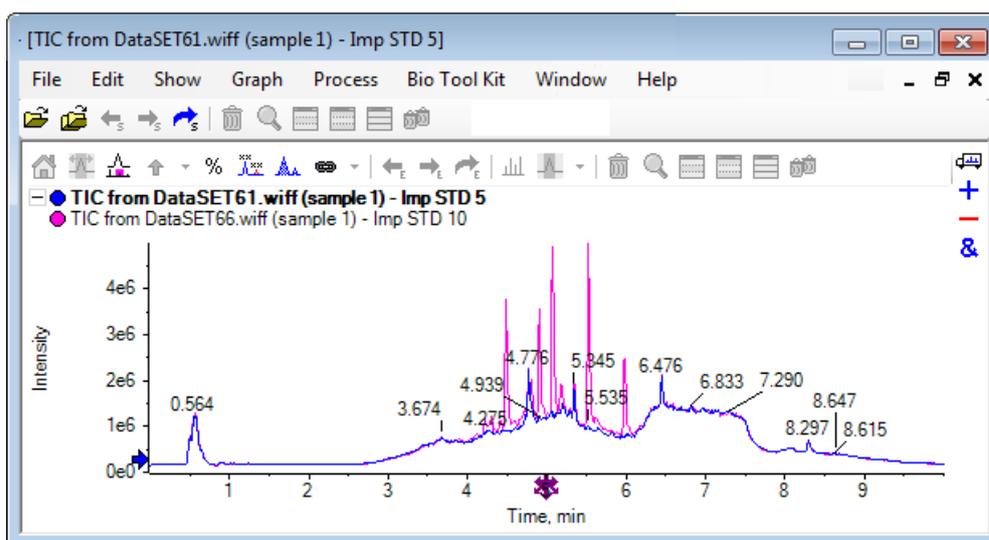
O Cromatograma de íons totais (TIC), espectros e o Cromatograma de íon extraído (XIC) são as visualizações de dados mais utilizadas ao explorar e revisar dados. O software fornece vínculos entre essas visualizações de dados para que os usuários possam gerar espectros rapidamente e depois XICs, para determinar se os picos nos espectros são de um ou mais picos cromatográficos.

Cromatograma de íons totais (TIC)

Essa é a visualização padrão mostrada quando um arquivo wiff de uma varredura ou várias varreduras é aberto. O TIC mostrado corresponde a um cromatograma gerado pela soma das intensidades de todos os íons em cada espectro e depois demonstrando em gráfico a soma como uma função do tempo de retenção.

Se a amostra foi adquirida usando experimentos em loop, então, o TIC mostrado corresponderá às somas de intensidades de ambos os experimentos e uma seta especial indicadora aparecerá no eixo X. Consulte a [Figura 1-15](#). Se clicar duas vezes no indicador, será mostrado um novo painel, mostrando TICs individuais sobrepostos para cada experimento.

Figura 1-15 TIC



Se a amostra contiver dados IDA, selecione a opção IDA Explorer, que é uma forma gráfica de mostrar a massa e os tempos de retenção dos íons precursores selecionados, ou opte por selecionar um TIC convencional. Se a opção de TIC estiver selecionada, então os TICs separados serão mostrados para a pesquisa e para a soma dependente de IDA.

Veja o TIC a qualquer momento clicando em **Show > Total Ion Chromatogram (TIC)** para abrir uma caixa de diálogo que permite a seleção de qualquer experimento. Caso selecione o Período 1 mostrará o TIC para todos os experimentos, enquanto as outras entradas corresponderam aos TICs individuais. Use **Shift+** ou **Ctrl+** para selecionar mais de um experimento.

Espectros

Se um arquivo contiver um único espectro, ele será mostrado quando for aberto.

Para dados com muitas varreduras, ao clicar duas vezes no cromatograma, ou no ícone **Exibir um espectro para seleção** aparecerá o espectro derivado ao tempo de retenção selecionado. Arraste o retângulo de seleção no cromatograma para atualizar o espectro e mostrar uma região.

Selecione várias regiões pressionando a tecla **Shift** depois de concluir a primeira seleção. Clique duas vezes em qualquer uma dessas seleções ou clique no ícone **Exibir um espectro para seleção** para gerar um novo painel de espectro com os espectros sobrepostos.

Para IDA, é aberta uma solicitação para sobrepor todos os espectros dependentes ou somente mostrar o primeiro espectro. No último caso, use as setas de direita e esquerda do teclado para mostrar os outros espectros.

Nota: Essa caixa de diálogo possui uma caixa de marcação **Only show again if the shift key is down**.

Gere espectros com ruídos de fundo subtraídos de duas formas:

- Gere espectros separados para as regiões de pico e linha de base e depois arraste o ícone de dois painéis de subtração do espectro de ruído de fundo para o espectro do pico.
- Defina uma região de ruído de fundo fazendo uma ou duas seleções no cromatograma e depois clicando no ícone **Configurar faixa de subtração do ruído de fundo**. Qualquer espectro gerado quando uma região de ruído é definida é subtraído automaticamente. A região de ruído de fundo é mostrada no cromatograma como um retângulo de seleção de cor vermelho claro e tanto ela, quanto as seleções do espectro, podem ser movidas para alterar os dados mostrados. Quando uma região de ruído de ruído é definida, ela pode ser removida clicando na seta próxima ao ícone e depois selecionando **Clear Subtraction Range**.

Nota: As setas de marcação são úteis no espectro, porque os rótulos do pico podem ser relativos ao pico mais próximo marcado com uma seta, que fornece uma maneira rápida de determinar as perdas de massa ou adutos. Se houverem várias sobreposições e o ícone Rotular todos os traços sobrepostos for selecionado, então, cada sobreposição será rotulada com relação à seta.

Cromatograma de Íon Extraído (XIC)

Os XICs podem ser gerados de duas formas:

- Clicando em **Show > Extracted Ion Chromatogram (XIC)**.
Essa ação abre uma caixa de diálogo em que as massas de início e fim ou valores de centro e largura podem ser digitados, dependendo do modo. Isso pode ser alterado no menu, aberto ao clicar com o botão direito dentro da caixa de diálogo. O menu também fornece acesso a outros comandos úteis, como a configuração de uma largura padrão e importação ou exportação da lista de massas. Os usuários também também podem definir valores de massa, para que sejam usados automaticamente até serem removidos.
- Fazendo uma ou mais seleções em um espectro e depois clicar duas vezes em um deles ou clicando no ícone **Exibir um XIC para seleção**.
Essas ações geram um XIC correspondente a cada seleção. Por padrão, o programa determina o maior pico em cada faixa de seleção e configura automaticamente o XIC à partir dos valores de massa mínimo e máximo, obtidos a meia altura do pico.. Se a tecla **Ctrl** estiver pressionada, a largura da seleção inteira será usada.

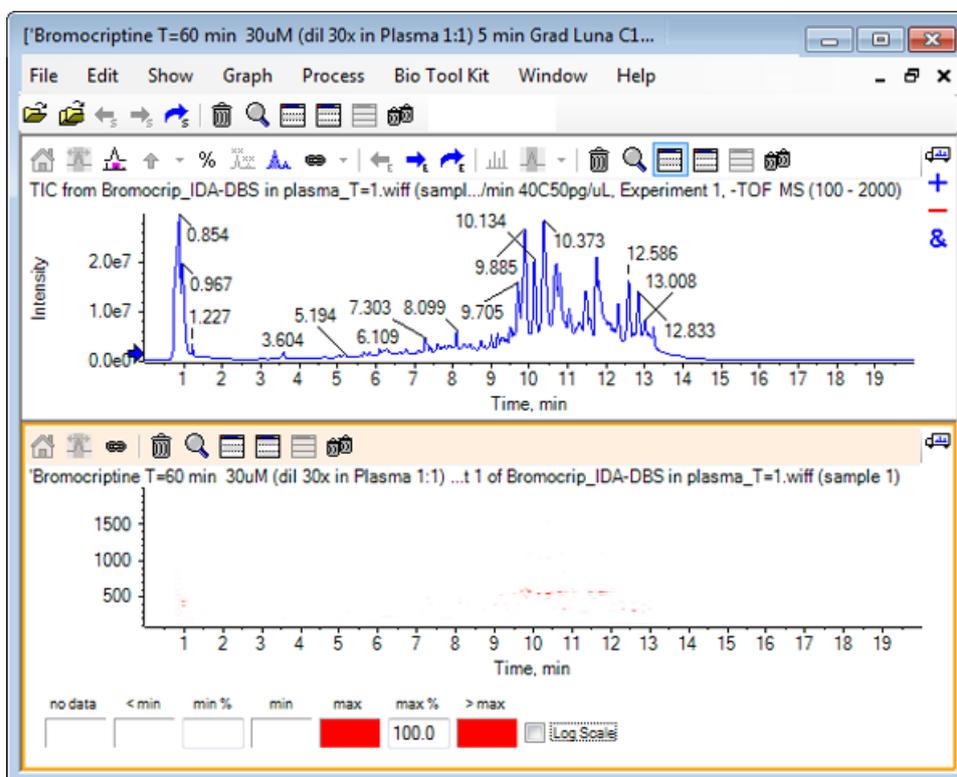
Em ambos os casos, é mostrado um gráfico contendo uma sobreposição para cada seleção. As seleções tornam-se. Arrastar os vínculos atualiza os XICs.

Nota: Os XICs normalmente são calculados e mostrados para toda a faixa cromatográfica, que pode ficar lenta, especialmente se houver várias seleções e os dados forem de um instrumento de alta resolução e contiver muitas varreduras. Um recurso útil é limitar as faixas de XIC para uma janela menor ao redor do tempo de retenção do espectro usado para gerá-las. Isso pode ser configurado na aba do XIC da caixa de diálogo mostrada depois de clicar em **Edit > Options > XIC**.

Gráficos de contorno e mapas de calor

Um gráfico de contorno LC/MS (**Show > LC/MS Contour Pane**) mostra todos os dados de uma amostra LC/MS em um único painel. O exemplo na [Figura 1-16](#) mostra um TIC e o mapa de contorno correspondente, que mostra os dados como um mapa da m/z versus o tempo de retenção com a intensidade codificada por cor. Nesse caso, os controles de cor também são mostrados, mas eles podem ser escondidos clicando com o botão direito na visualização e desmarcando a opção **Show Appearance Controls**. Como os gráficos de contorno e cromatogramas possuem o mesmo eixo x, eles podem ser vinculados juntos para que o zoom e a rolagem afetem as duas visualizações de forma semelhante, para fins comparativos.

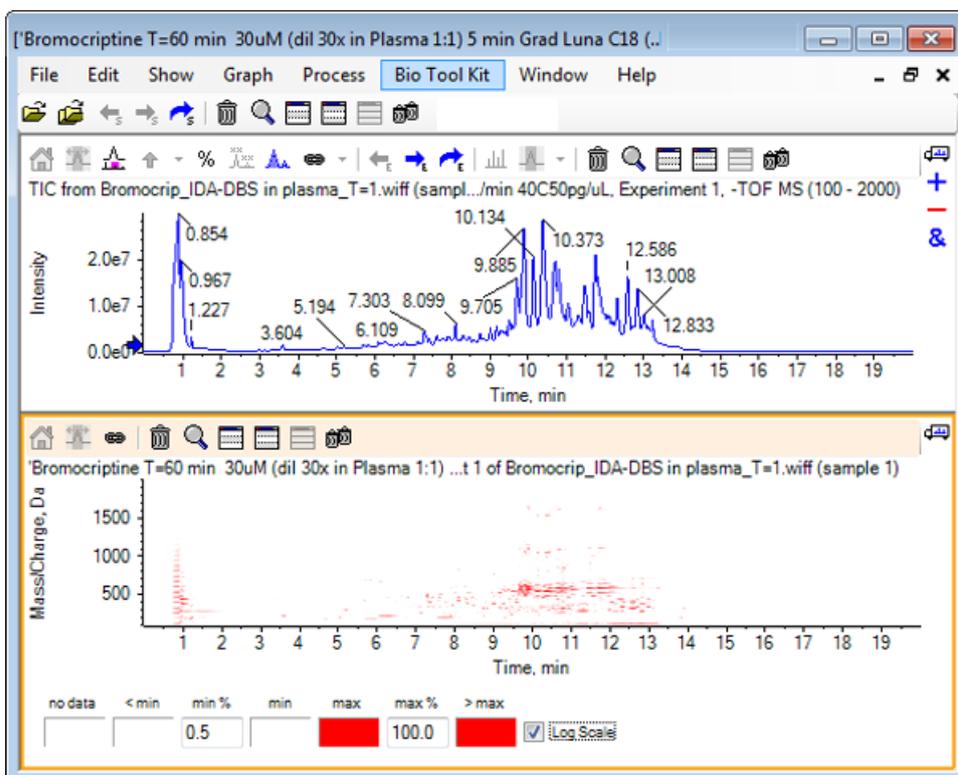
Figura 1-16 TIC e mapa de contorno correspondente



O controle de cor usa uma paleta de 256 cores para mostrar intensidades na faixa definida por % **mín.** e % **máx.** As intensidades abaixo da % **mín.** são representadas usando < **mín.** e as intensidades acima da % **máx.** são representadas usando > **máx.** Se as cores usadas para < **mín.** e nenhum dado forem as mesmas (como aqui), então qualquer ponto de dados abaixo da % **mín.** desaparecem. Essa é uma forma de limite visual que pode simplificar o gráfico, conforme mostrado na [Figura 1-17](#), em que o valor de % **mín.** foi

aumentado em 0,5%. Para mais informações sobre os controles de cor, consulte o *Guia do usuário do sistema*.

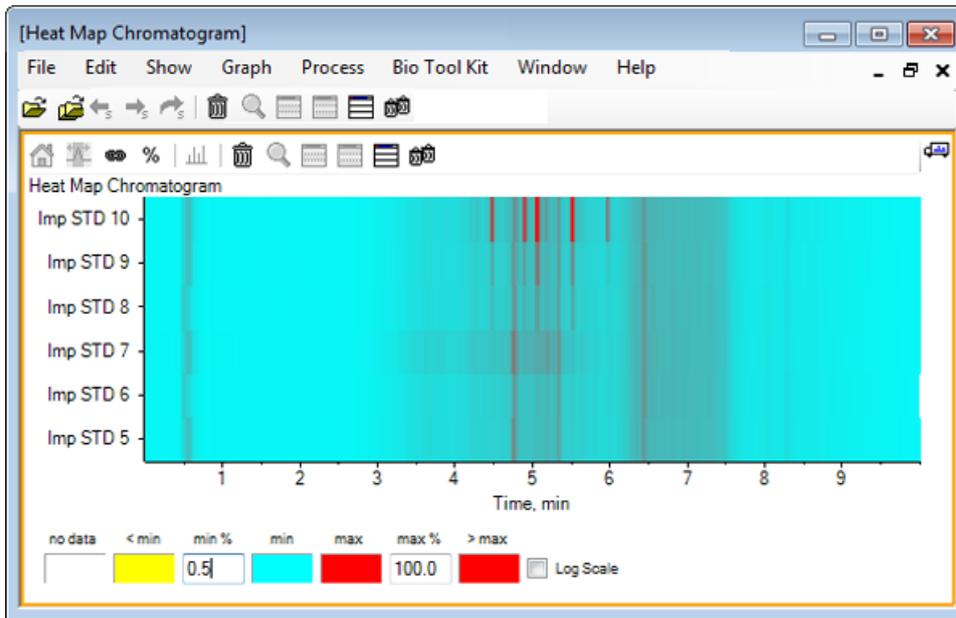
Figura 1-17 Mapa de contorno com valor da % mín. aumentado em 0,5%



Picos de baixa intensidade pode ser evidenciados ao reduzir a % **máx.** para que a paleta de cores abranja uma menor faixa de intensidade, mas todos os picos maiores que esse valor possuem a mesma cor. Isso também pode ser enfatizado selecionando a opção **Log Scale**. Ativar a **Log Scale** requer um valor diferente de zero da % **mín.** (por exemplo, 1 ou 0,1) e, então, mapeia as cores para o logaritmo da intensidade percentual.

As ferramentas de visualização de várias amostras no software incluem a capacidade de mostrar TICs, XICs e espectros de várias amostras como séries de mapas de calor individuais, que podem ajudar na comparação delas. A [Figura 1-18](#) é para uma série de cromatogramas TOF de seis analitos. Consulte a [Trabalhar com várias amostras](#).

Figura 1-18 Cromatograma de mapa de calor



Trabalhar com cromatogramas e espectros

2

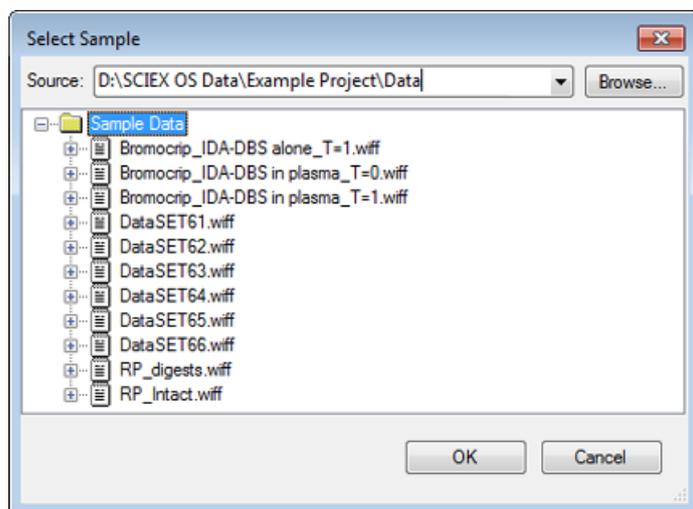
Essa seção descreve algumas das opções de processamento mais comuns. O arquivo usado é um arquivo IDA com vários experimentos em loop, mas nesse exemplo, é usado o primeiro experimento da análise, simulando uma análise simples de LC/MS. Na seção seguinte, a funcionalidade do IDA é explorada.

Abrir um arquivo de dados

1. Clique no ícone **Abrir amostra** na barra de ferramentas principal.

A caixa de diálogo **Select Sample** se abre.

Figura 2-1 Caixa de diálogo **Select Sample**



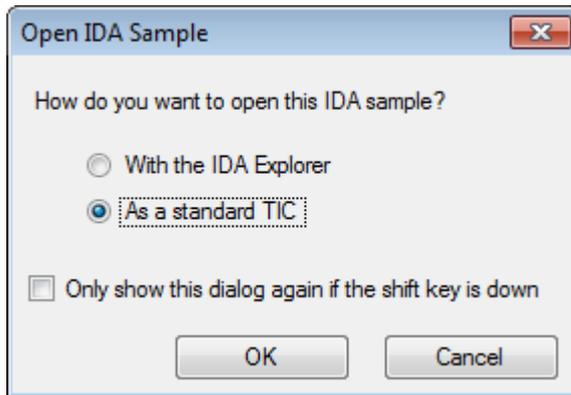
2. Se a pasta **Sample Data** não estiver selecionada, clique em **Browse** e navegue até a pasta **Sample Data**. Para mais informações sobre os locais de arquivos de dados instalados, consulte [Instituição](#).
3. Para mostrar todas as amostras no arquivo, clique no ícone à esquerda do arquivo **Bromocrip_IDA-DBS alone_T=1.wiff**.

Há apenas uma amostra no arquivo **Bromocrip_IDA-DBS alone_T=1.wiff**.

4. Selecione o nome da amostra e depois clique em **OK**.

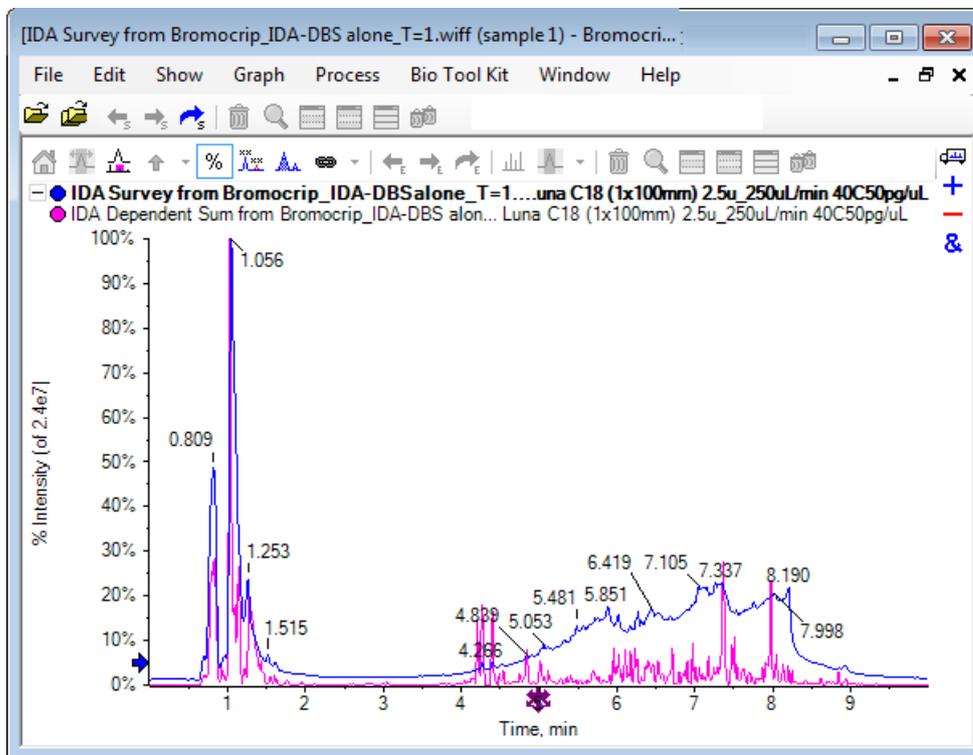
Como esse é um arquivo IDA, o software solicita que você especifique como abrir a amostra selecionada.

Figura 2-2 Abrir amostra IDA



5. Clique em **As a standard TIC**, se ainda não estiver selecionado, depois clique em **OK** para gerar o TIC mostrado na [Figura 2-3](#).

Figura 2-3 TIC



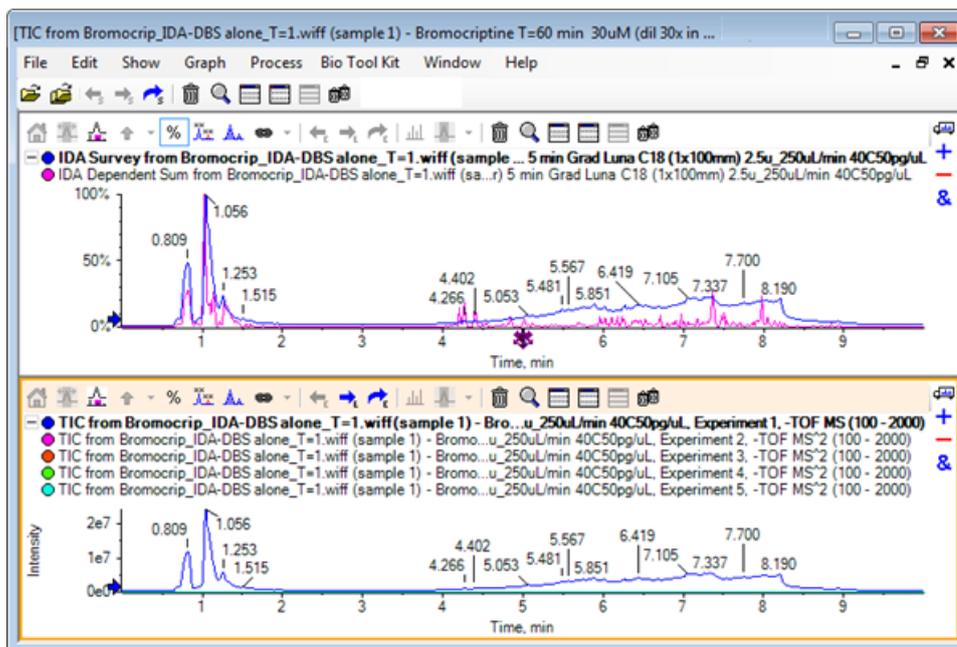
O painel possui uma sobreposição para o TIC de varredura da análise (azul) e outra para as varreduras dependentes da soma (ion produto). Nesse caso, nós queremos processar os dados da análise para mostrar apenas o TIC de análise.

Mostrar o TIC para um experimento

1. Clique duas vezes no ícone **Clicar duas vezes para sobrepor TICs individuais para todos os experimentos** no centro do eixo x para gerar TICs sobrepostos para todos os experimentos.

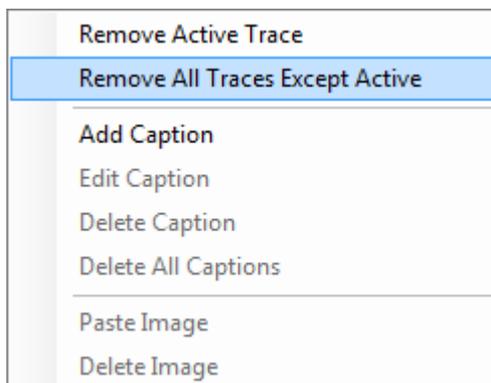
O novo cromatograma é o painel ativo. Além disso, como a análise é o primeiro experimento, ela é o traço ativo conforme indicado pelo título em negrito no cabeçalho.

Figura 2-4 TICs sobrepostos



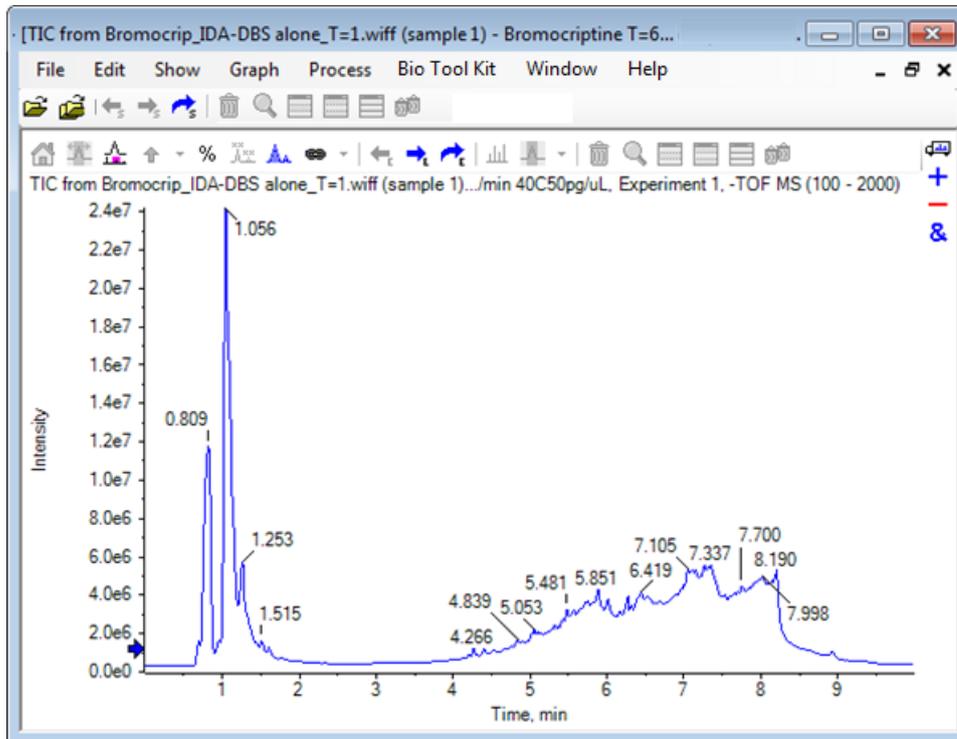
2. Clique com o botão direito dentro do painel do cromatograma ativo e depois clique em **Remove All Traces Except Active** para que somente o TIC da análise permaneça.

Figura 2-5 Menu ativo com o botão direito



3. No mesmo painel, clique no ícone **Apagar todos os outros painéis** para deixar apenas o TIC da análise.

Figura 2-6 TIC de análise



Mostrar um XIC para uma fórmula molecular conhecida

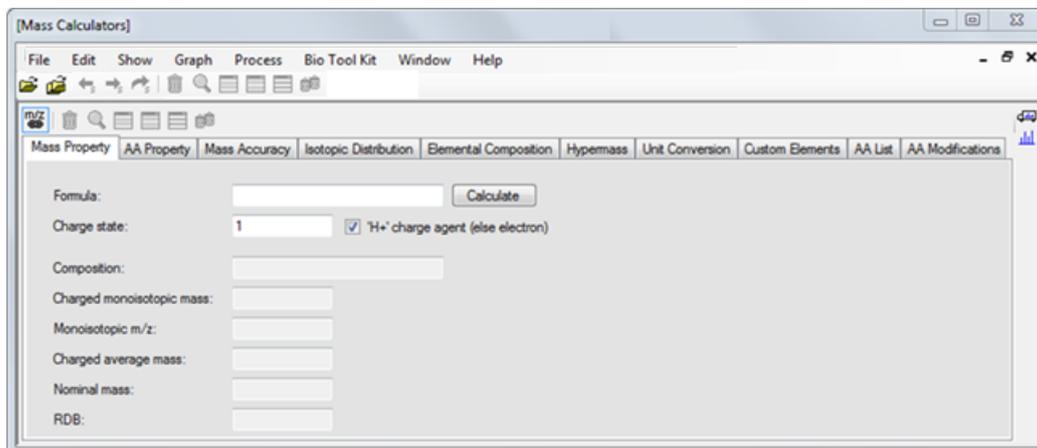
Embora alguns picos aparentemente pequenos sejam óbvios no intervalo de 4 min a 7 min, é possível que muitos estejam escondidos pelo ruído de fundo, que é moderadamente intenso nesses dados. Como essa amostra corresponde a uma incubação microssômica de bromocriptina, use a faixa de m/z do íon molecular esperado como um guia inicial para a localização do pico. A fórmula molecular da bromocriptina é $C_{32}H_{40}N_5O_5Br$ e, como esses dados estão em modo negativo, nós esperamos ver um íon $(M - H)^-$.

1. Clique em **Show > Mass Calculators**.
2. Clique na aba **Mass Property** no painel **Mass Calculators**.
3. Digite a fórmula molecular no campo **Formula**.
4. Digite **-1** no campo **Charge state**.
5. Selecione o **'H+' charge agent (else electron)**.
6. Clique em **Calculate**.

Nota: Também é possível remover manualmente um hidrogênio da fórmula molecular e não selecionar a opção 'H+' charge agent (else electron).

A caixa de diálogo é atualizada para mostrar vários valores de massa: monoisotópico, médio e assim por diante.

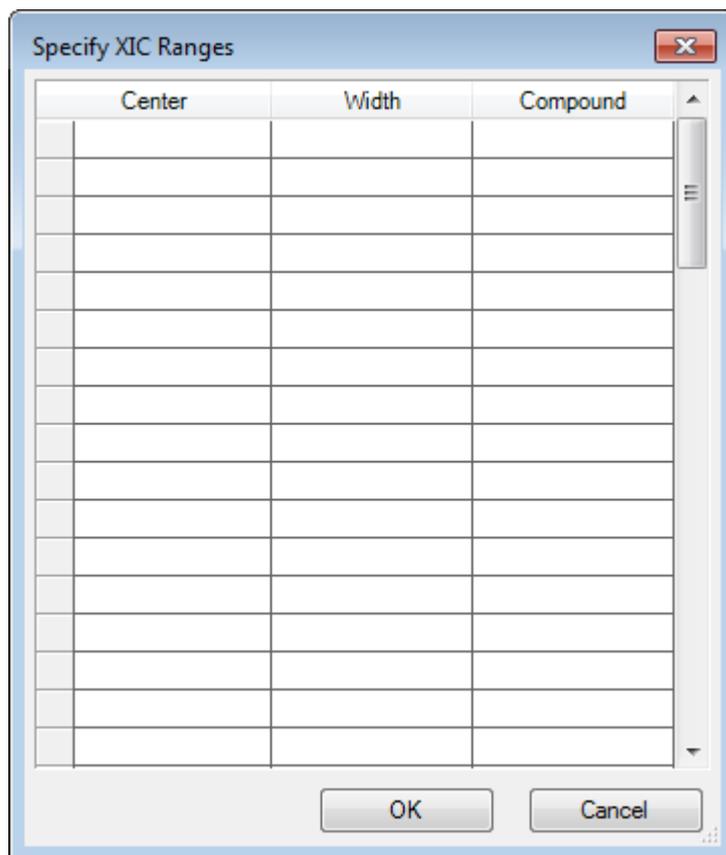
Figura 2-7 Painel Mass Calculators



Nota: Com esses valores de massa, os isótopos são resolvidos com facilidade. Portanto, o valor m/z Monoisotópica é o mais apropriado.

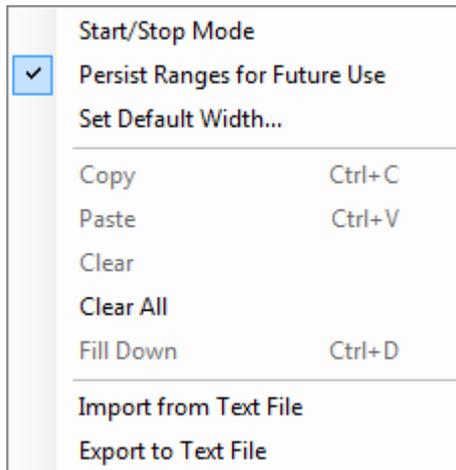
7. Selecione o valor **Monoisotopic m/z** e pressione **Ctrl+C** para copiar o valor para a área de transferência.
8. Clique no ícone **Excluir esse painel** para excluir o painel **Mass Calculators** ou clique no ícone **Ocultar esse painel** para ocultar o painel.
9. Clique em **Show > Extracted Ion Chromatogram (XIC)** para abrir a caixa de diálogo **Specify XIC Ranges**.

