



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química

Laboratório "Thomson" de Espectrometria de Massas
CP 6154 13083-971 Campinas, SP Brasil Fone/Fax: (19) 3788.3049
<http://thomson.iqm.unicamp.br>

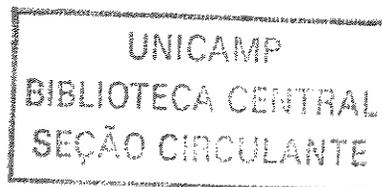
TESE DE DOUTORADO

*"Aplicações de Técnicas Modernas de Espectrometria de
Massas em Química Analítica e em Estudos de Mecanismos
de Reações na Fase Gasosa"*

Lilian Lúcia da Rocha

Orientador: Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin

Thomson MS Lab



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	Unicamp 15820
V	EX
TOMBO BC/	58641
PROC.	16-DF-04
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	23-06-04
Nº CPD	

CM00198279-4

Bibid: 317497

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP

R582a

Rocha, Lilian Lúcia da.

Aplicações de técnicas modernas de espectrometria de massas em química analítica e em estudos de mecanismos de reações na fase gasosa / Lilian Lúcia da Rocha. -- Campinas, SP: [s.n], 2002.

Orientador: Marcos N. Eberlin.

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

1. Espectrometria de massas. 2. *Mecanismos de reação. 3. *Compostos voláteis e semi-voláteis. 4. Cerveja. I. Eberlin, Marcos N. II. Universidade Estadual de Campinas.
III. Título.

Aos meus pais Antônio e Vera, e especialmente a minha mãe, pelo apoio, pelos esforços para eu chegar até aqui, pela compreensão, e dedicação e mim desprendidos.

Quantas loucuras fiz por teu amor, Antônio.
Vê estas olheiras dramáticas,
Este poema roubado:
“o cinamomo floresce
em frente do teu postigo.
Cada flor murcha que desce,
Morro de sonhar contigo”.
Ó bardo, eu estou tão fraca
E teu cabelo é tão negro,
Eu vivo tão perturbada,
pensando com tanta força
meu pensamento de amor,
que já nem sinto mais fome,
o sono fugiu de mim. Me dão mingaus,
caldos quentes, me dão prudentes conselhos,
eu quero é a ponta sedosa do teu bigode atrevido,
a tua boca de brasa, Antônio, as nossas vias ligadas.
Antônio lindo, meu bem,
ó meu amor adorado,
Antônio, Antônio.
Para sempre tua.

By Adélia Prado (Bagagem - 1993)

Ao Júlio pelo amor, pelo carinho, pela atenção
e por sempre me mostrar que existe um caminho
para a felicidade.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, que torna tudo possível;
- Em especial ao Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin, pela orientação e pela oportunidade de desenvolver este trabalho;
- A minha família que mesmo distante torceu por mim a todo o momento;
- A Dr^a Regina Sparrapan por sua grande ajuda e amizade;
- Ao Dr. Fábio César Gozzo por sua ajuda na realização dos cálculos teóricos realizados neste trabalho e pela amizade;
- Ao Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes por sua ajuda e amizade;
- A Dr. Maria Anita Mendes por sua ajuda e amizade;
- A Prof. Dr. Ildenize Cunha pelas palavras de incentivo e pelo carinho e amizade;
- A Cíntia e ao Humberto pela amizade e sua ajuda imprescindível durante os experimentos de biocatálise;
- Ao Alex por sua amizade e toda sua ajuda nos experimentos para a tipificação de amostras de cerveja;
- Ao Leonardo por sua ajuda imprescindível nos experimentos com o Reagente de Tebbe;
- Aos amigos do laboratório Thomson que estiveram comigo durante a realização deste trabalho (Adão, Alessandra, Alexandra, Alex, Aline, Ane, Anita, Beto, Eduardo, Fábio, Leonardo, Liliane, Regina, Reinaldo, Renato, Rosana) pela amizade, pela ajuda e contribuições dadas a este trabalho;
- A todos os meus amigos do Instituto de Química da UNICAMP pela convivência agradável, pelos momentos descontraídos, pelo carinho e amizade.
- A todos os meus amigos de Belo Horizonte, que mesmo distantes me deram força para seguir em frente.
- Ao Cidão e a Zelinda pelo apoio, pela convivência agradável e pela ajuda;
- À todos os funcionários do Instituto de Química e em especial a Bel e ao André da Comissão de Pós-Graduação e ao Iveraldo pela paciência e ajuda;
- Ao Instituto de Química pelas facilidades na realização dos trabalhos;
- A FAPESP pelo apoio financeiro.

CURRICULUM VITAE

1 – DADOS PESSOAIS

Nome: Lilian Lúcia da Rocha

Filiação: Antônio Alves da Rocha e Vera Lúcia Miranda da Rocha

Data de Nascimento: 21 de Janeiro de 1973

Naturalidade: Belo Horizonte/MG

Nacionalidade: Brasileira

Estado Civil: Casada

Registro Geral: M-4.896.535 - SSP/MG

Carteira Profissional: 36.519 **Série:** 0065/MG

CPF: 849.414.306-97

Endereço Residencial: Avenida Francisco Glicério, 1664/1008 – Centro –
Campinas/SP - CEP: 13012-980 - Fone: (19) 3237- 6411

Endereço Profissional: Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química
– Campinas/São Paulo - CP 6154 – CEP: 13083-971 – Fone: (19) 3788 - 3049

Endereço Eletrônico: lilian_lucia@hotmail.com

2 – EDUCAÇÃO SECUNDÁRIA E SUPERIOR

2.1 – Segundo Grau (Técnico Profissionalizante)

Curso Técnico em Química

Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET-MG)

Belo Horizonte, MG 1988-1990

2.2 – Curso Superior de Graduação

Bacharelado em Química

Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

Belo Horizonte, MG 1994-1997

2.3 – Curso de Pós-Graduação

2.3.1 – Mestrado

Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

Belo Horizonte, MG 1998-1999

Orientador: Prof. Dr. Rodinei Augusti

Dissertação: ***“Utilização da Técnica MIMS no Estudo de Reações de Interesse Ambiental em Meio Aquoso”***

2.3.2 – Doutorado

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Campinas, SP 1999-2004

Orientador: Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin

Tese: ***“Aplicações de Técnicas Modernas de Espectrometria de Massas em Química Analítica e em Estudos de Mecanismos de Reações na Fase Gasosa”***

RESUMO

Aplicações de Técnicas Modernas de Espectrometria de Massas em Química Analítica e em Estudos de Mecanismos de Reações na Fase Gasosa

Palavras chaves: Espectrometria de Massas, Mecanismos de Reação, Compostos Voláteis e Semi-voláteis, Cerveja.

Aluna: Lillian Lúcia da Rocha

Orientador: Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin

Neste trabalho utilizaram-se técnicas de espectrometria de massas para se realizar análises quantitativas de compostos semi-voláteis presentes em preparações farmacêuticas, para tipificação de amostras de cervejas nacionais e importadas e no monitoramento de reações em meio aquoso e em fase gasosa. Estes estudos foram divididos em seis partes.

O monitoramento de reações de biotransformação foi realizado de modo a se verificar a formação dos produtos de redução a partir de substratos contendo grupos carbonílicos utilizando-se uma levedura encapsulada em alginato de cálcio. Pelo monitoramento de tais processos utilizando a técnica MIMS, tornou-se possível observar a conversão dos substratos utilizados nos produtos da reação.

De modo a realizar análises quantitativas de ácido acetilsalicílico (AAS), vitamina C(ácido ascórbico) e cafeína em amostras de preparações farmacêuticas a técnica de DIMP/T&R-MIMS foi utilizada de modo a fornecer mais uma alternativa de análise de tais compostos na matriz selecionada em adição as técnicas já descritas na literatura.

Dando seqüência ao trabalho, o estudo de um conjunto de amostras de cervejas nacionais e importadas de diferentes estilos foi realizado utilizando-se a técnica de ESI-MS para a tipificação destas amostras de cerveja uma vez que as características distintas de cada tipo de cerveja são refletidas em seus espectros de massas respectivos. Análise de componentes principais (PCA) aplicada aos

espectros de massas obtidos também foi utilizada neste caso para se realizar uma classificação destas amostras.

De modo a se verificar os intermediários transientes formados em solução durante a reação entre o reagente de Tebbe e vinil-éteres a solução contendo as espécies formadas durante esta reação foi transferida para a fase gasosa utilizando-se a técnica de APCI-MS (ionização química a pressão atmosférica acoplada a um espectrômetro de massas). Para se obter informações estruturais sobre os intermediários formados durante a reação a técnica de APCI-MS/MS (ionização química a pressão atmosférica seguida por dissociação induzida por colisão com um gás inerte) foi utilizada. O fato dos intermediários de reação serem transientes torna impossível a utilização de técnicas espectroscópicas tradicionais (RMN, UV, etc.) para o monitoramento deste tipo de reação.

Utilizando-se espectrometria de massas seqüencial, cátions halocarbonila XCO^+ (X= F, Cl, Br) foram reagidos com compostos aromáticos em fase gasosa de modo a se promover a funcionalização seletiva e a ativação da ligação C-H inerte de compostos aromáticos (M-H) via carbonilação iônica. Além da reação de carbonilação foram observadas também a reação de transferência de elétron e a reação de transferência de halogênio.

Finalmente, compostos isoméricos foram caracterizados por reações diagnósticas em fase gasosa com acetonitrila utilizando um espectrômetro de massas pentaquadrupolar. Desta forma pretendemos caracterizar toda uma classe de compostos que contém cátions hidróxi- e amino-benzoila diagnósticos em comum.

ABSTRACT

Applications of Modern Techniques of Mass Spectrometry in Analytical Chemistry and in Studies of Mechanisms of Reactions in the Gaseous Phase

Keywords: Mass Spectrometry, Mechanism of Reaction, Volatile and Semi-volatile Compounds, Beer.

Author: Lilian Lúcia da Rocha.

Adviser: Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin.

In this work techniques of mass spectrometry were used to quantify semi-volatile compounds in pharmaceutical preparations, for fingerprint of samples of national and imported beers and in the reactions monitoring in aqueous media and in gaseous phase. These studies had been divided in six parts.

The biocatalysis reactions monitoring were carried in order to verify the formation of the reduction products from reagents containing carbonyl groups using *Saccharomyces cerevisiae*. The monitoring of such processes using the MIMS technique became possible to observe the conversion of reagents used in the products of the reaction.

In order to quantify acetylsalicylic acid (AAS), ascorbic acid (Vitamin C) and caffeine in samples of pharmaceutical preparations the DIMP/T&R-MIMS technique was used in order to supply one more alternative of analysis of such compounds in the matrix selected in addition the described techniques already in literature.

Giving sequence to the work, the study of a set of samples of national and imported beers of different styles was realized using ESI-MS for the fingerprint of these samples of beer once that the distinct characteristics of each type of beer are reflected in its respective mass spectras. Analysis of principal components (PCA) applied to the mass spectras also was used to carry through a classification of these samples.

In order to verify the transient intermediates formed in solution during the reaction between Tebbe's reagent and vinyl-ethers the solution containing the species formed during this reaction was transferred to the gaseous phase using the APCI-MS technique (Atmospheric Pressure Chemical Ionization connected to a mass spectrometer). To get structural informations on the intermediate formed during the reaction the APCI-MS/MS technique (Atmospheric Pressure Chemical Ionization followed by CID with an inert gas) was used. The fact of the reaction intermediates to be transient species becomes impossible the use of traditional spectroscopic techniques (RMN, UV, etc.) for monitoring of this type of reaction.

Using pentaquadrupole mass spectrometer halocarbonyl cations XCO^+ ($\text{X} = \text{F}, \text{Cl}, \text{Br}$) were reacted with aromatic compounds in gaseous phase in order to promote C-H bond activation of aromatic compounds (M-H) via gas-phase ionic carbonylation. This novel reaction occurs via electrophilic addition followed by prompt HX elimination, forms the respective acylium ions (M-CO^+), and competes with electron abstraction and X^+ transfer.

Finally, isomeric compounds were characterized by gas-phase structurally diagnostic ion-molecule reactions with acetonitrile using a pentaquadrupole mass spectrometer. This way we intend to distinguish many sets of homologous isomeric *ortho*, *meta* and *para*-acyl and amidyl anilines and phenols with diagnostic fragment ions formed upon 70 eV EI of the isomeric precursor molecules.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas	xx
Capítulo I – Introdução	1
I.1– A Espectrometria de Massas e Suas Potencialidades.....	1
I.2 - Monitoramento de Compostos Orgânicos Voláteis (VOCs) e Semi- voláteis SVOCs).....	2
I.2.1- Breve histórico e descrição da técnica MIMS.....	3
I.2.2 – A técnica de DIMP/T&R-MIMS.....	6
I.3 – Ionização a Pressão atmosférica.....	9
I.3.1 - A técnica de ESI-MS.....	10
I.3.2 - A técnica de APCI-S.....	12
I.4 – Estudos de Reações Entre Íons e Moléculas na Fase Gasosa.....	15
I.4.1 – Os diagramas de energia potencial (DEP) para as reações entre íons e moléculas na fase gasosa e em fase condensada.....	18
I.4.2 - A espectrometria de massas pentaquadrupolar (QqQqQ).....	19
I.4.3 - Os cálculos teóricos.....	21
Capítulo II – Objetivos	22
Capítulo III – Parte Experimental	24
III.1 – Monitoramento de reações de biotransformação promovidas pela levedura “ <i>saccharomyces cerevisiae</i> ” utilizando a técnica MIMS.....	24
III.1. 1 – Introdução dos substrato no reator de vidro.....	24
III.1. 2 – Retirada dos produtos de reação remanescentes do reator de vidro.....	25
III.1. 3 – Utilização da técnica MIMS.....	25
III.2 – Determinação de cafeína, ácido ascórbico e ácido acetilsalicílico em preparações farmacêuticas utilizando DIMP/T&R-MIMS.....	27
III.2.1 – Preparo de amostras, de soluções padrão e condições de análise.....	27
III.2.2 – Utilização do sistema DIMP/T&R-MIMS.....	27
III.3 – Tipificação de diferentes tipos de cervejas nacionais e importadas utilizando a técnica de ESI-MS.....	29

III.3.1 - Preparação de Amostras.....	29
III.3.2 – Utilização do espectrômetro de massas Qq-oTOF.....	29
III.4 - Investigação do mecanismo de reação entre o reagente de Tebbe e vinil-éteres utilizando a técnica de APCI-MS E APCI-MS/MS.....	30
III.4.1- Preparação de Amostras.....	30
III.4.2 – Utilização do espectrômetro de massas Q-Trap.....	30
III.5 - Espectrômetro de massas pentaquadrupolar (QqQqQ).....	31
III.5.1 - Simbologia dos experimentos de espectrometria de massas seqüencial.....	32
Capítulo IV – Resultados e Discussões.....	33
IV.1- Monitoramento de reações de biotransformação promovidas pela levedura “ <i>saccharomyces cerevisiae</i> ” utilizando a técnica MIMS.....	33
IV.1.1- Conclusão.....	42
IV.2 - Determinação de cafeína, ácido ascórbico e ácido acetilsalicílico em preparações farmacêuticas utilizando a técnica DIMP/T&R- MIMS.....	43
IV.2.1 – Linearidade e reprodutibilidade do sistema DIMP/T&R-MIMS para os compostos analisados.....	44
IV.2.2 – Determinação de cafeína em amostras de preparações farmacêuticas..	44
IV.2.3 – Determinação de ácido ascórbico (vitamina C) em amostras de preparações farmacêuticas.....	46
IV.2.4 – Determinação de ácido acetilsalicílico (AAS) em amostras de preparações farmacêuticas.....	49
IV.2.5 – Conclusão.....	51
IV.3 - Tipificação de diferentes tipos de cervejas nacionais e importadas utilizando a técnica de ESI-MS.....	52
IV. 3. 1 – Análise por ESI-MS das amostras de cerveja selecionadas.....	54
IV.3.2 - Análise quimiométrica dos dados obtidos.....	59
IV.3.3 – Conclusões.....	66
IV.4 - Investigação do mecanismo de reação entre o reagente de Tebbe e vinil-éteres utilizando as técnicas de apci-ms e APCI-MS/MS.....	67

IV.4.1 – Conclusão.....	71
IV.5- Reações de funcionalização de ligações inertes C-H por carbonilação ativada por íons XCO^+ (X= F, Cl, Br) com compostos aromáticos utilizando espectrometria de massas seqüencial	72
IV.5.1 - Preparação direta de FCO^+ gasoso.....	74
IV.5.2 - Reações de três cátions halocarbonila com benzeno.....	75
IV.5.3 - Reações de íons FCO^+ com tiofeno, pirrol e furano.....	79
IV.5.4 - Substituições alquílicas.....	82
IV.5.5 - FSO^+	83
IV.5.6 – Conclusão.....	87
IV.6- Localização do sítio de carga em cátions hidroxí- e amino-benzoila por reações diagnósticas em fase gasosa com acetonitrila.....	88
IV.6.1 - Comportamento em experimentos de CID.....	91
IV.6.2 - Reações com acetonitrila.....	92
IV.6.3 – Conclusões.....	102
Capítulo V – Referências Bibliográficas.....	103

LISTA DE ABREVIATURAS

MS - Espectrometria de Massas;

MSⁿ – Espectrometria de Massas Seqüencial;

MALDI-TOF – Ionização por Dessorção por Laser Auxiliada por Matriz Acoplada a um Espectrômetro de Massas por Tempo de Vôo.

