

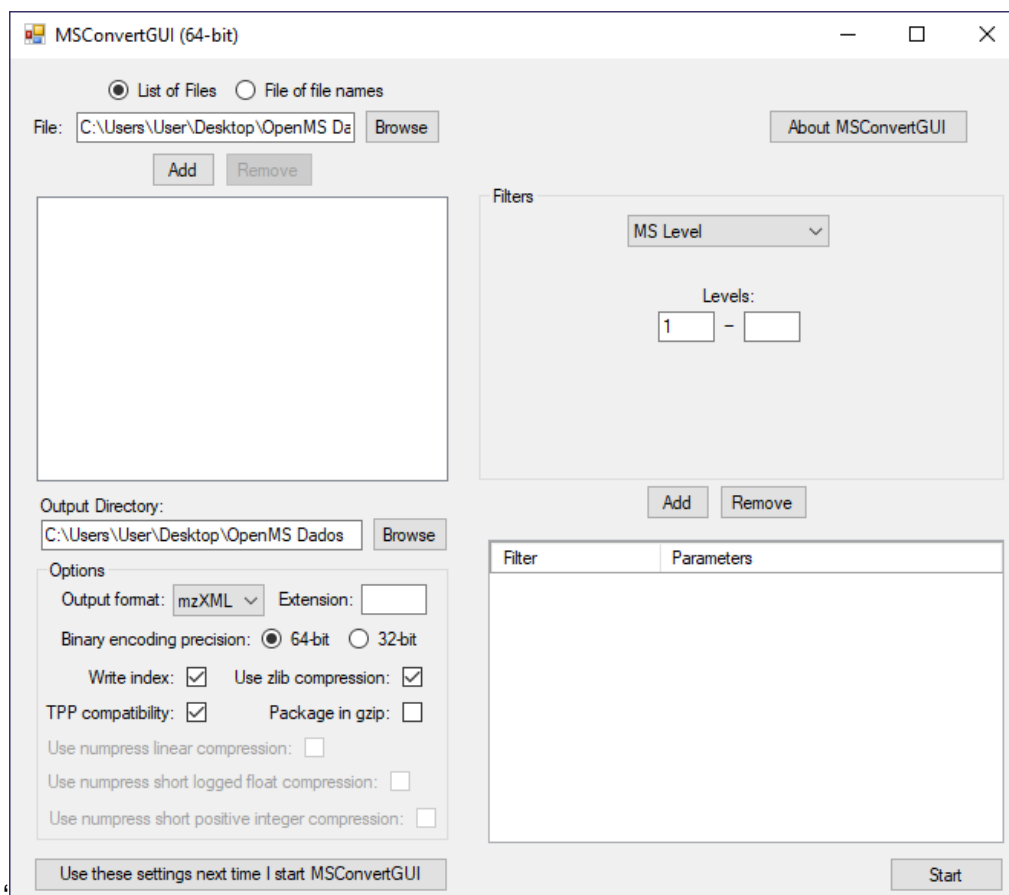
Para análise qualitativa dos resultados do equipamento LC-MS/MS, a CAIQ recomenda o uso do software **mMass**, que é de uso gratuito. Neste guia, você encontrará as informações básicas sobre os softwares necessários para converter e analisar os dados, bem como uma introdução ao uso do mMass.

Download e Instalação dos Programas

1. Faça o download do software mMass e descompacte o programa (não é necessário realizar instalação): <http://www.mmass.org/download/>.
2. Faça o download do ProteoWizard, *suíte* que contem o programa **MSConvert** que é necessário para conversão dos resultados, e siga as instruções de instalação do programa: <http://proteowizard.sourceforge.net/download.html>
3. Faça o download dos resultados, que estarão no formato *.wiff* no DropBox da CAIQ:
https://www.dropbox.com/sh/0dq8rys07al4n32/AADIG223FnCleoAlsqv_s-7oa?dl=0