Figura 2-8 Caixa de diálogo Specify XIC Ranges



10. Clique com o botão direito na caixa de diálogo **Specify XIC Ranges** para abrir o menu.
11. No menu, faça o seguinte:
 - a. Garanta que a opção **Start/Stop Mode** não esteja selecionada, para que os valores de XIC sejam inseridos como um valor central e uma largura.
 - b. Clique em **Set Default Width**, digite **0,05** e depois clique em **OK**.
 - c. Clique em **Persist Ranges for Future Use** para que os valores sejam lembrados da próxima vez que a caixa de diálogo for usada.

Figura 2-9 Menu de contexto



12. Retorne à caixa de diálogo **Specify XIC Ranges**.

A caixa de diálogo agora é configurada, para que somente uma massa seja digitada para cada XIC de interesse e uma largura padrão seja usada.

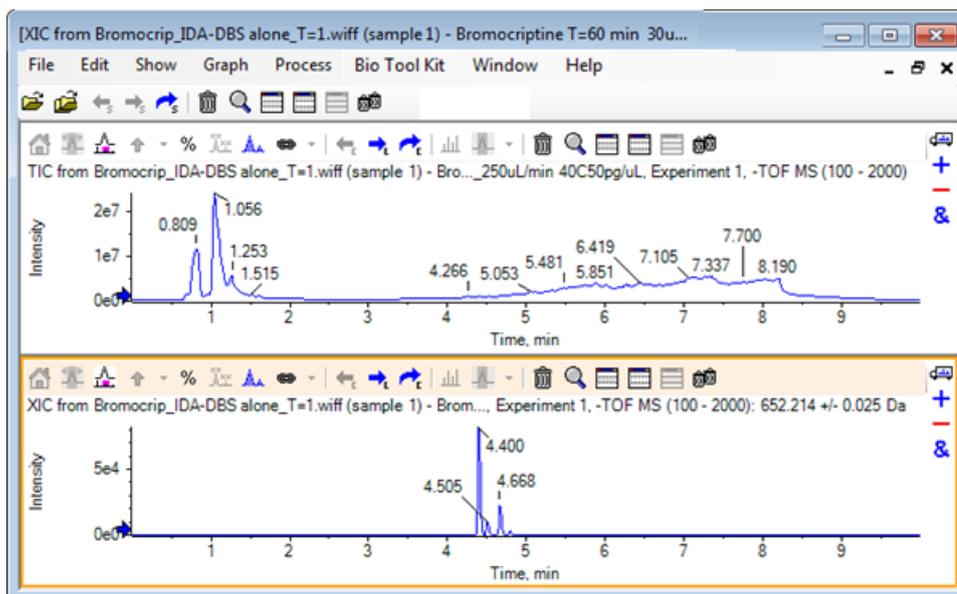
13. Selecione a primeira célula sob **Center** e depois pressione **Ctrl+V** para colar o valor de massa da etapa 7.

14. Clique em **OK**.

Nota: Como uma largura padrão foi configurada, não é necessário digitar um valor individual.

O painel agora contém o TIC e o XIC para íon molecular esperado de bromocriptina.

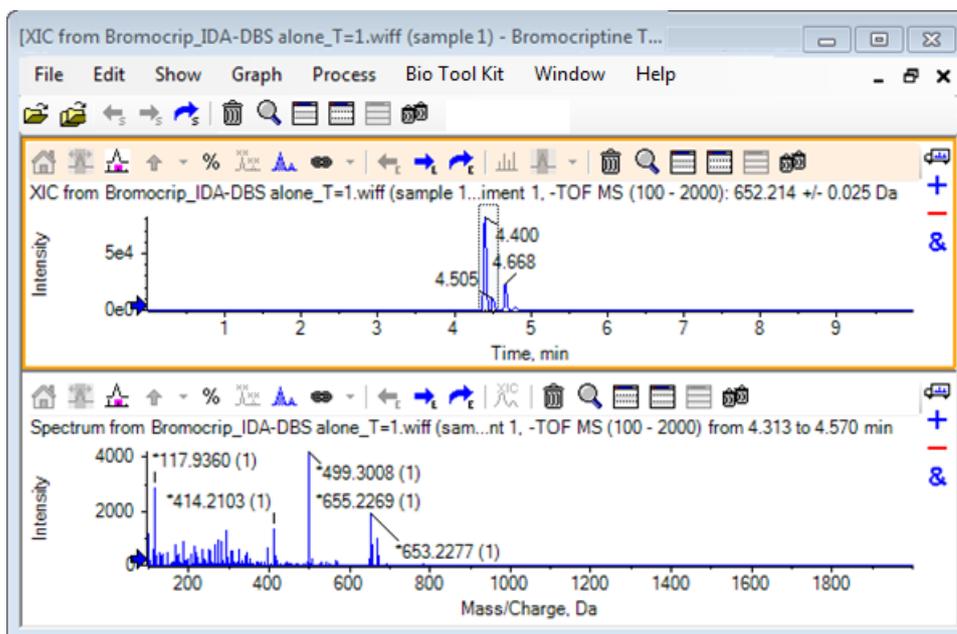
Figura 2-10 TIC e XIC para o íon molecular esperado de bromocriptina



Gerar e interagir com um espectro

1. Oculte o painel do TIC, faça uma seleção ao redor do maior pico no XIC, e depois clique no ícone **Exibir um espectro para seleção** para gerar o espectro médio para essa região.

Figura 2-11 Espectro para o maior pico no XIC



Nota: Na Figura 2-11, o campo **Label** na aba **Peak Labeling & Finding** da caixa de diálogo **Options** (disponível por meio de **Edit > Options**) é configurado para **Mass (Charge)**.

2. Amplie o eixo X de aproximadamente 630 a 700 Da para aumentar o zoom do espectro nessa região.

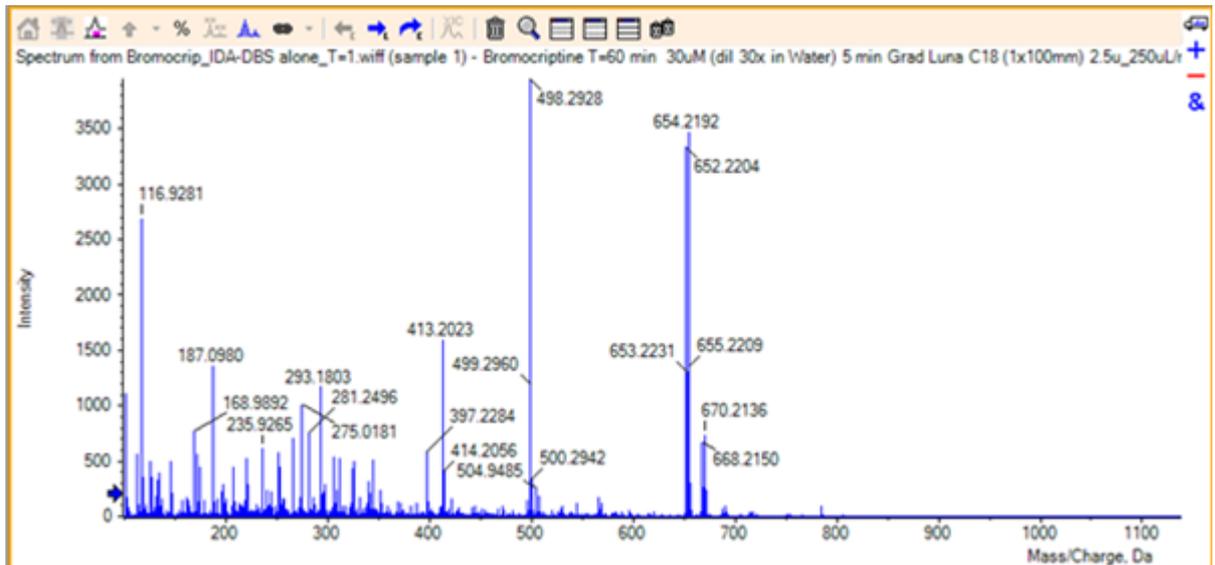
Nota: Isso talvez precise ser feito em duas etapas.

Existe um pico em 652,2199, muito próximo ao valor esperado de 652,2140, que também mostra o padrão isotópico do bromo, mas existe uma segunda agregação de isótopos de bromo começando em 668,2158. Os valores exatos de m/z diferem dependendo da janela do tempo de retenção selecionada no XIC.

Nota: O estilo de rotulagem usado aqui mostra uma faixa de m/z e uma estimativa do estado de carga em colchetes (com base no espaçamento entre os picos). Os picos que parecem ser monoisotópicos também estão marcados com um asterisco. O algoritmo de rotulagem não reconhece os isótopos diferentes de ^{13}C e, então, rotula o isótopo ^{81}Br como tendo carga única, mas o marca incorretamente como monoisotópico.

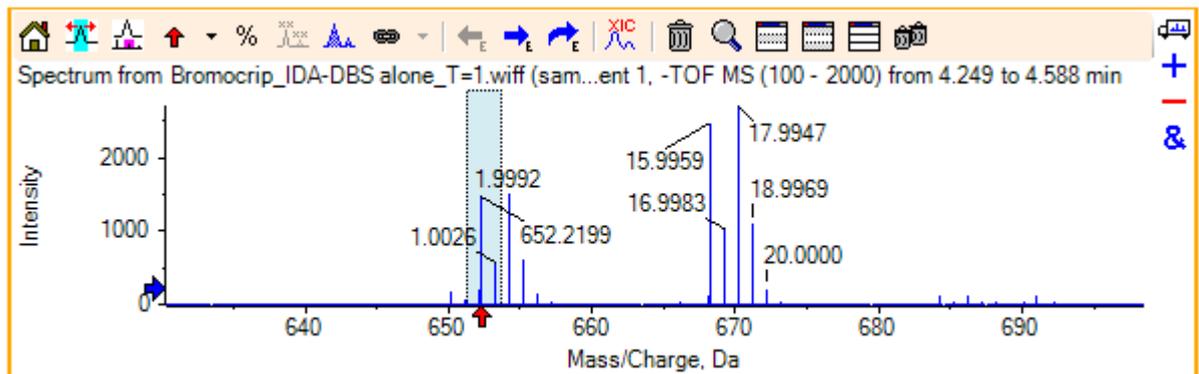
3. Altere o estilo de rotulagem para o estilo padrão, clicando em **Edit > Options**, navegando até a aba **Peak Labeling & Finding**, e depois alterando a configuração para **Mass / Charge** no campo **Label**.
4. Clique em **OK**.

Figura 2-12 Espectro com um estilo de rotulagem diferente



5. No espectro expandido, faça uma seleção ao redor do pico em 652,2199 e depois clique no ícone **Incluir** setas marcadoras para picos selecionados.

Figura 2-13 Espectro mostrado **↑** do pico selecionado



A rotulagem da massa agora é relativa ao pico selecionado, então, as diferenças entre os picos de massa são mostradas. O rótulo para o pico em 668,2158 agora aparece como 15,9959 correspondendo à massa de oxigênio e sugerindo que esse pico é o metabólito hidróxi-bromocriptina.

Dica! As setas podem ser movidas arrastando elas até outro pico e removidas selecionando **Remove All Arrows** da lista adjacente ao ícone da seta.

6. Faça uma seleção ao redor do pico rotulado 15,9959 e clique no ícone **Exibir um XIC para a seleção**.
7. Na caixa de diálogo **XIC Selection Ranges**, clique em **OK**.

Figura 2-14 Caixa de diálogo XIC Selection Ranges

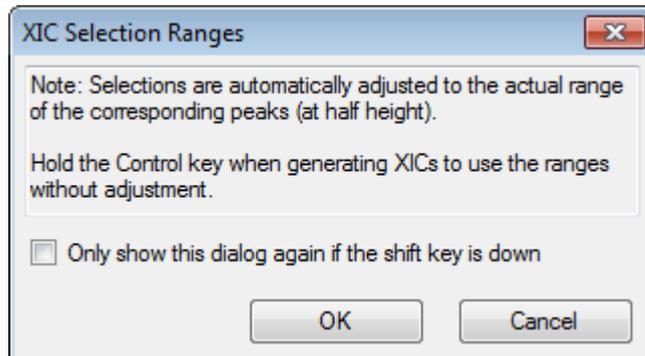
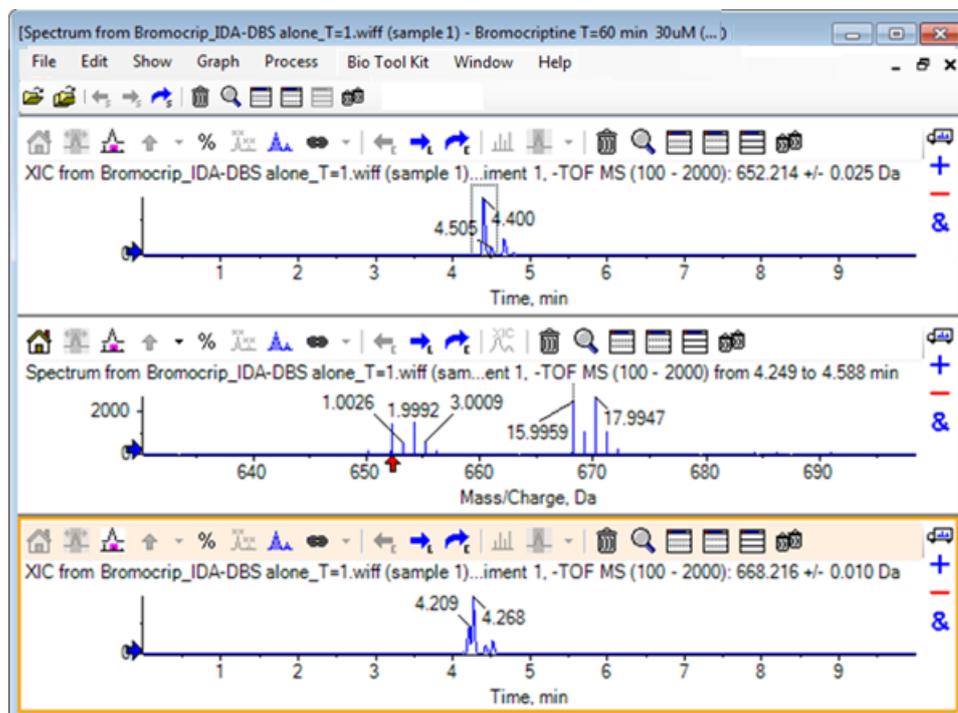


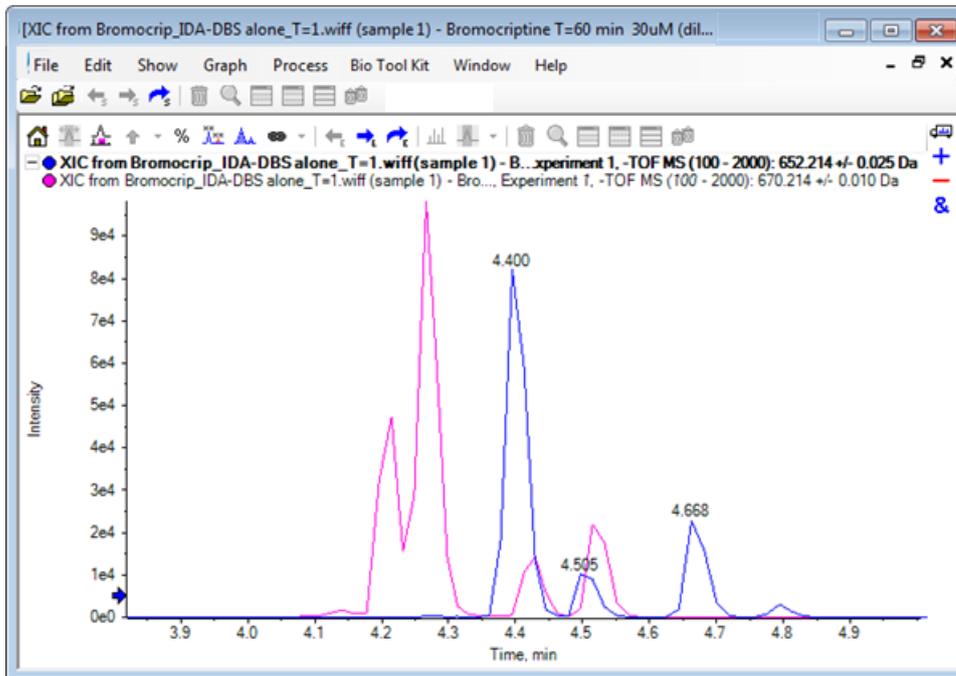
Figura 2-15 XIC



Essa é uma forma muito útil de gerar XICs interativamente. Por padrão, a largura usada para o XIC é a largura da massa do pico à meia altura e um vínculo de seleção é mostrado no espectro.

8. Arraste o vínculo selecionado para atualizar o XIC mostrado e, se desejar incluir mais XICs, basta apenas repetir esta etapa.
9. Clique no ícone **Arrastar para outro gráfico para sobrepor os dados ativos no gráfico de destino** nesse novo cromatograma e depois arraste o cromatograma ao painel de XIC original para que eles sejam sobrepostos.

Figura 2-16 XICs sobrepostos

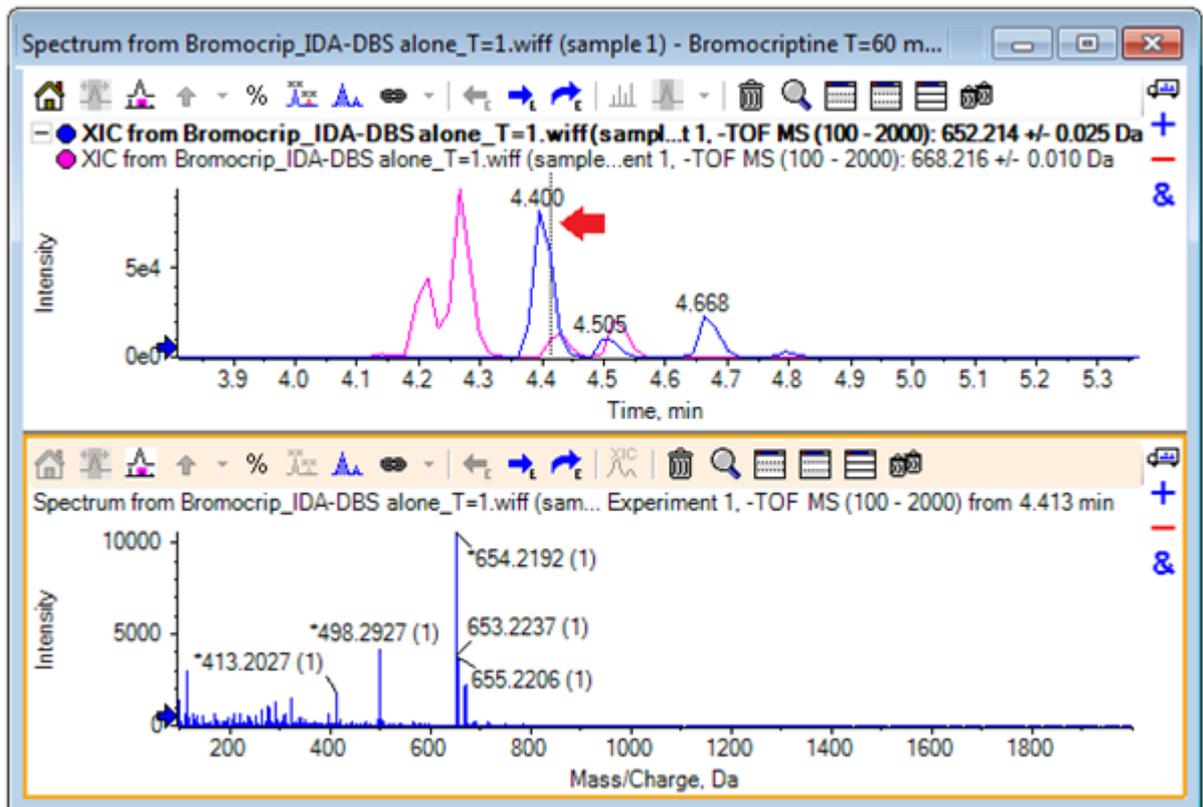


10. Oculte ou exclua o segundo painel do cromatograma e do espectro, e depois amplie os cromatogramas sobrepostos para mostrar a região entre aproximadamente 4 min a 5 min.

Existem dois picos em torno dos 4,4 min., um de cada XIC, que eluem de forma semelhante, mas não exatamente no mesmo tempo de retenção. Também existem vários picos em 668,216 Da no cromatograma, indicando supostamente a presença de outros metabólitos hidroxilados.

11. Clique duas vezes no painel do cromatograma em 4,40 min para gerar o espectro a partir de uma varredura única.

Figura 2-17 Espectro de uma única varredura



Uma linha pontilhada no XIC indica a varredura mostrada (marcada com uma seta na Figura 2-17). Se a linha for arrastada, o espectro será atualizado para que a região próxima de 4,40 min seja explorada. Use as setas para frente e para trás do teclado para movimentar uma varredura por vez. É possível obter um espectro limpo para o pico com m/z de 652,214 ao mover a linha para uma região em que o sinal para o íon 668,215 é zero (mesmo que aqui o ruído de fundo seja bem alto), mas um espectro limpo para o último não pode ser obtido dessa forma.

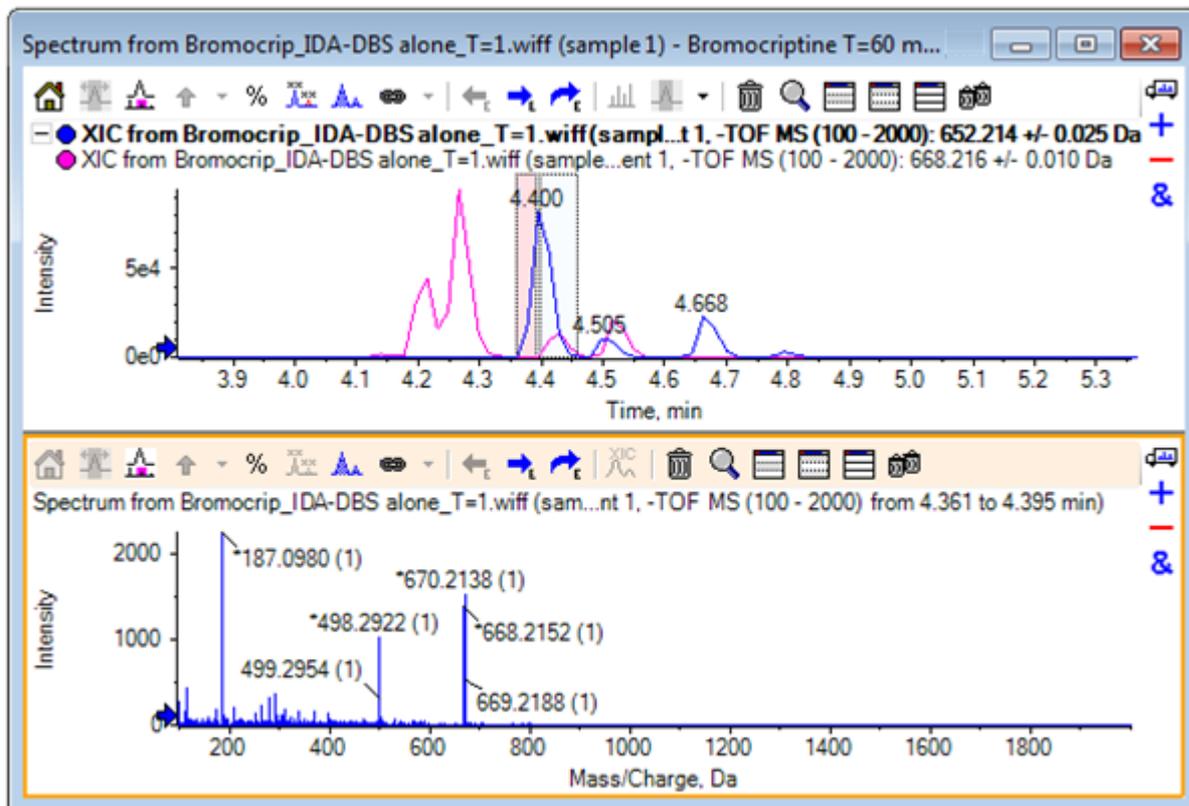
12. Exclua o painel do espectro.
13. No painel do cromatograma, faça uma seleção estreita que inclua o lado esquerdo do pico 652, mas evite o pico 668 e depois clique no ícone **Configurar faixa de subtração do ruído de fundo**.

A seleção ficará rosa.

Quando uma faixa de subtração tiver sido definida, ela será automaticamente subtraída de qualquer espectro gerado posteriormente. A faixa pode ser apagada selecionando **Clear Subtraction Range**, na lista acessada por meio de uma seta pequena à direita do ícone **Configurar faixa de subtração**.

14. Faça outra seleção no cromatograma que inclua o vértice do pico 668, mas o mínimo possível do pico 652, depois clique no ícone **Exibir um espectro para seleção**.

Figura 2-18 Espectro subtraído do ruído de fundo para o pico 668



O resultado é um espectro subtraído do ruído de fundo para o pico 668, que contém o pico 652 com baixa intensidade. Ambas as seleções no cromatograma permanecem vinculadas aos seus respectivos espectros, mesmo que o ruído de fundo não esteja visível, e podem ser movidas para outras partes do cromatograma. Mover a seleção do espectro atualiza automaticamente o espectro mostrado, mas se a região do ruído de fundo for alterada, então, ela apenas será aplicada aos espectros gerados posteriormente.

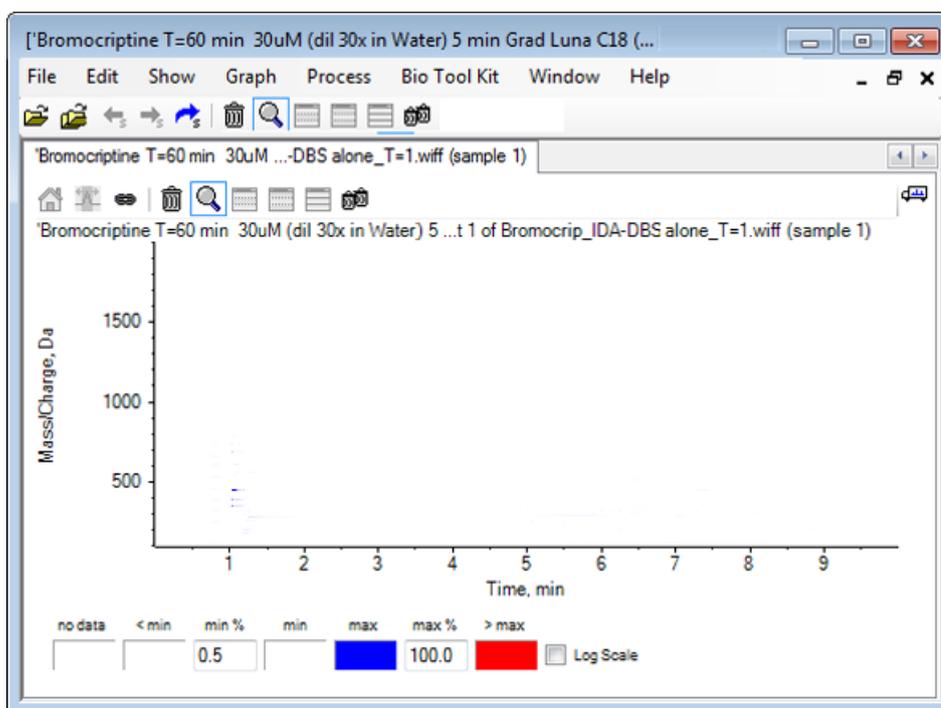
15. Clique no ícone **Ocultar todos os outros painéis**, clique no TIC do espectro único e depois clique no ícone **Apagar todos os outros painéis** para mostrar somente o TIC.
16. Se o painel do TIC for excluído, clique em **Show > Total Ion Chromatogram (TIC)**, selecione **Period 1, Experiment 1** e depois clique em **OK**.

Usar um gráfico de contorno

Uma alternativa para visualizar partes de um conjunto de dados (cromatogramas ou espectros) é usar um Gráfico de contorno para obter uma visão geral completa de um experimento. Os gráficos de contorno podem ser muito informativos, mas, geralmente, é necessário ajustar os parâmetros de visualização para obter os melhores resultados. Nesse caso, o composto precursor é bromado e o gráfico de contorno oferece uma forma de localizar os picos com o padrão isotópico do bromo.

1. Com o TIC de experimento único ativo, clique em **Show > LC/MS Contour Pane** e depois clique no ícone **Expandir o painel ativo para preencher a janela** na barra de ferramentas do Gráfico de contorno resultante, para que ele seja o único painel visível.
2. Se os controles de aparência (caixas de cor no canto inferior esquerdo) não estiverem visíveis, clique com o botão direito no painel e clique em **Show Appearance Control**. Consulte o [Gráficos de contorno e mapas de calor](#) e o *Guia de referência*.

Figura 2-19 Gráfico de contorno

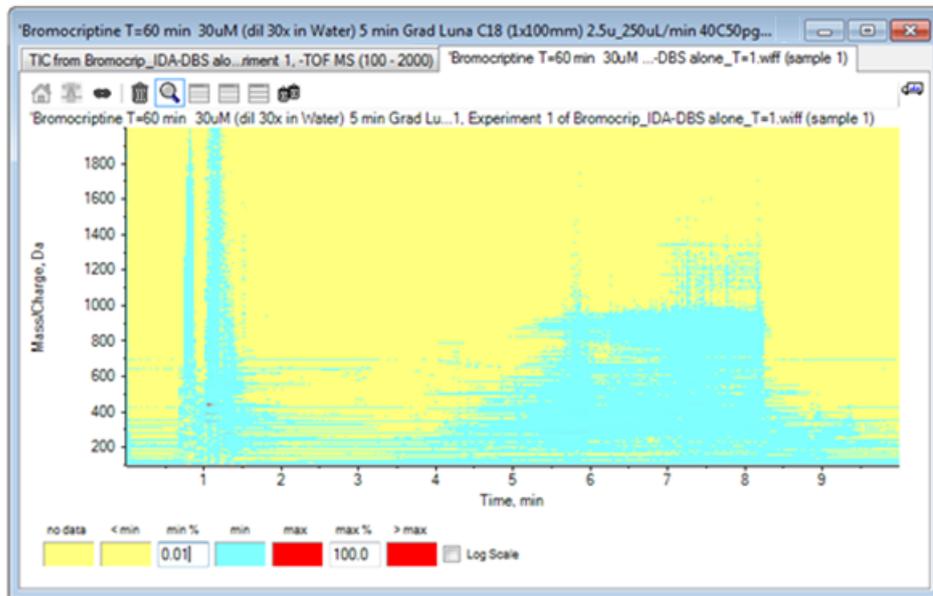


Dica! Com os parâmetros predefinidos, a visualização não é muito útil, pois é dominada por picos de baixo nível e ruídos que obscurecem os picos reais. Gere uma visualização melhor ao:

- Alterar a intensidade mínima a ser mostrada. Isso altera todos os pontos de dados abaixo desse nível para serem desenhados na mesma cor que os pontos em que não há dados, ou seja, eles ficam invisíveis.
- Alterar a cor do mapeamento para que as cores disponíveis abranjam uma faixa de intensidade menor, o que melhora a visibilidade dos pequenos picos.

3. Alterar o valor mínimo de % para **0,01**. Isso faz com que todos os pontos de dados com intensidades menores que 0,01% do pico de base desapareçam.

Figura 2-20 Gráfico de contorno



Muito mais da estrutura nos dados é mostrado. O volume morto e a área de limpeza de coluna estão vazios e existem vários picos de fundo que estão presentes em todos os tempos de retenção e são mostrados como linhas horizontais.

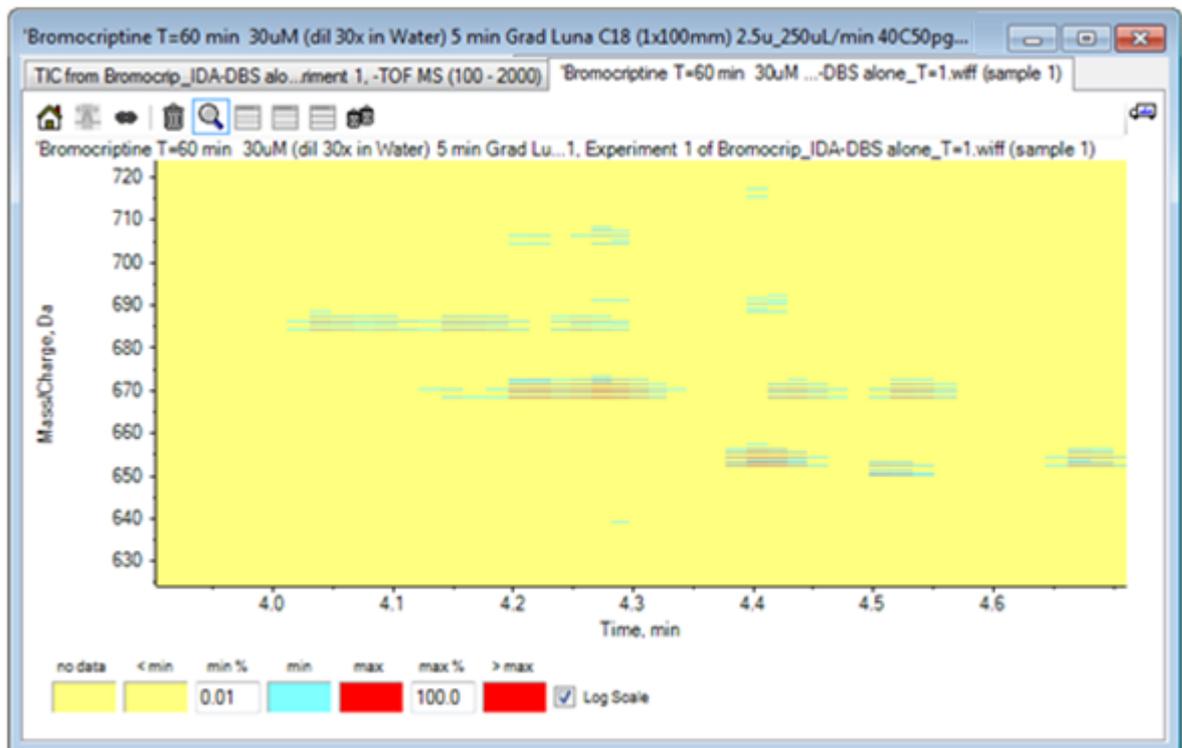
4. Marque a opção **Log scale**.