ESI – Ionização por Electrospray;

ESI-MS – Ionização por Electrospray Acoplada a um Espectrômetro de Massas;

MIMS – Espectrometria de Massas por Introdução via Membrana;

VOCs – Compostos Orgânicos Voláteis;

SVOCs – Compostos Orgânicos Semi-Voláteis;

EI – Ionização por Elétrons;

CI – Ionização Química;

DIMP– Sonda de Membrana de Inserção Direta;

T&R-MIMS – Espectrometria de Massas por Introdução via Membrana Acoplada a um Sistema de Trapeamento e Liberação;

SIM – Monitoramento de Íon Seletivo;

APCI – Ionização Química a Pressão Atmosférica;

APCI-MS - Ionização Química a Pressão Atmosférica acoplada a um Espectrômetro de Massas;

CID – Dissociação Induzida por Colisão;

GC-MS – Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas;

ICP-AES – Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado;

FT-ICR – Espectrômetro de Massas de Ressonância Ciclotrônica de Íons por Transformada de Fourier;

TS – Estado de Transição;

PCA – Análise de Componentes Principais;

CP – Componente Principal.

Capítulo I

INTRODUÇÃO

I.1 - A ESPECTROMETRIA DE MASSAS E SUAS POTENCIALIDADES

Grandes avanços recentes em instrumentação e o desenvolvimento de novas técnicas revitalizaram acentuadamente a Espectrometria de Massas (MS), que se constitui hoje em uma das mais abrangentes técnicas instrumentais em ciência, com amplas aplicações em diversos campos da química, biologia e ciências médicas e tecnológicas. Com seus novos horizontes, e amplas perspectivas de desenvolvimento, a MS vem se consolidando como uma ferramenta extremamente versátil e essencial em ciência. Desde pesquisas aplicadas até as mais fundamentais, a MS têm exercido papel de grande destaque, com crescente atuação.

Aplicações tradicionais da MS, como os espectros de massas obtidos de amostras puras através das técnicas de EI (Ionização por Elétrons) e CI (Ionização Química), já são largamente reconhecidas como das mais poderosas em análises estruturais de uma ampla variedade de classes de compostos, e de misturas quando associada a técnicas separativas.

O desenvolvimento de espectrômetros de massas de estágios múltiplos, como os triplo- e pentaquadrupolos, “*ion-traps*” e aparelhos de setores múltiplos (EB, BE, EBE, etc.) e também os híbridos (como os BEQqQ) constituíram também eventos muito importantes, permitindo o acesso a técnicas de MSⁿ e o aumento significativo de suas potencialidades analíticas. Análises estruturais de íons pré-selecionados realizados através de processos de dissociação ou reações íon/molécula permitem informações analíticas bem mais detalhadas quando comparadas àquelas obtidas através de espectros de massas simples. Com técnicas MSⁿ, obtem-se não somente a razão massa/carga (m/z) dos íons, mas também informações sobre as estruturas individuais de cada um destes íons, permitindo portanto a “reconstrução” por partes da estrutura da molécula precursora. Análises de misturas diretamente por MSⁿ também se torna possível, visto que íons de cada um de seus constituintes podem ser individualmente

separados e analisados. Desta forma, pode-se analisar misturas de compostos para as quais separações cromatográficas não são indicadas. Estudos detalhados de importantes intermediários iônicos, ou íons de diferentes classes, sem a influência de solventes ou contra-íons, podem também ser realizados com grande refinamento, permitindo estudos fundamentais de reatividade, descoberta e propostas de novas reações, e determinações de propriedades termodinâmicas.

Dois grandes eventos no desenvolvimento e na ampliação da gama de aplicações de MS ocorreram no início dos anos 90 com os desenvolvimentos das técnicas MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time-of-Flight*) e ESI-MS (*Electrospray*-MS).¹ Através de conceitos simples, mas revolucionários, moléculas termolábeis, íons em solução, complexos organometálicos, polímeros e moléculas de elevadas massas moleculares (até 1Mu ou mais), enfim espécies antes não adequadas às técnicas clássicas de ionização em MS, podem hoje ser analisadas com facilidade ou por MALDI-TOF ou por ESI em espectrômetros de massas convencionais. Massas moleculares de proteínas, polímeros e outras macromoléculas têm sido determinadas com precisões nunca antes alcançadas por outros métodos, além de inúmeras novas aplicações para moléculas menores de diversas classes. Estas novas técnicas de ionização têm assim projetado a MS em novas áreas, com destaque para a bioquímica, ciências médicas e de materiais. As técnicas MALDI-TOF e principalmente ESI-MS consolidaram portanto a MS como a técnica instrumental de mais amplo espectro de aplicações em ciência.

I.2 – MONITORAMENTO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS (VOCs) E SEMI-VOLÁTEIS (SVOCs)

A técnica MIMS (Espectrometria de Massas por Introdução via Membrana) vem sendo aprimorada nos últimos anos e tem se tornado uma das técnicas mais simples, rápida e sensível para as análises de compostos orgânicos voláteis² e semivoláteis³⁻⁴ não apenas em água bem como em outras matrizes como ar e solo.⁵⁻¹¹ A técnica MIMS está se desenvolvendo rapidamente e apresenta elevado potencial em química, com um número crescente de aplicações em química ambiental e também bioquímica e no monitoramento de processos químicos e

biológicos. MIMS pode ser aplicada para o monitoramento de processos químicos em tempo real e em “*in-situ*”,¹²⁻¹⁵ tais como: (a) a conversão de cloro a cloraminas, uma reação ambiental relevante durante o processo de tratamento de água, por exemplo;¹⁶⁻¹⁸ (b) cloração de fenol e compostos relacionados, modelos de ácidos húmicos, por hipoclorito de sódio;¹⁹ (c) oxidação de derivados de benzeno pelo reagente de Fenton;²⁰ (d) Fotólise de aril-metil-éster em solução aquosa e em solução metanólica;²¹ (e) Hidrólise da epícloridrina, um composto representativo na indústria de polímeros;²² (f) hidro-descloração catalítica de cloretos aromáticos, um importante processo para tratar compostos organoclorados.²³

1.2.1 – Breve histórico e descrição da técnica MIMS.

Em 1963, a técnica MIMS foi utilizada por Hoch e Kok²⁴ para o acompanhamento “*in situ*” da cinética da fotossíntese, através de medidas de oxigênio e dióxido de carbono. Este estudo foi seguido por vários outros estudos fotoquímicos por MIMS.²⁵⁻²⁷ Outra aplicação inicial das membranas em espectrometria de massas foi sua utilização como interface entre aparelhos cromatográficos e espectrômetros de massas.²⁸ Aplicações para a cinética de reações biológicas incluem os trabalhos pioneiros de Calvo e colaboradores²⁹ e Degn e Kristenson³⁰. Aplicações para o monitoramento de sistemas de reação foram introduzidos por Westover e Tou³¹ que estudaram compostos orgânicos voláteis (VOCs) tais como clorofórmio, hexano e metanol. Reuss e colaboradores³² adaptaram o sistema montado por Westover e Tou para o monitoramento “*on-line*” de fermentação, uma área na qual MIMS apresenta substancial aplicação.³²⁻³⁵

Na verdade, quando alguém se refere ao uso da técnica MIMS em um experimento qualquer, deve-se pensar em uma análise feita por um espectrômetro de massas (MS) onde a particularidade está na forma como a amostra é introduzida no mesmo. A simplicidade, sensibilidade, baixo custo e detecção muito próxima ao tempo real, e suas aplicações tem tornado a técnica MIMS³⁶ um método especialmente atraente para a análise de compostos orgânicos voláteis (VOCs), em amostras ambientais.³⁷

Espectrometria de Massas por Introdução via Membrana é uma técnica analítica na qual uma membrana semipermeável faz interface entre a amostra e o vácuo do espectrômetro de massas.

Em linhas gerais, MIMS se baseia na passagem seletiva de um analito, geralmente dissolvido em água, por uma membrana semipermeável (tipicamente polidimetilsiloxano, também conhecido como silicone) o qual é então conduzido até a fonte do espectrômetro de massas (Figura 1). O processo conhecido como pervaporação provoca um enriquecimento do analito e pode ser dividido em três etapas: ³⁸

- 1- adsorção do analito à superfície da membrana;
- 2- difusão deste ao longo da espessura da membrana;
- 3- dessorção da superfície da membrana na região de vácuo.

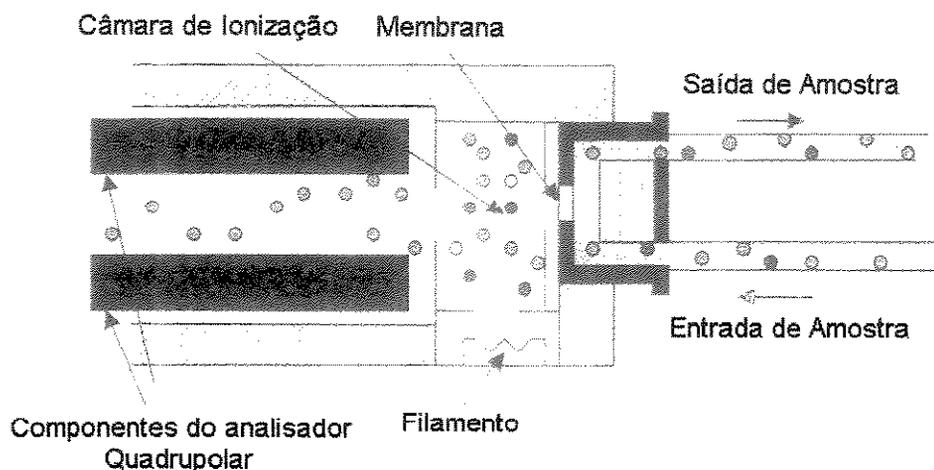


Figura 1 – Esquema geral de MIMS utilizando Ionização por Elétrons (EI) para ionizar os analitos que permeiam através de uma membrana planar de silicone.

Uma vez na região de vácuo, o analito chega até a fonte podendo ser ionizado tanto por ionização por elétrons (EI), como por ionização química (CI).

O fato da vazão da matriz (contendo os analitos), usualmente água ou ar, através da membrana ser proporcionalmente menor que a vazão dos analitos orgânicos de interesse resulta em um enriquecimento dos analitos na membrana. Este fato acarreta limites de detecção menores para os analitos, chegando a níveis de ng L^{-1} para analitos em água e a níveis de ng m^{-3} para analitos em ar. Outras vantagens importantes oferecidas por MIMS são (i) o método é rápido, (ii) não é necessário um pré-tratamento da amostra (como extrações, derivatizações,

etc), (iii) o custo por amostra é baixo, (iv) solventes não são utilizados, (v) MIMS pode ser utilizada para monitoramento contínuo a longo prazo de processos ambientais, bioquímicos e químicos e (vi) permite fácil interfaceamento com qualquer espectrômetro de massas (setoriais, quadrupolares e por armadilha de íons).³⁹

Vários modelos de dispositivos vêm sendo desenvolvidos desde a invenção feita por Hoch e Kok,²⁴ sendo possível dividi-los em duas classes principais (Figura 2):

a - os dispositivos onde a membrana fica no final da linha de transferência, distante da fonte de íons.

b - os dispositivos onde a membrana fica na entrada da fonte de íons (inserção direta).^{39a}

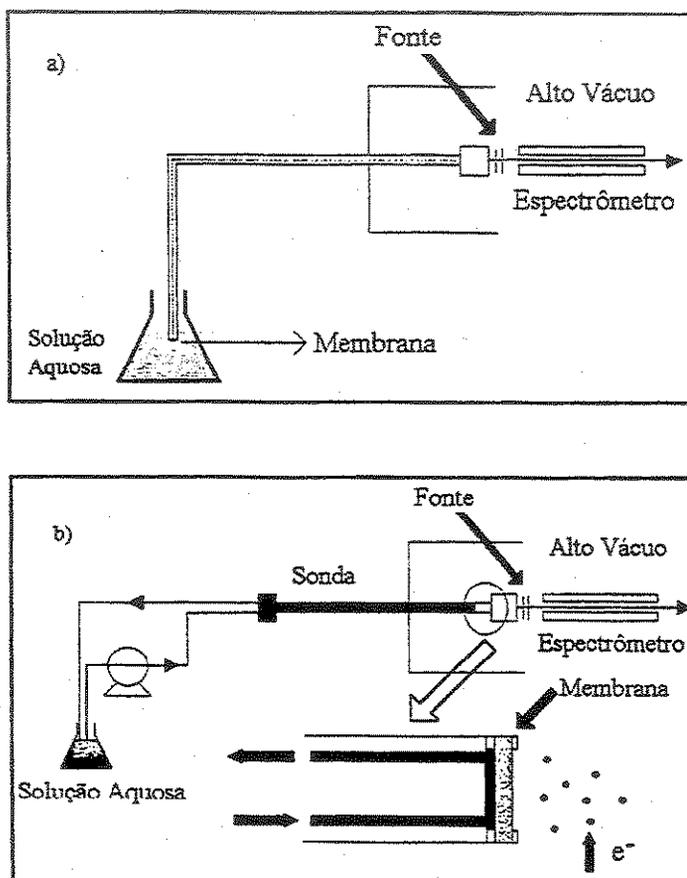


Figura 2 – Análise por MIMS através de: (a) Dispositivo de Inserção Distante e (b) de Inserção Direta.

O dispositivo de inserção direta, por diminuir o efeito de memória observado para o dispositivo de inserção distante, veio aprimorar a técnica MIMS.

1.2.2 – A técnica de DIMP/T&R-MIMS.³

A técnica de DIMP/T&R-MIMS³ é uma técnica derivada da técnica MIMS. Ela é constituída por uma sonda de membrana de inserção direta removível (DIMP) para análise combinada em nível de traço de compostos orgânicos voláteis (VOCs) e compostos orgânicos semi-voláteis (SVOCs). Neste método, compostos orgânicos semivoláteis (SVOCs) são pré-concentrados dentro de uma membrana tubular que passa diretamente através da fonte de íons. Uma fenda na fonte paralela tanto à membrana como ao filamento permite a radiação aquecida do filamento bombardear a superfície da membrana continuamente. Durante o período de amostragem, a membrana é mantida resfriada pelo fluxo contínuo de um líquido (tipicamente água) através de seu interior. Contudo, durante uma pequena interrupção do fluxo do líquido a membrana é rapidamente aquecida a uma temperatura superior a 300 °C e os compostos orgânicos dissolvidos na membrana são liberados dentro da fonte de íons. Desta forma, um pico de dessorção é obtido.³ O sistema DIMP/T&R-MIMS promove, durante o passo de dessorção térmica necessário para a análise de SVOCs, um aquecimento uniforme e rápido da membrana e ionização eficiente. Portanto, a sensibilidade é acentuada e os efeitos de memória são reduzidos em comparação com a técnica T&R-MIMS inicialmente desenvolvida.^{3b}

Perfil do Sinal: A Figura 3 mostra o perfil típico de um sinal para uma análise DIMP/T&R-MIMS, utilizando uma solução de β -naftol 25×10^{-6} mol L⁻¹. O experimento foi realizado utilizando monitoramento de íon seletivo (SIM). O sinal escolhido para o monitoramento do β -naftol foi seu íon molecular de m/z 144. No momento em que a solução começa a fluir através do sistema (a), pode ser observado um aumento na intensidade do sinal, correspondendo à resposta do sistema em seu modo MIMS convencional, porém este aumento é pouco significativo, não permitindo uma análise a baixos limites de detecção. O fluxo de amostragem é interrompido (b) e, quando o ar alcança a membrana (c) a

temperatura aumenta rapidamente. Então, o composto pré-concentrado é eficientemente liberado para a fase gasosa. Desta forma, a intensidade do sinal aumenta e após alguns segundos decresce novamente, produzindo assim um sinal bem definido e consideravelmente estreito. Para o β -naftol foi obtido um sinal aproximadamente 50 vezes mais intenso em relação ao obtido utilizando a técnica MIMS. Quando o fluxo de ar termina (d) e a água é novamente bombeada através do sistema, a membrana é rapidamente resfriada, fazendo com que o sinal retorne à linha base.