Conversão dos arquivos

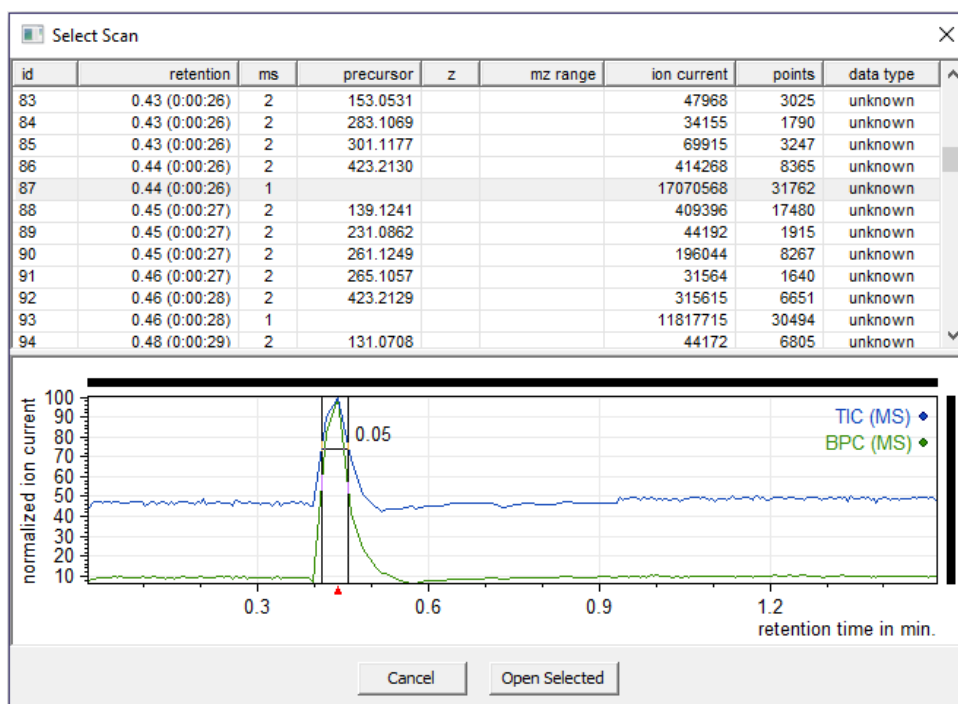
1. Abra o programa **MSConvert** que foi instalado via ProteoWizard (dependendo da versão do Windows ele poderá aparecer como MSConvertGUI).
2. Clique em *Browse* e então selecione os arquivos *.wiff* que deseja converter. Clique em *Add*.
3. Na opção *Output Format*, selecione **mzXML**. Não é necessário alterar os outros parâmetros.



4. Clique em Start para realizar a conversão. Note será criado um arquivo mzXML para cada injeção existente no arquivo wiff. Os arquivos convertidos serão salvos na mesma pasta do arquivo original.

Analizando os arquivos no mMass

1. Abra o programa mMass e clique em File → Open. Selecione um dos arquivos mzXML.
2. Uma janela como a mostrada abaixo será selecionada. Primeiramente, selecione o pico do cromatograma que deseja analisar (para análises do tipo FIA, o pico normalmente aparece entre 0,40 e 0,45 minutos). A lista de espectros mostrará os espectros que existem nesta região.



3. Selecione o espectro de ms^1 com maior intensidade total (*ion current*) dessa região, e clique em *Open Selected*.
4. Com o espectro aberto, clique em *Processing* e então *Peak Picking*. Em geral, os valores padrão dos parâmetros são suficientes para identificar os principais picos.
 - a. Se algum pico de interesse não for identificado, mesmo ao se modificar os parâmetros do Peak Picking, ele poderá ser identificado manualmente utilizando a ferramenta *Label Peak* (Ctrl + Shift + P). Após selecionar a ferramenta, arraste o cursor sobre o pico para adicionar a sua *Label*. Após a identificação manual, recomenda-se selecionar novamente a ferramenta *Spectrum Ruler* (Ctrl + Shift + H) para facilitar a navegação no espectro.
5. Com os picos identificados, a análise qualitativa já é possível. Para dar *zoom*, segure a tecla Ctrl e selecione a região que deseja ampliar. Clique duas vezes para remover o *zoom*.
6. Para visualizar o espectro de ms^2 de uma substância, abra novamente o arquivo wiff e procure pelo espectro que tenha como precursor o íon de interesse. Se o íon não estiver na lista, ele não foi fragmentado.

- a. Ao abrir mais de um espectro, ambos serão mostrados na janela ao mesmo tempo, o que pode dificultar a visualização dos picos. Para ocultar um espectro aberto, clique no círculo colorido ao lado do nome do arquivo na lista de *Documents* à esquerda.
7. Caso queira subtrair uma injeção de branco ou o próprio solvente da amostra (ou seja, um espectro obtido antes do pico no cromatograma), siga estes passos:
 - a. Abra o espectro que deseja subtrair.
 - b. Na lista do lado esquerdo, clique no espectro principal (da amostra).
 - c. Vá em *Processing* → *Math Operations*.
 - d. Selecione *Subtract A - B*.
 - e. Em *Spectrum A*, o espectro da amostra deverá estar selecionado. Em *Spectrum B*, selecione o espectro que deseja subtrair (branco ou solvente).
 - f. É possível que alguns picos no novo espectro apareçam com sinal negativo. Caso isto aconteça, abra a ferramenta *Correct Baseline* (Ctrl + B) e clique em *Apply*. Os picos negativos deverão ser removidos.
 - g. Após o término das operações matemáticas no espectro, será necessário realizar o *Peak Picking* novamente.
8. O espectro mostrado pode ser exportado para imagem direto do mMass, indo em *File* → *Export*. Nessa janela também é possível exportar o espectro como texto para que seja plotado em outros programas.
9. O espectro processado pode ser salvo em um formato do próprio mMass caso você queira fechá-lo e retomar a análise posteriormente.