As cores selecionadas são mapeadas ao logaritmo de intensidade (como uma porcentagem da intensidade do pico de base), que possui o efeito de melhorar os menores picos de intensidade, por exemplo, a agregação em torno de 4 min a 4,5 min com massas no intervalo de 600 a 700.

5. Selecione essa região e depois clique no ícone **Dar zoom na seleção para visualização total**.

Dica! Também é possível dar zoom nos eixos x e y, independentemente, da forma comum.

Figura 2-21 Gráfico de contorno



A visualização mostra agora que existem vários picos bromados nessa área que podem ser diferenciados pelos conjuntos de quatro linhas paralelas que correspondem ao isótopos ^{79}Br e ^{81}Br e seus isótopos ^{13}C .

6. Experimente as configurações de controle de cor e observe os efeitos na visualização.
7. Quando terminar, feche a janela.

Isso também fecha o arquivo de dados.

Resumo

Nesta seção, as seguintes tarefas foram discutidas:

- Navegando e abrindo um arquivo de dados para mostrar um TIC.
- Alterando a visualização para que somente um experimento seja usado.
- Usando a calculadora de massa para determinar a massa de um íon de uma composição elementar e usando isso para gerar um XIC.
- Gerando espectros e cromatogramas interativamente e usando setas marcadoras nos espectros para mostrar a diferença de massa entre os picos.
- Gerando um espectro com ruído de fundo subtraído.
- Usando um gráfico de contorno para visualização geral de um conjunto de dados.

Trabalhar com cromatogramas e espectros

Essas operações são a base de todo o processamento de dados, independentemente do tipo de dado sendo mostrado.

Em um experimento IDA, os dados do espectro MS/MS (e possivelmente MS3) são coletados automaticamente quando as informações em um ou mais espectros da análise atendem a determinados critérios. É comum configurar os parâmetros para evitar coletar vários espectros do mesmo pico de LC ao excluir a massa do precursor (não permitindo que ela aja como um acionador) por determinado período de tempo. Ocasionalmente, espectros redundantes podem ser coletados. Além disso, como o IDA é acionado assim que um pico atende determinados critérios, ele geralmente gera um espectro anterior ao pico de LC, podendo não adquirir um espectro de boa qualidade.

O software contém ferramentas para mostrar, filtra e processar dados de IDA. Algumas destas ferramentas serão exploradas nessa seção.

Feche qualquer janela aberta antes de iniciar.

Mostrar e juntar espectros

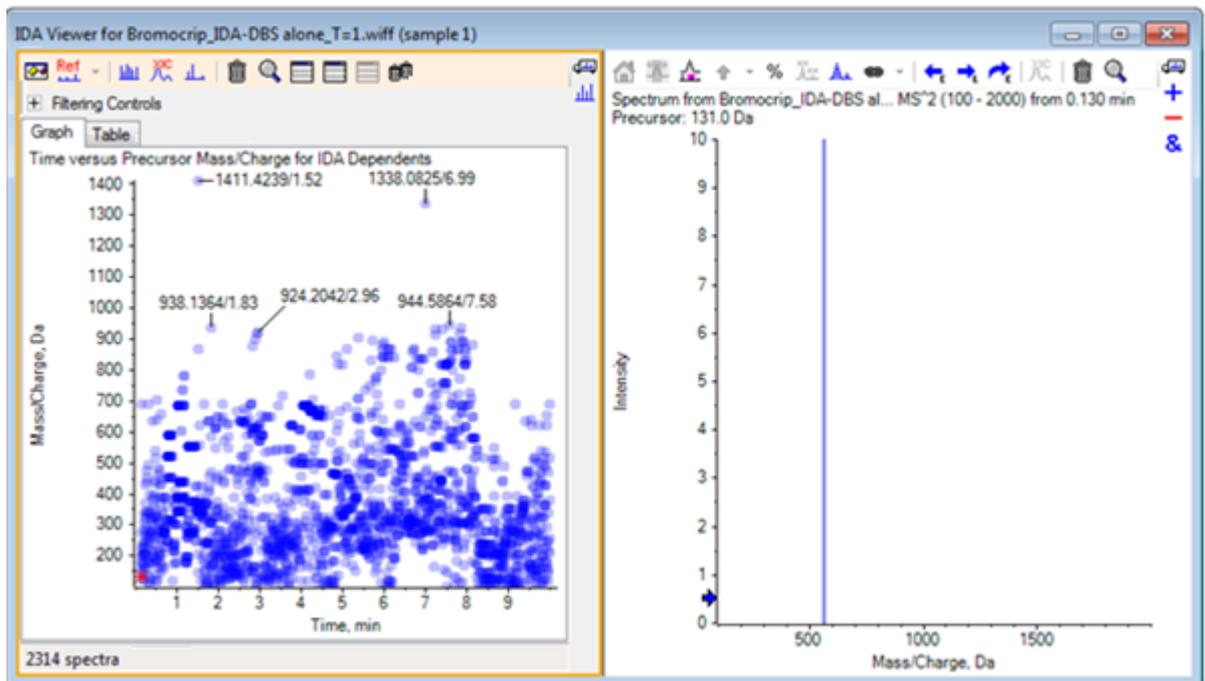
1. Clique no ícone **Abrir amostra** na barra de ferramentas principal.

A caixa de diálogo **Select Sample** se abre.

2. Se a pasta **Sample Data** não estiver selecionada, clique em **Browse** e navegue até a pasta **Sample Data**.
3. Selecione o arquivo **Bromocrip_IDA-DBS alone_T=1.wiff** e depois clique em **OK**.
4. Na caixa de diálogo **Open IDA Sample**, clique em **With the IDA Explorer** e depois clique em **OK**.

O programa examina todos os espectros no arquivo de dados e depois gera o gráfico a seguir.

Figura 3-1 Visualizador IDA



O painel esquerdo contém uma aba **Graph** e uma aba **Table**. A aba **Graph** mostra um gráfico de contorno virtual em que cada ponto de dados representa o tempo de retenção e a faixa de m/z de um íon que foi selecionado como um íon precursor. A aba **Table** mostra uma visualização tabular dos pontos de dados no gráfico de contorno virtual. O painel direito mostra o espectro para os pontos de dados selecionados. Inicialmente, o primeiro espectro MS/MS é mostrado.

O gráfico de contorno usa a intensidade da cor para refletir a intensidade do pico. As cores mais escuras indicam picos mais intensos. Os rótulos são representados onde possível, garantindo que eles não sobreponham pontos de dados ou uns aos outros. Dê zoom no gráfico de contorno para examinar uma área com mais detalhes e mostrar mais rótulos.

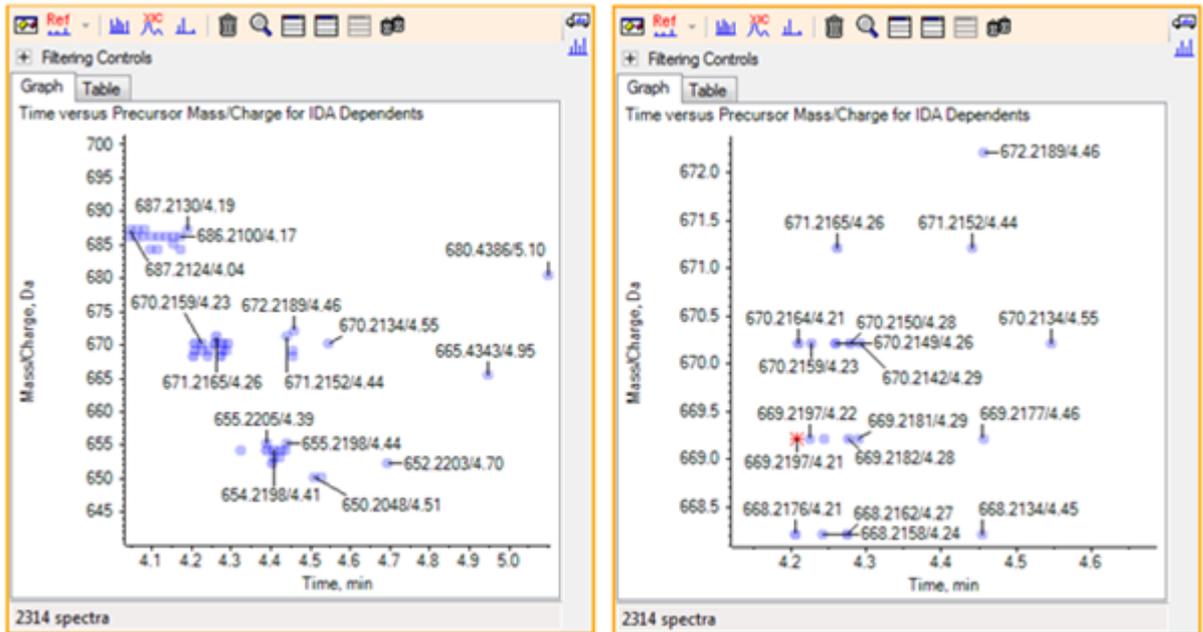
5. No painel esquerdo, aumente o zoom da região de 4 min para 5 min e de 640 Da para 700 Da em que os picos relacionados à bromocriptina foram mostrados anteriormente.

A figura à esquerda (Figura 3-2) mostra apenas o painel esquerdo. Se a visualização atual for diferente, clique no ícone **Mostrar opções** e desmarque a opção **Merge spectra with similar precursor masses** na aba **General** da caixa de diálogo **Options**.

Um grande número de espectros MS/MS foi coletado nessa área e, embora os picos cromatográficos sejam muito estreitos, vários desses íons são provavelmente dos mesmos picos. Além disso, os espectros MS/MS foram coletados para pico com seu respectivo padrão isotópico.

6. Amplie o gráfico na região de faixa de m/z de 668 até 672 Da. Consulte o painel direito na Figura 3-2.

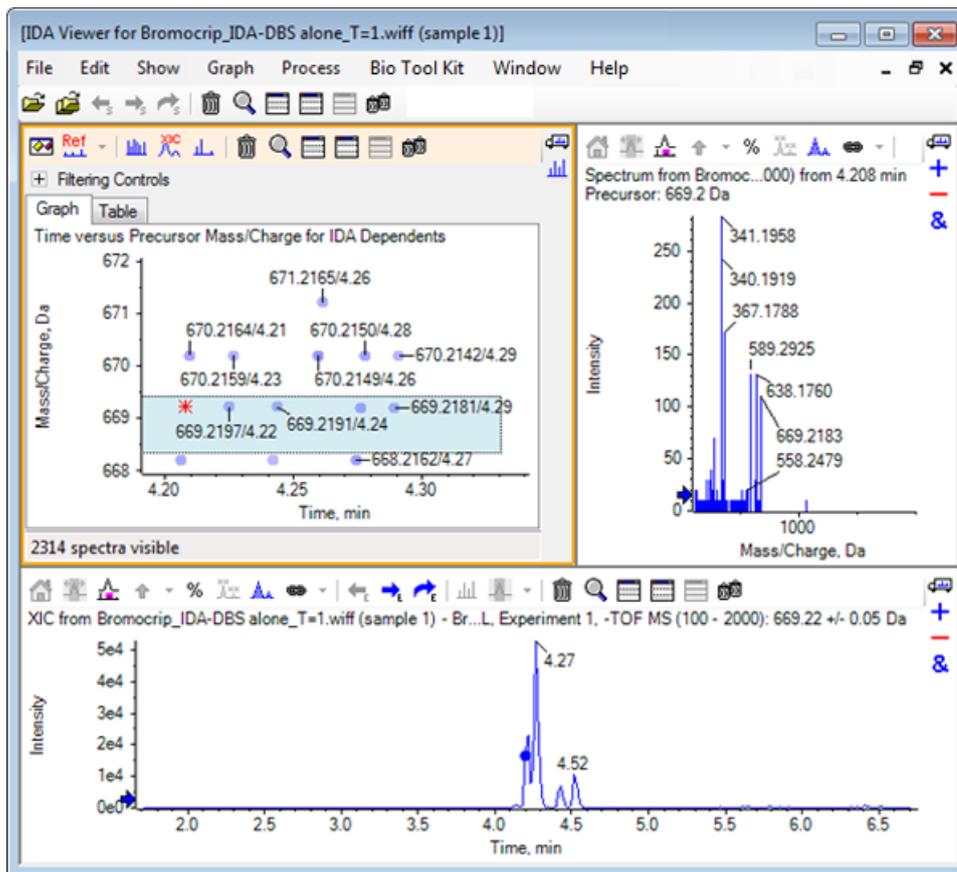
Figura 3-2 Visualizador IDA



7. Selecione o primeiro dos picos de valor 669,2197 (mostrado como um asterisco no painel direito acima) e depois clique no ícone **Exibir um XIC para seleção** para mostrar o XIC para essa massa precursora na varredura da análise.

Selecionar inicialmente o pico faz com que o espectro MS/MS correspondente seja mostrado.

Figura 3-3 XIC para a massa do precursor em uma varredura de análise



Se houver um ponto de dados sem rótulo no gráfico de contorno, mova o cursor sobre ele para mostrar a faixa de m/z e a legenda de tempo de retenção para que os tempos das varreduras de íons produto sejam relacionados ao cromatograma da análise.

Para o pico 669,2, as primeiras três varreduras estão relacionadas ao primeiro pico de XIC em 4,21 min, que é também onde uma varredura de 668,2 foi gerada; as duas segundas varreduras estão relacionadas ao pico em 4,27 min, e a última varredura é do pico em 4,42 min (669,2177/4,46). Nenhuma varredura foi realizada para o pico 669,2 aos 4,52 min, mas uma varredura foi obtida para o pico 670,2.

Nota: Os tempos de varredura são ligeiramente diferentes, porque são obtidos sequencialmente, mesmo se forem detectados na mesma varredura de análise. Os menores picos do isótopo podem não ser detectados tão rapidamente quando os maiores.

8. Desenhe um retângulo de seleção ao redor das primeiras cinco varreduras de 669,2, clique com o botão direito, e depois selecione **Select Points in Graph Selection**.

Isso faz com que o painel do espectro sobreponha todos os espectros de MS/MS.

O sistema obteve mais varreduras do que o necessário. Ao reduzir o número de espectros para processar e juntar aqueles que estão muito próximos para serem compostos diferentes, pode-se obter resultados de melhor qualidade. A junção usa a massa e o tempo de retenção para determinar essas varreduras.

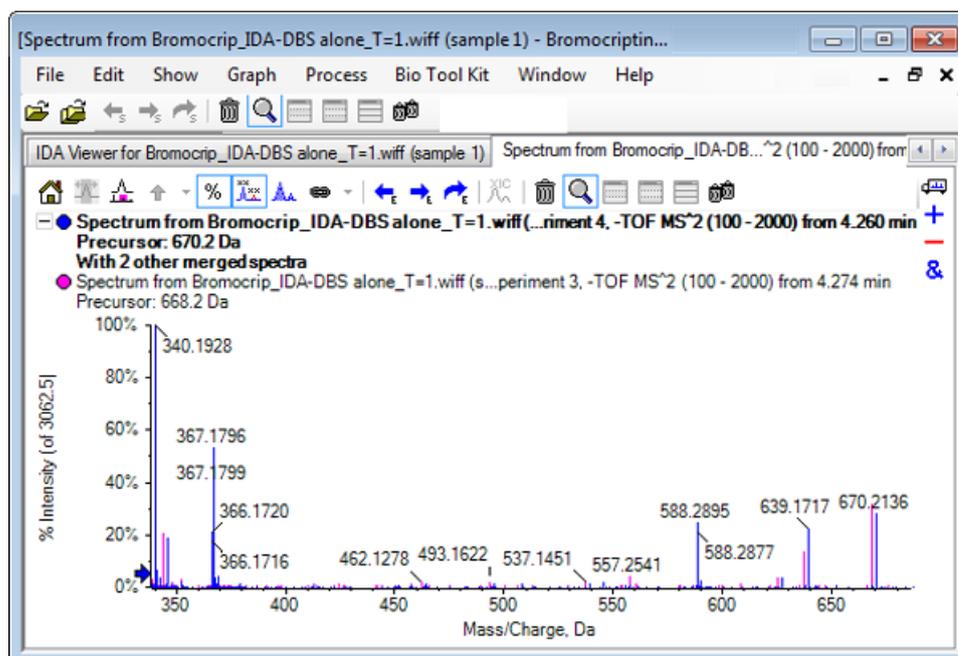
9. Clique no ícone **Mostrar opções**, marque a opção **Merge spectra with similar precursor masses** e depois configure a **Mass tolerance** para **10 ppm** e a **RT gap tolerance** para **0,03 min**. (os picos nessa análise são de aproximadamente 2 segundos).
10. Clique em **OK**.

Nota: Essa parte da caixa de diálogo também permite que os usuários definam como os XICs devem ser extraídos. A largura da massa deve corresponder à largura da resolução ou do pico do instrumento e é útil para limitar o intervalo de tempo usado, porque isso acelera o processamento.

Juntar os dados dessa forma resulta em três picos para 669,2 em 4,21, 4,28 e 4,46 min. A barra de status na parte inferior do painel visualizador de IDA mostra o progresso à medida que os dados estão sendo mesclados e depois mostra o número total de espectros dependentes depois que a junção estiver concluída.

11. Clique no ponto de dados em 670,2149/4,26 e depois pressione a tecla **Ctrl** e clique no ponto em 668,2162/4,27.
12. No painel de espectro MS/MS, clique no ícone **Expandir o painel ativo para preencher a janela**, o ícone **Usar por cento eixo y** e ícone **Rotular todos os traços sobrepostos** e depois dê zoom no eixo x para mostrar a região de 340 a 680.

Figura 3-4 Espectro: região de m/z 340 a 680 ampliada



Como esses dois precursores correspondem aos isótopos de Br, os espectros devem ser idênticos, exceto para os íons que retêm o átomo Br, que são mostrados como um par de picos separados por dois Da. Nesse exemplo, os fragmentos (traço 668,2) em 344,0441, 625,1765, e 637,1712 contêm o átomo de Br enquanto fragmentos em 340,1925, 367,1796 e 588,2877 não contêm.

Coloque uma seta no pico 588,2877 e observe que os picos 668 e 670 agora estão rotulados com a massa dos isótopos de Br mais 1, indicando que o pico em 588,2877 corresponde à perda de HBr.

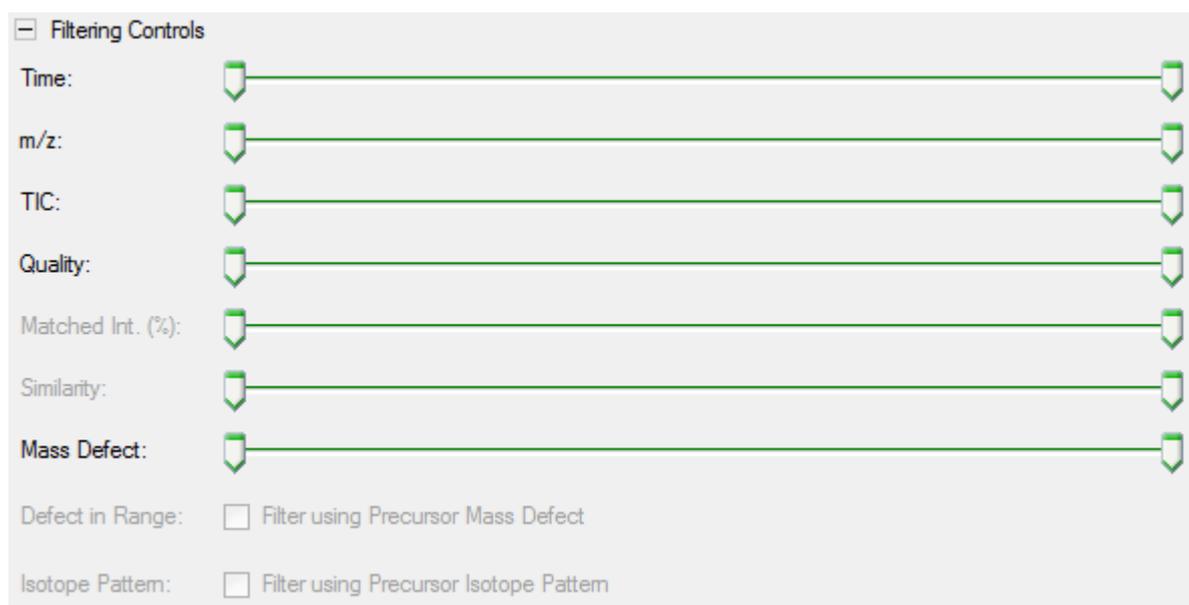
13. Remova a seta do espectro, clique no ícone **Expandir o painel ativo para preencher a janela** e depois dê zoom no gráfico de contorno para ver todos os pontos.

Filtrar dados IDA

O explorador IDA contém vários filtros que podem ser usados para reduzir a quantidade de dados a ser visualizada ou processada. Isso será descrito nessa seção.

1. No gráfico de contorno, clique no ícone **Expandir o painel ativo para preencher a janela** e depois clique no ícone próximo a **Filtering Controls** abaixo da barra de ferramentas.

Figura 3-5 Filtrando dados IDA



Esta janela mostra várias opções de ajuste e caixas de marcação, cada um correspondendo a um critério de filtragem diferente, que pode ser usado para ajustar a quantidade de dados mostrados. O tempo de retenção (**Time**) e a faixa de m/z (**m/z**) podem ser selecionados aqui ou dando zoom na painel.

Os outros filtros são os seguintes:

- **TIC:** configura limites para a intensidade somada dos picos no espectro MS/MS. Isso geralmente é usado para remover varreduras pequenas e com ruídos.
- **Quality:** essa é fração da intensidade somada que é maior que o equivalente de 1 contagem, ou seja, é menos provável que seja devido ao ruído, e é uma estimativa da qualidade espectral.
- **Matched Int. (%):** avalia a fração da intensidade somada, explicada por fragmentos conhecidos e perdas neutras ao usar **Fragment Matching**.
- **Similarity:** disponível quando um espectro de referência for configurado. Este recurso mede a fração da intensidade somada que corresponde aos fragmentos comuns e perdas neutras no espectro de referência. Consulte a [Usar um espectro de referência](#).

- **Mass Defect:** configura uma faixa única para a fração decimal de uma massa. Este recurso é útil para localizar metabólitos, porque as transformações metabólicas comuns (O, O₂ e assim por diante) não mudam significativamente o defeito da molécula precursora, então, usar uma faixa próxima a seu defeito pode revelar possíveis metabólitos.
- **Defect in Range:** além da faixa única de defeito da massa, o software também permite que os usuários definam vários defeitos que se aplicam a faixas de massa diferentes. Se tais faixas foram definidas, essa caixa de marcação permite que os usuários determinem se aplicam o filtro ou não. As faixas são configuradas na aba **Mass Defect** na caixa de diálogo **Options**.
- **Isotope pattern:** com esta caixa de seleção, os usuários aplicam um ou mais filtros do padrão isotópico aos dados de pesquisa de MS. Ou seja, as informações apareceram somente se o íon precursor selecionado tiver o padrão desejado. Esses padrões são definidos na aba **Isotope Pattern** da caixa de diálogo **Options**.

Cada um dos filtros possui dois controles de ajuste, para que uma faixa possa ser definida. Clique duas vezes em qualquer controle e digite diretamente um valor.

2. Experimente com as configurações dos controles deslizantes e perceba que, mesmo os valores mínimos usados na configuração do **TIC** (por exemplo, 1e3) ou **Quality** (1) possuem um efeito significativo. Configure o valor mínimo de **TIC** para 2e3 e todos os outros para 0.

O defeito de massa da bromocriptina é aproximadamente 0,22, então não é provável que metabólitos simples tenham valores maiores que esse ou muito menores.

3. Defina os filtros de **Mass Defect** entre 0,18 e 0,23 e observe que, entre os picos remanescentes, existem aqueles que se aproximam de 4,5 min e 650 Da e que existe apenas um ponto de dados de uma relação de m/z de 652,2211 nesta região (4,40 min).
4. Oculte os controles de filtro clicando no ícone próximo a **Filtering Controls**.

Dica! Altere quais filtros são visíveis, clicando com o botão direito na área do filtro, selecionado **Filters** e depois selecionando todos os apropriados.

Usar um espectro de referência

1. No gráfico de contornos, clique no ponto de dados em 652,2211/4,40 (própria bromocriptina) e depois clique no ícone **Configurar o espectro de referência (para classificação por similaridade)**.

Nota: Pode ser necessário dar zoom no gráfico primeiro.

2. Clique na seta ao lado do ícone **Configurar o espectro de referência (para classificação por similaridade)** e depois certifique-se de que **Overlay Reference Spectrum** esteja selecionado.
3. Clique no ponto em 654,2185/4,39.

Com um espectro de referência definido e **Overlay Reference Spectrum** selecionado, qualquer espectro mostrado também possui o espectro de referência sobreposto para que possam ser facilmente comparados. Isso é útil ao trabalhar com metabólitos, porque fornece uma maneira rápida de determinar quais picos são alterados e quais não são.

Desse modo, tornamos o espectro MS/MS do íon precursor para o isótopo de bromo de menor massa a referência e sobrepusemos o espectro para o isótopo de maior massa, então, temos uma visualização semelhante àquela gerada anteriormente para o pico 688,2. Ou seja, os íons contendo bromo podem ser identificados pela presença de picos com distância de dois Da entre eles.

4. Clique no ícone **Expandir o painel ativo para preencher a janela** e depois, no gráfico de contorno, clique em **Table** (logo abaixo de **Filtering Controls**).

Nota: Se necessário, mova o painel do espectro abaixo da tabela (arrastando e soltando o painel para rearranjar os ícones) para que todas as colunas fiquem visíveis.

A tabela mostra as mesmas informações que o explorador gráfico, mas fornece detalhes adicionais. Ela também responde aos controles de filtro para que as duas visualizações contenham os mesmos espectros. A tabela é vinculada à visualização do espectro para que a seleção das linhas faça com que o espectro seja atualizado e as linhas possam ser organizadas clicando nos cabeçalhos das colunas.

Quando um espectro de referência é definido, duas colunas extras são mostradas: **Delta m/z** mostra a diferença da massa precursora da referência e o espectro correspondente à linha. **Similarity** mostra a semelhança entre dois espectros.

5. Clique em **Delta m/z** para organizar a tabela e observar que ela contém vários picos diferindo em aproximadamente 15,995 (a massa do oxigênio) e um a 31,990 (O₂), que são prováveis metabólitos de hidroxibromocriptina.
6. Clique em uma linha na tabela para mostrar os espectros associados.

Nota: Esses espectros possuem valores que indicam alta semelhança, assim como as varreduras com as massas do precursor com dois Da a mais, que foram obtidos dos íons com ⁸¹Br.

Resumo

Nesta seção, as seguintes tarefas foram discutidas:

- Examinar um arquivo IDA usando as visualizações gráficas e tabulares do IDA Explorer.
- Mesclar espectros relacionados depois de determinar o que é necessário.
- Filtrar o número de espectros mostrados usando TIC e filtros de defeito de massa.
- Sobrepor espectros para que eles possam ser comparados.
- Definir um espectro de referência e usar a tabela para encontrar metabólitos prováveis.

Essas operações são fundamentais para processar dados IDA.

A próxima seção descreve como usar as ferramentas de estrutura usando o espectro MS/MS da bromocriptina.

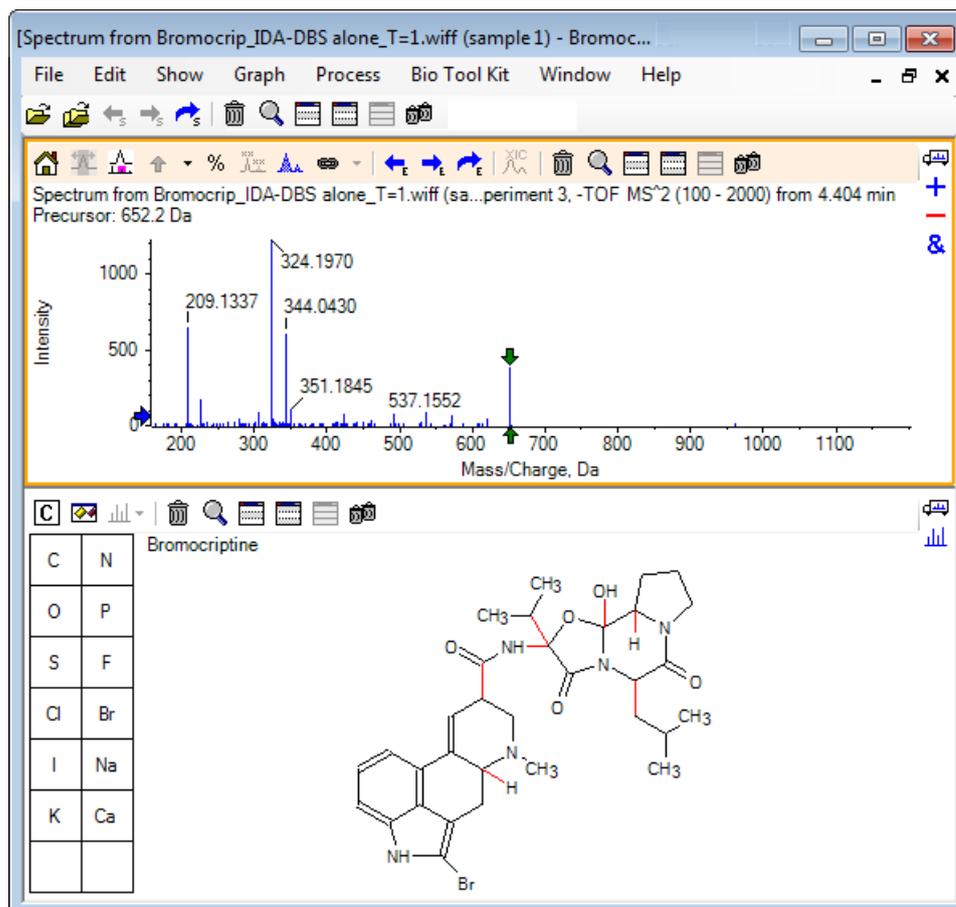
O software contém ferramentas para ajudar a vincular as massas dos íons a estruturas (salvas como arquivos .mol) e a explorar locais possíveis para biotransformações.

Vincular uma estrutura a um espectro MS/MS

1. Localize o espectro MS/MS de bromocriptina, 652,2211/4,40. Consulte [Trabalhar com o explorador de IDA](#).
2. Clique no ícone **Ocultar todos os outros painéis** no gráfico de contornos para que somente o espectro fique visível.
3. Clique em **File > Open Mol File**.
4. Na caixa de diálogo **Select Mol File**, selecione o arquivo **Bromocriptine.mol** e depois clique em **Open**. Para mais informações sobre os locais de arquivos de dados instalados, consulte [Instituição](#).

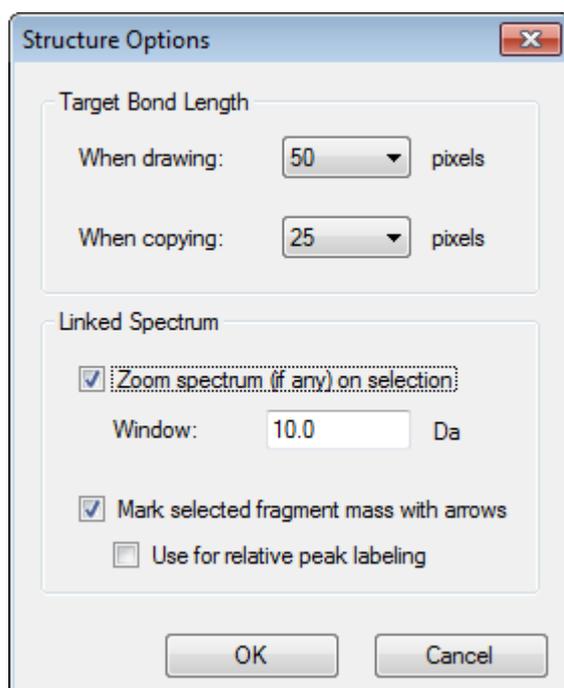
Um novo painel é aberto abaixo do espectro para mostrar a estrutura e as ferramentas.

Figura 4-1 Estrutura da bromocriptina



5. Clique na caixa de diálogo **Show options** no painel da estrutura, garanta que as caixas **Zoom spectrum (if any) on selection** e **Mark selected fragments mass with arrows** estejam selecionadas e depois clique em **OK**. Os outros parâmetros podem ser deixados inalterados.

Figura 4-2 Caixa de diálogo Structure Options



O espectro e a estrutura são automaticamente vinculados, porque o espectro estava ativo quando o painel de estrutura foi criado. Vincule manualmente a estrutura a um espectro arrastando o ícone **Exibir um espectro para seleção** ao espectro adequado.

Arrastar o painel da estrutura faz com que uma linha (laço) siga o cursor, permitindo que os usuários selecionem a estrutura total ou parcial, que é então representada em negrito. Como há um espectro vinculado, ele mostrará a região ao redor da massa da subestrutura selecionada.

6. Desenhe um laço ao redor da molécula inteira e a visualização mudará para mostrar o pico m/z de 652,2177, que corresponde ao íon $(M - H)^-$.