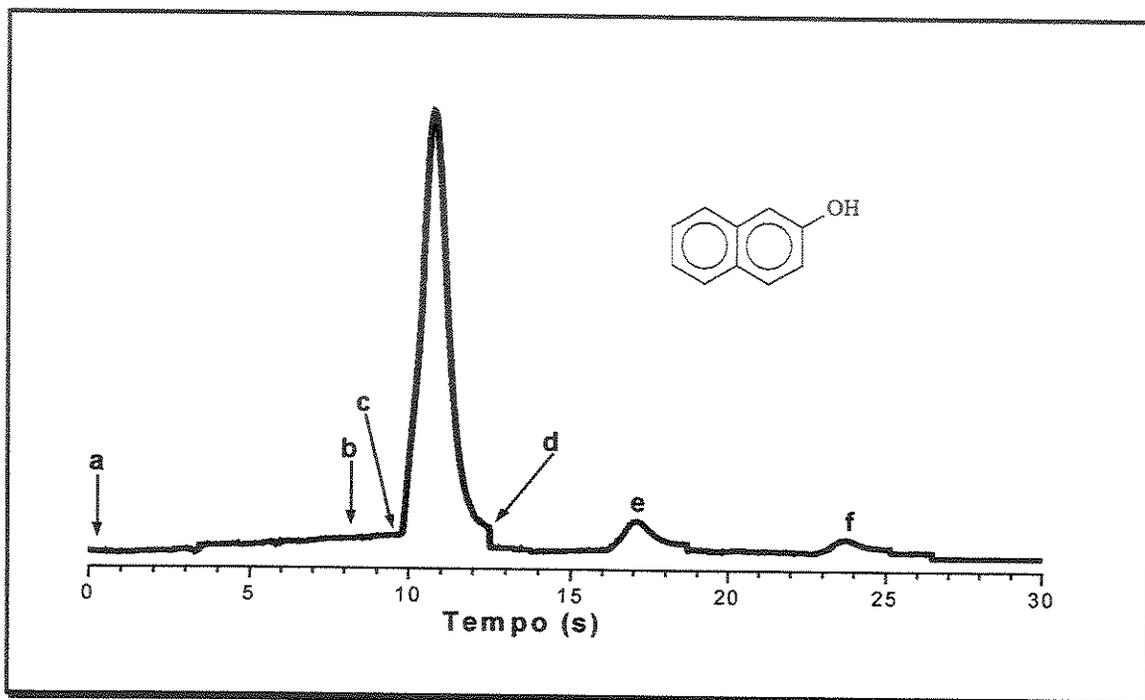


Figura 3 - Perfil do sinal do sistema DIMP/T&R-MIMS utilizando o modo de varredura SIM para uma solução de β -naftol $25 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. (a) início do bombeamento da solução; (b) introdução de ar no sistema; (c) chegada do ar à membrana; (d) chegada de água à membrana; (e) primeira limpeza; (f) segunda limpeza.

Efeito de Memória: A limpeza da membrana para a eliminação dos SVOCs residuais é realizada da seguinte maneira: bombeia-se água por 1 min, após isso interrompe-se o fluxo de água deixando o ar passar pela membrana, aquecendo-a. Esta etapa é repetida até que a membrana esteja completamente limpa. Os SVOC são quase que completamente eliminados na primeira lavagem como pode ser observado na Figura 3, e a limpeza torna-se completa na segunda lavagem,

resultando somente o pico de dessorção (f). A abundância deste pico é praticamente igual ao aumento da linha base ocasionada pelo aquecimento da própria membrana, ou seja, do ruído químico da membrana.^{3a}

No sistema T&R-MIMS inicialmente desenvolvida,^{3b} por ser utilizado somente um filamento, a face da membrana que não fica voltada para o filamento não é aquecida de maneira eficiente durante a etapa de dessorção, tornando desta forma o sistema mais suscetível a efeitos de memória. O aquecimento uniforme da membrana promovido pelo sistema DIMP/T&R-MIMS resulta em uma dessorção térmica uniforme melhorando a sensibilidade do sistema e reduzindo possíveis efeitos de memória, conseqüentemente diminuindo o tempo de análise.

Aquisição de Espectros de Massas Completos: O pico DIMP/T&R-MIMS tem tempo de duração consideravelmente curto, mas mesmo assim este tempo é suficiente para permitir a aquisição de vários espectros de massa completos dos composto que estão sendo analisados. Isto permite que se faça a identificação do analito com segurança. A Figura 4 mostra exemplos de espectros de massas completos obtidos através de análises utilizando o sistema DIMP/T&R-MIMS. Os espectros foram adquiridos no tempo de dessorção máximo (2min) utilizando solução diluída (25×10^{-6} mol L⁻¹) de alguns SVOCs de relativa importância. Os testes preliminares mostraram a eficiência do sistema para análise de alguns compostos orgânicos tais como: benzo[a]pireno, β -naftol, nicotina, fenantreno, ácido láctico, dimetilsulfoxido (DMSO) e cafeína.

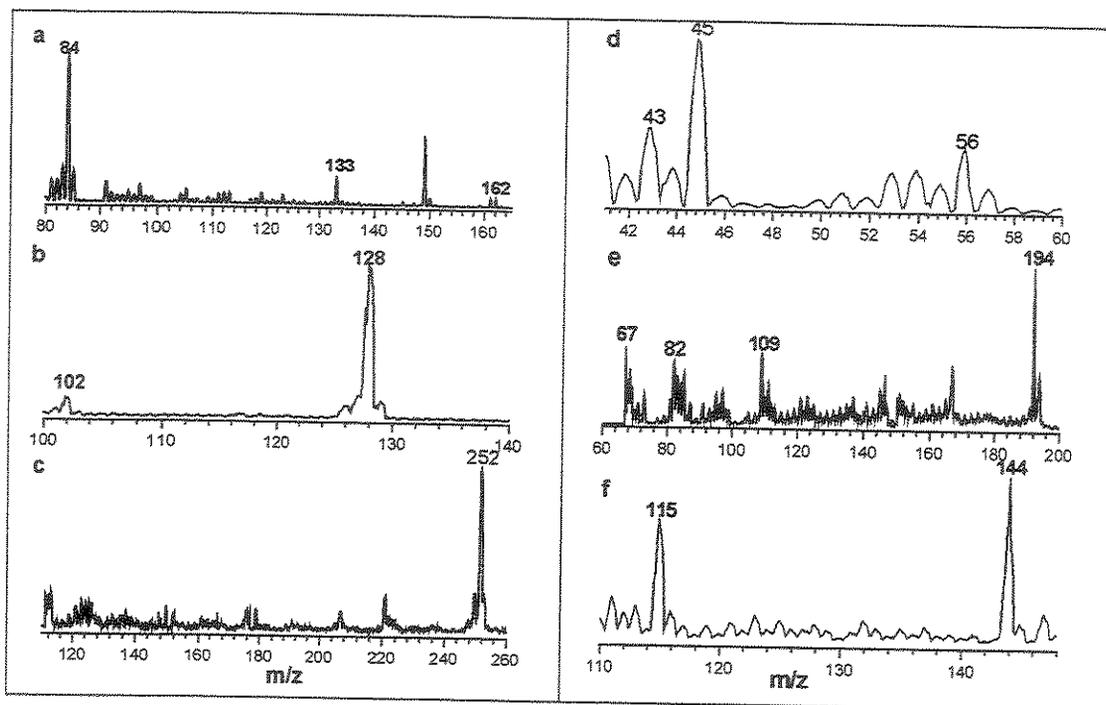


Figura 4 - Espectros de massas (EI a 70eV) obtidos com o sistema DIMP/T&R-MIMS. Soluções aquosas (25×10^{-6} mol L⁻¹); **(a)** nicotina; **(b)** naftaleno; **(c)** benzo[a]pireno; **(d)** ácido láctico; **(e)** cafeína; **(f)** β-naftol.

Os resultados apresentados mostraram que a técnica pode ser utilizada com eficiência em análise ambiental, principalmente para amostras líquidas contaminadas com compostos tais como: fenol, fenóis clorados, e compostos poliaromáticos.

I.3 – IONIZAÇÃO A PRESSÃO ATMOSFÉRICA

Espectrômetros de massas têm sido usados para o estudo de processos de ionização a pressão atmosférica. Desta forma, os íons podem ser levados da fase líquida para a fase gasosa se uma solução de uma amostra iônica ou polar é introduzida dentro de uma fonte de ionização a pressão atmosférica utilizando-se ionização por Electrospray (ESI). Por outro lado, analitos de moderada a baixa polaridade, e também compostos não-polares, e com massas moleculares pequenas a médias serão volatilizados por sua passagem através de um nebulizador aquecido e são ionizados a pressão atmosférica por ionização

química promovida por íons do solvente utilizando-se ionização química a pressão atmosférica (APCI).

Vejamos a seguir as particularidades e limitações de cada técnica para a análise dos mais variados analitos a pressão atmosférica.

1.3.1 - A técnica de ESI-MS (“Electrospray – Mass Spectrometry”)

Electrospray (ESI) é uma técnica suave de ionização que tem revolucionado a maneira que as moléculas são ionizadas e transferidas para os espectrômetros de massas para medida de massas e caracterização estrutural.⁴⁰ ESI tem, portanto, expandido muito a aplicabilidade da espectrometria de massas para uma variedade de novas classes de moléculas com instabilidade térmica e com elevadas polaridades e massas. Espectrometria de massas com ionização por ESI (e sistemas em tandem) tem sido principalmente (e de forma bem sucedida) aplicada para as análises de biomoléculas.⁴¹⁻⁴⁸ Por exemplo, a identificação e sequenciamento de proteínas foram motivação para o Prêmio Nobel em química de 2002 (John J. Fenn). Contudo, ESI-MS também têm se mostrado uma poderosa técnica para a caracterização estrutural de compostos orgânicos, inorgânicos e organometálicos⁴⁹⁻⁵⁹ e tem também sido aplicado como um método para rápida classificação de amostras “via impressão digital” de misturas complexas.⁶⁰⁻⁶² A técnica de ESI é também extremamente rápida, com um tempo médio de análise de poucos minutos, e, portanto, adequada para a análise de um grande número de amostras.⁶³

A Figura 5 descreve o mecanismo de ionização com a transferência dos íons positivos das gotas do spray para a fase gasosa. O processo de ionização por ESI é inovador, pois íons são formados em solução, e não mais na fase gasosa, eliminando-se então os problemas de volatilização de substâncias termolábeis e macromoléculas. A solução pode conter íons resultantes simplesmente da dissolução, por exemplo, de sais, ou íons formados por protonação ($[M+H]^+$) ou desprotonação ($[M-H]^-$ ou complexação com cátions) de substâncias ácidas ou básicas com ampla faixa de pesos moleculares. Esta solução é então submetida a um spray eletrolítico que oxida os íons negativos, deixando as gotas produzidas no spray com excesso de íons positivos, ou

alternativamente, através da redução dos íons positivos, com excesso de íons negativos. Através de uma contra-corrente de nitrogênio aquecido evapora-se o solvente e reduz-se o volume da gota. Ocorre então repulsão crescente entre íons de mesma carga, com possível subdivisão das gotas, e estes íons são eventualmente transferidos para a fase gasosa em um processo brando e eficaz. A partir desta etapa, operam os processos normais de análise, seleção e detecção de íons na fase gasosa por MS.

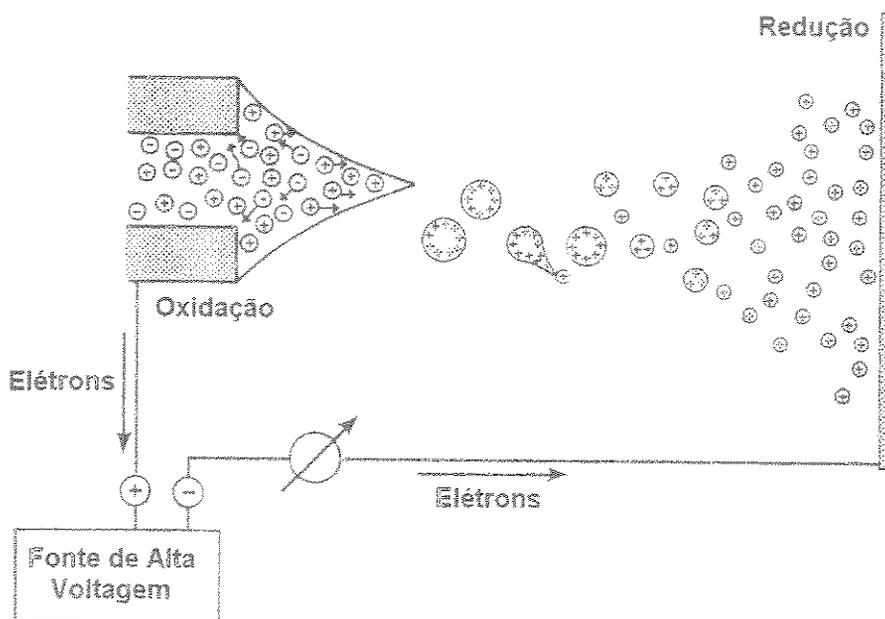


Figura 5 - Mecanismo de Ionização por Electrospray (ESI).

A técnica de ESI é também revolucionária ao permitir a MS o acesso e o estudo da química e estrutura de uma ampla variedade de íons antes inacessíveis por MS clássica com ionização EI/CI. Como exemplos podemos citar cátions metálicos dos mais variados obtidos por simples ionização de soluções aquosas de seus sais; íons organometálicos, aminoácidos, peptídeos, proteínas e carboidratos em geral, e diversas substâncias termolábeis, ionizadas em solução nas suas formas protonada, desprotonada ou complexada com cátions metálicos. A ausência de dissociação devido à formação de íons "frios" em solução é vantajosa para a análise de massas moleculares, mas dificulta a análise estrutural detalhada. A combinação de ESI com técnicas de MS/MS (Figura 6) se mostra então ideal e completa, pois, por exemplo, moléculas mono- ou multi-protonadas

podem ser selecionadas pelo primeiro analisador de massas Q_1 de um equipamento triploquadrupolar, dissociadas por CID (dissociação induzida por colisão) em q_2 , e os fragmentos analisados então por Q_3 .

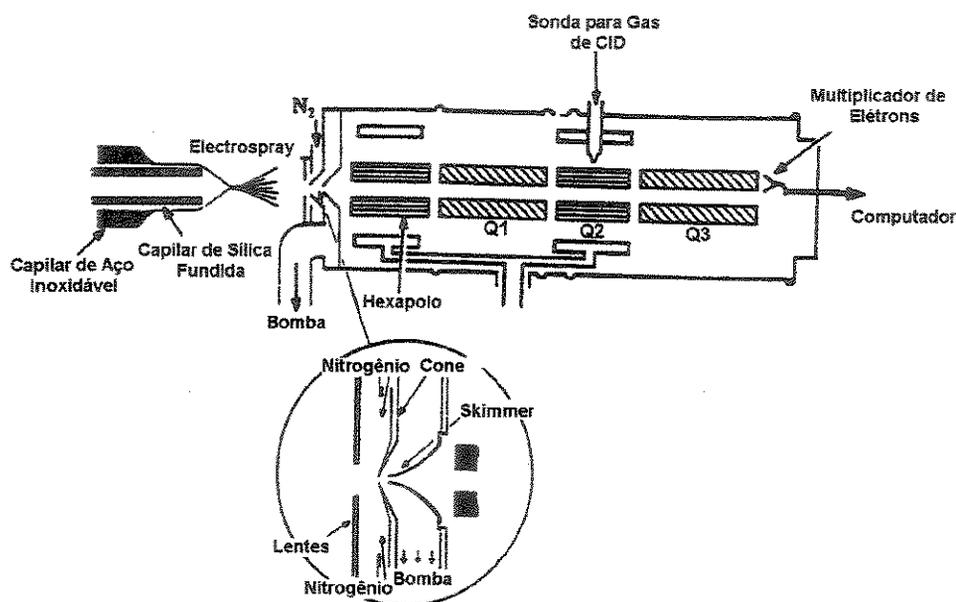


Figura 6– Combinação de ionização por ESI com técnicas de MS/MS.

I.3.2 - A técnica de APCI-MS (“Atmospheric Pressure Chemical Ionization – Mass Spectrometry”)

O processo de ionização na fase gasosa pode acontecer via os processos idênticos àqueles ocorrendo nas fontes de ionização química: transferência de carga, captura de elétrons e reações íon-molécula.⁶⁴

Ionização química a pressão atmosférica (APCI) é um método de ionização a pressão atmosférica utilizando uma descarga corona. As moléculas do solvente são ionizadas primeiro, e então uma reação íon-molécula entre os íons do solvente ionizados e as moléculas da amostra levam à produção de íons protonados ou desprotonados da amostra (Figura 7). APCI, inicialmente chamada ionização a pressão atmosférica (API), foi desenvolvida por Horning e colaboradores. Uma solução líquida volátil (água ou metanol, etc.) contendo os analitos é introduzida em uma fonte de APCI a uma vazão constante de 0,5-2,0 mL/min., e as soluções são nebulizadas e vaporizadas sob aquecimento. Pela

descarga corona, as moléculas do solvente são ionizadas para produzir íons do solvente, que então reagem com as moléculas da amostra, produzindo espécies protonadas $(M+H)^+$, desprotonadas $(M-H)^-$ e associações com íons amônio $(M + NH_4)^+$ (quando acetato de amônio ou tampão de formato de amônio é usado).⁶⁵ A maioria das reações íon-molécula em APCI envolve a química ácido-base em fase gasosa.⁶⁶

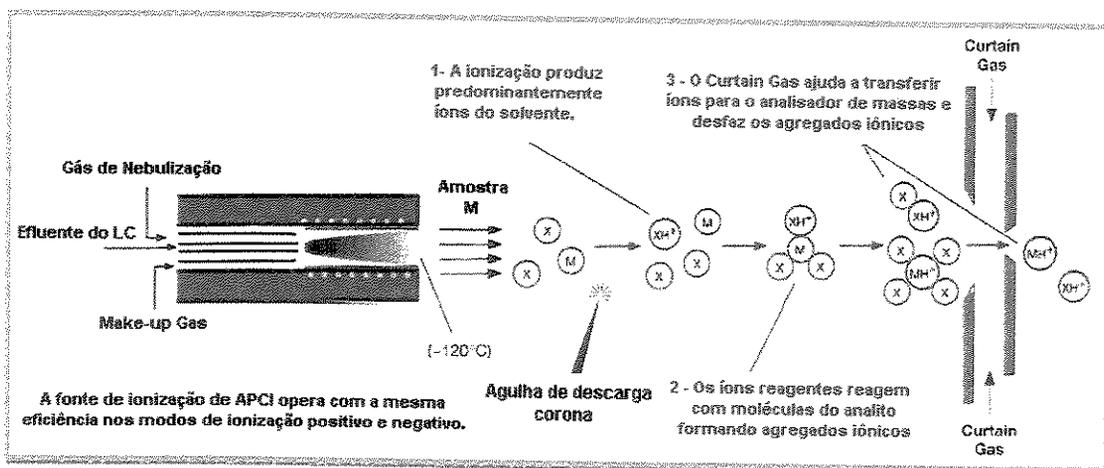


Figura 7 - Mecanismo de Ionização por APCI.

APCI é uma técnica de ionização adequada para as análises de analitos de moderada a baixa polaridade (e também compostos não-polares) e com massas moleculares pequenas a médias (Figura 8). Assim, estes analitos (antes na fase líquida) com estas características, sob aquecimento, serão volatilizados por sua passagem através de um nebulizador aquecido e ionizados por ionização química a pressão atmosférica na fonte de APCI. Desta forma, a utilização de APCI na indústria farmacêutica para a análise de drogas e metabólitos está presente. Da mesma forma esta técnica é útil para a análise de corantes, de ácidos graxos, esteróides, PAH's (hidrocarbonetos aromáticos polinucleares) e PCB's (bifenilas policloradas) e para amostras contendo heteroátomos (uréia, carbamatos e benzodiazepinas). Ou seja, APCI é adequada para amostras com massas moleculares menores ou iguais a 1000 u. De forma contrária, amostras que são tipicamente analisados por ESI e carregadas em solução (como proteínas, peptídeos e aminoácidos, que tendem a ser espécies termicamente lábeis) devido a suas altas massas serão menos voláteis e, portanto, não são adequadas para análise por APCI porque devido a sua baixa volatilidade elas não serão

transferidas intactas para a fonte de ionização devido a sua decomposição no nebulizador aquecido da fonte de APCI. Em contraste com ESI, a evaporação do solvente e a ionização do analito são dois processos separados, o último sendo uma ionização química a pressão atmosférica com uma fase móvel agindo como gás reagente. Uma vez que a evaporação da fase móvel é suportada pela aplicação de temperaturas de até 500⁰C, esta forma de ionização é um tanto menos branda do que ESI. APCI normalmente produz íons contendo uma única carga através da adição ou abstração de prótons (e. g. $[M + H]^+$ e $[M - H]$, respectivamente), enquanto que a ionização por Electrospray pode gerar íons multiplamente carregados de proteínas de alta massa molecular, por exemplo.⁶⁷

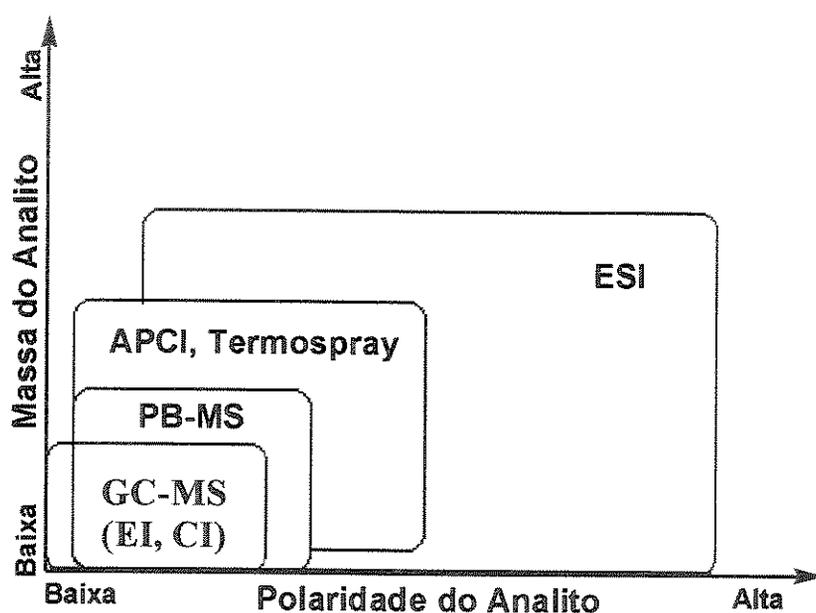
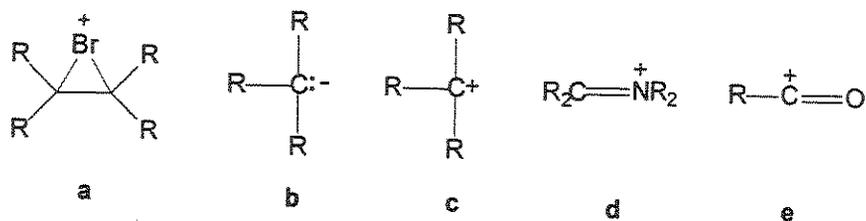


Figura 8 – Faixa de aplicação de técnicas de espectrometria de massas (ionização) como função da polaridade do analito e da massa molecular.

I.4 – ESTUDOS DE REAÇÕES ENTRE ÍONS E MOLÉCULAS NA FASE GASOSA.

As espécies iônicas desempenham um papel fundamental em vários processos químicos. Um exemplo característico de tal papel é fornecido por muitas reações sinteticamente úteis, as quais são dirigidas ou muito afetadas pelas propriedades de seus intermediários iônicos. A força motriz para estas reações é freqüentemente determinada pela grande reatividade dos intermediários iônicos, enquanto algumas de suas propriedades únicas são responsáveis em muitos casos por sua estereoquímica e regioquímica específicas observadas. Muitas mudanças na estrutura (ou conectividade) dos reagentes iniciais também ocorrem durante o curso da reação devido ao rearranjo dos intermediários iônicos. Por exemplo, íons clorônios e bromônios *a* são os intermediários chave em reações sinteticamente úteis de adição de halogênios a alquinos e alquenos, a sua estrutura e reatividade conta para a alta estereoseletividade desta reação. Os carbânions intermediários *b* nas reações de condensação aldólicas, os íons carbônios *c* em muitas reações de substituição nucleofílica, os íons imônios *d* nas reações de Mannich, e os íons acílios *e* nas reações de Friedel-Crafts são outros exemplos representativos de espécies intermediárias chave em importantes reações químicas. Espécies iônicas também desempenham um proeminente papel em outras áreas tais como na química da ionosfera e na química da chama. Um amplo conhecimento das propriedades intrínsecas de tais íons é, portanto, indispensável para o entendimento e controle das reações químicas e outros processos químicos importantes em que eles participam como intermediários chaves.



Soluções, porém, dificultam estudos detalhados de espécies iônicas devido ao curto tempo de vida destas espécies no meio condensado e à interferência do solvente. Além disso, o meio condensado impede, muitas vezes, a formação de outros íons com reatividades potencialmente interessantes. Tem-se ainda que os

dados obtidos por estudos em solução são sempre referentes ao conjunto íon/solvente, sendo impossível conhecer, isoladamente, a reatividade intrínseca dos íons e o efeito de solvatação: conhece-se apenas as propriedades resultantes desta associação.⁶⁸

A espectrometria de massas (MS) é a técnica instrumental mais apropriada para a investigação da estrutura e reatividade de íons, e a medida de suas propriedades físico-químicas. O ambiente de alto vácuo do espectrômetro de massas apresenta-se ideal para estudar as propriedades intrínsecas de espécies iônicas em fase gasosa e para procurar paralelos ou para predizer sua química em fase condensada. Muitos íons os quais são difíceis de serem isolados ou até mesmo espécies inacessíveis em solução, podem ser facilmente geradas na fase gasosa por técnicas de espectrometria de massas. Em fase gasosa, tais íons usualmente mostram tempos de vida relativamente longos que permite seu isolamento e o estudo de suas propriedades intrínsecas.⁶⁸ Os diversos tipos de ionização disponíveis hoje em espectrometria de massas permitem também a geração de uma ampla variedade de íons, muitos ainda não observados em fase condensada e, portanto, ainda não estudados. Quando se utilizam espectrômetros de massas de estágios múltiplos,⁶⁹ como triplo e pentaquadrupolos, os “*ion-traps*” e os ICR’s (ressonância ciclotrônica de íons), torna-se possível a realização de experimentos de MS seqüencial (MSⁿ). Os íons gerados na fase gasosa podem ser isolados e em seguida reagidos com moléculas neutras, processo este denominado de reação íon/molécula (IM). Alternativamente, estes íons podem ser colididos com um gás inerte, induzindo assim sua fragmentação: este processo é conhecido como dissociação induzida por colisão (CID). Estes experimentos podem ser utilizados na elucidação estrutural, no estudo da reatividade e na obtenção das propriedades físico-química dos íons.⁷⁰

Vários instrumentos de MS seqüencial se aplicam ao estudo de reações íon/molécula, e entre eles se destacam os ICR’s, “*ion-traps*” e multiquadrupolares. Na categoria dos multiquadrupolares, os equipamentos pentaquadrupolares têm a vantagem de permitir três estágios de análise de massa/carga (m/z), proporcionando, assim, experimentos seqüenciais no espaço. Nestes experimentos, os três primeiros quadrupolos são utilizados para a realização da reação, enquanto os dois últimos podem servir para uma segunda reação com os

íons produto da primeira reação ou a dissociação destes induzida por colisão (CID). Nestes instrumentos, portanto, todas as etapas de um estudo de reatividade são realizadas: purificação e seleção do reagente, reação, separação dos produtos de reação e, por fim, a análise estrutural destes por MS.⁷¹

1.4.1 – Os diagramas de energia potencial (DEP) para as reações entre íons e moléculas na fase gasosa e em fase condensada

Reações entre íons e moléculas são comuns em química e podem ser estudadas tanto em solução como em fase gasosa. Embora muitos conceitos físico-químicos clássicos empregados em solução sejam válidos também em fase gasosa, algumas peculiaridades distinguem as reações íon/molécula em fase gasosa das reações em fase condensada.

Na fase gasosa, os experimentos são realizados sob pressão reduzida e em um curto espaço de tempo, condições que não possibilitam o estabelecimento de equilíbrio. As reações íon/molécula são, portanto, controladas pelos aspectos cinéticos. Outra diferença se observa no diagrama de energia potencial (DEP) de reações íon/molécula. Na Figura 9a é mostrado o DEP de reação na fase condensada e na Figura 9b o DEP de uma reação na fase gasosa, ambas exotérmicas.

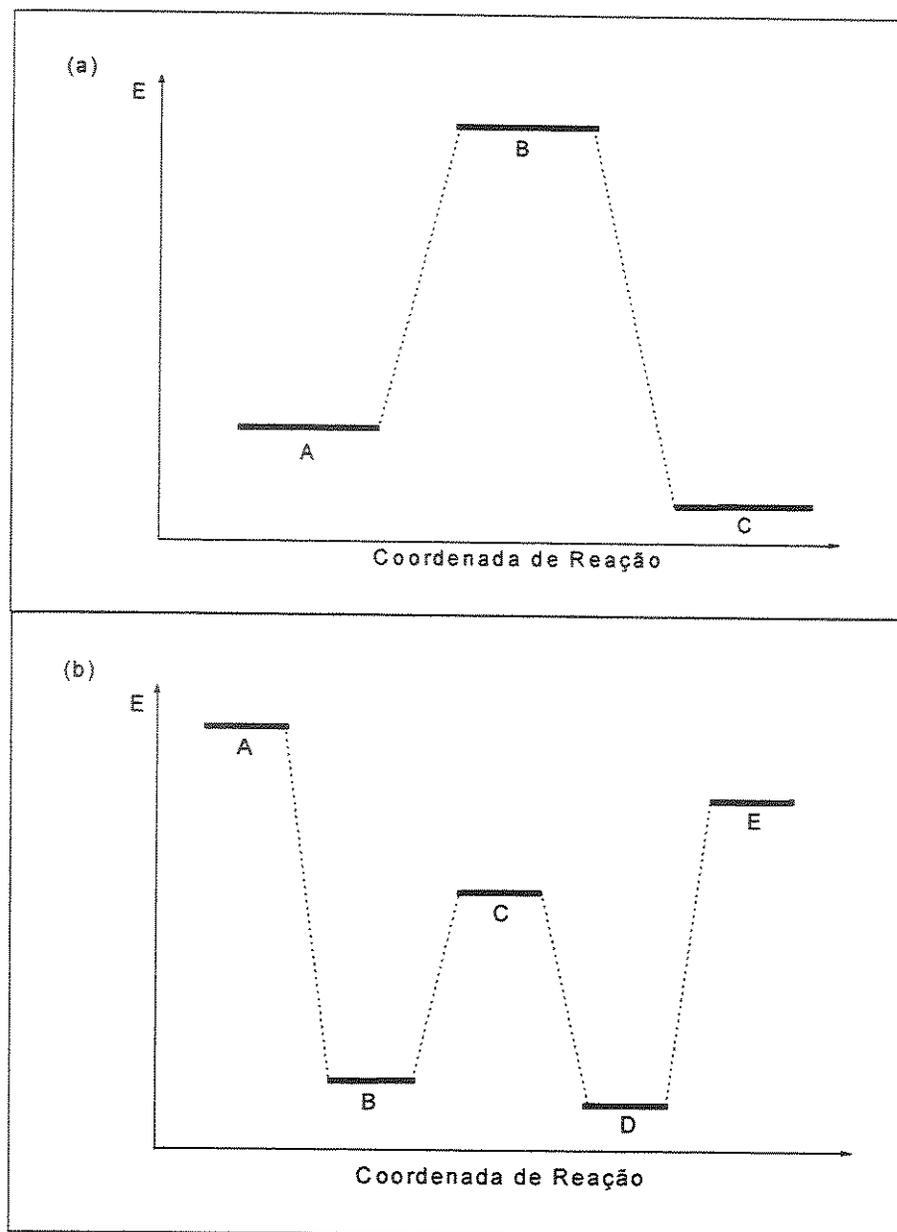


Figura 9 – Diagramas de energia potencial (DEP) para uma reação exotérmica na fase condensada (a) e na fase gasosa (b).

Na Figura 9a, o patamar (A) representa a energia dos reagentes que, através de um estado de transição (B), se transforma nos produtos (C). Já na Figura 9b, (A) representa a energia dos reagentes isolados, enquanto que (B) representa a energia do “complexo íon/molécula”, mais estável devido às forças de atração intermoleculares. Uma vez formado o “complexo íon/molécula” (Esquema 1), a reação prossegue através de um estado de transição (C) levando aos produtos (D). Estes produtos, por sua vez, podem se separar com aumento de

energia (E). Este diagrama observado na fase gasosa é conhecido como duplo poço de potencial.⁷² A diferença entre os DEP's de reações em solução e em fase gasosa é causada pelo efeito do solvente. Em solução, a energia dos reagentes já se encontra minimizada pelas interações com o solvente. Desse modo, a aproximação das moléculas dos reagentes não resulta em estabilização adicional. Já nas reações íon/molécula em fase gasosa, os reagentes se encontram isolados e, ao se aproximar o íon de uma molécula neutra, as interações intermoleculares (interações entre o íon e o dipolo da molécula neutra) tornam o “complexo íon/molécula” mais estável que as duas espécies isoladas.

O “complexo íon/molécula” (CIM) consiste em um cluster onde há uma atração forte entre a nuvem eletrônica da molécula neutra (dipolo e dipolo induzido) e o íon em questão.



Esquema 1 - Complexo íon-molécula.