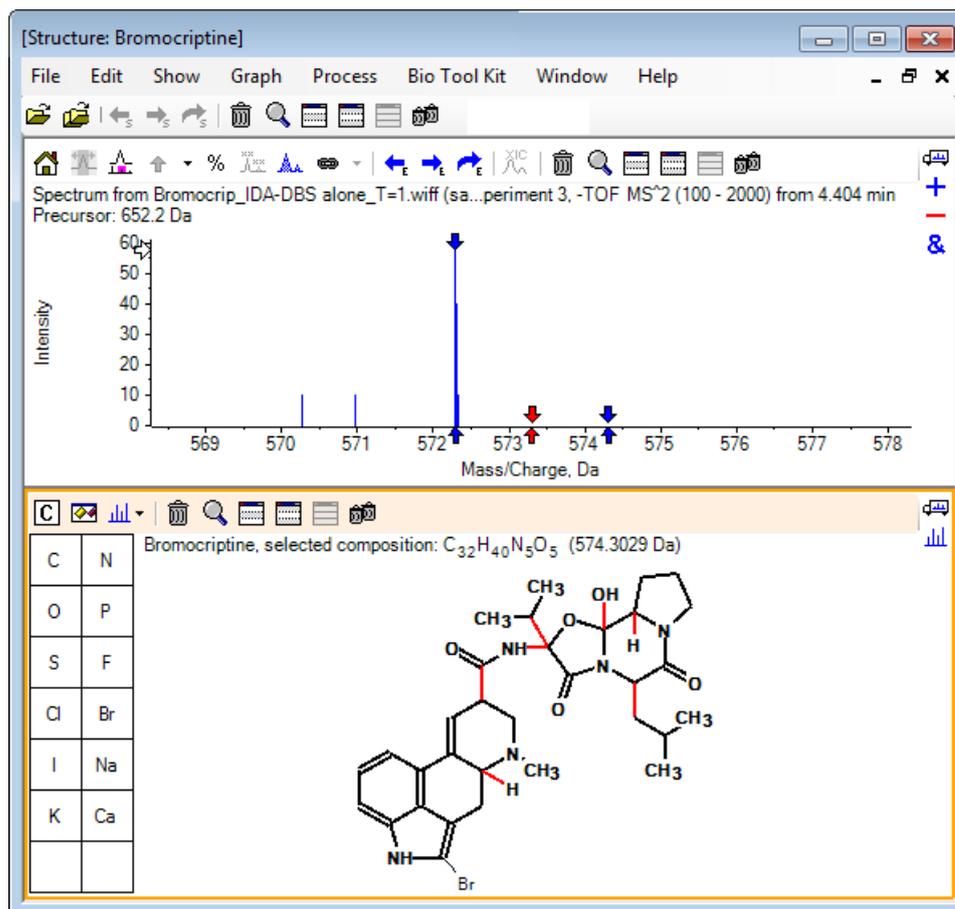
Como a opção **Mark selected fragment mass with arrows** estava selecionada, uma seta vermelha é desenhada acima e abaixo do pico, indicando que essa é a massa esperada de um íon correspondente à região selecionada (ou seja, $(M - H)^-$, porque esses dados estão no modo negativo).

Nota: O título do painel da estrutura indica a composição elementar e a massa do componente neutro correspondente à seleção (ou seja, $C_{32}H_{40}N_5O_5Br$ com uma massa de 653,2213 Da).

Se **Mark selected fragment mass with arrows** estiver selecionado, uma seta verde será desenhada no pico 652,2177 quando nada estiver selecionado no painel de estrutura. Isso acontece porque a seta verde marca o complemento da seleção atual e sem a seleção o complemento é a molécula inteira.

7. Selecione a molécula inteira, exceto o átomo de bromo. Consulte a [Figura 4-3](#).

Figura 4-3 Estrutura da bromocriptina



Nota: O átomo de bromo é o único em fonte normal, e o título no painel de estrutura mostra a composição $C_{32}H_{40}N_5O_5$ com uma massa de 574,3029 Da. No espectro, a seta vermelha indica a massa esperada da seleção, ou seja, a massa do íon molecular $(M - H)^-$ menos a massa do bromo, e existem setas a 1 Da de distância em cada lado. É comum que os átomos adicionais de hidrogênio sejam ganhos ou perdidos durante a fragmentação e o software indica essa possibilidade desenhando um par de setas azuis em +1 e -1 para cada ligação quebrada. Nesse caso, somente uma ligação foi quebrada, então existem apenas duas setas adicionais.

O pico real no espectro corresponde a uma dessas setas, indicando que um átomo de hidrogênio foi perdido, ou seja, HBr , então, a massa do íon corresponde a $(M - H - HBr)^-$.

Trabalhar com fragmentos

O software contém um preditor de fragmentos que pode gerar a massa de espécies formada por quebras de ligações e incluindo ou removendo átomos de hidrogênio.

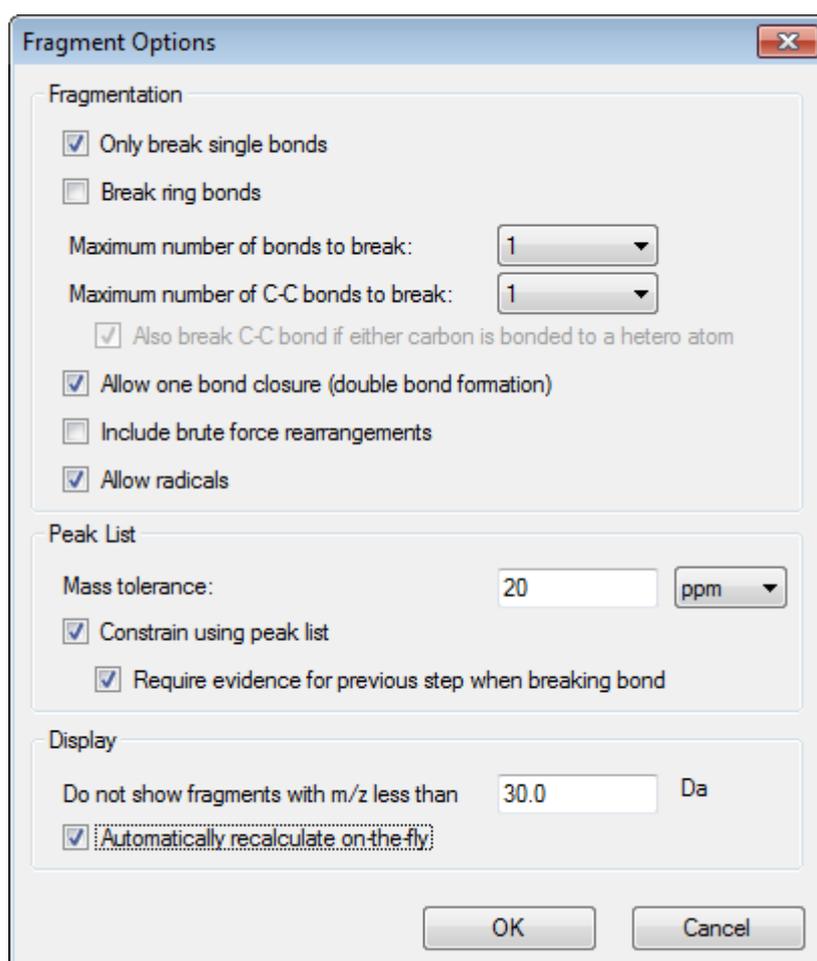
Nota: Essa previsão é puramente aritmética, não usa lógica química e tende a superestimar os fragmentos produzidos, mas é uma ferramenta útil para analisar fragmentos.

1. Com a estrutura do painel ativa, clique em **Show > Fragments Pane**.

Uma barra de progresso pode ser mostrada, dependendo das configurações na caixa de diálogo **Fragment Options**. Consulte a [Figura 4-4](#).

2. Clique no ícone **Mostrar caixa de diálogo de opções**, configure os parâmetros conforme mostrado em [Figura 4-4](#), e clique em **OK**.

Figura 4-4 Caixa de diálogo Fragment Options



Configure as opções para que um conjunto pequeno de fragmentos simples seja produzido e depois aumente o número e tipo de ligações quebradas, conforme necessário, para explicar os íons observados. Permitir que várias ligações se quebrem causa lentidão no programa e gera um número maior de fragmentos improváveis.

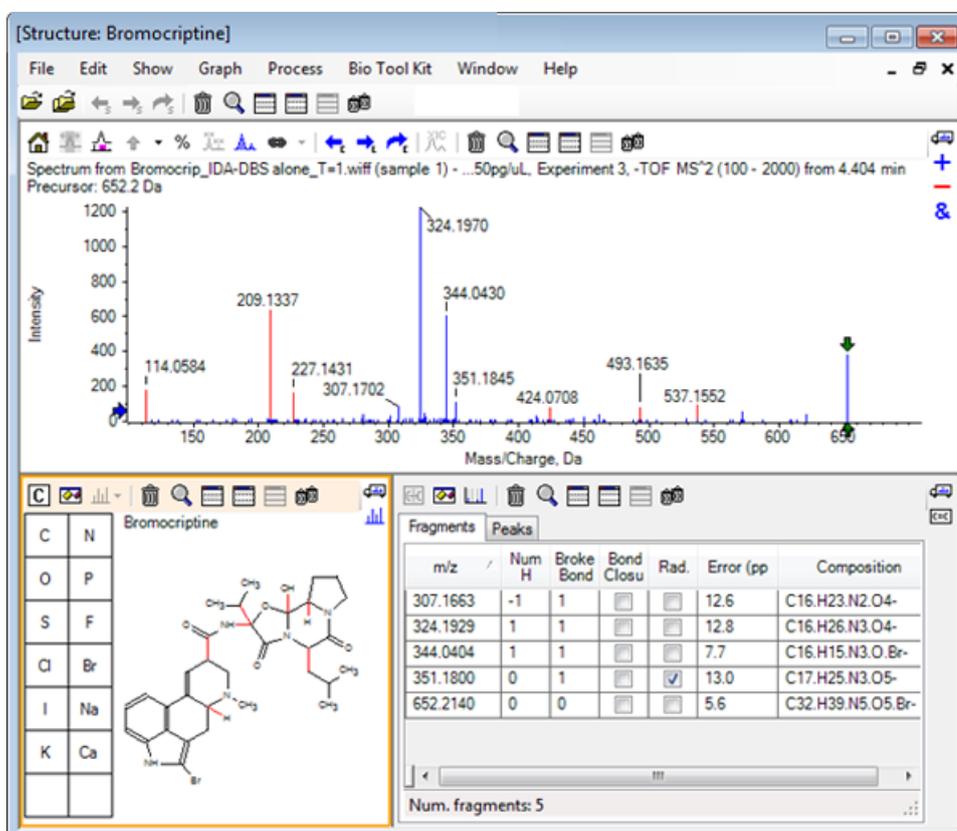
Trabalhar com ferramentas de estrutura

A maioria dos parâmetros na caixa de diálogo **Fragment Options** está descrita no *Guia de referência*, mas deve ser observado o seguinte:

- Se a opção **Automatically recalculate on-the-fly** estiver selecionada, quaisquer mudanças no espectro (alteração para um diferente ajuste de parâmetros) ou seleção faz com que os fragmentos sejam recalculados. Esse geralmente é o comportamento desejado, mas pode ter impacto na velocidade da análise se as opções estiverem configuradas para produzir vários fragmentos. Se essa opção não for utilizada, clique no ícone **Fragmento**.
- **Constrain using peak list** significa que o software mostrará somente os fragmentos que correspondem aos picos no espectro com a tolerância adequada.
- **Require evidence for previous step when breaking bond** somente é eficaz quando mais de uma ligação é quebrada. Primeiro, o programa quebra uma ligação e depois considera quebrar ligações nas partes resultantes. Se essa opção estiver selecionada, devem existir íons correspondentes às partes antes de serem quebradas mais vezes.

Com esses parâmetros, a visualização deve lembrar a [Figura 4-5](#), mas deve ser levemente diferente, porque somente os picos acima da configuração do limite (também rotulada) são considerados.

Figura 4-5 Estrutura da bromocriptina

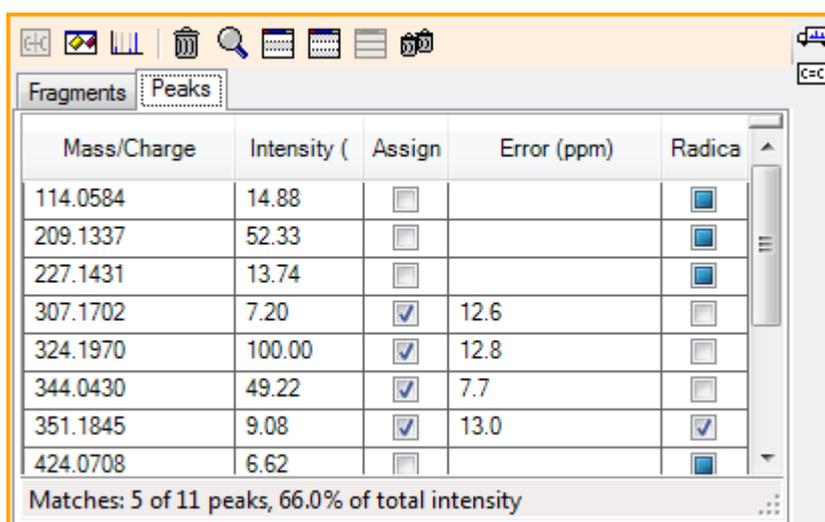


Nota: Os picos no espectro são coloridos para indicar os designados (azul) e os não designados (vermelho) correspondentes aos picos na aba Fragmentos.

O painel de fragmentos contém duas guias:

- **Fragments:** neste exemplo, a lista é curta, porque não são gerados muitos fragmentos sob essa condição, e somente alguns deles correspondem aos picos no espectro, conforme necessário, porque a caixa de seleção **Constrain using peak list** foi selecionada.
- **Peaks:** mostra uma tabela listando os picos no espectro que estão acima do limite, suas intensidades, e se foram designados a um fragmento. Para picos designados também é mostrado um erro de massa.

Figura 4-6 Painel de fragmentos

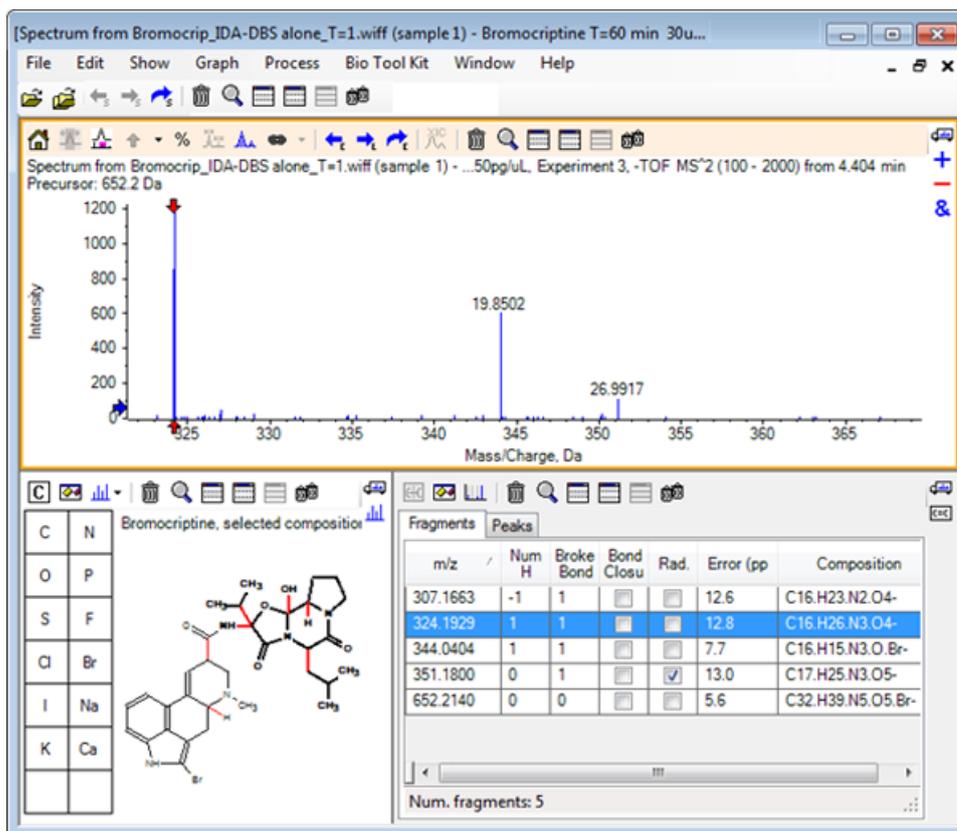


Mass/Charge	Intensity (%)	Assign	Error (ppm)	Radical
114.0584	14.88	<input type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>
209.1337	52.33	<input type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>
227.1431	13.74	<input type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>
307.1702	7.20	<input checked="" type="checkbox"/>	12.6	<input type="checkbox"/>
324.1970	100.00	<input checked="" type="checkbox"/>	12.8	<input type="checkbox"/>
344.0430	49.22	<input checked="" type="checkbox"/>	7.7	<input type="checkbox"/>
351.1845	9.08	<input checked="" type="checkbox"/>	13.0	<input checked="" type="checkbox"/>
424.0708	6.62	<input type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>

Matches: 5 of 11 peaks, 66.0% of total intensity

3. Na aba **Fragments**, selecione uma linha para uma faixa de m/z de 324,1929. O pico é marcado com uma seta vermelha para mostrar que essa é a massa esperada e a subestrutura correspondente é demonstrada em negrito no painel de estrutura.

Figura 4-7 Caixa de diálogo de fragmentação



Nota: A composição e a massa no título do painel de estrutura agora refletem a massa do íon, em vez da massa neutra.

- Examine as estruturas designadas aos outros fragmentos.

Todas elas estão relacionadas à ligação da amida central que separa as duas partes cíclicas da molécula e parecem possíveis.

Nota: As composições elementares designadas são consistentes com os espectros sobrepostos que foram gerados no [Usar um espectro de referência](#), nos quais a presença de Br em fragmentos foi deduzida ao comparar os espectros de íons moleculares que contém ^{79}Br e ^{81}Br .

- Aumente o zoom do espectro para toda que a faixa de massas fique visível.

Dois dos maiores picos estão designados, uma m/z de 324,1970 e uma m/z de 344,0430, correspondentes aos dois lados da molécula, e estão representados em azul. No entanto, existem vários picos que ainda não estão designados.

- Abra a caixa de diálogo **Options** e depois altere o **Maximum number of bonds to break** para **2**.

Nota: Dependendo da configuração de limite, essa opção pode fazer com que alguns picos pequenos sejam assimilados, mas não os mais abundantes (de m/z em 114,0584, 209,1337 e 227,1431, por exemplo). Se o espectro estiver rotulado em relação a uma seta vermelha, clique no painel de estrutura para limpar qualquer seleção para mostrar os valores de massa absoluta.

7. Marque a opção **Break ring bonds** e depois clique em **OK**.

Diversos íons adicionais agora são assimilados, incluindo aqueles em m/z de 209,1337 e 227,1431. Selecione as novas massas no painel **Fragments** para realçar as subestruturas e mostra que elas estão relacionadas a clivagens do anel na parte do peptídeo cíclico da molécula. Esses íons provavelmente serão úteis para determinar os locais de transformação metabólica nessa região.

Incluir subestruturas em um espectro

Selecione partes da estrutura e as utilize para anotar o espectro para referência futura. Dependendo do tamanho do painel de espectro, use a caixa de diálogo **Options** no painel de estrutura para ajudar o **Target Bond Length** para copiar.

1. Na caixa de diálogo **Fragment Options**, desmarque a opção **Break ring bonds** para simplificar o número de fragmentos.
2. No painel de fragmentos, selecione uma linha correspondente a um ou mais íons abundantes para destacar a estrutura correspondente.
3. Clique dentro do painel de estrutura.
4. Clique em **Edit > Copy**.
5. Clique com o botão direito em um painel com espectro ativo e depois clique em **Paste Image**.

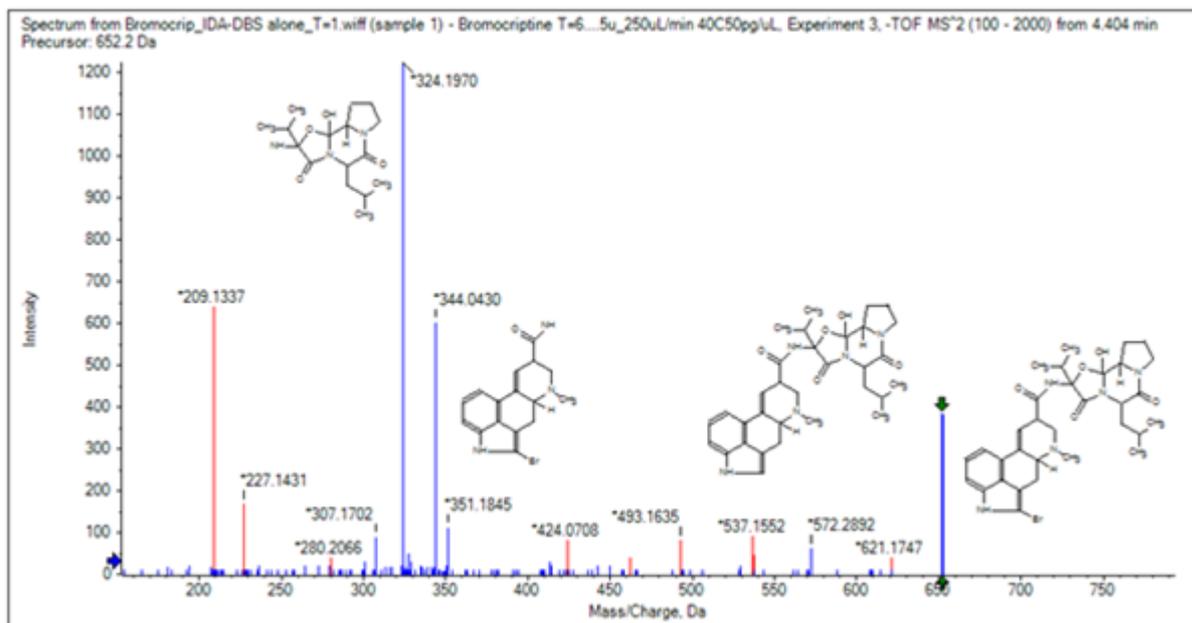
Isso faz com que uma imagem da subestrutura seja colada no painel do espectro.

6. Mova a imagem arrastando-a para o local desejado. Uma imagem pode ser excluída totalmente clicando com o botão direito e depois selecionando **Delete Image**.

As imagens são vinculadas ao espectro, ou seja, às posições de intensidade da massa, portanto, elas se movem à medida que o usuário rola ou dá zoom.

7. Repita as etapas 2 a 6 para que outros fragmentos gerem uma imagem final semelhante à [Figura 4-8](#).

Figura 4-8 Espectro com subestruturas incluídas



8. Clique em **File > Print > Print Preview Window** para verificar o posicionamento das subestruturas.

Como os íons assimilados são representados em azul, eles são fáceis de se associar às estruturas correspondentes.

9. Copie a imagem e depois a cole em um programa de desenho para incluir linhas ou outros recursos.

Trabalhar com espectros de MS/MS relacionados

Em algumas aplicações, é útil poder comparar o espectro de um composto modificado, um metabólito, por exemplo, ao espectro e estrutura do composto precursor.

1. Use o explorador IDA para mostrar o gráfico de contorno novamente. Selecione o pico em 668,2176/4,21 e depois oculte o Gráfico de contorno.

Como os painéis de estrutura e de fragmentos estão vinculados ao espectro, eles foram atualizados para refletir o novo espectro, mas a estrutura ainda é a mesma do composto precursor, enquanto o espectro foi obtido de um composto com um átomo de oxigênio adicional (16 Da a mais na massa). Em muitos casos ainda existem algumas assimilações, indicando as partes da molécula que não foram alteradas, mas nesse caso, nenhuma assimilação significativa de íons foi representada em vermelho.

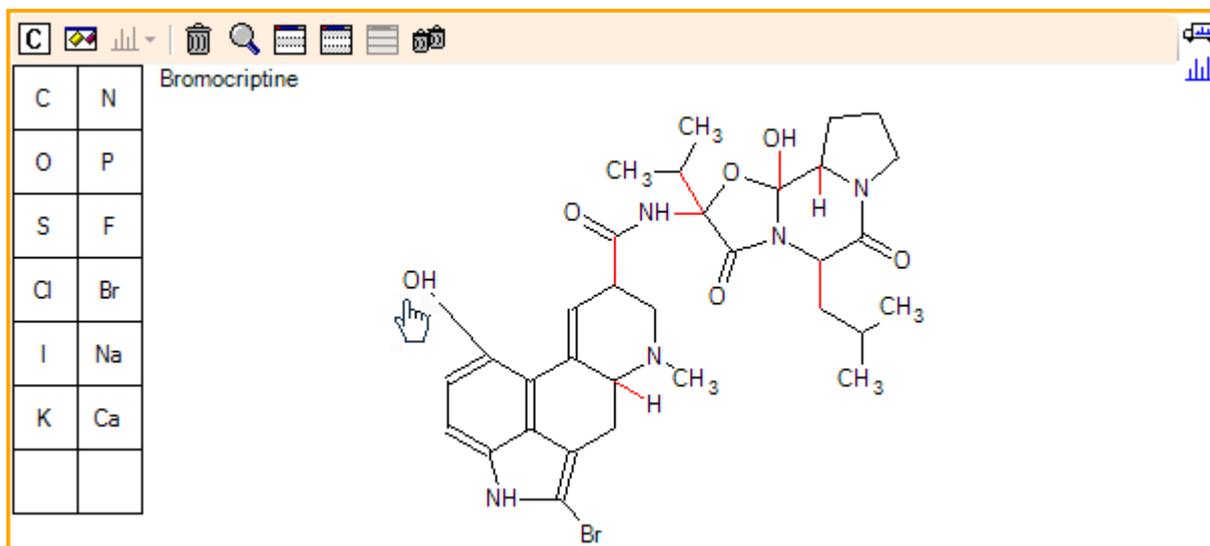
O painel de estrutura contém ferramentas de desenho mais simples que permitem modificações na estrutura para ver se podem ser encontradas novas assimilações.

2. O lado esquerdo do painel de estrutura contém uma grade com símbolos dos elementos. Clique no **O** e arraste-o em direção à estrutura principal

Quando o átomo estiver perto da estrutura, ele é conectado por uma ligação que segue o cursor à medida que é arrastado próximo da estrutura.

3. Arraste o símbolo **O** para que uma ligação seja desenhada na parte inferior da estrutura (ergolina) e solte o mouse (por exemplo, coloque o novo átomo no anel de fenil). A [Figura 4-9](#) mostra este processo.

Figura 4-9 Painel de estrutura

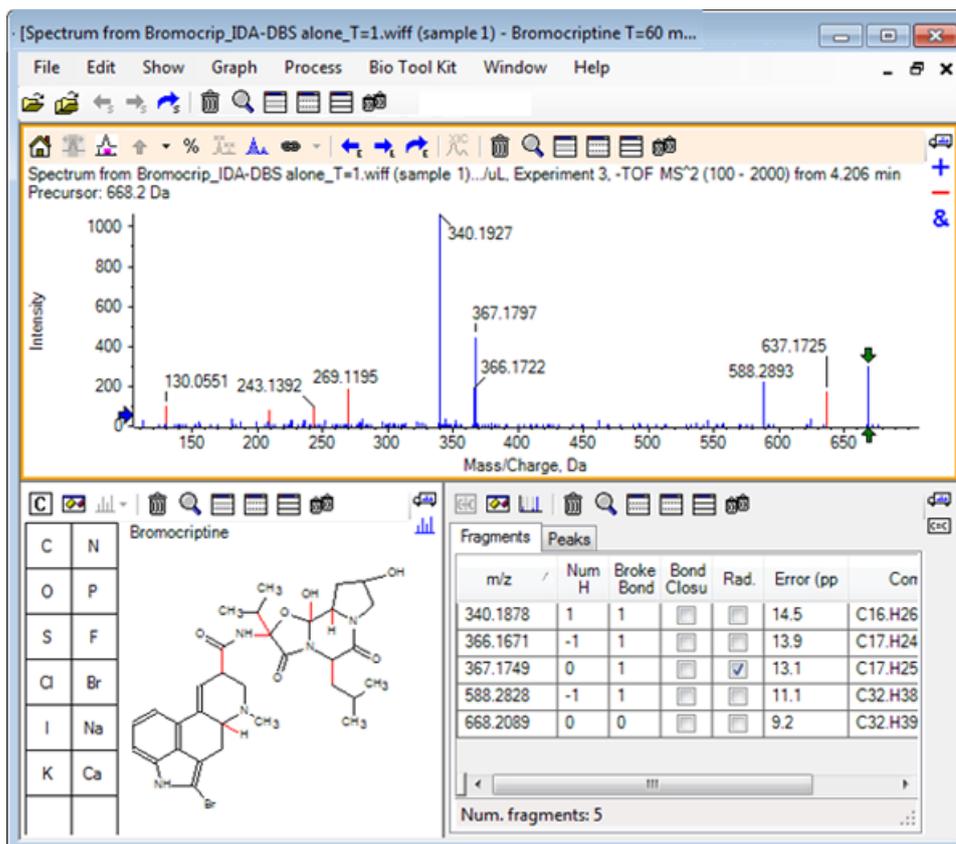


O espectro é atualizado novamente e mostra duas assimilações: o íon molecular em 668,2089 e o íon correspondente à perda de HBr em 588,2828. Isso sugere que a composição elementar está correta agora, mas o fato de que os fragmentos maiores não são identificados sugere que o átomo não foi adicionado à parte correta da molécula.

4. Clique no grupo **OH** recém adicionado e depois arraste-o para o anel de pirrolidina na parte superior da estrutura. Garanta que o único átomo sendo movido esteja destacado em negrito. Caso contrário, a estrutura inteira destacada será movida.

Conforme mostrado na [Figura 4-10](#), isso faz com que os íons em 340,1927, 366,1722 e 367,1797 correspondam as subestruturas nas formas hidroxiladas de íons assimilados no espectro do composto precursor.

Figura 4-10 Espectro de bromocriptina



Vários dos picos de massa baixa não correspondidos estavam presentes no espectro precursor, ou são equivalentes hidroxilados que foram assimilados quando o algoritmo permitiu quebrar ligações do anel, mas existe um íon de massa alta em 637,1725 que provavelmente é devido a uma etapa de fragmentação simples e ainda não foi assimilado.

5. Na aba **Fragments**, selecione a linha para 668,2089 para que ela seja rotulada e os outros íons sejam rotulados em relação à ela.

Isso mostra que o pico em 637,1725 corresponde à perda de massa de 31,0364 da molécula precursora, que poderia ser CH_3NH_2 ou CH_3O . Como esse íon não foi observado no espectro da molécula precursora, parece mais provável que seja derivado da hidroxilação que ocorre em um dos grupos metil na parte de peptídeo cíclico da estrutura.

6. Clique duas vezes no painel de estrutura para desmarcar a seleção da estrutura e depois arraste o novo grupo **OH** para um dos grupos metil à direita da estrutura.
7. Abra a caixa de diálogo **Fragment Options**, configure a **Mass tolerance** em 30 ppm e depois clique em **OK**.

O íon 637 agora é assimilado e selecionar essa linha no painel de fragmentos mostra que o íon pode corresponder à perda de uma fração metóxi.

- Abra a caixa de diálogo **Fragment Options**, selecione a opção **Break ring bonds** e depois clique em **OK**.

A maioria dos fragmentos agora podem ser assimilados, embora o íon em 209 só possa ser correspondido se as três quebras de ligações forem permitidas (as duas necessárias da molécula precursora mais a perda do átomo de oxigênio adicional).

Nota: O painel de fragmentos agora contém várias linhas para algumas das massas, como 637,1905. Cada uma dessas linhas corresponde a um possível fragmento diferente (e mais ainda: são gerados se as três ligações puderem ser quebradas). A aba Picos, no painel de fragmentos, somente mostra a identificação que deve ser a melhor com base em uma combinação da precisão da massa, o número de ligações quebradas, se o fragmento é um radical e assim por diante. Nesse caso, a melhor identificação é de um fragmento que poderia ter sido gerado pelo composto precursor, mas não foi observado, então, as opções adicionais mostrada na aba Fragments podem ser úteis na sugestão de potenciais vias que não são óbvias.

Resumo

Nesta seção, as seguintes tarefas foram discutidas:

- Incluir uma estrutura como um arquivo .mol e depois vinculá-lo a um espectro.
- Selecionar partes da estrutura e depois determinar se há um pico de massa correspondente.
- Gerar um painel de fragmentos e depois configurar os parâmetros para observar fragmentos simples.
- Trabalhar com as abas **Fragments** e **Peaks** para mostrar composições correspondentes, estruturas e picos de massa.
- Modificar as **Fragment Options** para permitir vias de fragmentação mais complexas.
- Incluir subestruturas a um painel de espectro.
- Modificar a estrutura para explorar a fragmentação de moléculas relacionadas, como metabólitos.

Em geral, é uma boa prática começar permitindo processos de fragmentação simples e opções de fragmentação adicionais (ligações adicionais, ligações em anel) conforme necessário, para explicar os íons observados. Isso é consistente com o fato de que fragmentos são gerados por uma série de etapas, com os fragmentos mais simples sendo formados primeiro, ao invés de em uma etapa combinada que quebra várias ligações. Claro que um fragmento simples pode ser instável e fragmentar imediatamente ainda mais, então, isso não será observado. Além disso, permitir um grande número de etapas de fragmentação requer mais tempo de processamento e leva mais tempo para terminar.

Ao comparar moléculas relacionadas, pode ser útil sobrepor o espectro de referência (molécula precursora) e a forma modificada e depois vincular a visualização a um painel de estrutura ou de fragmentos, que é atualizado à medida que o espectro ativo é trocado. No entanto, as cores aplicadas aos íons identificados e não assimilados podem dificultar a distinção se houver sobreposições, então, é recomendado trabalhar com um único espectro até obter familiaridade com o programa e com as visualizações.

Embora seja comum trabalhar com apenas uma amostra, existem ocasiões em que informações adicionais podem ser obtidas ao comparar e visualizar várias ao mesmo tempo. Essa seção ilustra algumas das ferramentas disponíveis no software, primeiro para duas amostras e depois para várias amostras.

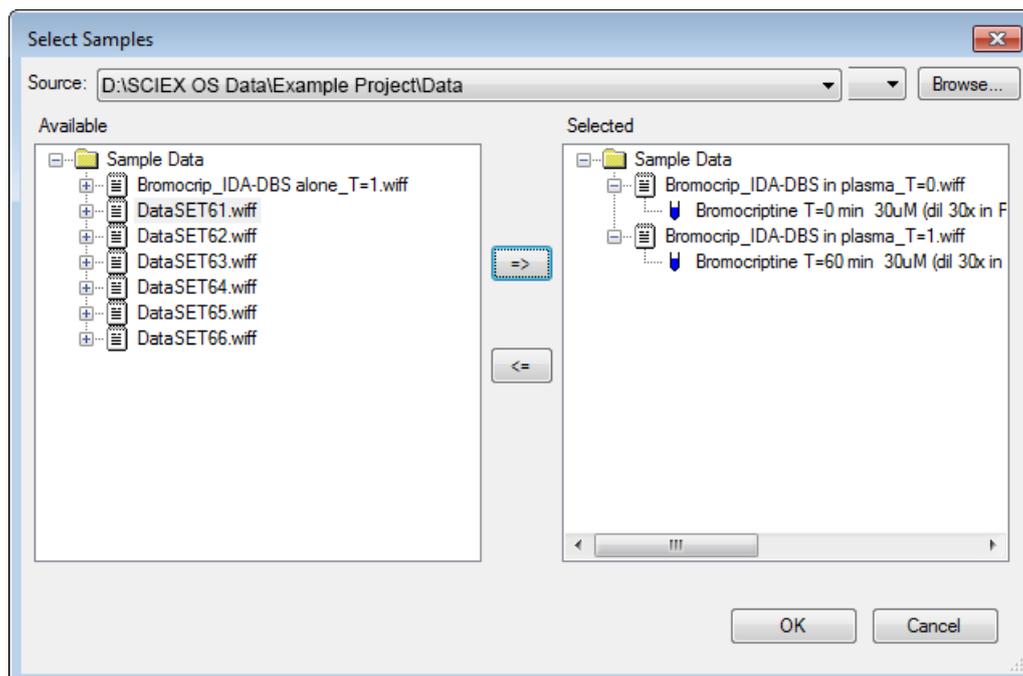
Trabalhar com duas amostras

Um fluxo de trabalho comum é comparar duas amostras obtidas sob diferentes condições para determinar as alterações. Por exemplo, dois momentos diferentes depois da administração de um medicamento farmacêutico. Os dados sendo comparados nesse exercício (T = 0 hora e T = 1 hora) são de uma incubação de bromocriptina com microsomas de fígado de rato enriquecidas em plasma.

Feche todas as janelas abertas antes de iniciar.

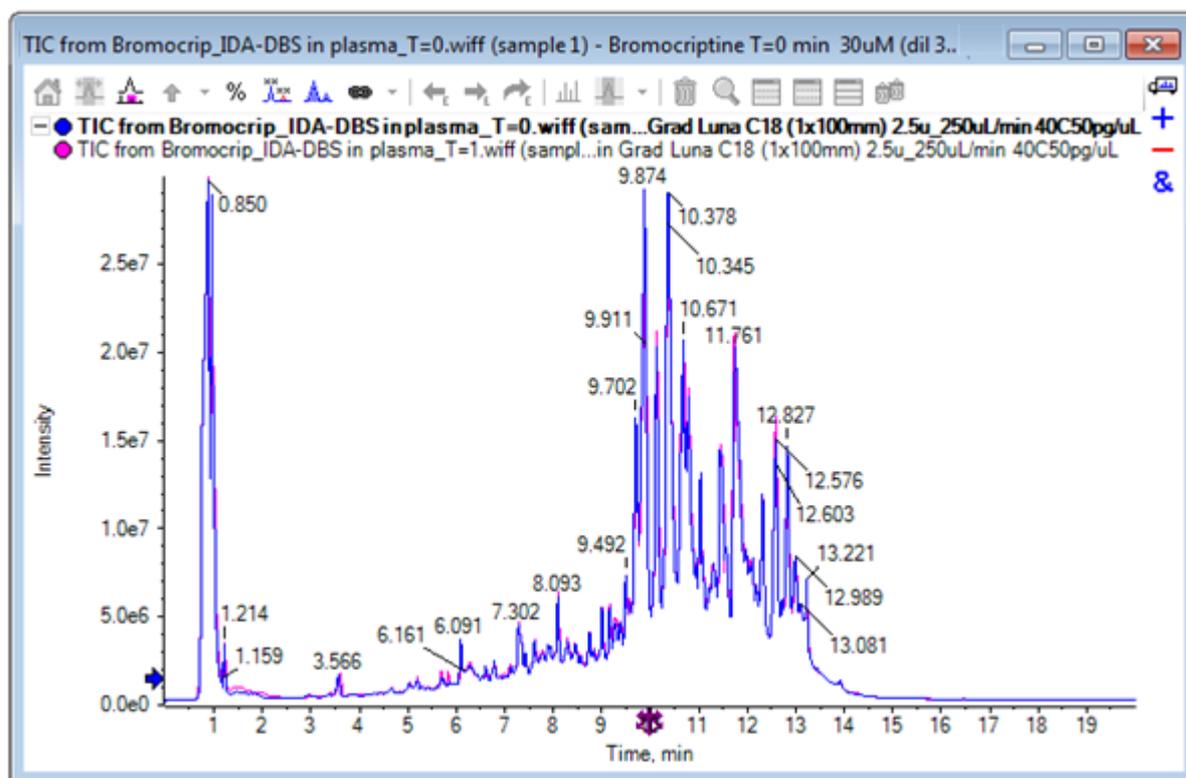
1. Clique em **File > Open Multiple Samples**, e depois navegue até a pasta contendo os dados da amostra.
2. Selecione os arquivos **Bromocrip_IDA-DBS em plasma_T=0.wiff** e **Bromocrip_IDA-DBS em plasma_T=1.wiff**
3. Clique em **OK**.

Figura 5-1 Selecione várias amostras.



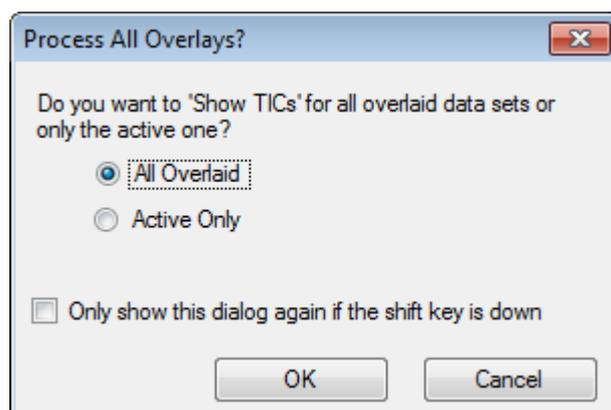
Ao contrário de abrir um único arquivo IDA, no qual TICs separados são mostrados para a análise e varreduras dependentes, com vários arquivos IDA, um único TIC de todos os dados é mostrado para todas as amostras. Neste caso, existem dois TICs, como mostrado na [Figura 5-2](#)

Figura 5-2 TICs



4. Clique em **Show > Total Ion Chromatogram (TIC)** para abrir a caixa de diálogo **Select Experiment**.
5. Selecione **Period 1, Experiment 1 - TOF MS (100 - 2000)** e depois clique em **OK**.

Figura 5-3 Caixa de diálogo Process All Overlays



Trabalhar com várias amostras

A caixa de diálogo **Process All Overlays**, que é mostrado sempre que traços sobrepostos são processados, permite que usuários escolham se querem processar todos os traços ou somente o traço ativo. Processar todos os traços é útil porque as operações subsequentes afetam todos os traços (amostras).

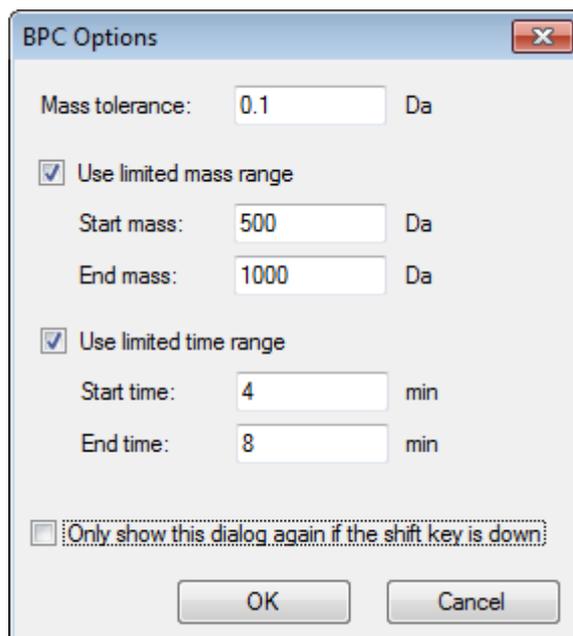
6. Selecione **All Overlaid**.
7. Selecione a opção **Only show the dialog again if the shift key is down** para tornar essa escolha a ação padrão.
8. Clique em **OK**.

Isso gera um painel contendo sobreposições das TICs de pesquisa. A cromatografia é muito reprodutível, e os picos dos metabólitos, intensos. Alguns metabólitos, alguns podem ser melhor observados quando ampliados e quando se comparam os cromatogramas (examine a região em cerca de 6 min) mas, geralmente, é necessário trabalho adicional. Existem várias formas de gerar gráficos que são mais fáceis de comparar. Para este exemplo, é usado um cromatograma de pico de base.

Nota: Se **File > Open Heat Map TICs from Wiff** estiver clicado, as visualizações de faixa podem ser geradas diretamente sem mostrar primeiro os cromatogramas sobrepostos.

9. Oculte o painel do TIC original e depois clique em **Show > Base Peak Chromatogram (BPC)**.
10. Na caixa de diálogo **BPC Options**, modifique as configurações, conforme necessário, para corresponder aos valores na [Figura 5-4](#) e depois clique em **OK**.

Figura 5-4 Caixa de diálogo BPC Options



Um cromatograma de pico de base é construído e representado em gráfico a intensidade do maior pico em cada varredura como uma função do tempo de retenção. Para fornecer informações adicionais, cada

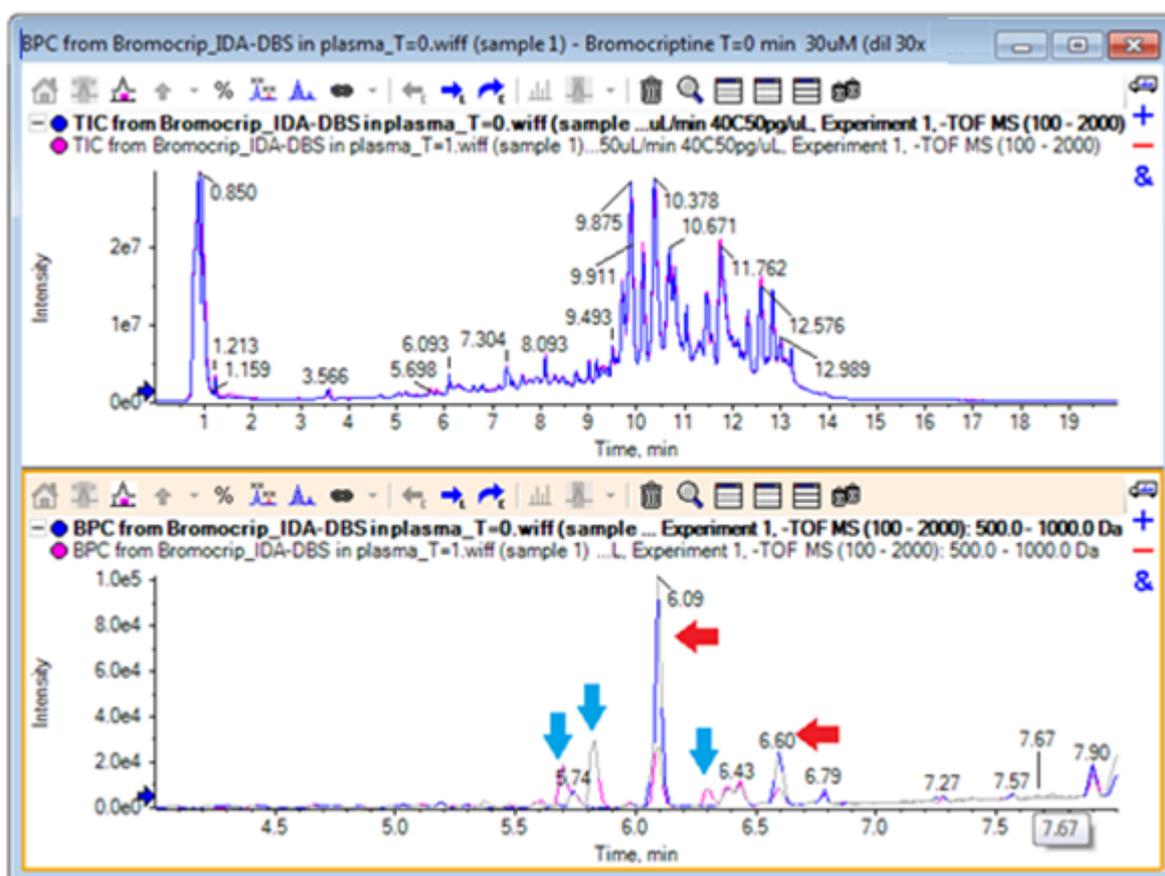
traço alterna entre sua cor normal e cinza quando a massa do pico da base altera para mais do que a tolerância de massa especificada nessa caixa de diálogo.

Opcionalmente, é possível limitar a faixa de massa considerada, podendo evitar artefatos causados por picos da linha de base ruidosos por exemplo, e definir a faixa de tempo de retenção para acelerar o processamento. Como sabemos que a massa da bromocriptina é aproximadamente 652, metabólitos simples não estarão abaixo de m/z de 500.

11. Na caixa de diálogo **Process All Overlays**, certifique-se de que a opção **All Overlaid** está selecionada e depois clique em **OK**.

Um novo painel mostra o BPC, que é muito mais simples e fácil de comparar do que os TICs originais.

Figura 5-5 BPC



Existem dois picos (marcados com setas vermelhas) que parecem diminuir na amostra de 1 hora (linha de cor rosa) comparados à amostra T = 0 (linha azul). Esses picos correspondem à bromocriptina (6,09 min.) e um isômero. Também existem três picos (setas azuis) que estão presentes na amostra T = 1, mas não na amostra T = 0. Esses são potenciais metabólitos.

Nota: O BPC pode ser muito útil, mas ele apenas reflete o comportamento do íon mais intenso (no intervalo de massa escolhido). Os picos de massa que nunca se tornam os picos de base nunca podem ser mostrados, então, use outras ferramentas ao buscar diferenças entre as amostras.

Trabalhar com várias amostras

12. Oculte o painel TIC.
13. Clique duas vezes no painel BPC em 6,09 min.
14. Selecione **All Overlaid** na caixa de diálogo **Process All Overlays** e depois clique em **OK**.

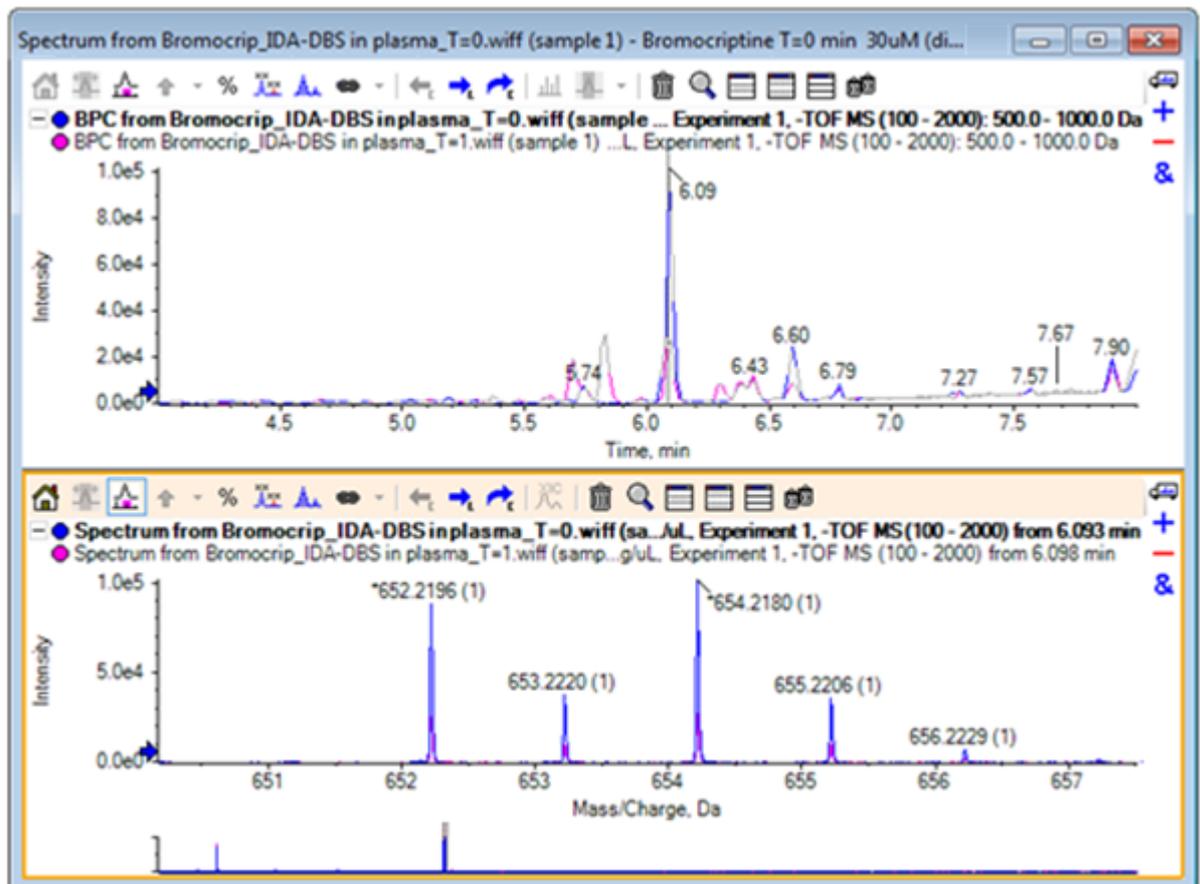
Isso gera dois espectros sobrepostos.

15. No painel de espectros, clique e depois dê zoom para mostrar o padrão isotópico em torno de m/z de 652. Consulte a [Figura 5-6](#).

O painel do espectro contém os espectros sobrepostos de duas amostras, para que elas possam ser facilmente comparadas. Neste exemplo, fica claro que a intensidade na amostra T = 1 hora (rosa) é menor do que na amostra T = 0.

O gráfico de visualização geral é muito útil ao observar dados de alta resolução como esses, porque ele fornece uma maneira de ver os detalhes enquanto mantém todo o espectro visível.

Figura 5-6 Padrão isotópico observado em torno de m/z de 652.



16. No painel Cromatograma, mova o cursor sobre a linha que mostra o tempo do espectro (anteriormente precisava de um clique duplo).
17. Quando o cursor mudar para uma seta dupla, arraste-o para o pico em aproximadamente 5,8 min.

O espectro continua a mostrar o intervalo de massa expandido, que agora somente possui ruído e pequenos picos. Para mostrar os picos rosa intensos na janela principal, arraste o retângulo rosa no gráfico de visualização geral indicado por um seta preta abaixo. A visualização volta ao normal quando o mouse é solto.

Para a [Figura 5-8](#), o ícone **Rótulo e traços sobrepostos** foi selecionado.

Figura 5-7 BPC e espectro

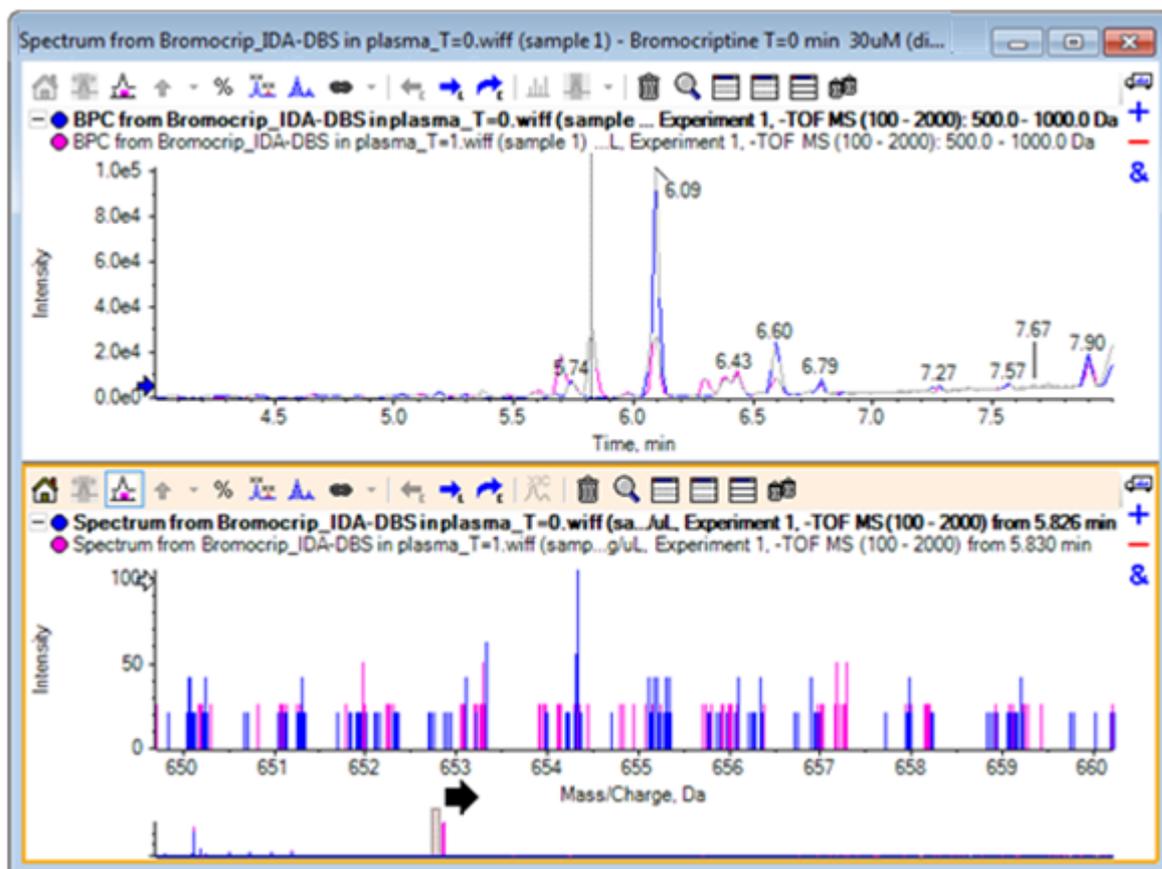
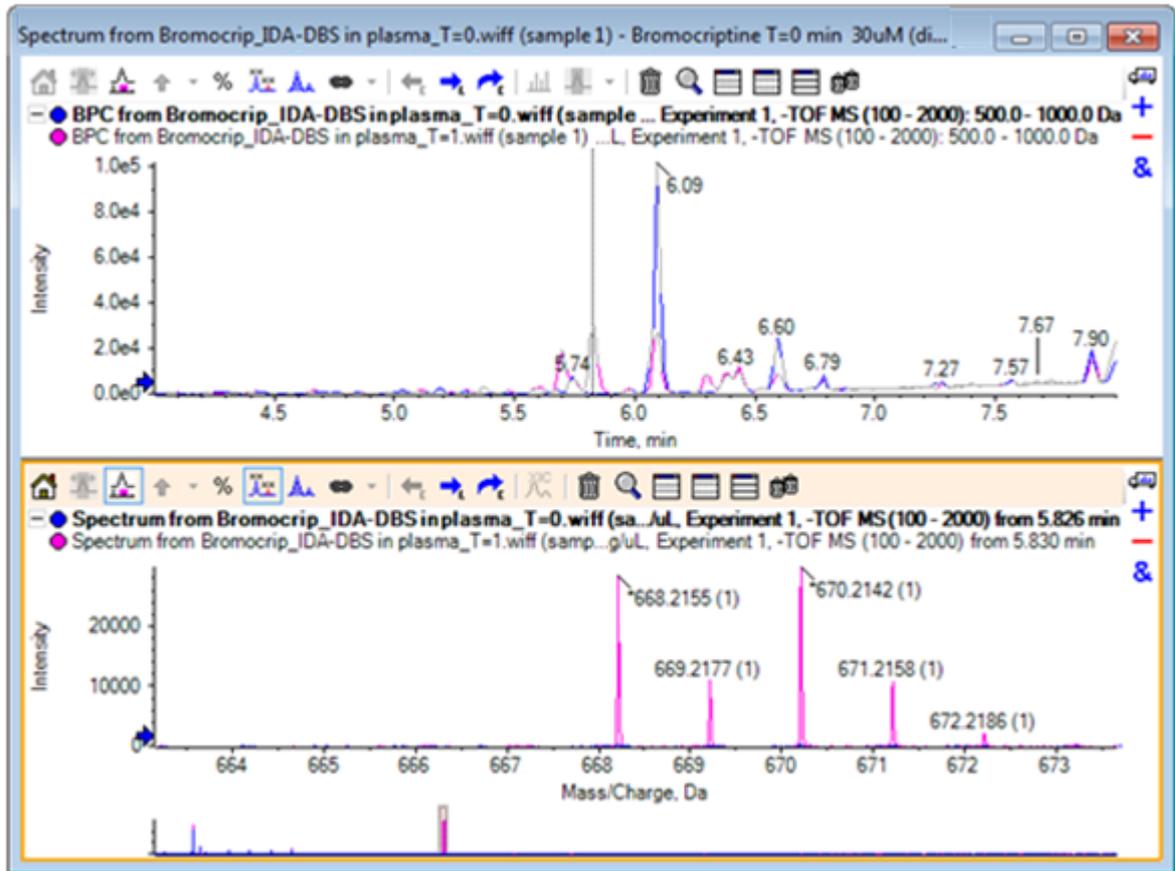


Figura 5-8 Opção BPC e espectro com rótulo de todos os traços sobrepostos aplicada



Esses picos estão ausentes na amostra T = 0.

18. Feche todas as janelas abertas antes continuar.

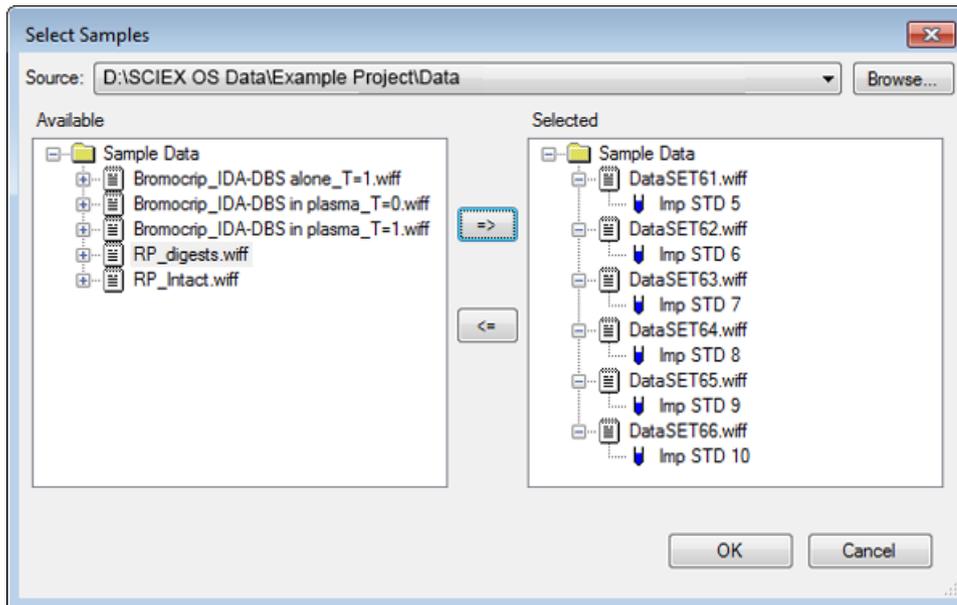
Trabalhar com mais de duas amostras

Com mais de duas amostras sobrepostas, as janelas podem se tornar confusas e as diferenças mais difíceis de associar à amostra correta. O software contém outras ferramentas para ajudar a mostrar os dados de várias amostras.

O conjunto de dados usado para o exemplo é de uma análise de perfil de impureza de seis conjuntos de dados diferentes.

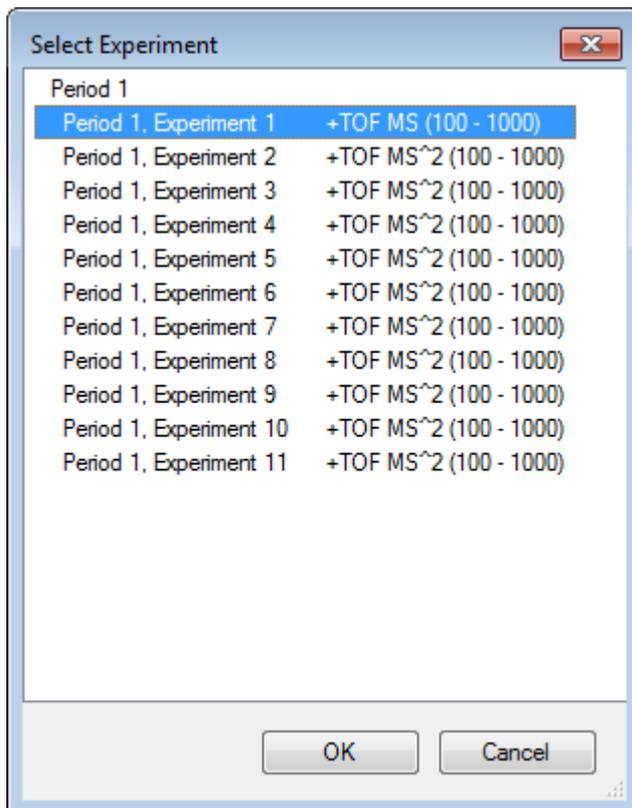
1. Clique em **File > Open Multiple Samples**.
2. Selecione os arquivos **DataSet61.wiff to DataSet66.wiff** e depois mova-os para o painel **Selected**.

Figura 5-9 Várias amostras selecionadas



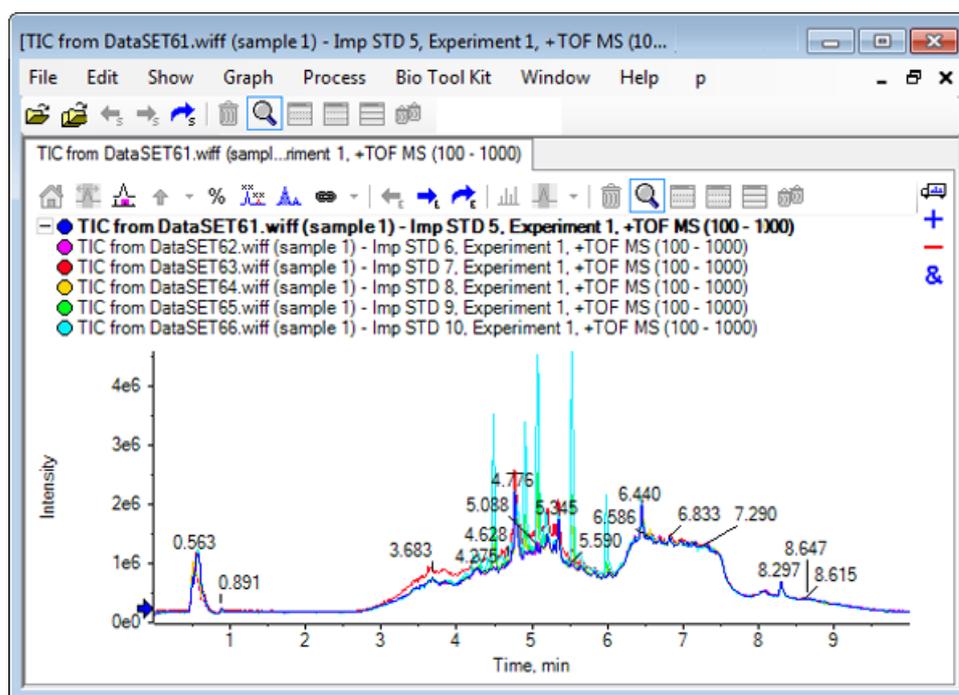
3. Clique em **OK**.
4. Clique em **Show > Total Ion Chromatogram (TIC)**.
5. Selecione **Period 1, Experiment 1** da caixa de diálogo **Select Experiment**.

Figura 5-10 Caixa de diálogo Select Experiment



6. Clique em **OK**.
7. Na caixa de diálogo **Process All Overlays**, selecione **All Overlaid** e depois clique em **OK**. O gráfico mostra a sobreposição de um cromatograma TIC para cada amostra no arquivo.