I.4.2 - A espectrometria de massas pentaquadrupolar (QqQqQ)

Desde os trabalhos pioneiros de Thomson, Dempster, Aston e Cooks, tem ocorrido um marcante crescimento no uso da MS, e junto com esse crescimento surgiu em 1986 o primeiro pentaquadrupolo (QqQqQ),⁷³ resultado do desenvolvimento da espectrometria de massas monoquadrupolar e triploquadrupolar (QqQ).⁷⁴ O pentaquadrupolo foi construído para expandir as aplicações de triploquadrupolos, que em processos de dissociação ou reações íon/molécula não poderiam fornecer informações estruturais sobre os produtos iônicos formados. Assim, o arranjo pentaquadrupolar se tornou uma alternativa natural e em 1986 Morrison⁷³ e Rolando e colaboradores⁷⁵ descreveram o primeiro pentaquadrupolo totalmente interfaceado e assim capaz de realizar com rapidez e eficiência todos os modo de varredura MS³.

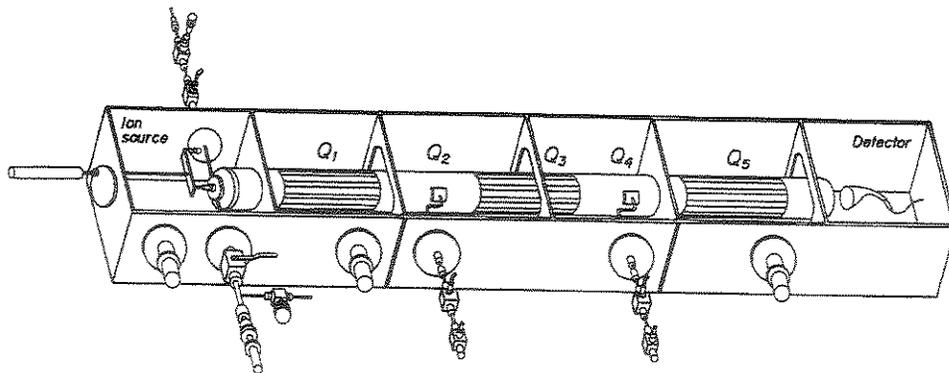


Figura 10 - Representação Esquemática do Espectrômetro de Massas Pentaquadrupolar existente no Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas (IQ – UNICAMP).

Pentaquadrupolos (QqQqQ) empregam dois quadrupolos de reação ou colisão (q_2 e q_4), mais conhecidos como quadrupolos focalizadores de íons ou quadrupolos do tipo “*rf-only*”, e três quadrupolos analisadores de massas operacionalmente independentes (Q_1 , Q_3 e Q_5). Seu arranjo seqüencial “*on-line*” (seqüencial no espaço), permite o estudo de reações de íons selecionados (pelas suas razões m/z) com moléculas neutras que ocorrem em seqüência em duas regiões separadas no espaço (q_2 e q_4) e que são monitoradas pelos três analisadores de massas (Q_1 , Q_3 e Q_5). Assim, é possível a realização de experimentos MS/MS/MS (MS^3) seqüenciais no espaço, que podem fornecer informações detalhadas das propriedades químicas e termodinâmicas de espécies moleculares, como suas conectividades, seus grupos funcionais, suas reatividades intrínsecas, acidez, eletro e nucleofilicidade. Estas informações podem ainda encontrar aplicações analíticas, sintéticas e em medidas de propriedades termodinâmicas.⁷¹

Além de fornecer informações sobre a reatividade de íons e moléculas,⁷¹ experimentos MS^3 em pentaquadrupolos são feitos na ausência de solvente e contra-íons, podendo-se assim estudar as reatividades intrínsecas destas espécies, aproximando muito os resultados obtidos em reações íon/molécula em fase gasosa daquelas previstas por cálculos teóricos “*ab initio*”. Como se sabe, esses cálculos são realizados na “ausência de solventes”, ou seja, para espécies isoladas.

As reações íon/molécula na fase gasosa podem fornecer informações importantes para a química em solução, por determinar as propriedades intrínsecas dos íons⁷⁶ e das moléculas na ausência de solvente. Estas informações são relevantes para reações onde intermediários iônicos altamente reativos em solução, estão envolvidos, e como uma poderosa técnica de pré-seleção (“*screening*”) de reações ainda não testadas em solução, mas com potencial sintético previsto pelos estudos em fase gasosa.

1.4.3 - Os cálculos teóricos

Outra importante ferramenta nos estudos da reatividade, estrutura e propriedades de íons são os cálculos de orbitais moleculares. Através da resolução de equações da mecânica quântica,⁷⁷ várias propriedades podem ser calculadas para, em princípio, qualquer espécie química. Um dos dados mais importantes fornecidos por esses cálculos é a energia eletrônica. Através dessas energias, os diagramas de energia potencial podem ser calculados de forma a se obter uma visão geral do processo químico em questão. Adicionalmente, várias outras propriedades úteis podem ser obtidas para as espécies calculadas, como a geometria de equilíbrio, frequências de vibração, energia do ponto zero, momentos de multipolo, distribuição de carga e spin, entre outras.

Ao se realizar um cálculo “*ab initio*”, o modelo teórico considera a espécie isolada no espaço, livre de qualquer interferência do meio (embora haja métodos para a simulação do efeito de solvente ou de campo elétrico). Desse modo, os dados obtidos correspondem aos de uma molécula em vácuo absoluto, condição semelhante à dos experimentos realizados em espectrômetros de massas. Desse modo, espera-se que os dados dos cálculos teóricos consigam modelar os resultados experimentais em fase gasosa com uma precisão maior do que a obtida para experimentos em fase condensada.

Capítulo II

OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo utilizar técnicas de espectrometria de massas em análises quantitativas de compostos semi-voláteis presentes em preparações farmacêuticas, para a tipificação de amostras de cerveja nacionais e importadas e no monitoramento de reações em meio aquoso e em fase gasosa. Estes estudos foram divididos em seis partes.

O monitoramento de reações de biotransformação foi realizado com o objetivo de se verificar a formação dos produtos de redução a partir de substratos contendo grupos carbonílicos utilizando-se uma levedura encapsulada em alginato de cálcio. O monitoramento de tais processos utilizando a técnica MIMS tornou possível se observar a conversão dos substratos utilizados nos produtos da reação.

Análises quantitativas de ácido acetilsalicílico (AAS), vitamina C (ácido ascórbico) e cafeína em amostras de preparações farmacêuticas utilizando a técnica DIMP/T&R-MIMS foram realizadas com o objetivo de fornecer mais uma alternativa de análise de tais compostos na matriz selecionada em adição as demais técnicas já conhecidas.

Dando seqüência ao trabalho, um estudo de um conjunto de amostras de cervejas nacionais e importadas de diferentes tipos foi realizado utilizando-se a técnica de ESI-MS de modo a se realizar uma tipificação destas amostras com espectros de massas bem característicos para cada tipo de cerveja analisada. Análise de componentes principais (PCA) aplicada aos espectros de massas obtidos também foi utilizada com o objetivo de se realizar uma classificação destas amostras.

Com o objetivo de se estudar o mecanismo de reação entre o reagente de Tebbe e vinil-éteres em fase gasosa foram utilizadas as técnicas de APCI e APCI-MS/MS para se estudar os intermediários titanociclos transientes formados durante a reação de modo a se inferir no mecanismo deste tipo de reação já descrito na literatura.

Cátions halocarbonila XCO^+ ($X= F, Cl, Br$) foram reagidos com compostos aromáticos em fase gasosa com o objetivo de promover a funcionalização seletiva e a ativação da ligação C-H inerte de compostos aromáticos (M-H) via carbonilação iônica utilizando espectrometria de massas seqüencial.

Finalmente, compostos isoméricos com fragmentos diagnósticos em comum foram reagidos em fase gasosa com acetonitrila utilizando um espectrômetro de massas pentaquadrupolar de modo a caracterizar toda uma classe de compostos que contém cátions hidróxi- e amino-benzoila diagnósticos em comum.

Capítulo III

PARTE EXPERIMENTAL

III.1 – MONITORAMENTO DE REAÇÕES DE BIOTRANSFORMAÇÃO PROMOVIDAS PELA LEVEDURA “SACCHAROMYCES CEREVISIAE” UTILIZANDO A TÉCNICA MIMS.

III.1. 1 – Introdução dos substratos no reator de vidro.

Nestes experimentos, 50 mg dos substratos utilizados e 10,0g de glicose foram dissolvidos em 400 mL de água contendo 5 % de etanol para completa dissolução do substrato em água. Neste caso, 7,5g de “*Saccharomyces Cerevisiae*” liofilizado foram encapsulados em alginato de cálcio. As soluções contendo cada substrato foram mantidas sob agitação constante (A) e com o auxílio de uma bomba peristáltica (ISMATEC multicanal - B) estas soluções foram transferidas a uma vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ para um reator de vidro contendo a levedura encapsulada em alginato de cálcio (C) e o efluente do reator foi coletado após passar por toda extensão do mesmo (D) (Figura 11). Este pequeno reator de vidro de 20,0 cm de comprimento e de 7,0 cm de largura contendo o microorganismo encapsulado recebeu os substratos promovendo a reação de redução dos mesmos. Antes da introdução dos substratos o reator contendo a levedura encapsulada é completamente preenchido com água destilada.

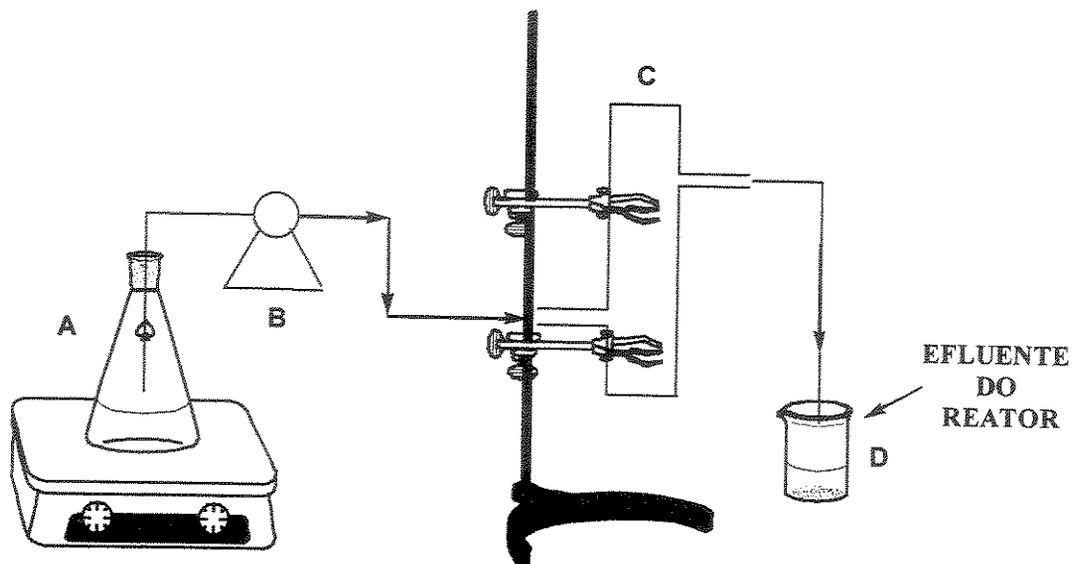


Figura 11 – Representação esquemática do sistema utilizado durante as reações de biotransformação: (A) solução contendo o substrato monitorado sob agitação; (B) bomba peristáltica de oito rolos; (C) reator de vidro contendo a levedura encapsulada em alginato de cálcio, (D) coletor do efluente do reator.

III.1. 2 – Retirada dos produtos de reação remanescentes do reator de vidro.

Após os 400 mL de cada substrato terem sido bombeados através do reator contendo a levedura (aproximadamente 6 horas), outros 400 mL contendo apenas água e açúcar foram bombeados através do reator para retirar o restante do produto de biotransformação contido em seu interior (por aproximadamente 5 horas). Este processo, que compreende o início da entrada de cada substrato até sua retirada completa do reator, tem uma duração de aproximadamente 11,0 horas para ambos os substratos utilizados.

III.1. 3 – Utilização da técnica MIMS.

Durante toda a reação foram coletadas alíquotas, tanto durante o período em que o reator de vidro estava sendo abastecido de substrato, como durante o período em que apenas água com açúcar estava realizando a limpeza do reator pela retirada dos produtos de reação remanescentes.

Devido às altas concentrações tanto dos substratos quanto dos produtos resultantes das duas reações monitoradas, os efluentes oriundos do reator

durante todo o período de monitoramento foram submetidos à diluição adequada para sua leitura pelo sistema MIMS. A coleta destas alíquotas submetidas à diluição foram feita em intervalos de 15 min. No início da reação, antes da coleta das primeiras gotas de efluente do reator observou-se que o tempo de residência do substrato dentro do mesmo era de 40 min. As alíquotas recolhidas (5,0 mL para o substrato A e 2,0 mL para o substrato B) foram diluídas para 10,0 mL de solução com água destilada. Os experimentos utilizando a sonda de MIMS (Figura 12) foram realizados em um espectrômetro de massas Extrel (Pittsburg, PA) adaptado com um quadrupolo de 3/4" de alta transmissão, utilizando EI com energia de ionização de 70 eV. As alíquotas do efluente contendo os analitos foram bombeadas através da sonda de membrana de silicone [Silastic 500-3, 0,010" de espessura, Dow Corning Co.] por uma bomba peristáltica de oito rolos a uma vazão de 2 mL min⁻¹. Após a leitura de cada alíquota água destilada foi utilizada para limpeza minimizando ao máximo a interferência entre alíquotas. Durante a passagem de apenas água destilada pela membrana observa-se a diminuição gradativa até a linha de base de cada razão massa/carga (*m/z*) que sofreu elevação de seu sinal. Os experimentos foram realizados em sala com temperatura controlada (23 ± 1°C). Foi utilizado o modo SIM (monitoramento de íon seletivo) pelo monitoramento das razões massa/carga (*m/z*) características do substrato (quando possível) e dos produtos de interesse produzidos durante a reação.

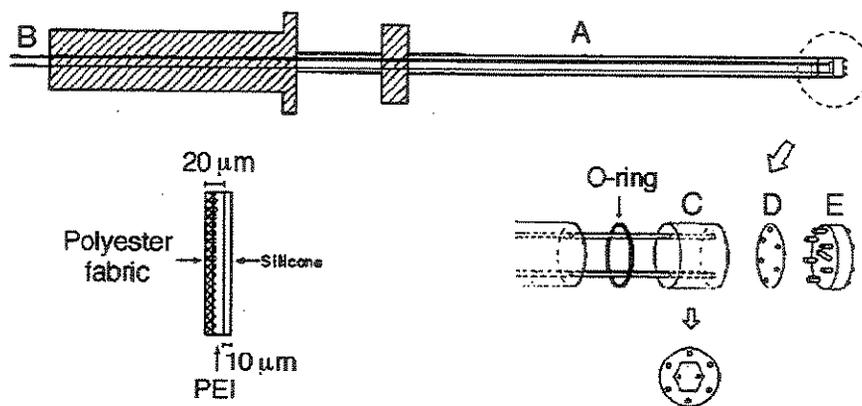


Figura 12 - Representação esquemática da sonda de membrana onde se destacam: (A) o corpo da sonda de membrana, (B) tubos de circulação da amostra, (C) cilindro de fixação da membrana, (D) membrana e (E) suporte vazado para a fixação da membrana.

III.2 – DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA, ÁCIDO ASCÓRBICO E ÁCIDO ACETILSALICÍLICO EM PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS UTILIZANDO DIMP/T&R-MIMS.

III.2.1 – Preparo de amostras, de soluções padrão e condições de análise:

Em todos os experimentos realizados uma porção do pó equivalente ao peso médio de vários comprimidos (em média dez comprimidos para cada analito) foi dissolvida em água destilada e filtrada com papel de filtro faixa preta para eliminar excipientes contidos nas amostras de modo a evitar obstruções no sistema DIMP/T&R-MIMS. As soluções padrão de cafeína, ácido ascórbico e ácido acetilsalicílico foram preparadas em água destilada a partir da diluição de uma solução padrão mais concentrada (1000 mg L^{-1}) dos analitos. Uma vez que ácido ascórbico, ácido acetilsalicílico e cafeína estão em suas formas neutras e, portanto, aptos a permear a membrana de silicone, em torno de $\text{pH}=4,0$, $\text{pH}=2,0$ e $\text{pH}=7,0$, respectivamente, as soluções padrão e as soluções das amostras foram preparadas nestes valores de pH. Curvas analíticas nas faixas de concentrações adequadas foram construídas para a quantificação destes compostos. Todas as soluções utilizadas (padrões e amostras) foram preparadas pouco antes da realização das análises para evitar uma possível degradação dos analitos. Análises em triplicata utilizando técnicas de DIMP/T&R-MIMS e de titulação (para cafeína não foi utilizada nenhuma técnica de titulação para comparação) foram realizadas. Todas as amostras dos fármacos utilizados contendo cafeína, ácido acetilsalicílico e ácido ascórbico pertenciam todas ao mesmo lote e fabricante e foram adquiridas em drogarias locais.