Figura 5-11 TICs sobrepostas do Experimento 1 do DataSet61.wiff até DataSet66.wiff



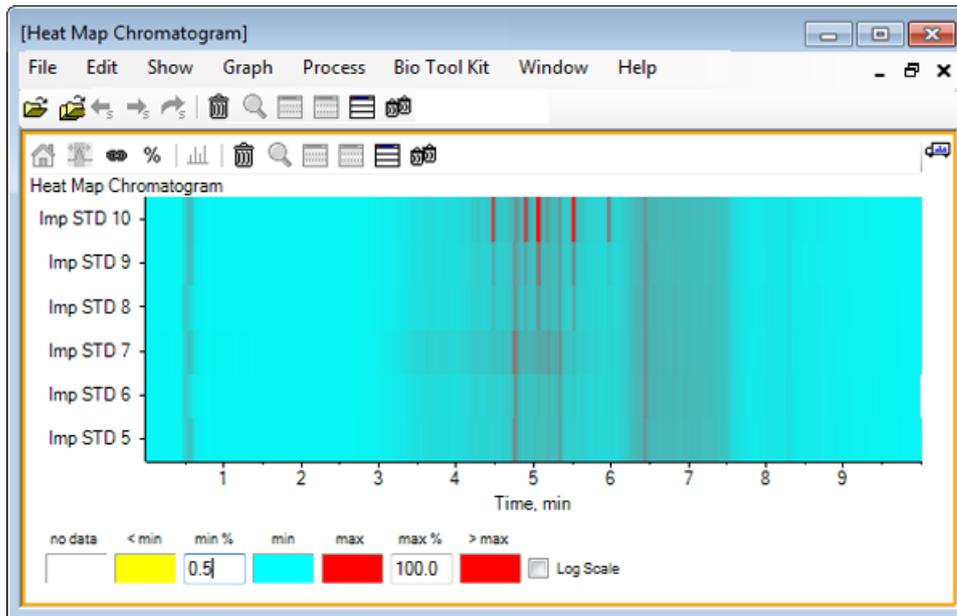
O título do traço ativo é mostrado em negrito. Clicar no ícone à esquerda desse título diminui os cabeçalhos a uma linha única, que fornece mais espaço para as informações.

8. Clique em **Show > Overlaid Traces as Heat Map** e, depois, no painel resultante, configure os controles de cor para que % mín. seja **0,5**, e % máx. seja **100**.

Dica! Clique com o botão direito e depois selecione **Show Appearance Control** se os controles não estiverem visíveis.

9. Clique dentro do painel do cromatograma e depois clique no ícone **Ocultar todos os outros painéis**.

Figura 5-12 Cromatograma de mapa de calor



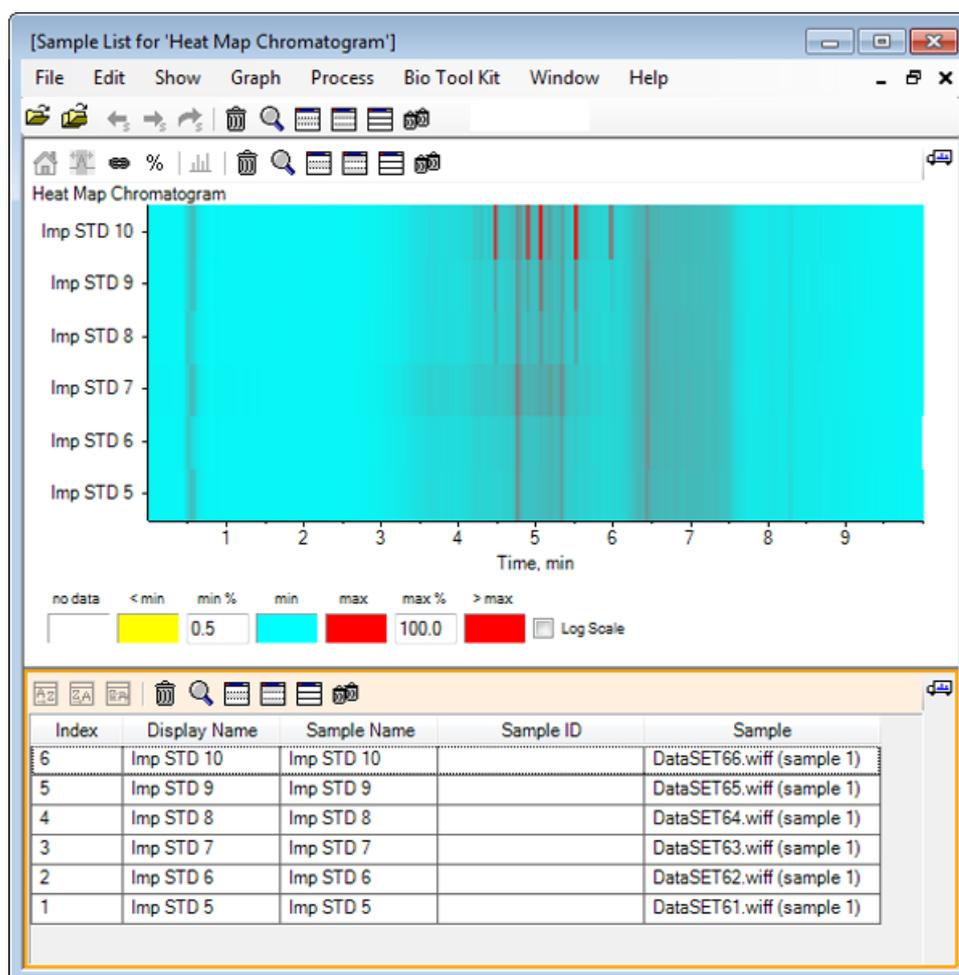
Cada amostra é representada por uma faixa horizontal única que mostra seu TIC, codificado por cor, de acordo com a intensidade. Usando o esquema de cores acima, o amarelo representa os pontos em que nenhum dado foi obtido ou em que a intensidade é menor do que 0,5% para em qualquer amostra, o azul representa 0,5% e o vermelho representa o sinal mais intenso.

A janela mostra de seis a sete picos (entre 4,5 min e 6,5 min) e que as respostas variam, exceto para o pico em 6,5 min.

A ordem dos picos é a mesma na qual as amostras foram adquiridas e talvez não seja o ideal. Neste exemplo, a ordem está adequada.

10. Clique com o botão direito no painel e depois clique em **Show Samples Table**. Inicialmente, a tabela de amostras é mostrada à direita do mapa de calor. O ícone **Arrastar e soltar para reorganizar os painéis** no canto superior direito do painel pode ser usado para arrastar o painel à parte inferior do mapa de calor para mover a tabela abaixo do painel original.

Figura 5-13 Lista de amostras para o cromatograma do mapa de calor

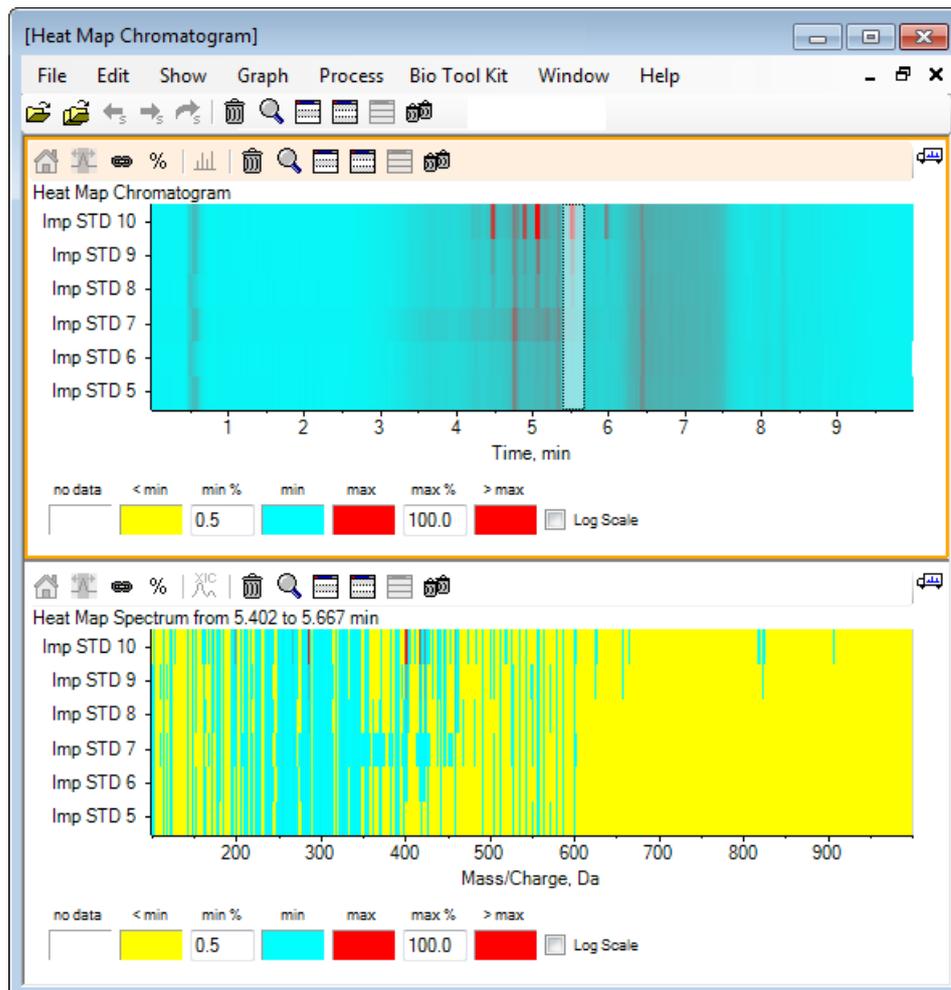


A tabela contém colunas para os vários campos de texto associados a cada amostra. A coluna **Display Name** é editável, as outras são somente leitura. Todas as colunas podem ser usadas para organizar a tabela e a visualização da amostra.

11. Faça uma seleção no Imp STD 10 em torno de 5,5 min, depois clique duas vezes dentro dele.

Um painel de Espectro de mapa de calor é gerado e a faixa de massa completa é mostrada no eixo x.

Figura 5-14 Espectro do mapa de calor



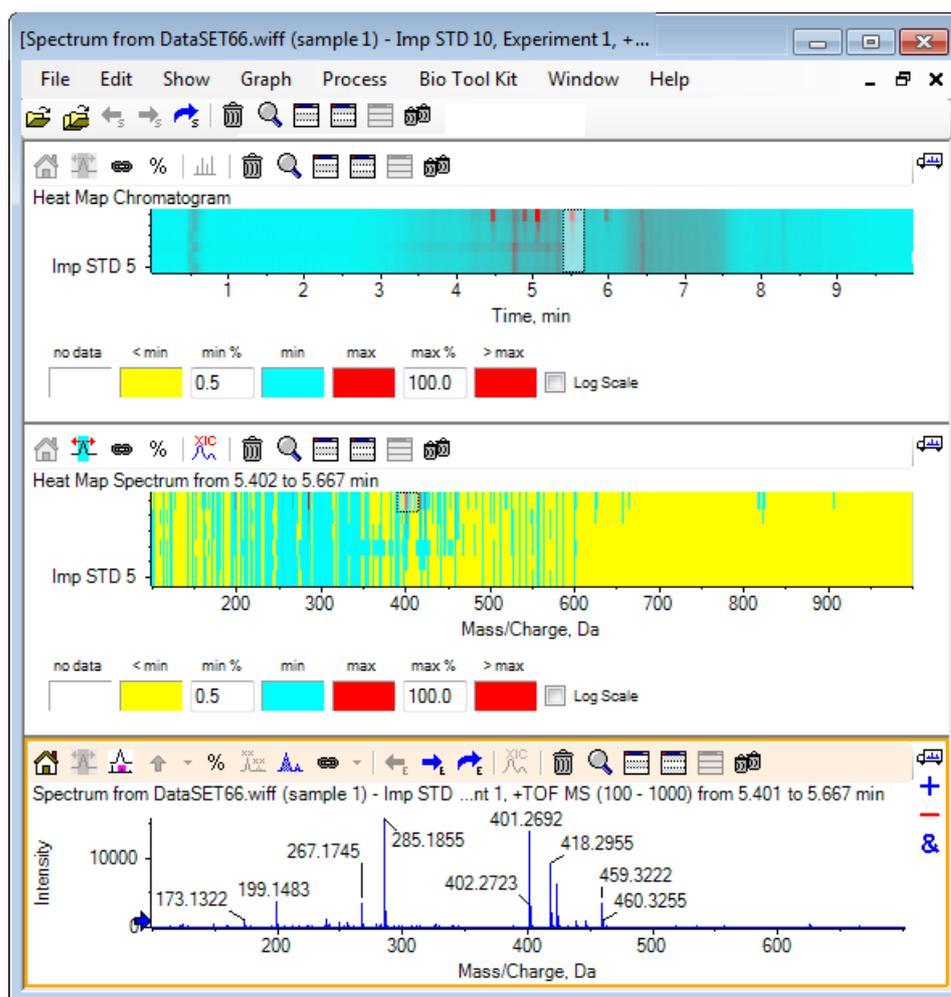
Do espectro, pode-se determinar que duas massas (entre m/z de 400 e m/z de 460) contribuem para a maior intensidade na região de tempo selecionada.

12. Selecione a massa ao redor de 401 Da para a amostra Imp STD 10 e depois clique com o botão direito para selecionar **Show Spectra for Selected Samples**.

Isso criará um espectro para essa amostra selecionada. O espectro neste momento é mostrado. Consulte a [Figura 5-15](#).

13. Clique duas vezes na massa ao redor de 401 Da no espectro do mapa de calor para gerar um XIC do mapa de calor.

Figura 5-15 Espectro



Resumo

Nesta seção, as seguintes tarefas foram discutidas:

- Trabalhar com várias ferramentas de amostra disponíveis no software.
- Comparar duas amostras com cromatogramas sobrepostos e espectros interativos.
- Comparar várias amostras com visualizações de mapa de calor.

Essa seção ilustra algumas das opções disponíveis sob o item no menu **Bio Tool Kit** no software.

Nota: O recurso MicroApp do kit de ferramentas biológicas deve ser ativado para acessar essa funcionalidade. Até que a ativação seja concluída, as únicas opções disponíveis são Peptide Fragments, Add Manual Reconstruct Highlights e Remove Manual Reconstruct Highlights. Consulte a seção Ativar o recurso do MicroApp do kit de ferramentas biológicas no documento *Notas de versão*.

Sequência manual

Use essa opção para sequenciar manualmente dados espectrais de MS/MS de uma amostra de proteína digerida.

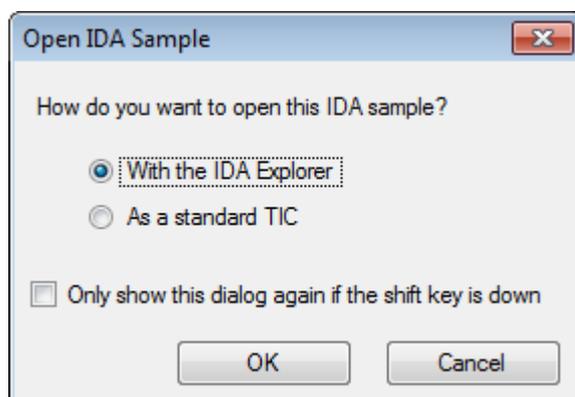
1. Clique no ícone **Abrir amostra** na barra de ferramentas principal.

A caixa de diálogo **Select Sample** se abre.

2. Se a pasta **Sample Data** não estiver selecionada, clique em **Browse** e navegue até a pasta **Sample Data**.
3. Selecione o arquivo **RP_digests.wiff** e depois clique em **OK**.

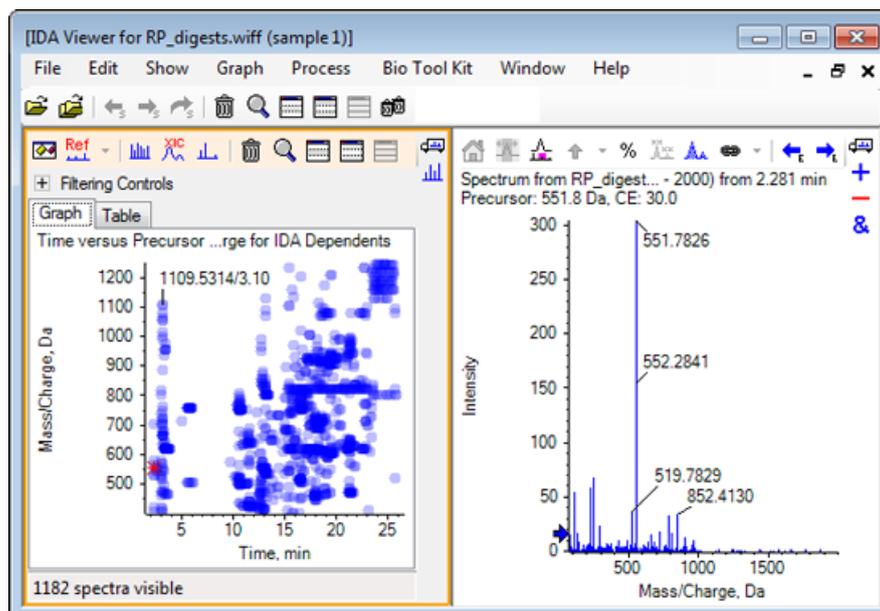
A caixa de diálogo **Open IDA Sample** se abre.

Figura 6-1 Caixa de diálogo Open IDA Sample



4. Garanta que a opção **With the IDA Explorer** esteja selecionada e depois clique em **OK**.

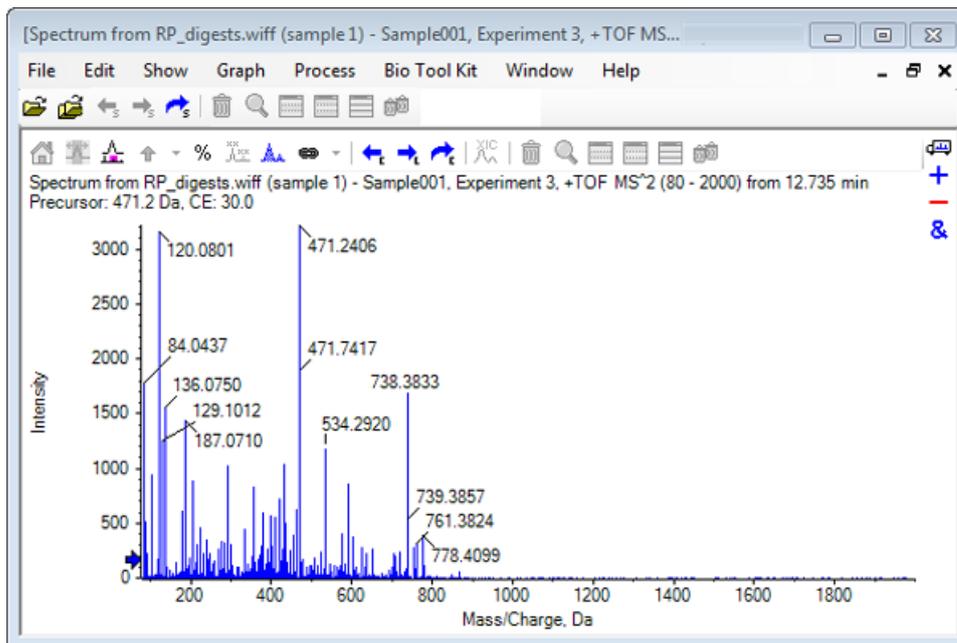
Figura 6-2 Espectro de RP_digests.wiff



5. Clique na aba **Table** .
6. Selecione *m/z* 471,2398 em **Time** 12,73.
7. Com o painel de espectro ativo, clique em **Graph > Duplicate Graph**.

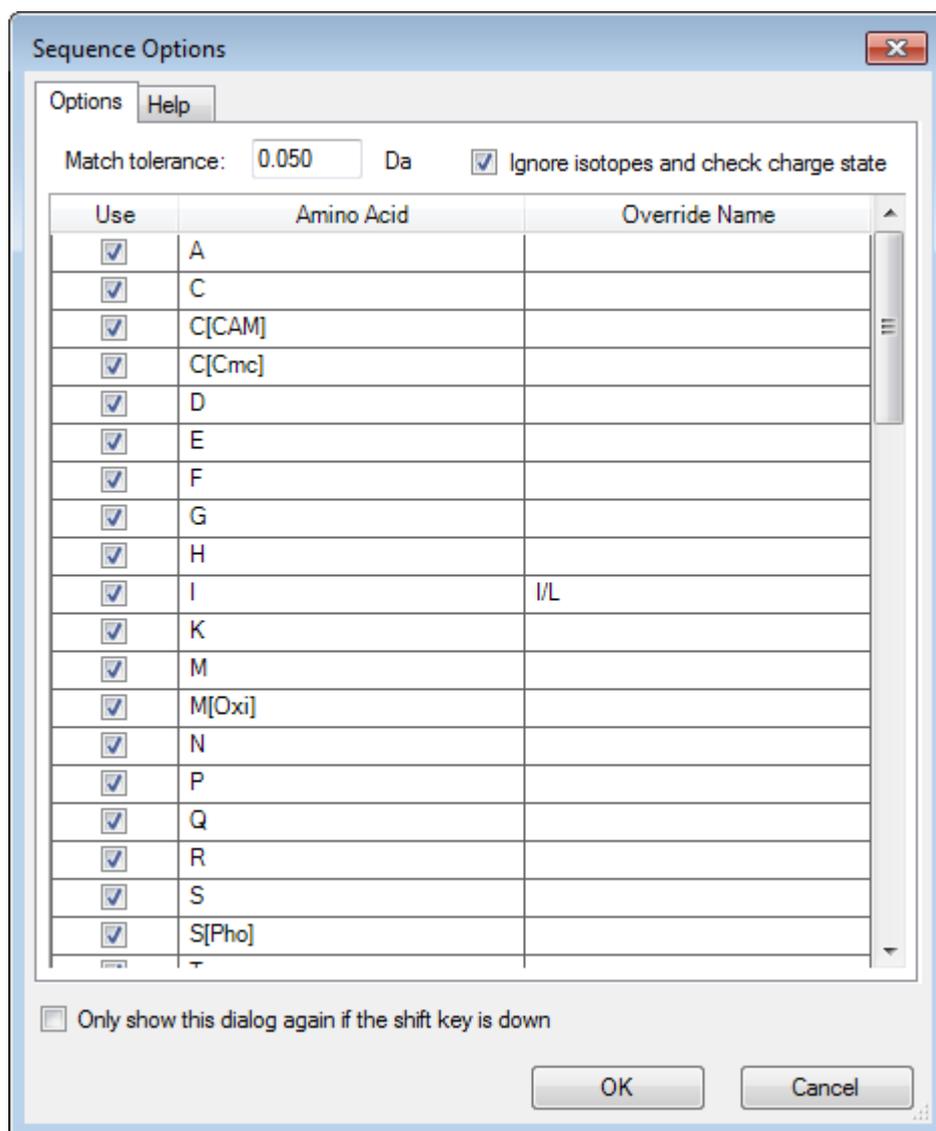
Um novo painel de espectro para o precursor selecionado (471,2) se abre. O painel do explorador IDA e seu painel de espectro associado podem ser excluídos.

Figura 6-3 Espectro para o precursor 471,2398 no tempo de retenção 12,73



8. Selecione o pico em **738,3833**.
9. Clique em **Bio Tool Kit > Manual Sequence**.
A caixa de diálogo **Sequence Options** se abre.

Figura 6-4 Caixa de diálogo Sequence Options

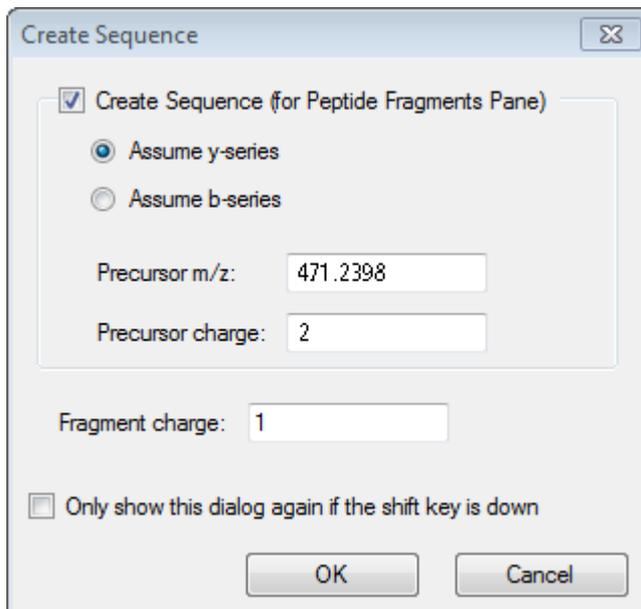


Nota: Quando a caixa de marcação Ignore isotopes and check charge state estiver selecionada, os isótopos e quaisquer picos com um estado de carga incorreto serão desconsiderados pelo software ao propor o aminoácido subsequente.

10. Clique em **OK**.

A caixa de diálogo **Create Sequence** se abre.

Figura 6-5 Caixa de diálogo Create Sequence

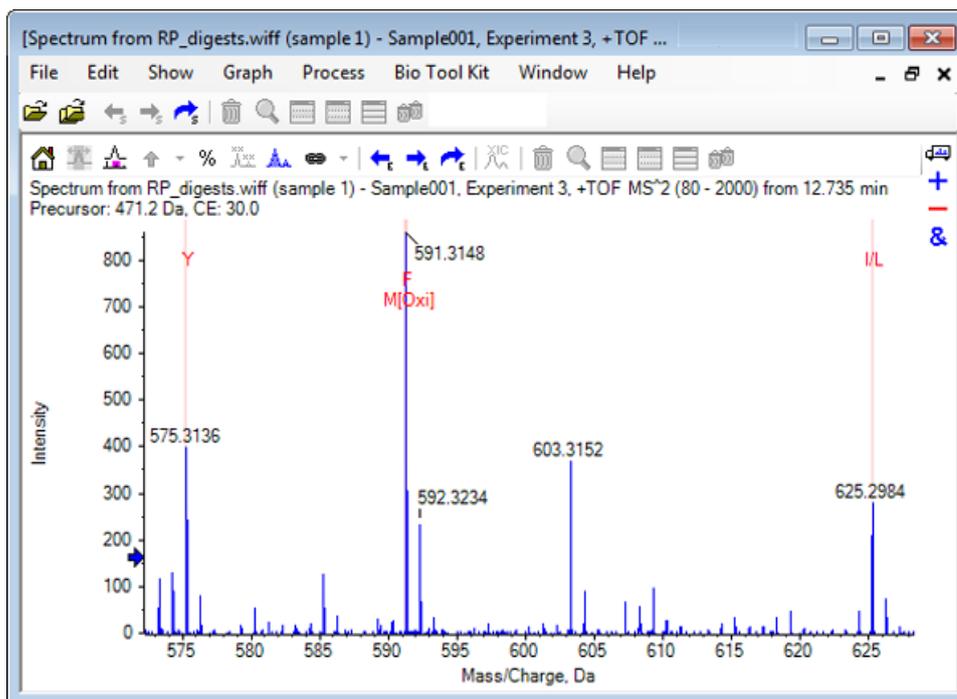


Nota: Essa caixa de diálogo permite que o usuário altere as suposições feitas para íons das séries y e b e o estado de carga depois que o arquivo for sequenciado manualmente e também, observar qual dos parâmetros usados induz melhor identificação para os dados.

11. Garanta que a opção **Create Sequence (for Peptide Fragments Pane)** esteja selecionada.
12. Digite **2** no campo **Precursor charge**.
13. Digite o valor da carga do pico selecionado para seguir na sequência manual no campo **Fragment Charge**.
14. Clique em **OK**.

O software é atualizado, mostrando um painel de espectro atualizado com linhas verticais vermelhas indicando o primeiro conjunto de possíveis aminoácidos ganhos ou perdidos nos dados espectrais.

Figura 6-6 Espectro sequenciado manualmente - Possibilidades iniciais

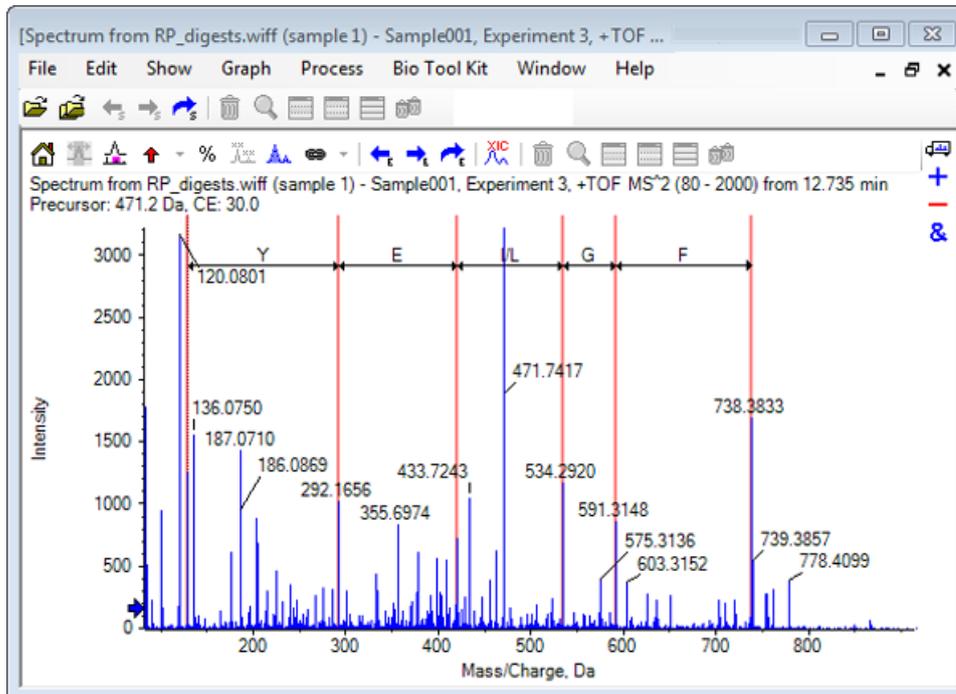


15. Clique duas vezes na legenda da linha vertical vermelha para ser sequenciada posteriormente.

O software atualiza, indicando o próximo conjunto de aminoácidos nos dados espectrais.

16. Repita a etapa 15 até que todos os aminoácidos possíveis tenham sido sugeridos.

Figura 6-7 Espectro sequenciado manualmente



Nota: Na [Figura 6-7](#), as legendas foram clicadas na seguinte ordem: F > G > I/L > E > Y.

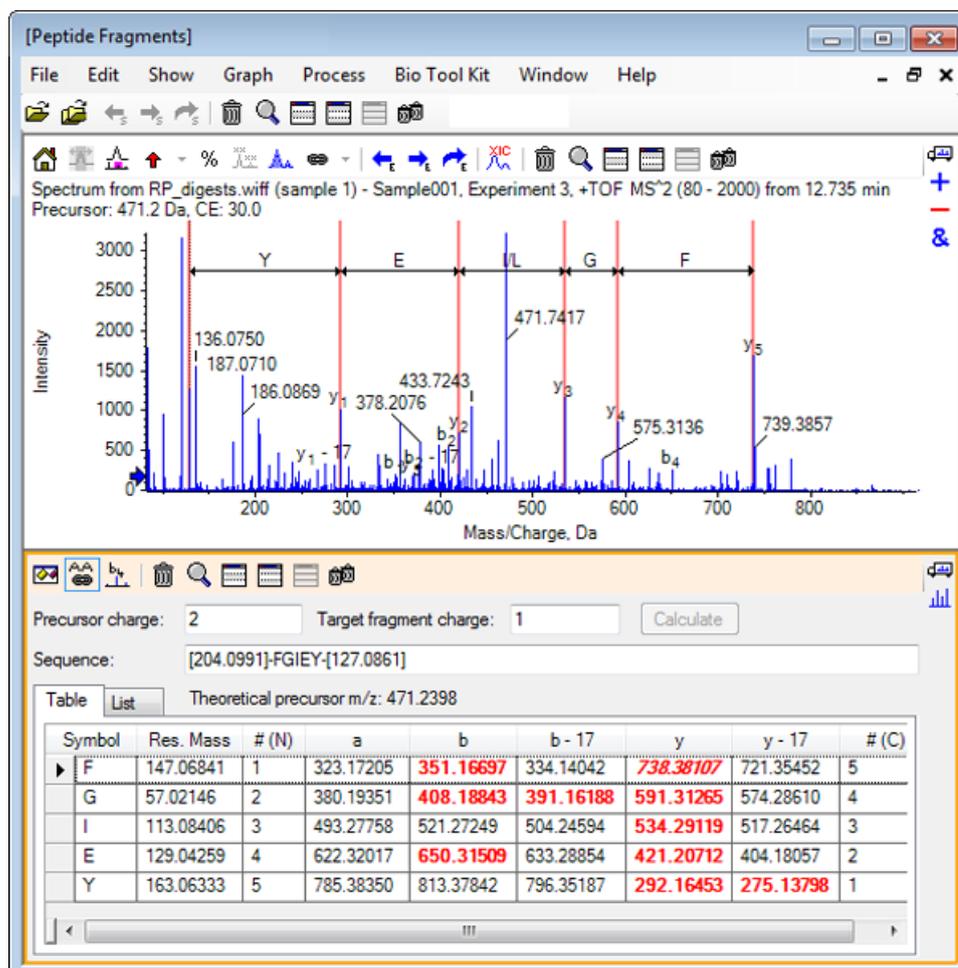
Dica! Se o software sugerir mais de uma possibilidade e você quiser seguir um caminho diferente daquele sugerido inicialmente, retorne para o gráfico de visualização inicial e repita esse procedimento selecionando um aminoácido alternativo correspondente.

Sequenciamento manual vinculado a fragmentos de peptídeo

1. Clique em **Bio Tool Kit > Peptide Fragments**.

O painel de fragmentos de peptídeo se abre, vinculado ao espectro sequenciado manualmente.

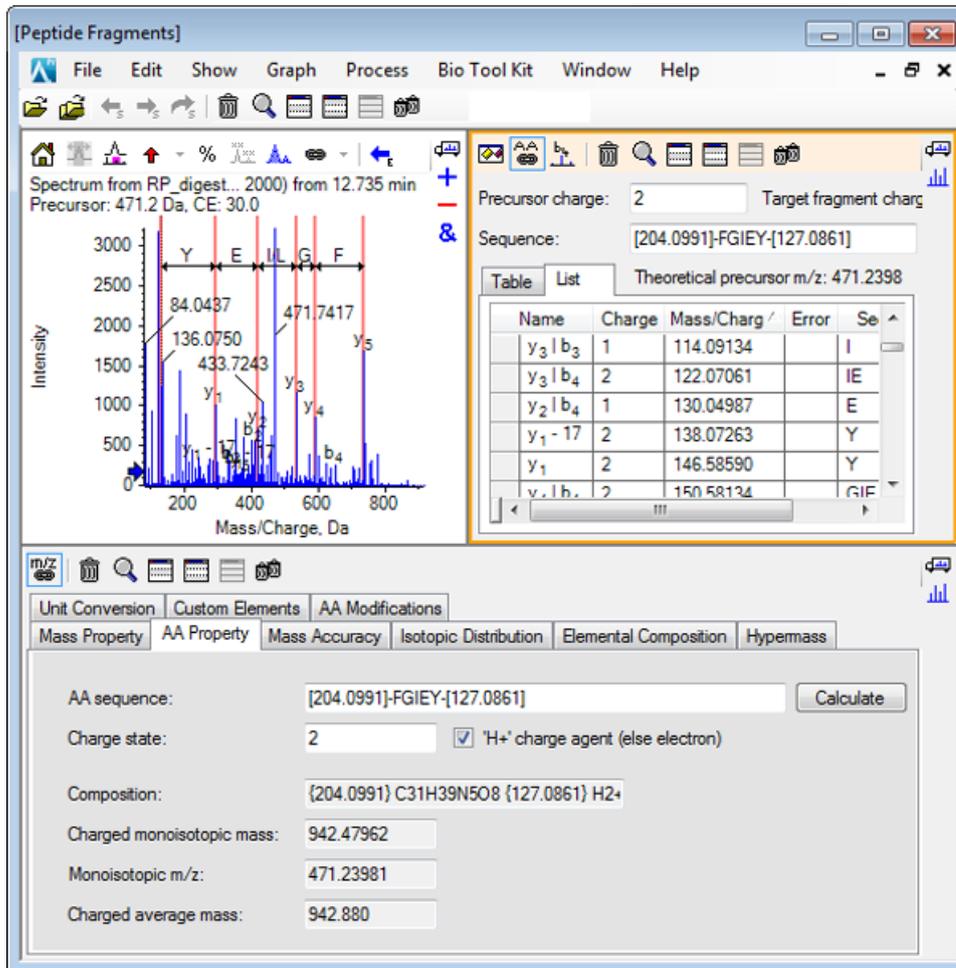
Figura 6-8 Painel de fragmentos de peptídeo vinculados ao espectro sequenciado manualmente



Nota: Aminoácidos que correspondem aos dados experimentais são mostrados na cor vermelha em negrito, nas colunas da aba Table. Aminoácidos que correspondem aos dados experimentais, mas que possuem uma carga de fragmento alvo diferente, são mostrados na cor vermelha em itálico nas colunas da aba Table.

2. Clique na aba **List**.
3. Clique em **Show** > **Mass Calculators**.
4. Clique na aba **AA Property**.

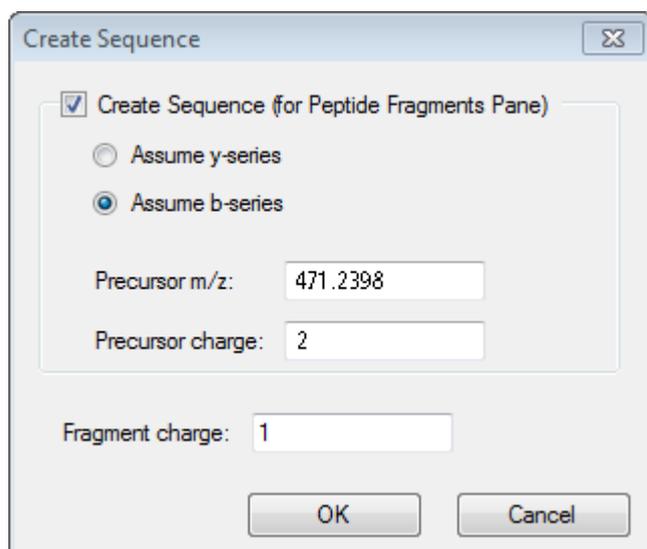
Figura 6-9 Calculadora de massa - aba AA Property



Nota: De forma padronizada, a calculadora de massa é vinculada automaticamente ao espectro sequenciado manualmente. As seqüências de aminoácidos do espectro são mostradas no campo **AA sequence**.

- Com o painel de espectro ativo, clique em **Bio Tool Kit > Set Sequence Creation Parameters**.
A caixa de diálogo **Create Sequence** se abre.

Figura 6-10 Caixa de diálogo Create Sequence



6. Complete a caixa de diálogo **Create Sequence** conforme o seguinte:

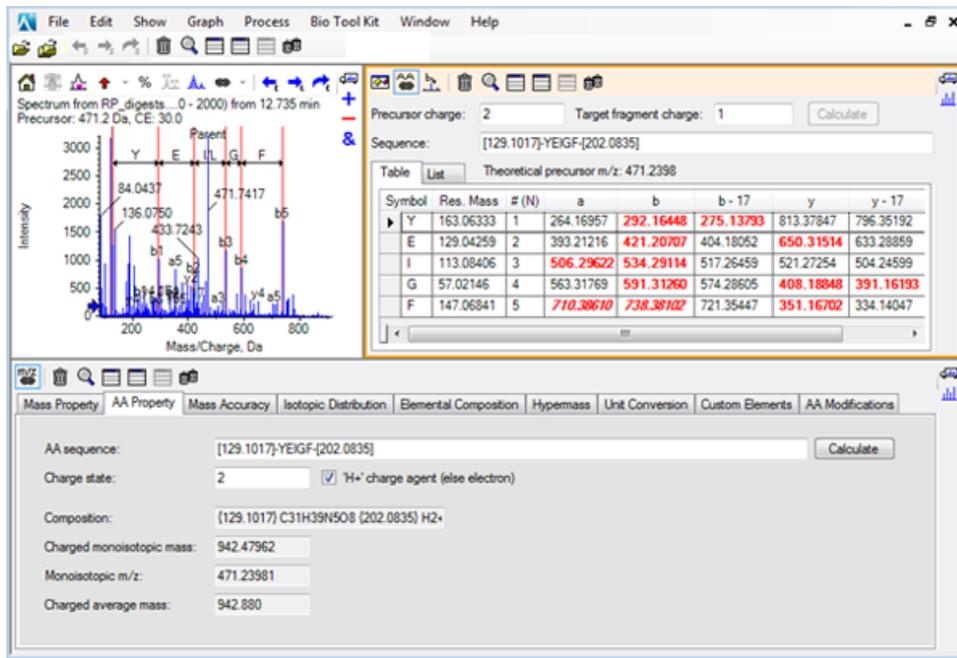
- Garanta que a opção **Create Sequence (for Peptide Fragments Pane)** esteja selecionada.
- Selecione a opção **Assume b-series**.
- Digite **471,2398** no campo **Precursor m/z**.
- Digite **2** no campo **Precursor charge**.
- Digite **1** no campo **Fragment charge**.

7. Clique em **OK**.

O painel Peptide Fragments e o painel Mass Calculators são atualizados com os novos dados da sequência.

8. Clique na aba **Table** no painel **Peptide Fragments**.

Figura 6-11 Painel de fragmentos de peptídeo vinculados ao espectro sequenciado manualmente atualizado



9. Com o painel de espectro ativo, clique em **Bio Tool Kit > Clear Manual Sequencing**.

Todas as marcações da sequência manual são removidas.

Incluir e remover marcações incluídas de reconstrução manual

Use a opção **Add Manual Reconstruct Highlights** para incluir marcadores indicando as posições teóricas de m/z de determinada massa para um espectro. Esse recurso é útil para confirmar se os picos particulares em um espectro correspondem ao mesmo componente quando os espectros contêm componentes de várias cargas. Use a opção **Remove Manual Reconstruct Highlights** para remover os marcadores.

Dica! Arraste a linha vertical do marcador para uma nova faixa de m/z para mover o marcador até um novo local.

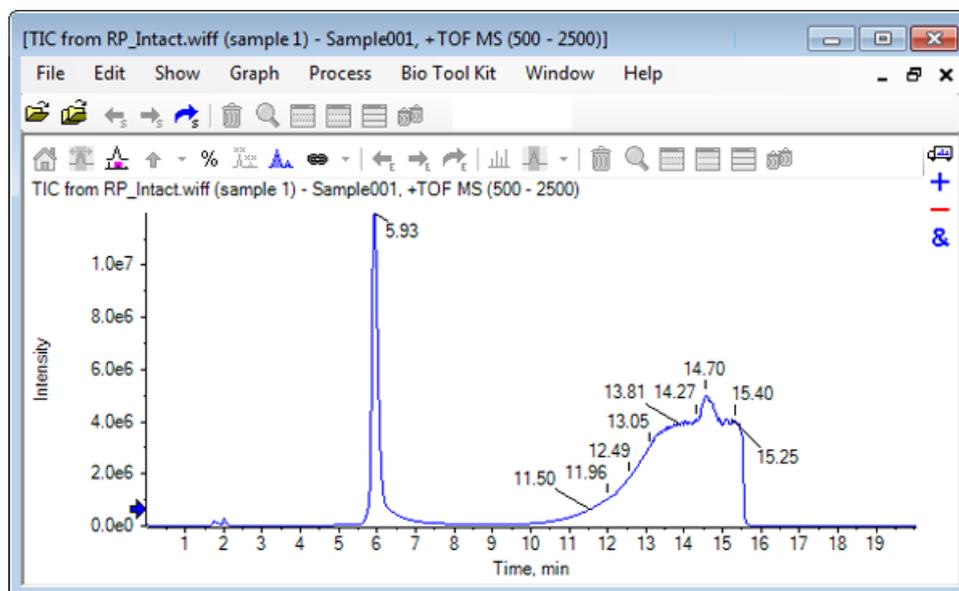
Dica! Clique na linha vertical do marcador ou no rótulo de estado de carga correspondente para tornar o marcador ativo. O marcador ativo mostra o local em m/z .

1. Clique no ícone **Abrir amostra** na barra de ferramentas principal.

A caixa de diálogo Select Sample se abre.

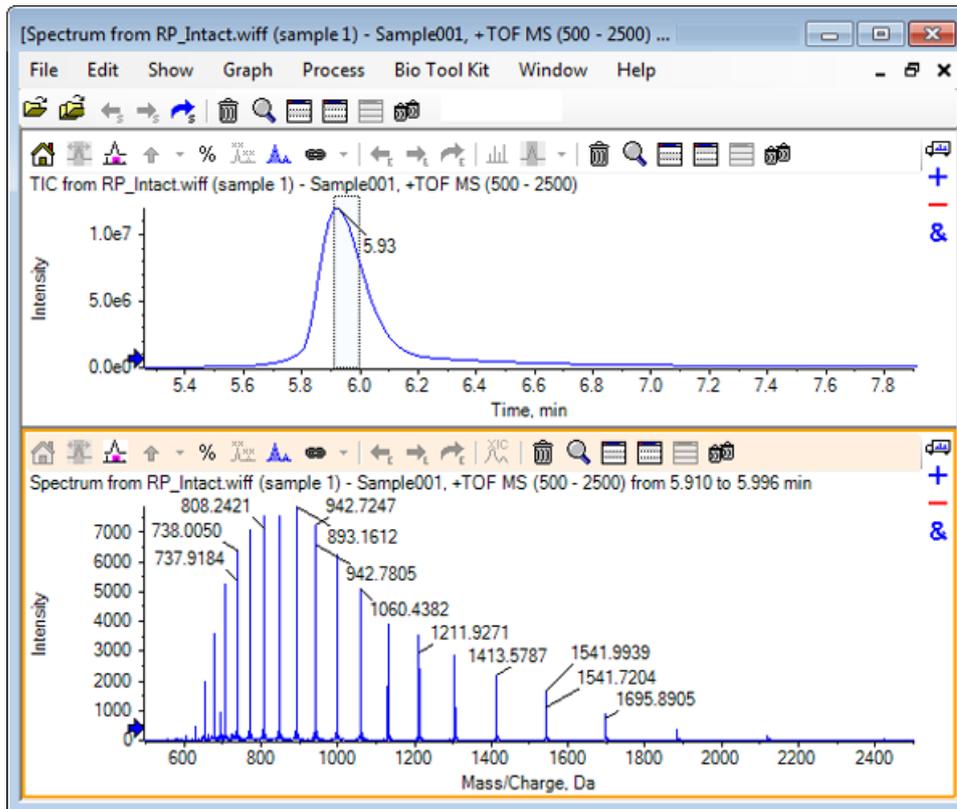
2. Se a pasta **Sample Data** não estiver selecionada, clique em **Browse** e navegue até a pasta **Sample Data**.
3. Selecione o arquivo **RP_Intact.wiff** e depois clique em **OK**.

Figura 6-12 TIC do arquivo RP_Intact.wiff



4. Crie um espectro médio usando a região superior (5,91 a 6,00 min.) do pico de mioglobina.

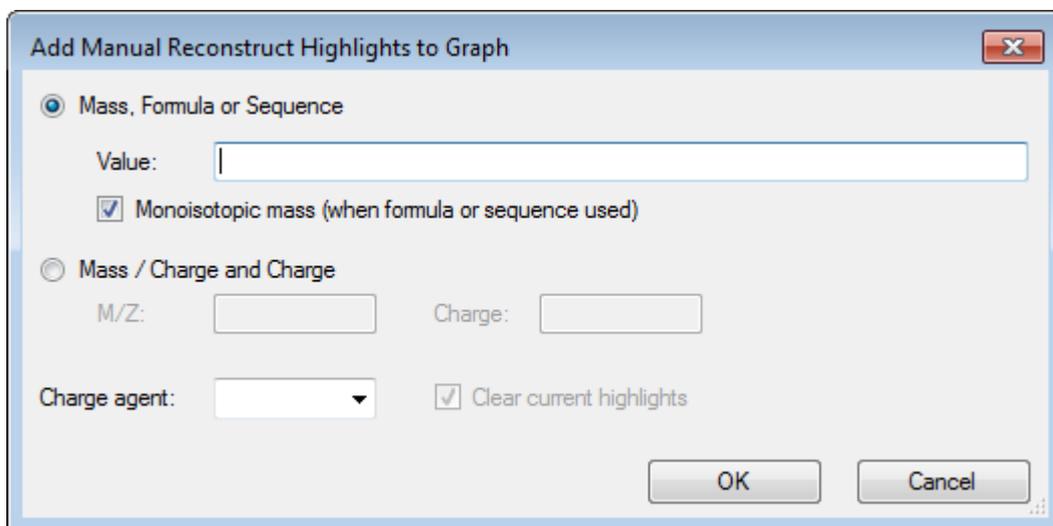
Figura 6-13 Espectro médio



5. Com o painel de espectro ativo, clique em **Bio Tool Kit > Add Manual Reconstruct Highlights**.

A caixa de diálogo **Add Manual Reconstruct Highlights to Graph** se abre.

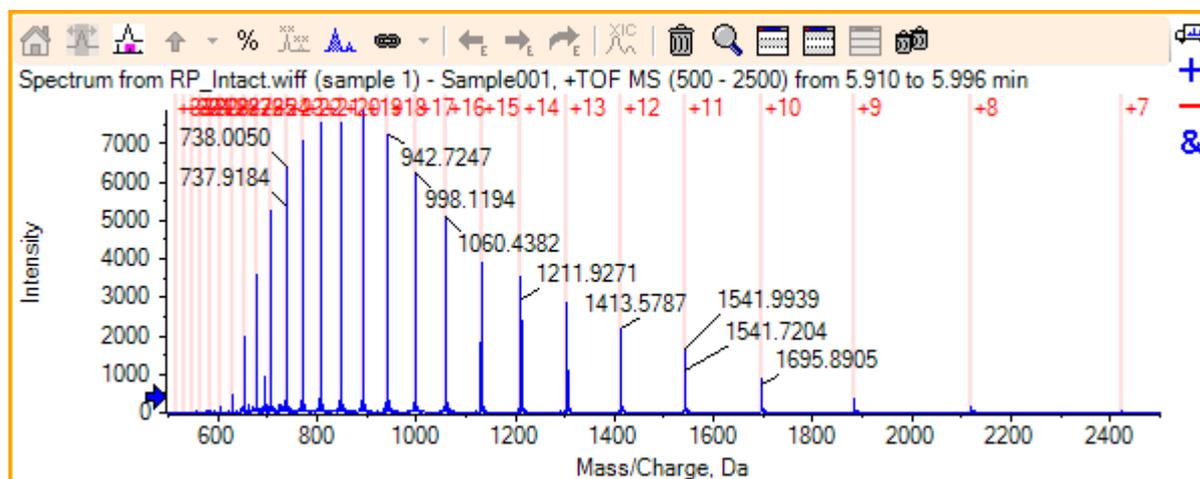
Figura 6-14 Incluir marcação de reconstrução manual no gráfico



6. Digite **16950** no campo **Value**.
7. Selecione **H+** como o **Charge Agent** e depois clique em **OK**.

O gráfico é atualizado, contendo os destaques.

Figura 6-15 Espectro com marcações incluídas



8. Clique em **Bio Tool Kit > Remove Manual Reconstruct Highlights** para remover os marcadores.

O gráfico é atualizado, com as marcações removidas.

Digerir proteína

Use essa opção para obter informações sobre sequências teóricas de peptídeos que resultam de uma clivagem enzimática definida pelo usuário de uma proteína específica.

Barra de ferramentas



Use os ícones na barra de ferramentas para facilitar a visualização, conforme necessário.

Tabela 6-1 Ícones da barra de ferramentas

Ícone	Nome (dica de ferramenta)
	Localizar e substituir na sequência
	Converter seleção para letras maiúsculas
	Localizar sequência

Trabalhar com o Kit de ferramentas biológicas

Nota: Os últimos seis ícones nessa barra de ferramentas, começando com o ícone Excluir esse painel, estão descritos em [Barra de ferramentas genéricas do painel](#).

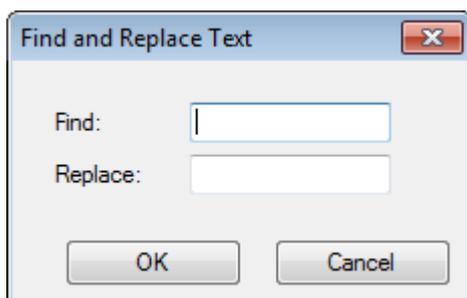
Localizar e substituir na sequência

Use essa opção para localizar texto existente no campo **Sequence** e substituí-lo pelo novo texto.

1. Clique no ícone **Localizar e substituir em sequência**.

A caixa de diálogo **Find and Replace Text** é aberta.

Figura 6-16 Caixa de diálogo Find and Replace Text



2. Digite as informações a serem substituídas no campo **Find**.
3. Digite as informações adequadas no campo **Replace**.
4. Clique em **OK**.

O software substitui o texto existente pelo texto especificado pelo usuário.

Converter seleção para letras maiúsculas

Use essa opção para converter o texto digitado no campo **Sequence** em letras minúsculas para letras maiúsculas.

1. Selecione o texto adequado.
2. Clique no ícone **Convert selection to uppercase**.

O software substitui o texto em letras minúsculas pelo mesmo texto em letras maiúsculas.

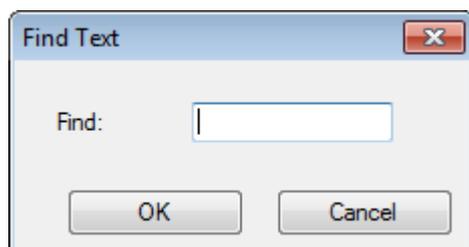
Localizar sequência

Use essa opção para localizar um texto no campo **Sequence**.

1. Clique no ícone **Localizar sequência**.

A caixa de diálogo **Find text** é aberta.

Figura 6-17 Diálogo Find Text



2. Digite as informações adequadas no campo **Find**.
3. Clique em **OK**.

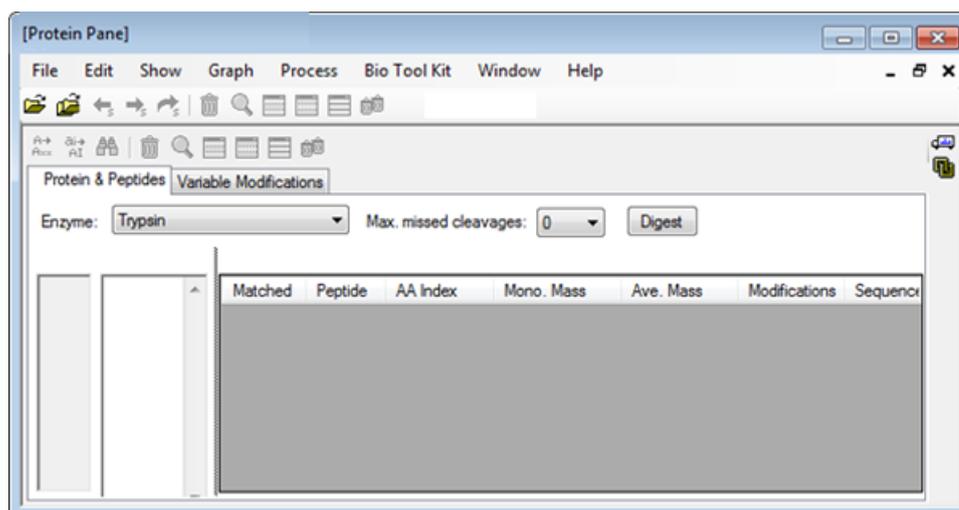
O software destaca o texto correspondente.

Digestão teórica de proteína

1. Clique em **Bio Tool Kit > Digest Protein**.

O painel **Protein** é aberto.

Figura 6-18 Painel Protein - aba Protein & Peptides



2. Digite uma sequência de proteína ou peptídeo no campo fornecido.

Nota: Para esse tutorial, GLSDGEWQQV LNVWGKVEAD IAGHGQEVLI RLFTGHPETL EKFDKFKHLK TEAEMKASED LKKHGTVVLT ALGGILKKKG HHEAELKPLA QSHATKHKIP IKYLEFISDA IIHVLHSKHP GDFGADAQGA MTKALELFRN DIAAKYKELG FQG (sequência de uma mioglobina) foi usado.

3. Selecione **Enzyme**.

Trabalhar com o Kit de ferramentas biológicas

Nota: Para esse tutorial, foi selecionada tripsina.

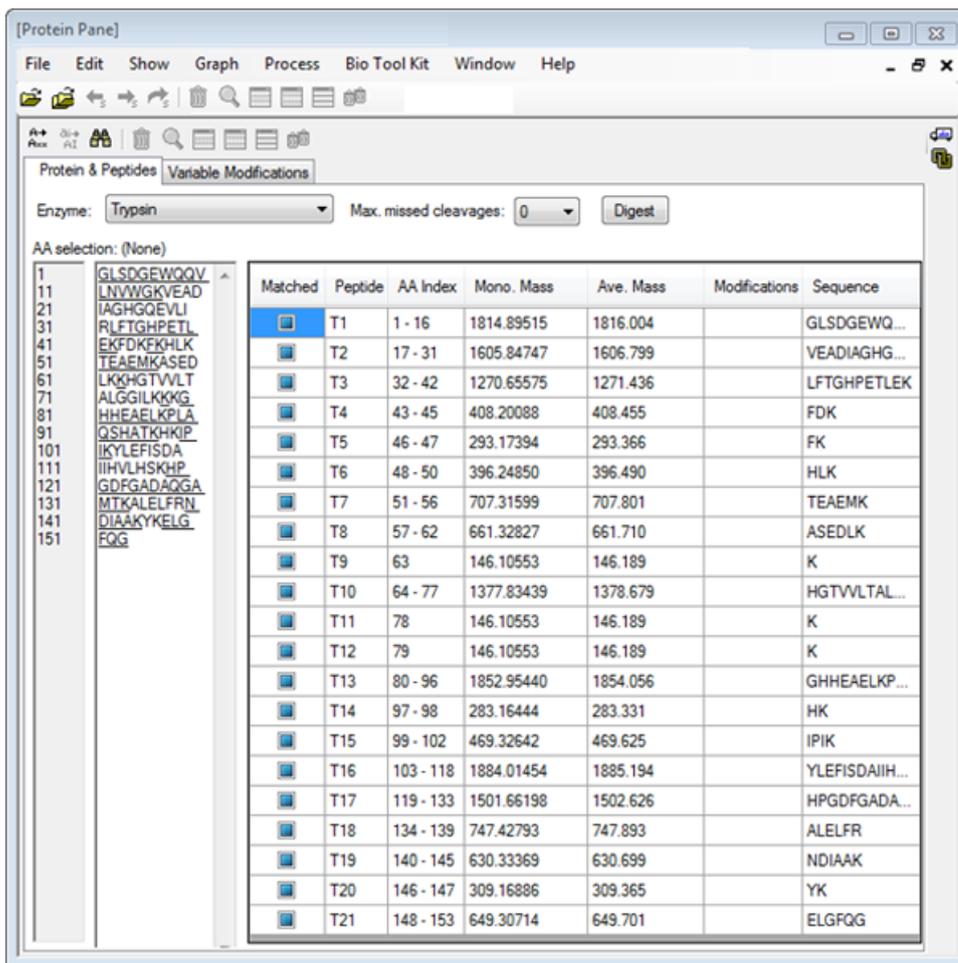
4. Selecione o **Max missed cleavages**.

Nota: Para esse tutorial, foi selecionado 0.

5. Clique em **Digest**.

O software preenche a tabela com informações teóricas dos peptídeos digeridos e suas sequências.

Figura 6-19 Painel de proteína preenchido com informações teóricas

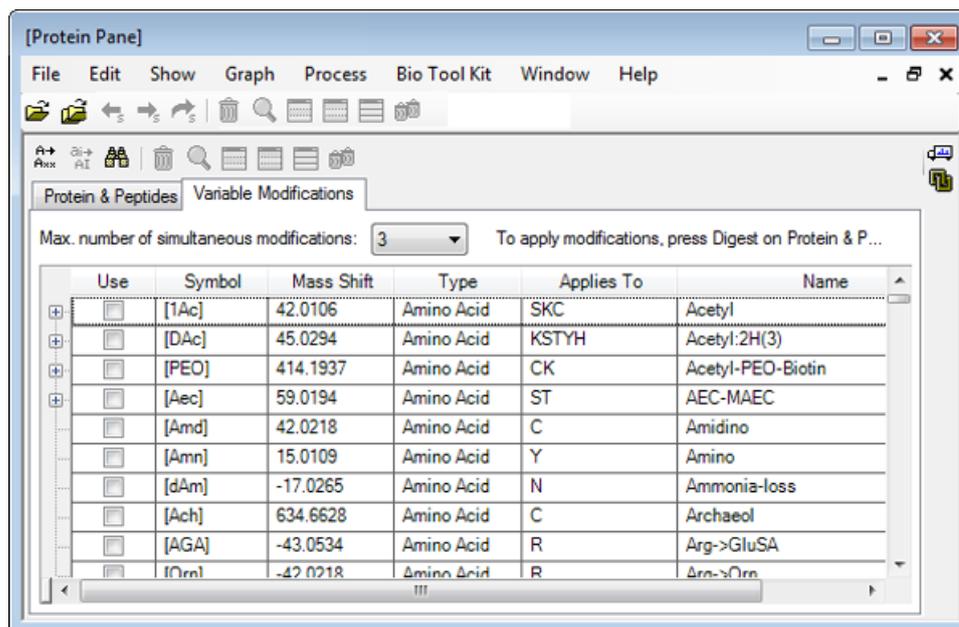


The screenshot shows the 'Protein Panel' software interface. The 'Protein & Peptides' tab is active, and the 'Enzyme' is set to 'Trypsin' with 'Max. missed cleavages' set to 0. The 'Digest' button is visible. The 'AA selection' is set to '(None)'. A list of peptides is shown on the left, and a table of matched peptides is displayed on the right.

Matched	Peptide	AA Index	Mono. Mass	Ave. Mass	Modifications	Sequence
<input checked="" type="checkbox"/>	T1	1 - 16	1814.89515	1816.004		GLSDGEWQ...
<input checked="" type="checkbox"/>	T2	17 - 31	1605.84747	1606.799		VEADIAGHG...
<input checked="" type="checkbox"/>	T3	32 - 42	1270.65575	1271.436		LFTGHPETLEK
<input checked="" type="checkbox"/>	T4	43 - 45	408.20088	408.455		FDK
<input checked="" type="checkbox"/>	T5	46 - 47	293.17394	293.366		FK
<input checked="" type="checkbox"/>	T6	48 - 50	396.24850	396.490		HLK
<input checked="" type="checkbox"/>	T7	51 - 56	707.31599	707.801		TEAEMK
<input checked="" type="checkbox"/>	T8	57 - 62	661.32827	661.710		ASEDLK
<input checked="" type="checkbox"/>	T9	63	146.10553	146.189		K
<input checked="" type="checkbox"/>	T10	64 - 77	1377.83439	1378.679		HGTWLTAL...
<input checked="" type="checkbox"/>	T11	78	146.10553	146.189		K
<input checked="" type="checkbox"/>	T12	79	146.10553	146.189		K
<input checked="" type="checkbox"/>	T13	80 - 96	1852.95440	1854.056		GHHEAELKP...
<input checked="" type="checkbox"/>	T14	97 - 98	283.16444	283.331		HK
<input checked="" type="checkbox"/>	T15	99 - 102	469.32642	469.625		IPIK
<input checked="" type="checkbox"/>	T16	103 - 118	1884.01454	1885.194		YLEFISDAIH...
<input checked="" type="checkbox"/>	T17	119 - 133	1501.66198	1502.626		HPGDFGADA...
<input checked="" type="checkbox"/>	T18	134 - 139	747.42793	747.893		ALELFR
<input checked="" type="checkbox"/>	T19	140 - 145	630.33369	630.699		NDIAAK
<input checked="" type="checkbox"/>	T20	146 - 147	309.16886	309.365		YK
<input checked="" type="checkbox"/>	T21	148 - 153	649.30714	649.701		ELGFQG

6. Clique na aba **Variable Modifications**.

Figura 6-20 Painel Protein - aba Variable Modifications



7. Selecione o **Max. number of simultaneous modifications**.

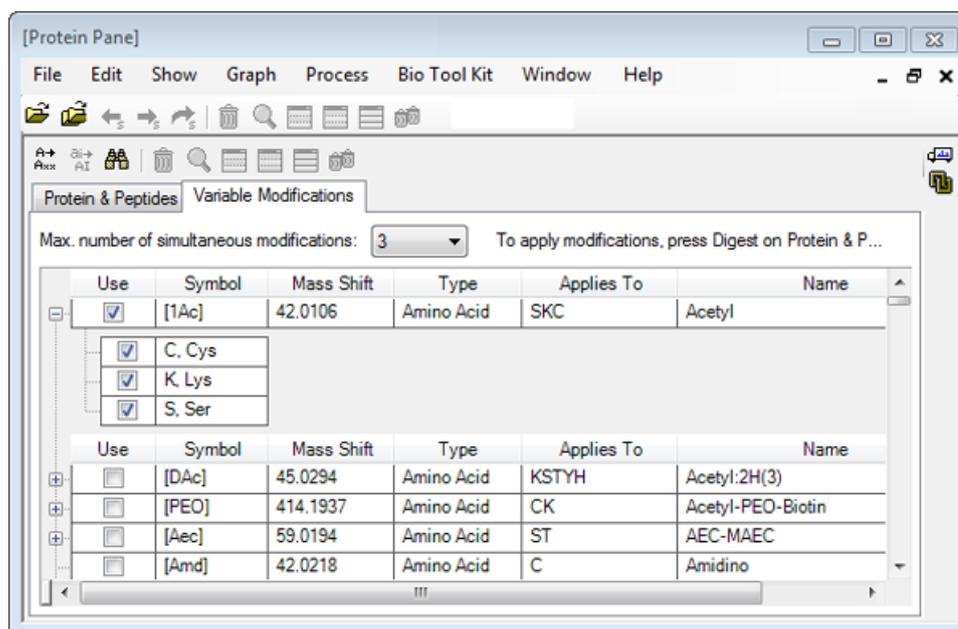
Nota: Para esse tutorial, foi selecionado 3.

8. Selecione a caixa de marcação na coluna **Use** para as modificações adequadas.

Dica! Se um ícone for mostrado à esquerda da caixa de marcação, a lista inteira de aminoácidos pode ser selecionada ou apenas aqueles que forem aplicáveis.

Nota: Para esse tutorial, a opção [1Ac] foi selecionada.

Figura 6-21 Exemplo de modificações selecionadas.



9. Clique na aba **Protein & Peptides**.

10. Clique em **Digest**.

Os resultados na tabela são modificados para refletir as seleções feitas pelo usuário.