III.2.2 – Utilização do sistema DIMP/T&R-MIMS

A solução do analito foi bombeada através do sistema DIMP/T&R-MIMS (Figura 13) por um intervalo de tempo de 20 min. Isto permite que o analito seja pré-concentrado no interior da membrana, a qual é mantida fria através do fluxo de fluido. O fluxo de amostra é então interrompido por um intervalo de tempo de 2,0 min para volatilização dos compostos que ficaram adsorvidos na membrana. Após a dessorção do analito da membrana, água é bombeada através da mesma por 1

minuto para se efetuar a limpeza da membrana. Novamente faz-se a interrupção deste fluxo aquecendo desta forma a membrana e volatilizando os compostos que ainda estejam adsorvidos na mesma de modo a promover sua limpeza completa. As soluções padrão e as soluções contendo os analitos foram bombeadas através da sonda de DIMP/T&R-MIMS por uma bomba peristáltica de oito rolos a uma vazão de 2mL min^{-1} .

A membrana é aquecida em toda a sua superfície. Este aquecimento uniforme é obtido por um correto posicionamento da membrana, ou seja, a membrana deve estar levemente inclinada. Este aquecimento uniforme reduz substancialmente o efeito de memória.

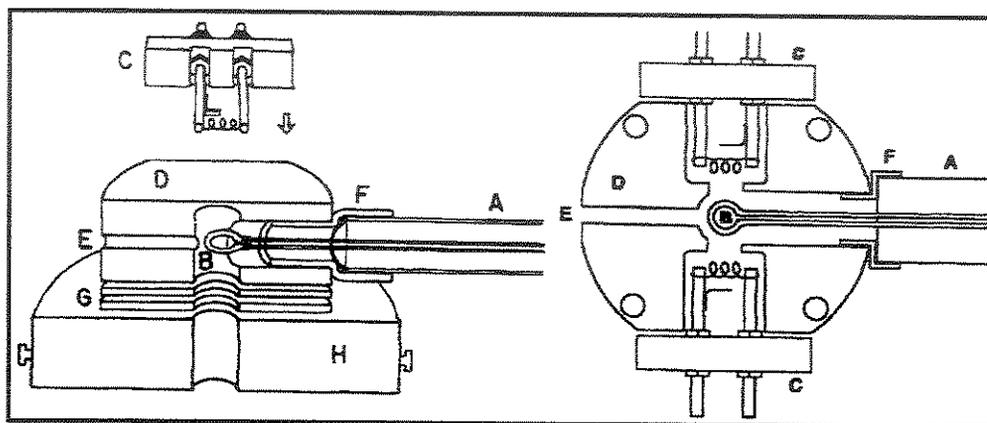


Figura 13 - Dois cortes ortogonais do sistema DIMP/T&R-MIMS: Os itens em negrito são: (A) sonda DIMP; (B) loop da membrana capilar; (C) filamentos; (D) bloco da fonte de íons; (E) entrada de gás para Cl₂; (F) adaptador de cerâmica para a sonda; (G) lentes; (H) fonte de íons.

Foi utilizado o modo de monitoramento SIM para todos os analitos, onde as razões massa/carga (m/z) características de cada um deles foram monitoradas de modo a determinar a concentração de tais analitos nas amostras analisadas. Os valores obtidos utilizando-se a sonda de membrana DIMP/T&R-MIMS foram comparados com valores obtidos através do método de titulométricos para cada analito específico.

III.3 – TIPIFICAÇÃO DE DIFERENTES TIPOS DE CERVEJAS NACIONAIS E IMPORTADAS UTILIZANDO A TÉCNICA DE ESI-MS.

III.3.1 - Preparação de Amostras:

Um conjunto de 29 amostras foi analisado (21 amostras nacionais e 8 amostras importadas) por ESI-MS. Antes da análise, cada amostra foi desgaseificada, para eliminação de CO₂ das mesmas, utilizando-se um banho de ultra-som de baixa potência. Logo em seguida, a 250 µL de amostra desgaseificada foram adicionados 750 µL de solvente (solução de CH₃OH:H₂O 1:1). As amostras foram submetidas a análises no modo de ionização positivo [ESI(+)-MS] e no modo de ionização negativo [ESI(-)-MS]. No caso das análises realizadas no modo positivo, 2 µL de ácido fórmico foram adicionados a cada amostra antes da análise (para ajudar na protonação das amostras fornecendo espectros com íons mais intensos) e no caso das análises realizadas no modo negativo 2 µL de hidróxido de amônio foram adicionados (para ajudar na desprotonação das amostras fornecendo espectros com íons mais intensos). Para cada amostra foi então obtido um espectro de massas característico.

III.3.2 – Utilização do espectrômetro de massas Qq-oTOF

Os experimentos realizados utilizando ESI-MS foram feitos em um equipamento Q-TOF I (Qq-oTOF) da Micromass (Manchester, UK). Este equipamento é um equipamento híbrido constituído por um duplo quadrupolo (Qq) e um espectrômetro de massas do tipo TOF (analisador de massas por tempo de voo) de alta resolução. A voltagem do capilar utilizada foi de 3000 V e a voltagem do cone utilizada foi 40 V (tanto no modo positivo quanto no modo negativo). Os experimentos foram realizados em sala com temperatura controlada (23 ± 1 °C). Uma bomba de microseringa foi usada para a introdução de amostras de cerveja na fonte de ESI a uma vazão de 10 µL min⁻¹. A faixa de varredura das razões massa/carga (*m/z*) foi de 50 até 1000 (Figura 14).

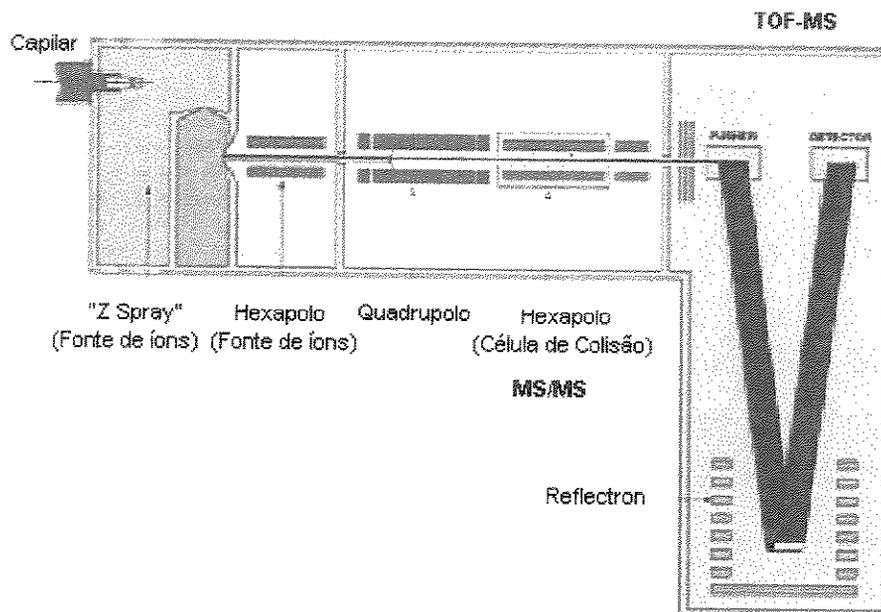


Figura 14 – Representação esquemática do espectrômetro de massas Qq-oTOF.

III.4 - INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE REAÇÃO ENTRE O REAGENTE DE TEBBE E VINIL-ÉTERES UTILIZANDO A TÉCNICA DE APCI-MS E APCI-MS/MS

III.4.1- Preparação de Amostras:

Os vinil-éteres utilizados (etil, propil, n-butil, iso-butil e terc-butil-vinil éteres) e o reagente de Tebbe foram obtidos da Aldrich. O reagente de Tebbe (preparado por dissolução em tolueno $1,0 \text{ mol L}^{-1}$) foi dissolvido diretamente em 1,5 mL dos vinil éteres estudados.

III.4.2 – Utilização do espectrômetro de massas Q-Trap

Os experimentos realizados com o sistema APCI-MS foram feitos em um equipamento Q-Trap da AppliedBiosystems (Foster City, CA) com uma fonte de ionização de APCI. Este aparelho é composto basicamente por dois quadrupolos (Q_1 e q_2) analisadores de massas (onde q_2 pode funcionar como quadrupolo de colisão) e um analisador "ion trap" linear. O espectrômetro de massas foi operado no modo positivo utilizando uma voltagem na agulha de descarga corona de 3,0 V e uma temperatura da fonte de 80°C . Os experimentos foram realizados em sala

com temperatura controlada (23 ± 1 °C). Uma bomba de microseringa foi usada para a introdução de amostras na fonte aquecida de APCI a uma vazão de $20 \mu\text{L min}^{-1}$. A faixa de varredura das razões massa/carga (m/z) foi de 50 até 1000 (Figura 15).

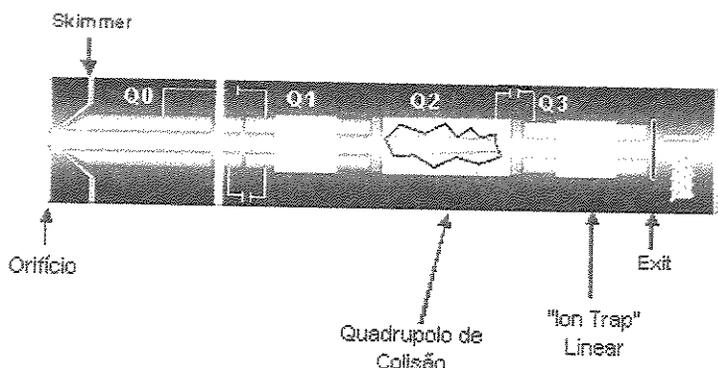


Figura 15 – Representação esquemática do espectrômetro de massas Q-Trap.

III.5 - ESPECTRÔMETRO DE MASSAS PENTAQUADROPOLAR (QqQqQ).

Os experimentos foram realizados em um espectrômetro de massas pentaquadrupolar EXTREL (Pittsburgh, PA) cujo esquema já foi mostrado na Figura 10.

Este instrumento consiste de uma fonte de formação de íons que pode operar por ionização eletrônica (EI) ou por ionização química (CI), três quadrupolos de varredura (Q_1 , Q_3 e Q_5), dois quadrupolos focalizadores de íons (q_2 e q_4) que operam somente com aplicação de voltagem na rádio frequência (rf) e um multiplicador de elétrons utilizado como detector. Deste modo, os potenciais aplicados aos quadrupolos fazem com que somente o íon de razão massa/carga (m/z) específica consiga atravessar o quadrupolo. O íon assim selecionado colide a uma energia próxima de zero eV com um gás neutro introduzido em q_2 e os produtos desta reação são analisados por Q_5 que opera no modo de varredura, enquanto q_3 é operado no modo "rf-only", ou seja, não efetuando análise da razão massa/carga (m/z).

Em um experimento de triplo estágio (MS^3), um dos produtos da reação realizada em Q_2 é selecionado por Q_3 , operado agora no modo de filtro de massas, e levado a colisão com um gás inerte (argônio) introduzido em Q_4 com

energia de colisão de 10-15 eV, processo denominado de dissociação induzida por colisão (CID).

As pressões utilizadas do reagente neutro e do argônio, medidas por um sensor localizado fora do quadrupolo, foram tipicamente da ordem de 10^{-5} Torr.

III.5.1 - Simbologia dos experimentos de espectrometria de massas seqüencial

Cooks e colaboradores definiram a simbologia para descrever os diversos experimentos seqüenciais em MS de múltiplos estágios. Esta simbologia é descrita resumidamente na Figura 16.

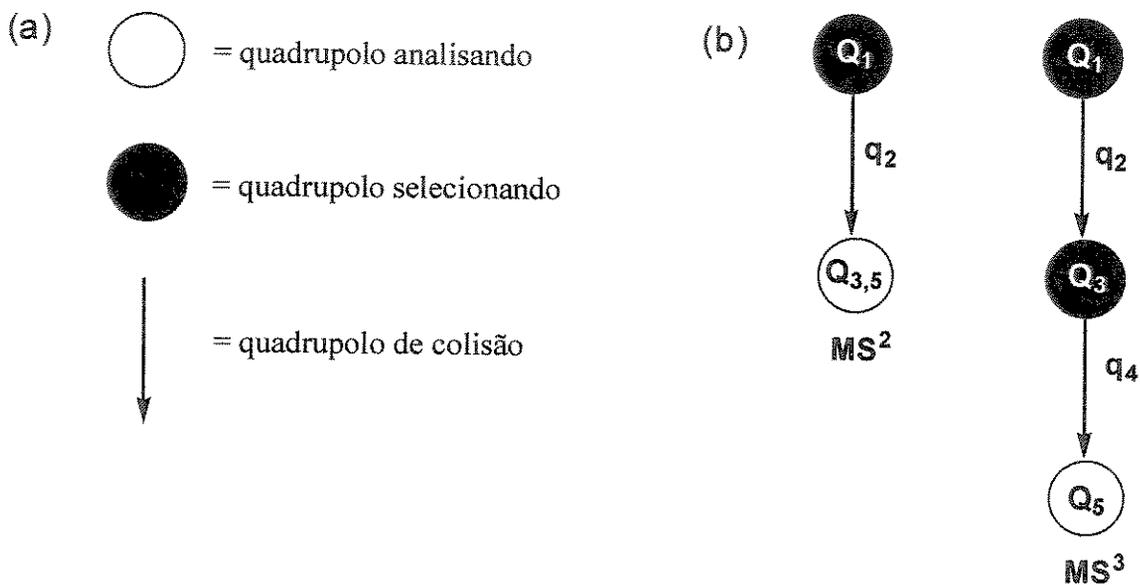


Figura 16 – Representação de uma reação íon/molécula em múltiplos estágios.

Capítulo IV

RESULTADOS E DISCUSSÕES

IV.1- MONITORAMENTO DE REAÇÕES DE BIOTRANSFORMAÇÃO PROMOVIDAS PELA LEVEDURA “*SACCHAROMYCES CEREVISIAE*” UTILIZANDO A TÉCNICA MIMS

As transformações microbianas e em particular aquelas mediadas por fermento, tem sido largamente empregadas desde os primórdios da humanidade para a produção de pão, de laticínios e bebidas alcoólicas. Todas as aplicações desde o início usavam culturas de microorganismos mistos, e dirigidas para operações biotecnologias em áreas da agricultura e nutrição humana. Foi L. Pasteur em 1862 quem estabeleceu a base científica destas antigas aplicações, principalmente a oxidação do álcool a ácido acético usando uma cultura pura de *Bacterium xylinum*. A ação redutora da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi observada pela primeira vez por Dumas em 1874. Ele constatou que a adição de enxofre finamente pulverizado a uma suspensão fresca de fermento biológico em uma solução de açúcar desprendia sulfeto de hidrogênio. Está muito bem documentado na literatura da última década que biocatalisadores (microorganismos e enzimas isoladas) tiveram ampla aplicação como reagentes seletivos para a solução de problemas sintéticos da química orgânica. Além disso, cada vez com mais intensidade, há uma absoluta necessidade de se desenvolver reagentes e processos ambientalmente compatíveis, uma das razões pelas quais os biocatalisadores tiveram este notável desenvolvimento nos últimos anos.⁷⁸

O mais popular biocatalisador utilizado pelos químicos orgânicos é o *Saccharomyces cerevisiae* (fermento de pão, de padaria ou de padeiro). Vários são os motivos para este sucesso destacando-se a alta enantioseletividade, rendimentos químicos compatíveis, a ampla disponibilidade, custo desprezível, não requer adição de dispendiosos cofatores, pois estão disponíveis nas células. Muitos artigos de revisão estão disponíveis na literatura mostrando a utilização do fermento de pão como biocatalisador em síntese orgânica. A enantiosseletividade

na redução de grupos carbonílicos por fermentos é também fortemente influenciada pela concentração do substrato e do produto formado. Essa monitoração do meio é particularmente importante nas reações mediadas com fermento de pão, principalmente quando o problema de rendimentos limitados (químicos e óticos) é decorrente da inibição pelo produto e substrato. Algumas alternativas para controle da concentração do substrato/produto foram introduzidas recentemente permitindo sensível melhora na seletividade.⁷⁸

O fermento biológico de padaria consegue catalisar vários tipos de reações: redução, condensação, cicloadição, oxidação, sendo que somente a última não produz carbono quiral.

Desta forma, nestes experimentos de biocatálise (biotransformação) a técnica MIMS foi utilizada (Figura 12) para se monitorar a redução de grupos carbonílicos promovida por "*saccharomyces cerevisiae*" no modo de monitoramento SIM onde um total de cinco razões massa/carga (m/z) características de substratos e produtos de reação foram selecionadas. Estas razões massa/carga (m/z) foram selecionadas de acordo com os sinais presentes nos respectivos espectros de massas de substratos e produtos obtidos por EI (ionização por elétrons) a 70 eV. Os substratos utilizados e seus produtos de biocatálise são mostrados no esquema 2. Em ambos os casos observaram-se a formação de produtos de redução a partir dos substratos **A** (2-oxo- 4-fenil-butirato de etila) e **B** (1-fenil-1,3-butanodiona).

133 e 188 – vide Figura 18b) era pouco intensa durante todo o processo, confundindo-se com a linha de base do equipamento indicando que após a passagem do substrato pelo reator este foi convertido em seu respectivo produto reduzido, mostrando a efetividade do processo de biocatálise. Outro fato observado foi que o íon de m/z 208 também possuía baixa intensidade, mas em contrapartida o sinal de m/z 117 (outro íon característico no espectro de massas do produto de redução – vide Figura 18a e Figura 17b) era intenso provavelmente porque o íon de m/z 208 permeou rapidamente a membrana e na fonte de ionização foi ionizado por EI gerando preferencialmente o íon de m/z 117 (esquema 4).

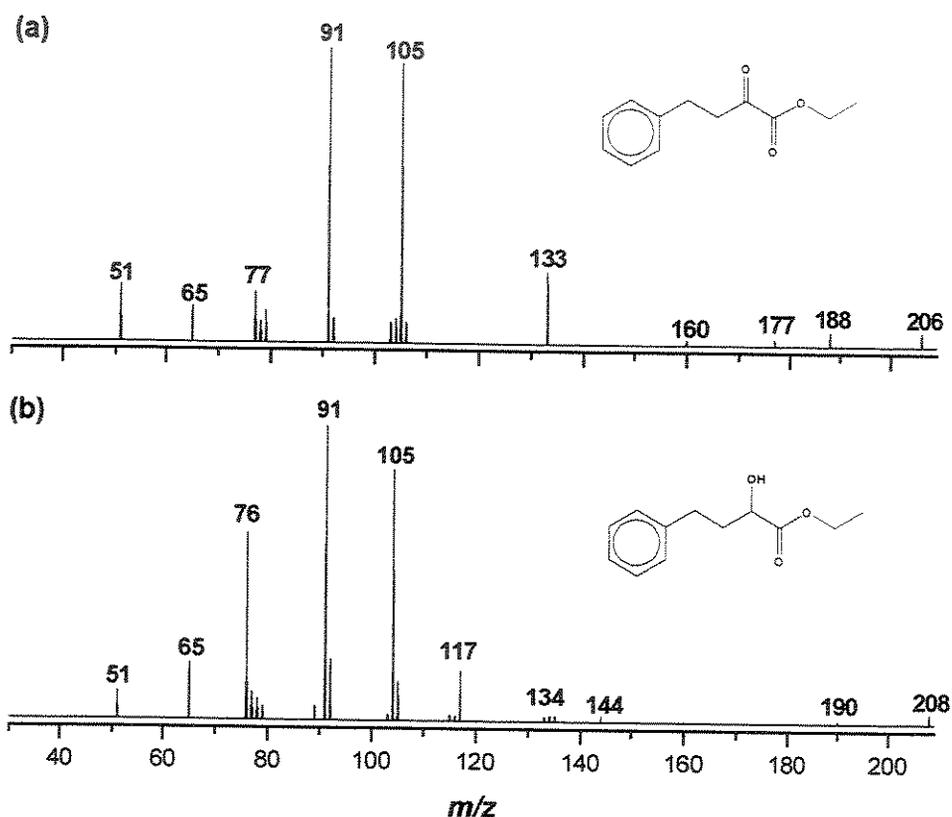


Figura 17– Espectros de massas: (a) Substrato A e (b) Produto de redução do substrato A.

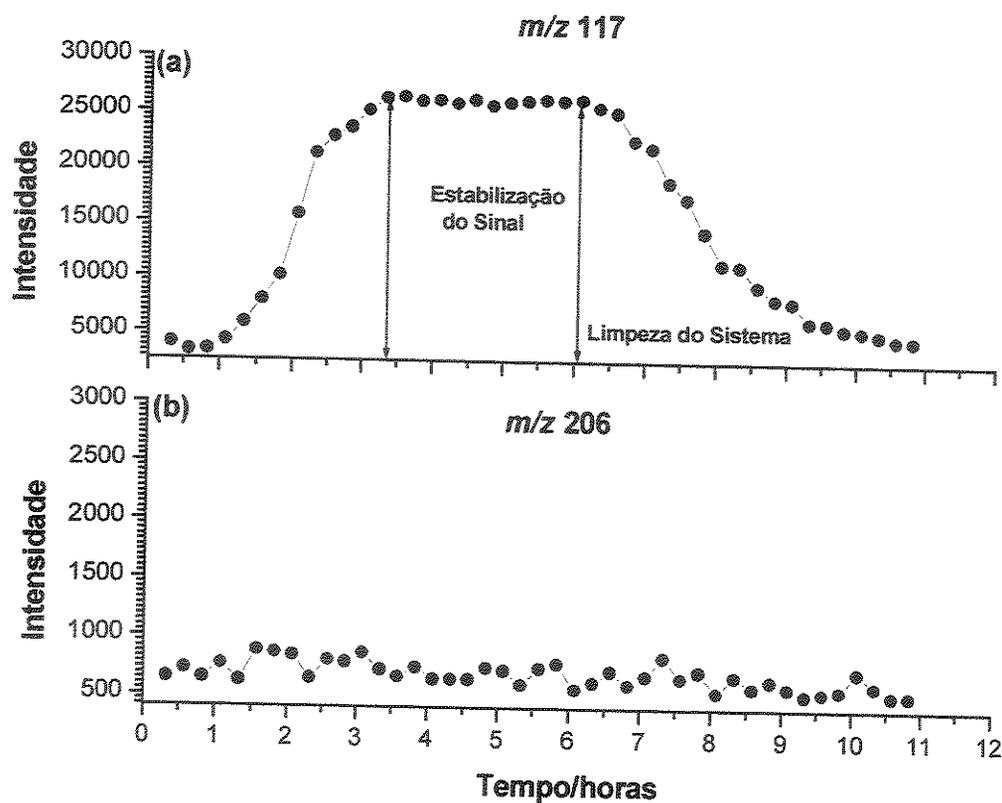
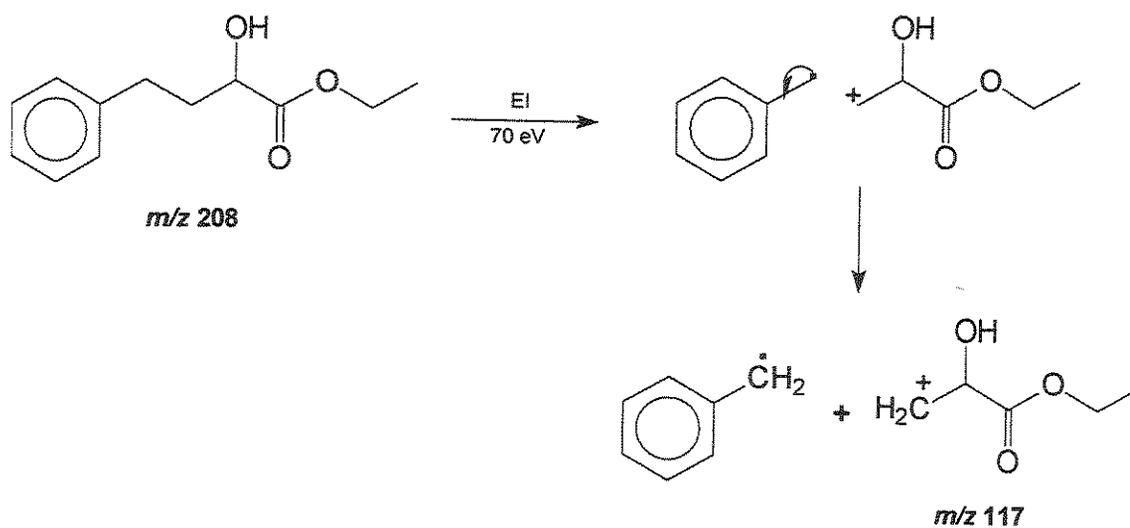


Figura 18 – Monitoramento por SIM dos íons: (a) m/z 117 do produto de redução do substrato A e (b) m/z 206 do substrato A.



Esquema 4

Desta forma, dentre os cinco íons monitorados (para o substrato m/z 133, 188, 206 e para o produto m/z 117, 208) destaca-se (Figura 18) o comportamento

apresentado pelos íons de m/z 206 (característico do substrato) e m/z 117 (característico do produto de reação).

Podemos verificar que o produto de redução do grupo cetona (m/z 117) é formado com o tempo e em seguida a intensidade de seu sinal se estabiliza. Após se bombear toda a solução do substrato pelo pequeno reator a adição de uma solução de água e açúcar (após 6 horas de passagem do substrato) pelo reator retira o produto de biocatálise ainda existente dentro do mesmo e o sinal característico deste produto sofre um decréscimo com o tempo.

Frente aos resultados obtidos para o substrato A, a reação de redução de um outro substrato contendo agora duas carbonilas (substrato B – 1-fenil-1,3-butanodiona) em presença de fermento de padaria foi monitorada. Para melhor entendimento do processo de reação, os espectros de massas para o substrato B e de seus produtos de redução resultantes são mostrados na Figura 19, enquanto que a Figura 20 mostra os resultados obtidos para o substrato B.

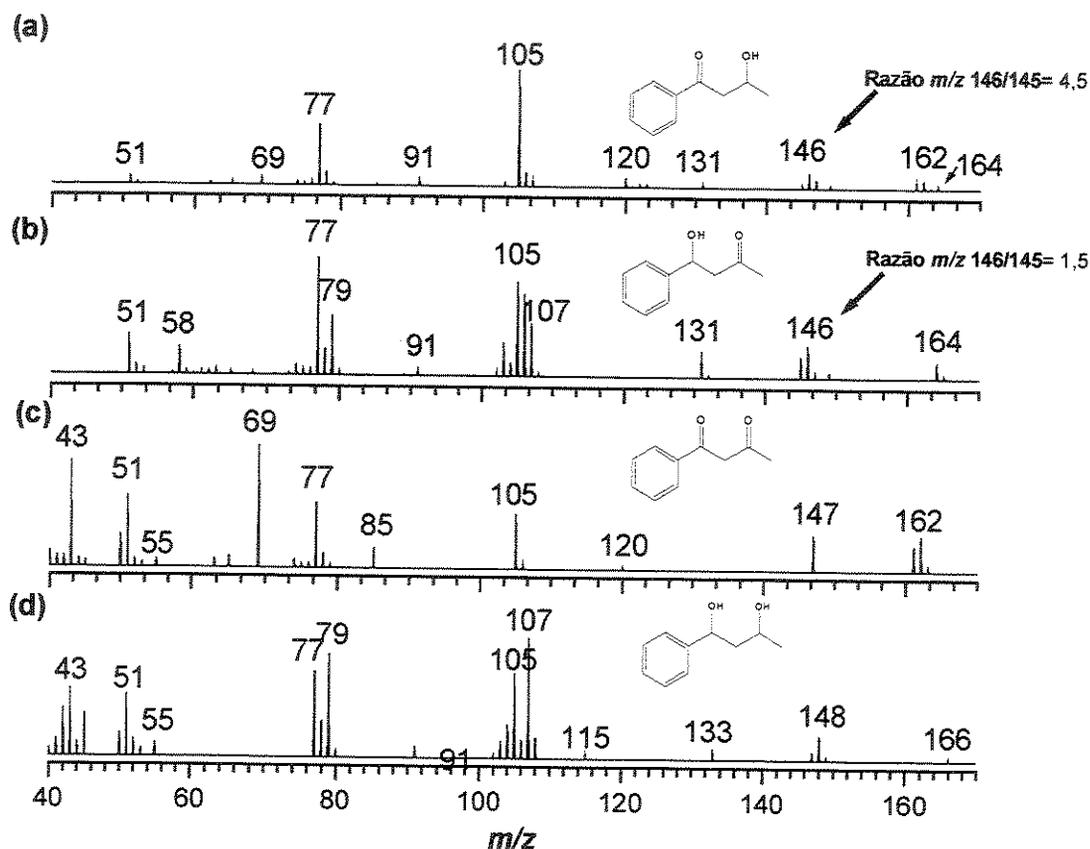


Figura 19 – Espectros de massas: (a) e (b) dos monoálcoois resultante da redução de apenas uma carbonila; (c) do substrato B e (d) do diol formado pela redução das duas carbonilas do substrato B.

Observando a Figura 19 podemos verificar que os espectros de massas do substrato (c), do diol (d), e principalmente no caso de cada monoálcool em particular (a) e (b), que todas estas espécies possuem espectros de massas muito semelhantes. Assim, uma vez que os espectros de cada monoálcool e/ou o espectro do diol continham as razões m/z contidas no espectro do substrato não foi possível monitorar um íon seletivo para este substrato. Monitoramos desta forma o íon de m/z 148, característico do diol, e os íons de m/z 146 e m/z 145, característicos dos dois monoálcoois, durante a reação. Apesar dos monoálcoois possuírem íons coincidentes em seus espectros de massas em particular eles apresentam uma razão entre os íons de m/z 146 e m/z 145 característica. Estes espectros nos mostram que a variação desta razão favorece um ou outro monoálcool resultante da redução de apenas uma das carbonilas do substrato. Podemos observar então, que neste caso, temos um sistema mais complexo do que o anteriormente estudado para o substrato A devido à grande sobreposição de sinais para todas as espécies envolvidas no caso do substrato B.

Este mesmo experimento monitorado por GC-MS (Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas) mostrou que após certo tempo de reação era possível observar a formação de ambos os monoálcoois mostrados na Figura 19. Nestes experimentos foi observado que um dos monoálcoois é formado mais rapidamente em detrimento do outro (monoálcool A-esquema 5). O monoálcool B (esquema 5) é provavelmente formado após a formação do monoálcool A, já que nos cromatogramas obtidos para o acompanhamento desta reação, quando o pico correspondente ao monoálcool A já é intenso, o pico correspondente ao monoálcool B apenas começa a aparecer no cromatograma em um determinado tempo de reação.

IV.1.1- CONCLUSÃO

Os resultados obtidos utilizando-se a técnica MIMS nos mostram ser esta técnica adequada para o monitoramento deste tipo de reação catalisada por uma levedura encapsulada em alginato de cálcio, mesmo em casos mais complicados onde há sinais coincidentes nos espectros de massas das espécies envolvidas.

O monitoramento destas reações visa fornecer informações adicionais que não foram obtidas por técnicas convencionais utilizadas para acompanhar este tipo de reação. Embora não seja possível observar a conversão dos substratos em produtos e ao mesmo tempo se obter informações sobre o excesso enantiomérico dos produtos formados utilizando-se somente a técnica MIMS, os resultados obtidos podem nos fornecer informações sobre o andamento das reações dentro de um processo que necessita apenas saber se houve e quando houve a conversão dos reagentes nos produtos de interesse. O mais importante é lembrar que não é necessário nenhum passo de extração do efluente do reator como em técnicas de GC-MS, tornando o processo mais dinâmico na obtenção de informações do processo como um todo.

IV.2 - DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA, ÁCIDO ASCÓRBICO E ÁCIDO ACETILSALICÍLICO EM PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS UTILIZANDO A TÉCNICA DIMP/T&R-MIMS.

A Figura 21 mostra os espectros de massas utilizando o sistema DIMP/T&R-MIMS após 20 min de pré-concentração de soluções a 250 mgL^{-1} de vitamina C, cafeína e ácido acetilsalicílico. Os sinais mais abundantes no espectro são os dos íons m/z 116 e 119 para a vitamina C, m/z 109 e 194 para a cafeína e m/z 120 e 138 para ácido acetilsalicílico. Os íons fragmentos de m/z 116, 120 e 194 foram utilizados para monitorar vitamina C, ácido acetilsalicílico e cafeína, respectivamente.

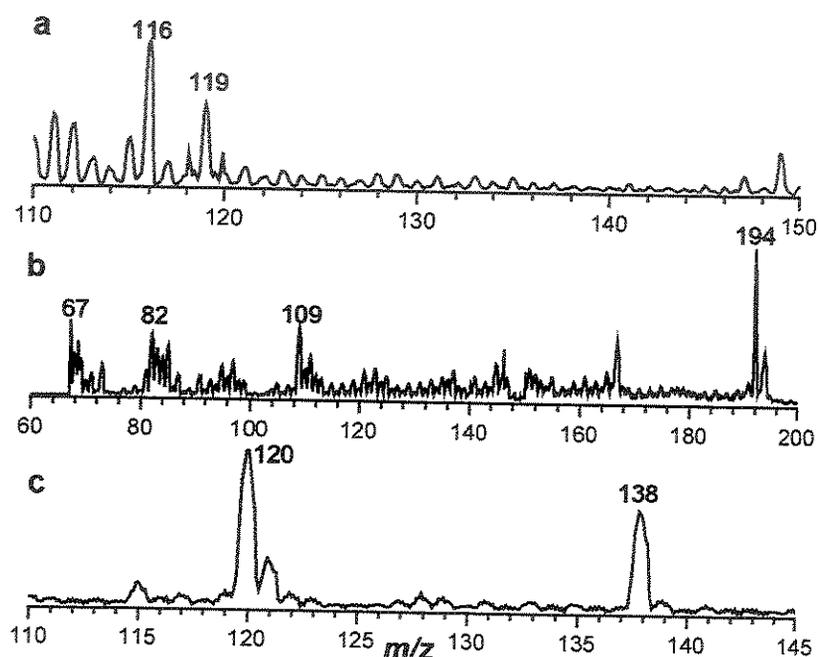


Figura 21 – Espectros de massas parciais de EI a 70 eV obtido utilizando a técnica DIMP-T&R-MIMS durante as análises de (a) Vitamina C, (b) Cafeína e (c) Ácido acetilsalicílico em uma solução aquosa a 250 mg L^{-1} contendo estes analitos.