Figura 6-22 Painel de proteína preenchido com as informações modificadas

The screenshot shows the 'Protein Panel' window with the 'Variable Modifications' tab selected. The 'Enzyme' is set to 'Trypsin' and 'Max. missed cleavages' is 0. The 'AA selection' is '(None)'. The main table displays the following data:

Matched	Peptide	AA Index	Mono. Mass	Ave. Mass	Modifications	Sequence
<input checked="" type="checkbox"/>	T1	1 - 16	1814.89515	1816.004		GLSDG...
<input checked="" type="checkbox"/>	T1	1 - 16	1856.90571	1858.041	[1Ac] (2 Iso...	GLSDG...
<input checked="" type="checkbox"/>	T1	1 - 16	1898.91628	1900.078	2[1Ac]	GLS[1A...
<input checked="" type="checkbox"/>	T2	17 - 31	1605.84747	1606.799		VEADIA...
<input checked="" type="checkbox"/>	T3	32 - 42	1270.65575	1271.436		LFTGHP...
<input checked="" type="checkbox"/>	T3	32 - 42	1312.66632	1313.473	[1Ac]	LFTGHP...
<input checked="" type="checkbox"/>	T4	43 - 45	408.20088	408.455		FDK
<input checked="" type="checkbox"/>	T4	43 - 45	450.21145	450.492	[1Ac]	FDK[1Ac]
<input checked="" type="checkbox"/>	T5	46 - 47	293.17394	293.366		FK
<input checked="" type="checkbox"/>	T5	46 - 47	335.18451	335.403	[1Ac]	FK[1Ac]
<input checked="" type="checkbox"/>	T6	48 - 50	396.24850	396.490		HLK
<input checked="" type="checkbox"/>	T6	48 - 50	438.25907	438.527	[1Ac]	HLK[1Ac]
<input checked="" type="checkbox"/>	T7	51 - 56	707.31599	707.801		TEAEMK
<input checked="" type="checkbox"/>	T7	51 - 56	749.32656	749.838	[1Ac]	TEAEM...
<input checked="" type="checkbox"/>	T8	57 - 62	661.32827	661.710		ASEDLK
<input checked="" type="checkbox"/>	T8	57 - 62	703.33884	703.747	[1Ac] (2 Iso...	ASEDLK

Reconstrução de peptídeo por LCMS

Reconstrução de peptídeo por LCMS identifica picos espectrais e executa uma deconvolução deles. A ferramenta de reconstrução de peptídeo por LCMS funciona em duas etapas. Primeiro, os picos são localizados usando a opção "Enhance" algoritmo de localização de pico. Segundo, a ferramenta encontra grupos de picos que formam séries de isótopos e séries de cargas e relatam a massa neutra de todos os componentes localizados.

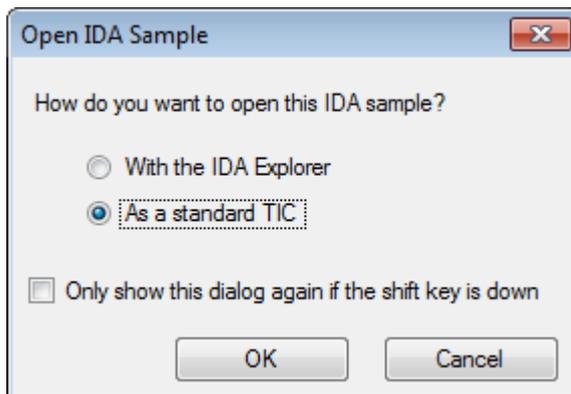
1. Clique no ícone **Abrir amostra** na barra de ferramentas principal.

A caixa de diálogo **Select Sample** se abre.

2. Se a pasta Sample Data não estiver selecionada, clique em **Browse** e navegue até a pasta **Sample Data**.
3. Selecione o arquivo **RP_digests.wiff** e depois clique em **OK**.

A caixa de diálogo **Open IDA Sample** se abre.

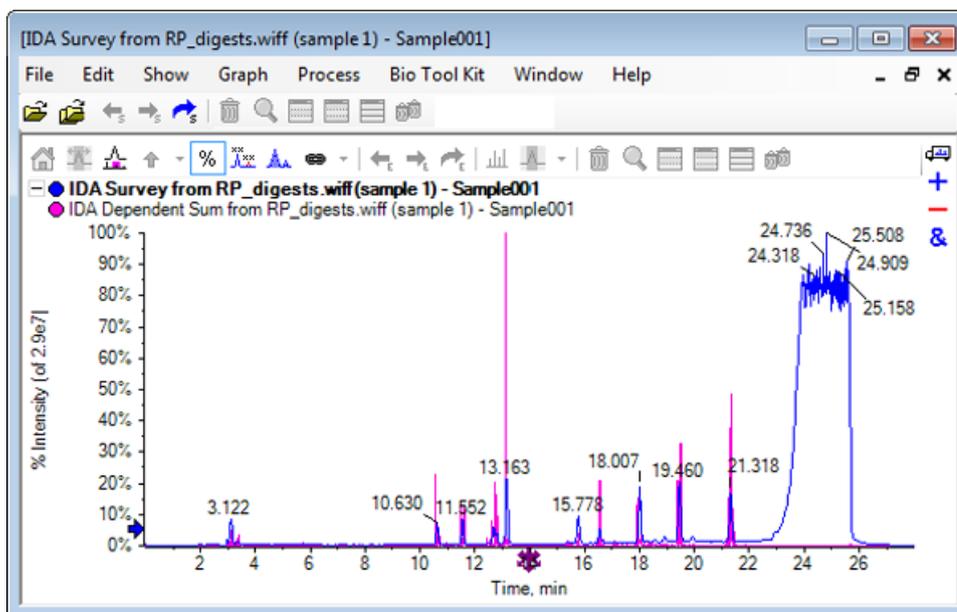
Figura 6-23 Caixa de diálogo Open IDA Sample



4. Garanta que a opção **As a standard TIC** esteja selecionada e depois clique em **OK**.

Garanta que o primeiro traço, **IDA Survey from RP_digests.wiff (sample 1) - Sample001**, seja mostrado em negro. Se necessário, selecione esse traço.

Figura 6-24 Análise IDA de RP_digests.wiff



5. Clique em **Bio Tool Kit > LCMS Peptide Reconstruct (with peak finding)**.

A caixa de diálogo **LCMS Peptide Reconstruct Options** se abre.

Figura 6-25 Caixa de diálogo LCMS Peptide Reconstruct Options

LCMS Peptide Reconstruct Options

Time Range
Minimum retention time: 0.00 min Maximum retention time: 0.00 min

'Enhance' Peak Finding
Approximate LC peak width: 6.0 sec Minimum intensity in counts: 5 counts
 Perform background subtraction Chemical noise intensity multiplier: 1.5

Charge Deconvolution
Mass tolerance: 0.100 Da Maximum charge: 5

OK Cancel

6. Digite os seguintes valores nos campos fornecidos:

- **9,00** min. no campo **Minimum retention time**
- Selecione a opção **Maximum retention time** e depois digite **16,00** no campo
- **6,0** s no campo **Approximate LC peak width**

Nota: A largura aproximada do pico é usada para determinar o deslocamento durante a subtração da linha de base.

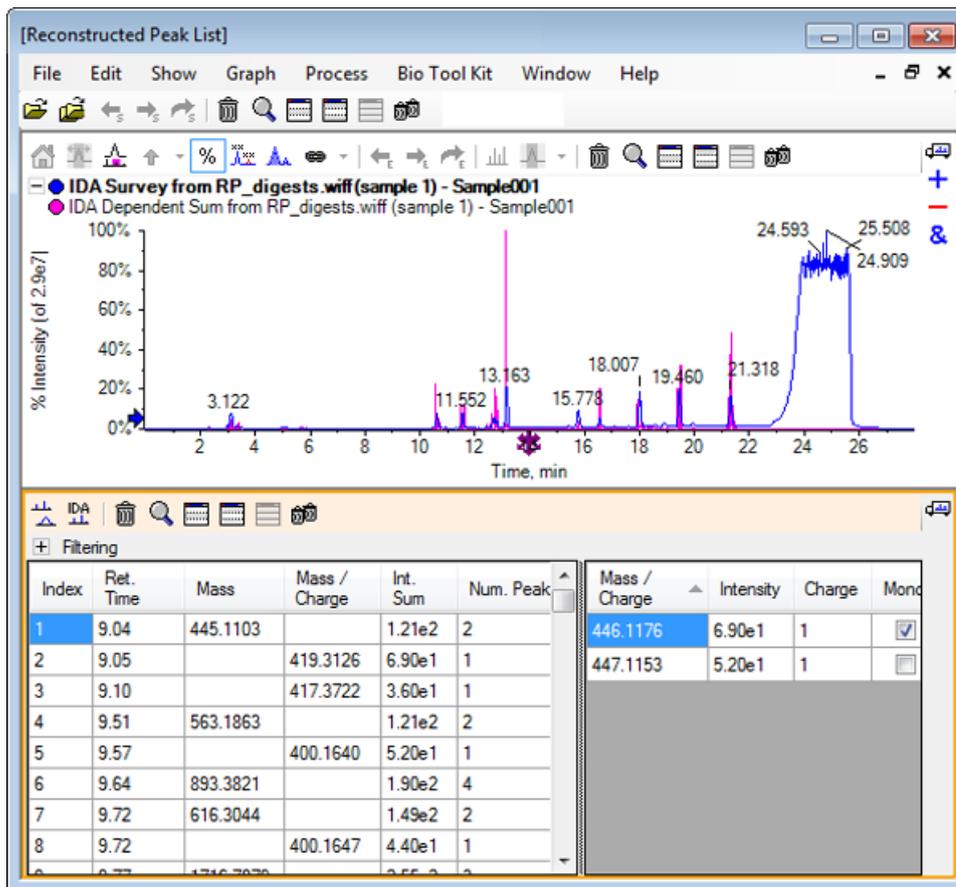
- **5** contagens no campo **Minimum intensity in counts**
- **1,5** no campo **Chemical noise intensity multiplier**
- **0,100** Da no campo **Mass tolerance**
- **5** no campo **Maximum charge**

Nota: A tolerância de massa na seção Charge Deconvolution garante que o pico reconstruído seja correspondente à proteína digerida teoricamente e que valores diferentes em m/z pertencentes ao mesmo peptídeo sejam agrupados juntos.

7. Clique em **OK**.

O software mostra uma tabela de peptídeos, separados por tempo de retenção. As informações a seguir são fornecidas para cada peptídeo listado: **Index, Ret. Time, Mass, Mass/Charge, Int. Sum e Num. Peaks**.

Figura 6-26 Lista de picos reconstruída



8. Expanda **Filtering** para mostrar as opções de filtragem disponíveis.

As opções de filtragem disponíveis incluem: **Intensity threshold**, **Min. Núm. Peaks**, e **Show matched peaks only**.

Figura 6-27 Opções de filtragem

Filtering
Intensity threshold:
Min. Num. Peaks: Show matched peaks only

Index	Ret. Time	Mass	Mass / Charge	Int. Sum	Num. Peaks	Mass / Charge	Intensity	Charge	Mono
1	9.04	445.1103		1.21e2	2	446.1176	6.90e1	1	<input checked="" type="checkbox"/>
2	9.05		419.3126	6.90e1	1	447.1153	5.20e1	1	<input type="checkbox"/>
3	9.10		417.3722	3.60e1	1				
4	9.51	563.1863		1.21e2	2				
5	9.57		400.1640	5.20e1	1				
6	9.64	893.3821		1.90e2	4				

9. Selecione um ou mais filtros para ajustar a visualização, conforme desejado.

Nota: Nesse tutorial, o limite de intensidade foi configurado para 2,39e4 e o número Núm. de picos foi configurado para 4.

Figura 6-28 Lista de picos filtrados reconstruídos

Filtering
Intensity threshold:
Min. Num. Peaks: Show matched peaks only

Index	Ret. Time	Mass	Mass / Charge	Int. Sum	Num. Peaks	Mass / Charge	Intensity	Charge	Mono
1	10.62	1501.6620		2.39e5	17	501.5605	2.98e4	3	<input checked="" type="checkbox"/>
2	11.55	1270.6542		2.98e5	16	501.8947	3.22e4	3	<input type="checkbox"/>
3	12.68	940.4651		1.93e5	9	502.2281	1.41e4	3	<input type="checkbox"/>
4	13.15	1605.8489		8.62e5	18	502.5619	5.46e3	3	<input type="checkbox"/>
5	15.76	563.3048		1.53e5	4	502.8962	2.39e3	3	<input type="checkbox"/>
6	15.78	747.4268		1.96e5	4	503.2294	3.95e2	3	<input type="checkbox"/>
						751.8383	3.89e4	2	<input checked="" type="checkbox"/>

Barra de ferramentas



Trabalhar com o Kit de ferramentas biológicas

Use os ícones na barra de ferramentas para facilitar a visualização, conforme necessário.

Tabela 6-2 Ícones da barra de ferramentas

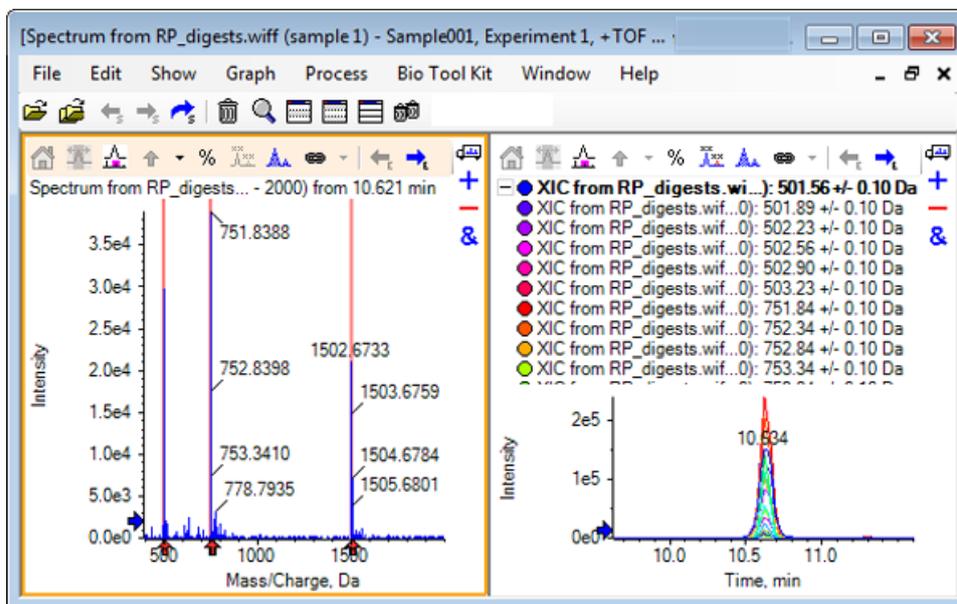
Ícone	Nome (dica de ferramenta)
	Mostrar espectro e XIC
	Mostrar espectro MS/MS de IDA

Nota: Os últimos seis ícones nessa barra de ferramentas, começando com o ícone Excluir esse painel, estão descritos em [Barra de ferramentas genéricas do painel](#).

Mostrar espectro e XIC

Quando o ícone **Mostrar espectro e XIC** estiver selecionado, o espectro a seguir e os painéis de XIC são abertos:

Figura 6-29 Mostrando os espectros e resultados do XIC



Para o espectro MS gerado, é mostrada uma seta abaixo de cada pico que contribuiu para a massa do peptídeo. O XIC de cada pico de m/z que contribuiu com a massa do peptídeo é mostrado como sobreposições no painel à direita.

Mostrar espectro MS/MS de IDA

Quando o ícone **Mostrar espectro MS/MS de IDA** é selecionado, o seguinte painel do espectro se abre:

Reconstrução de peptídeos por LCMS com proteína digerida

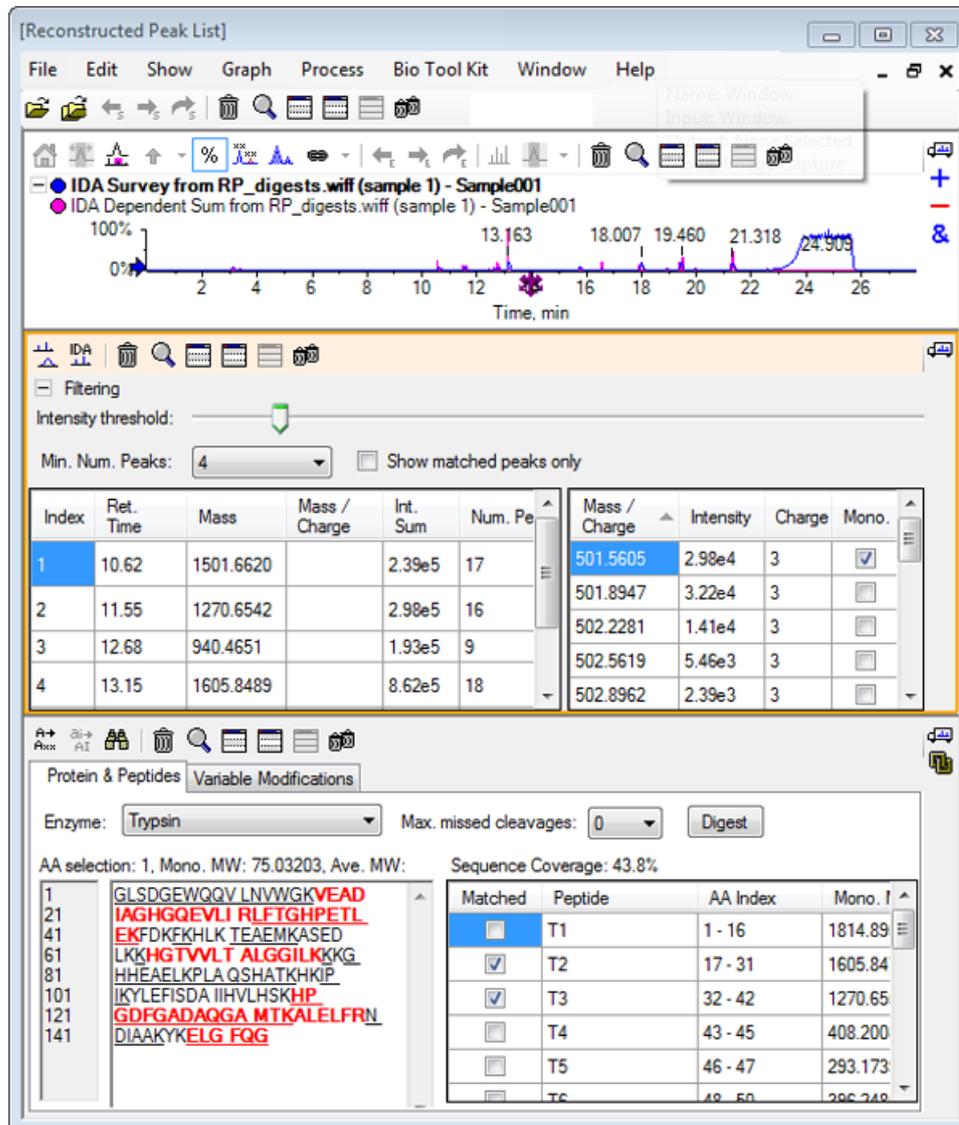
1. Clique em **Bio Tool Kit > Digest Protein**.

O painel **Protein** é aberto.

2. Arraste o ícone **Arraste até um painel de proteína para configurar sua lista de picos** do painel **Protein** para o painel **Reconstructed peak list**.

O painel **Protein** é atualizado, mostrando as sequências de peptídeo no painel Protein correspondentes àquelas da Reconstructed peak list. Os fragmentos no painel **Protein**, mostrados na cor vermelha e negrito, são fragmentos com correspondências exatas do painel **Reconstructed peak list**. Os fragmentos mostrados na cor vermelha, regular, são fragmentos que teriam fragmentos correspondentes no painel **Reconstructed peak list** se tivessem sido designados ao estado de carga indicado nos colchetes na coluna **Match** do painel **Reconstructed peak list**. Os fragmentos mostrados na cor preta não correspondem a nenhum fragmento no painel **Reconstructed peak list**.

Figura 6-30 Informações teóricas no painel de proteínas vinculado à lista de picos reconstruída



Reconstrução de proteína

Use essa opção para obter a massa média (peso molecular) de uma proteína intacta.

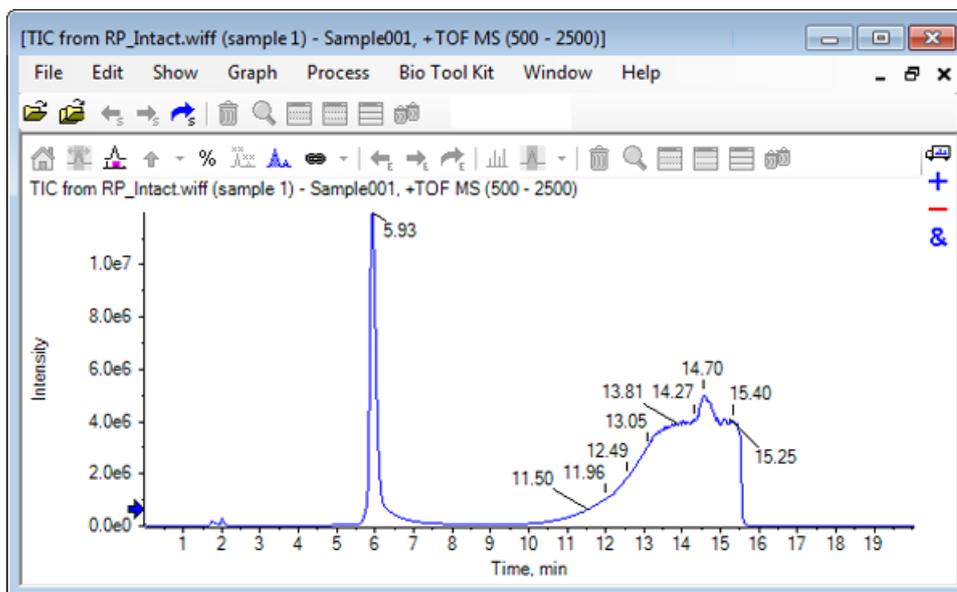
1. Clique no ícone **Abrir amostra** na barra de ferramentas principal.

A caixa de diálogo **Select Sample** se abre.

2. Se a pasta **Sample Data** não estiver selecionada, clique em **Browse** e navegue até a pasta **Sample Data**.

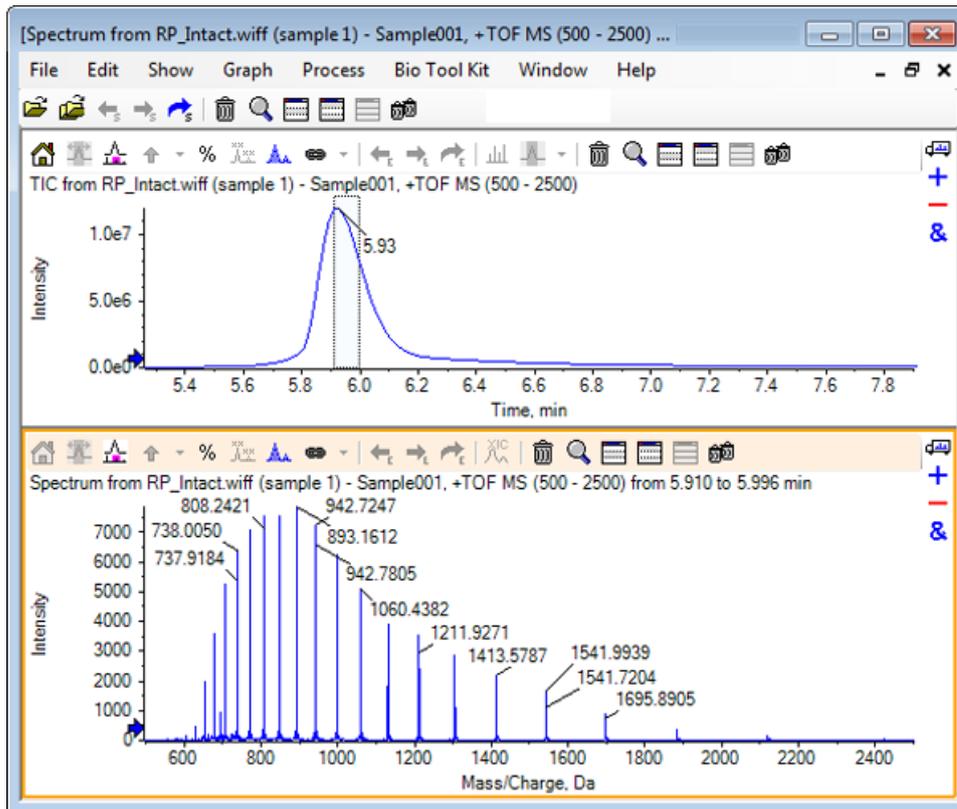
3. Selecione o arquivo **RP_Intact.wiff** e depois clique em **OK**.

Figura 6-31 TIC do arquivo **RP_Intact.wiff**



4. Crie um espectro médio usando uma região do pico em 5,93 min. Consulte a [Figura 6-32](#).

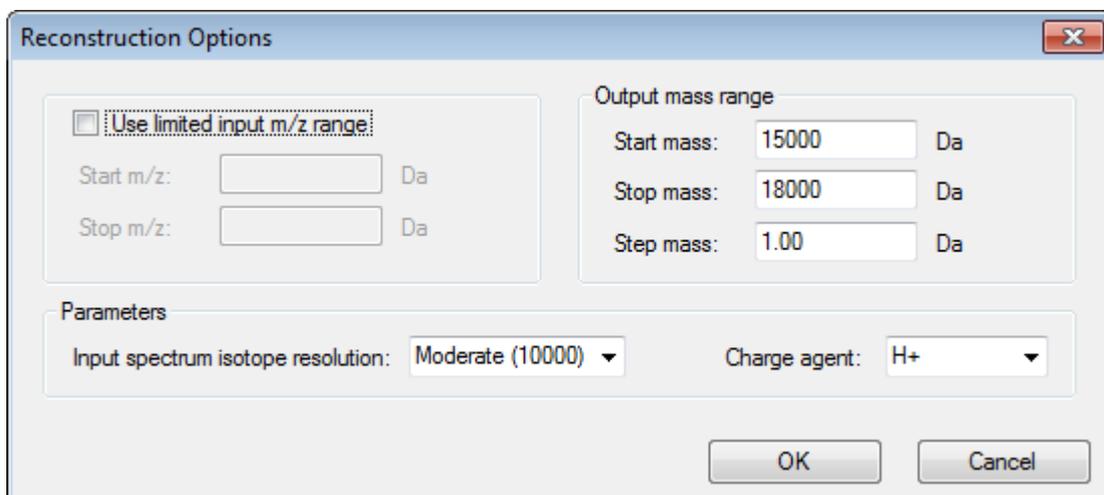
Figura 6-32 Espectro médio



5. Com o painel de espectro ativo, clique em **Bio Tool Kit > Reconstruct Protein**.

A caixa de diálogo **Reconstruction Options** se abre.

Figura 6-33 Reconstruction Options



6. Digite os valores adequados para as seguintes opções:

- **Start mass:** 15000 Da
- **Stop mass:** 18000 Da
- **Step mass:** 1,0 Da

7. Selecione **Input spectrum isotope resolution:** Moderate (10000).

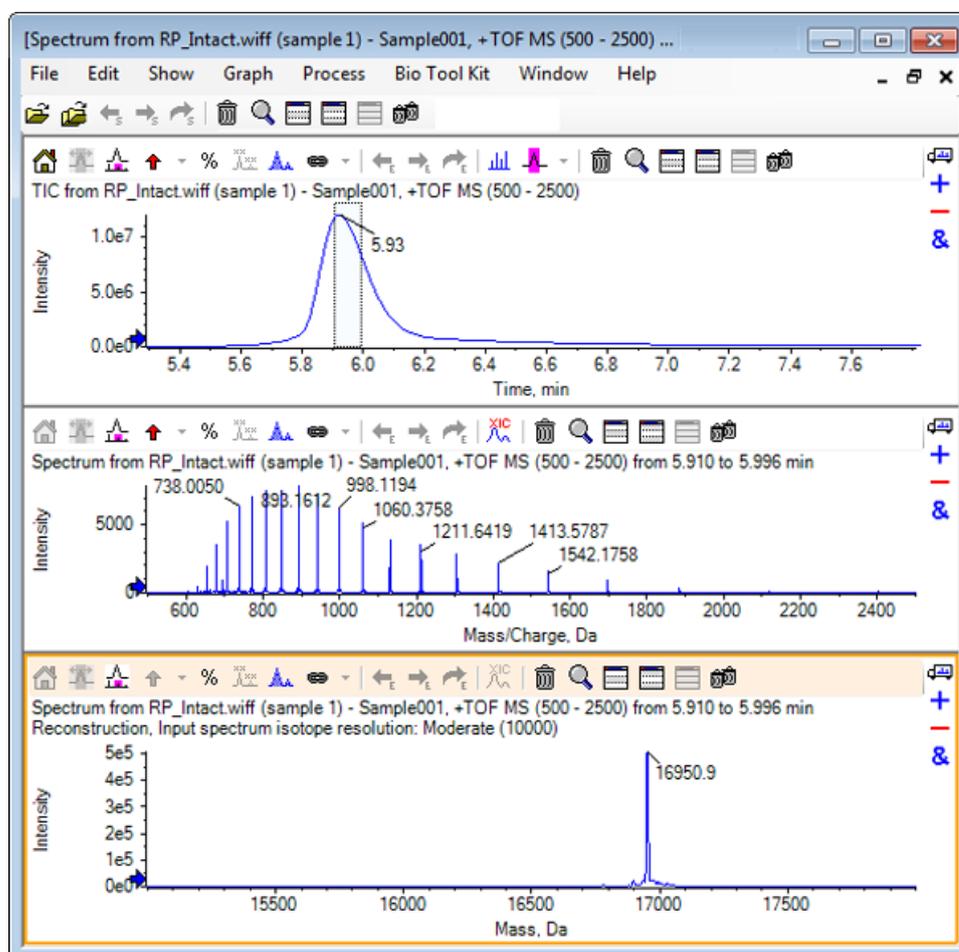
Nota: Para dados adquiridos usando um sistema de quadrupolo, o parâmetro de largura do pico é mostrado ao invés do parâmetro de resolução do isótopo no espectro de entrada.

8. Selecione o **Charge Agent** adequado: H+.

9. Clique em **OK**.

O software gera um espectro da proteína reconstruída sem um painel separado com o título: **Reconstruction, Input spectrum isotope resolution [user selection]**.

Figura 6-34 Painel de reconstrução

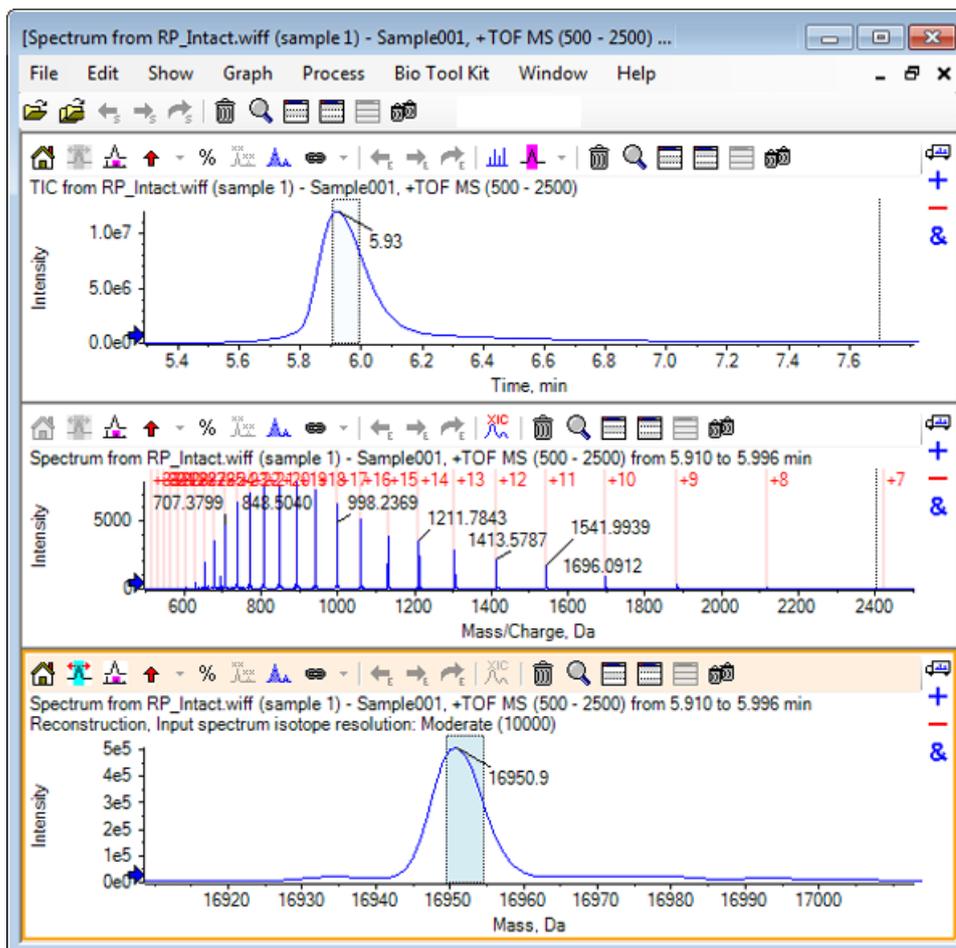


Nota: Para dados adquiridos usando um sistema de quadrupolo, o título no painel é: Reconstruction, Peak width [value].

10. Selecione o pico da proteína reconstruída.

Marcações da reconstrução manual vertical são incluídos ao espectro selecionado para gerar a proteína reconstruída.

Figura 6-35 Espectro com marcações da reconstrução manual



Resumo

Nesta seção, as seguintes tarefas foram discutidas:

- Sequenciar manualmente dados espectrais de MS/MS de uma amostra de proteína digerida.
- Vincular um espectro sequenciado manualmente com fragmentos de peptídeo.

- Incluir marcadores (Marcações de reconstrução manual) indicando as posições teóricas da faixa de m/z de uma determinada massa para um espectro.
- Remover marcadores de um espectro.
- Obter informações sobre sequências teóricas de peptídeos que resultam de uma clivagem enzimática definida pelo usuário de uma proteína específica.
- Usar a reconstrução de peptídeos por LCMS para identificar picos espectrais e executar uma deconvolução deles.
- Vincular informações teóricas a um painel de proteína com uma lista de picos reconstruídos.
- Obter a massa média (peso molecular) de uma proteína intacta.