IV.2.1 – Linearidade e reprodutibilidade do sistema DIMP/T&R-MIMS para os compostos analisados.

A linearidade de padrões e amostras foi verificada pela análise em triplicata de seis pontos no limite de 30 mg L⁻¹ a 400 mg L⁻¹ para cafeína, 100 mg L⁻¹ a 2000 mg L⁻¹ para vitamina C e 100 mg L⁻¹ a 1000 mg L⁻¹ para ácido acetilsalicílico.

As recuperações de tais compostos foram avaliadas com o mesmo método, comparando as concentrações calculadas e as concentrações medidas.

Pela aplicação das condições otimizadas para o sistema DIMP/T&R-MIMS, uma ótima linearidade foi observada para todos os compostos investigados em um amplo limite de concentrações variando de 30 mg L⁻¹ a 2000 mg L⁻¹. Coeficientes de correlação variando de 0,997 a 0,999 foram obtidos.

Para se determinar os desvios padrão relativos (RSD) na quantificação dos três analitos, foram realizadas análises em triplicata das amostras de preparações farmacêuticas analisadas. Como resultado destes experimentos os desvios padrões relativos (RSD) das medidas em triplicata dos três analitos variaram de 1,0 a 5,0 %.

IV.2.2 – Determinação de cafeína em amostras de preparações farmacêuticas.

Cafeína, um estimulante do sistema nervoso central, e seus metabólitos são largamente encontrados na dieta humana e em formulações farmacêuticas. Várias técnicas analíticas têm sido relatadas para a determinação de cafeína e seus metabólitos em fluidos biológicos, preparações farmacêuticas e em alimentos, baseados principalmente em HPLC. Métodos de HPLC, porém, requerem um passo de eliminação de interferentes (por exemplo, excipientes e corantes) das amostras antes da realização das análises cromatográficas propriamente ditas. Análises “*on-line*”, monitoramento de drogas terapêuticas e análises clínicas requerem um método que seja rápido, com pequena ou nenhuma preparação da amostra.⁷⁹

A utilização da técnica DIMP/T&R-MIMS surge então como um método alternativo para análise de cafeína. O método foi aplicado para análise de cafeína

em preparações farmacêuticas. As análises requerem apenas 20 min de pré-concentração do analito seguido por 2 min de aquecimento da membrana e nenhum pré-tratamento da amostra é necessário. Neste caso as amostras são apenas filtradas. Sob as condições otimizadas, a Figura 22 mostra a curva analítica obtida para cafeína com concentrações na faixa de 30 a 400 mgL⁻¹.

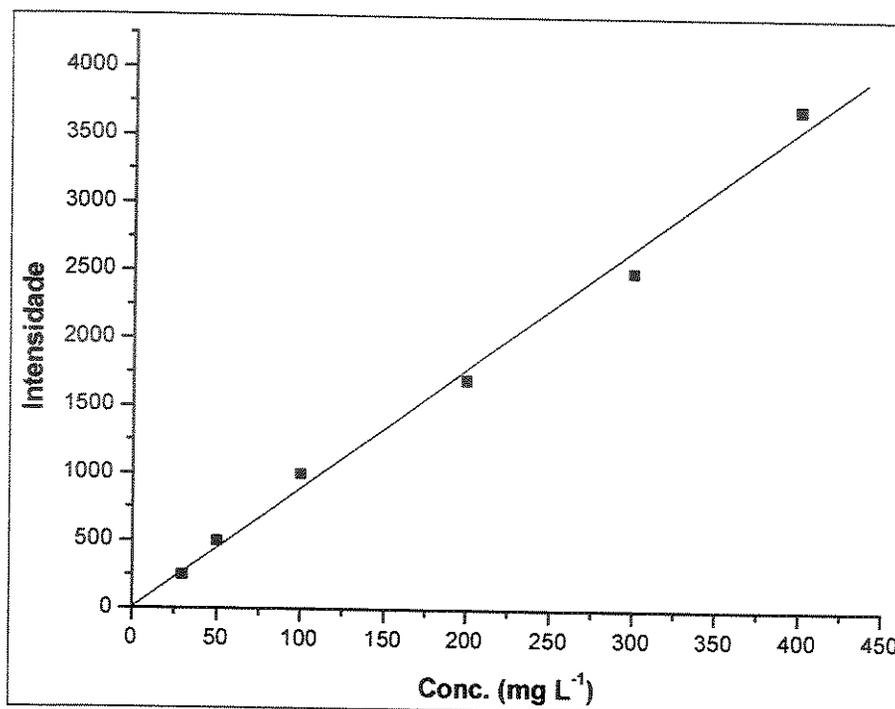


Figura 22 – Curva analítica obtida a partir de soluções padrão de cafeína na faixa de 30 a 400 mg L⁻¹ utilizando o modo de monitoramento SIM do íon *m/z* 194 por DIMP-T&R-MIMS, R= 0,997.

O limite de detecção para cafeína utilizando o sistema proposto é de 500 µg L⁻¹ e o coeficiente de correlação (R) da curva analítica é 0,997. Para caracterizar a repetibilidade do método uma solução de cafeína a 200 mgL⁻¹ foi utilizada e um desvio padrão relativo de 2% foi obtido. Medidas da concentração de cafeína foram realizadas pelo modo SIM de monitoramento do íon fragmento *m/z* 194.

As concentrações de cafeína em três amostras de preparações farmacêuticas disponíveis comercialmente foram determinadas usando-se o método acima descrito.

Os resultados obtidos são listados na Tabela 1. A recuperação de amostras fortificadas foi determinada, variando de 97,0-99,0%, que pode ser considerado um bom resultado. Observe que a quantidade de cafeína obtida por DIMP/T&R-MIMS nas três amostras é próxima das quantidades previamente informadas pelo fabricante. Um desvio padrão relativo de 4% foi observado pela análise em triplicata das amostras.

Tabela 1 – Concentrações de cafeína obtidas pela técnica DIMP/T&R-MIMS em amostras de preparações farmacêuticas.

Amostra	DIMP/T&R-MIMS (mg L⁻¹)	Especificações do fabricante (mg L⁻¹)	Erro^a (%)
01	34,6 ± 0,5	30	13,3
02	44,3 ± 0,8	50	13,0
03	57,0 ± 0,9	65	14,0

^a Diferença percentual entre os valores de concentração obtidos por DIMP/T&R-MIMS e as especificações do fabricante.

Uma vez verificada a linearidade e a repetibilidade observadas na determinação de cafeína utilizando a técnica DIMP/T&R-MIMS outras amostras de preparações farmacêuticas contendo vitamina C (ácido ascórbico) e ácido acetilsalicílico (AAS) foram analisadas.

IV.2.3 – Determinação de ácido ascórbico (vitamina C) em amostras de preparações farmacêuticas.

A vitamina C, uma vitamina solúvel em água, é um importante micronutriente e desempenha muitos papéis fisiológicos. Frutas e vegetais constituem a principal fonte de vitamina em muitas dietas humanas, onde elas ocorrem como ácido L-ascórbico (AA) e em sua forma oxidada (DHAA). Ambas as formas são biologicamente ativas.^{80a}

A determinação de ácido ascórbico total tem ganhado crescente significância em várias áreas da química analítica, tal como em aplicações

farmacêuticas e clínicas. Uma variedade de métodos para a determinação de ácido ascórbico têm sido desenvolvidas.^{80a}

Baseados nisto, propomos a utilização da técnica DIMP/T&R-MIMS que surge, então, como um método complementar para a análise de vitamina C em preparações farmacêuticas sem nenhum pré-tratamento da amostra.

A solução de cada comprimido foi preparada em água destilada contendo aproximadamente 250 mg L⁻¹ de vitamina C após a pulverização e o ajuste de pH até pH 4,0 pela adição de uma solução 0,1 mol L⁻¹ de HCl. O conteúdo de vitamina C nas amostras foi então determinado por análises em triplicata das amostras tanto pela técnica DIMP/T&R-MIMS como por titulação com iodato de potássio (para referência).^{80b}

As medidas das concentrações de vitamina C (mg L⁻¹) nas amostras foram realizadas pelo modo SIM se monitorando a intensidade do sinal *m/z* 116 através uma pré-concentração de 20,0 min do analito e 2,0 min de aquecimento da membrana.

As curvas analíticas (Figura 23) são lineares ($R=0,999$) na faixa de concentração de 100 mg L⁻¹ a 2000 mg L⁻¹. Para caracterizar a repetibilidade na análise das amostras, medidas em triplicata foram realizadas, mostrando um desvio padrão relativo de 1,0% entre as amostras.

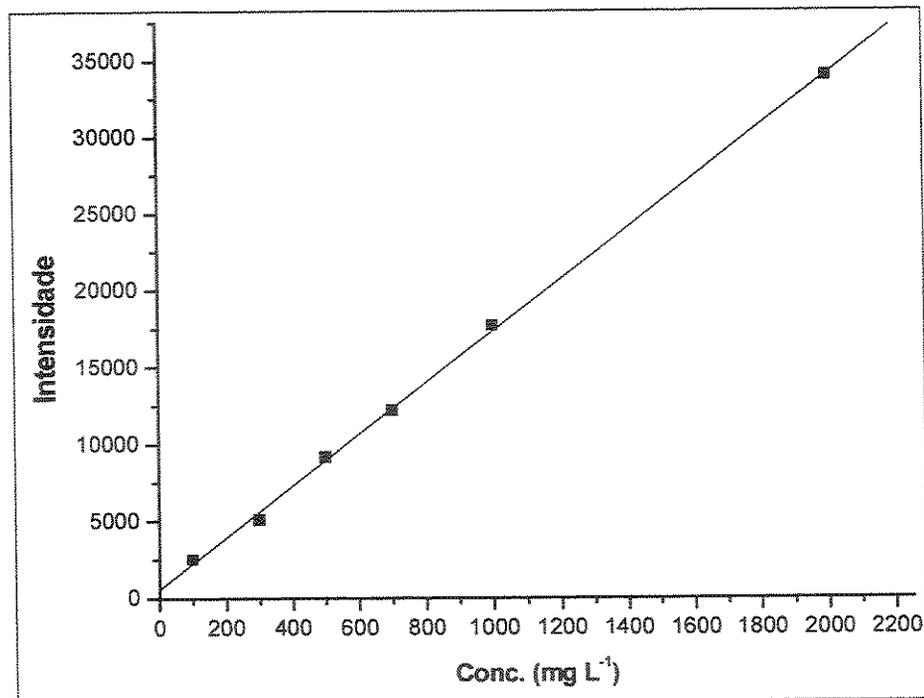


Figure 23 – Curva analítica utilizando o modo de monitoramento SIM do íon m/z 116 para Vitamina C utilizando a técnica DIMP-T&R-MIMS, $R= 0,999$.

Os resultados obtidos pela análise das amostras de preparações farmacêuticas contendo vitamina C, disponíveis comercialmente, são mostradas na Tabela 2. Os resultados obtidos tanto pela utilização da técnica DIMP-T&R-MIMS como por titulação estão de acordo com as especificações rotuladas.

Tabela 2 - Resultados obtidos por DIMP/T&R-MIMS e titulação em comparação com as especificações do fabricante para as amostras de preparações farmacêuticas contendo vitamina C.

Amostra	DIMP/T&R-MIMS (mg L ⁻¹)	Titulação ^a (mg L ⁻¹)	Especificação do fabricante (mg)	Erro ^b (%)
01	248,5 ± 5,0	249,4 ± 6,0	250	0,4
02	1050,0 ± 21,0	1058,0 ± 43,4	1000	0,8
03	1956,0 ± 37,0	1948,0 ± 58,4	2000	0,4
04	225,9 ± 6,0	224,8 ± 11,2	240	0,5

^a Titulação das amostras realizadas utilizando as "Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz", Volume 1, São Paulo, 1976.

^b Diferença percentual entre os valores de concentração obtidos por DIMP/T&R-MIMS e por titulação.

IV.2.4 – Determinação de ácido acetilsalicílico (AAS) em amostras de preparações farmacêuticas.

O ácido acetilsalicílico (AAS) é largamente empregado em formulações farmacêuticas para o alívio de dores de cabeça, dores musculares e inflamações devido a artrites ou ferimentos. O alto consumo desta substância no mundo mostra a importância do desenvolvimento de novas metodologias analíticas para sua determinação.^{81a}

Com esse intuito o sistema DIMP/T&R-MIMS foi utilizado para a quantificação de AAS em amostras de preparações farmacêuticas. O conteúdo de AAS nas amostras foi então determinado por análises em triplicata das amostras tanto pela técnica DIMP/T&R-MIMS como por titulação com hidróxido de sódio para referência.^{81b}

As soluções padrões de AAS foram preparadas na faixa de concentração de 100mg L^{-1} até 1000mg L^{-1} . O pH foi ajustado para aproximadamente 2,0 utilizando uma solução de HCl $0,1\text{mol L}^{-1}$. Com o espectrômetro de massas operando no modo SIM foi possível construir uma curva analítica monitorando-se o íon de m/z 120 (Figura 24).

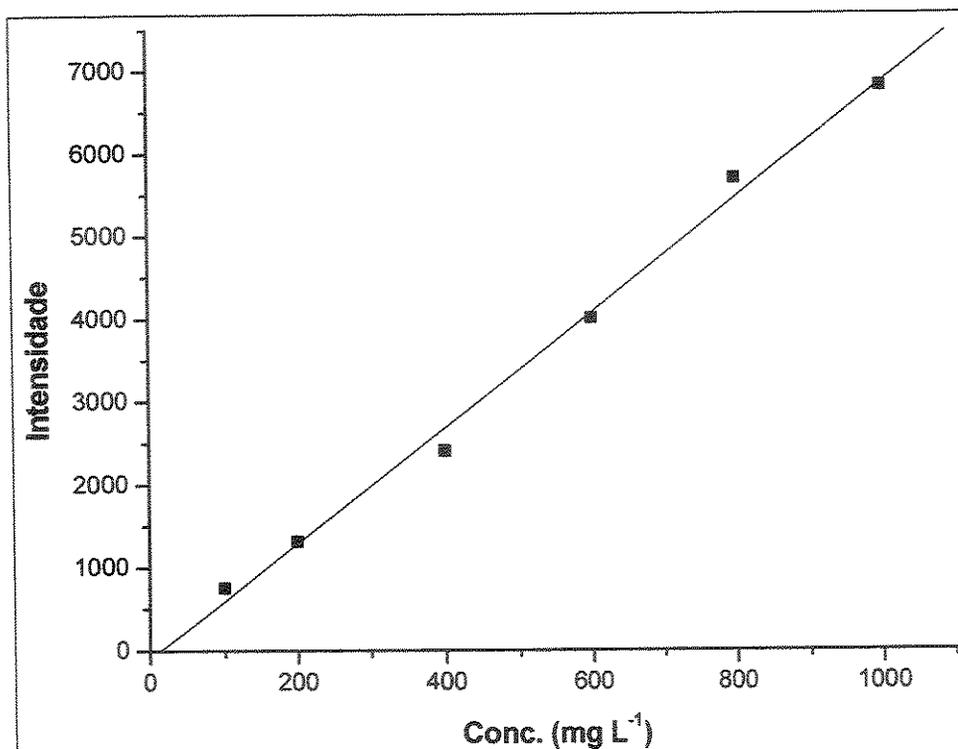


Figura 24 - Curva analítica para quantificação de ácido acetilsalicílico (AAS) por DIMP-T&R-MIMS, utilizando o modo SIM monitorando-se o íon de m/z 120, $R=0,997$.

A Figura 24 mostra a curva analítica obtida para os padrões de AAS, onde se observa a linearidade do método desenvolvido. As análises das amostras disponíveis comercialmente contendo AAS são sumarizadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultados obtidos pela técnica DIMP/T&R-MIMS e pelo método de titulação em comparação com os valores especificados pelo fabricante para a análise de ácido acetilsalicílico (AAS).

Amostra	DIMP/T&R-MIMS (mg L ⁻¹)	Titulação ^a (mg L ⁻¹)	Especificações do fabricante (mg)	Erro ^b (%)
01	488,6 ± 5,0	519,8 ± 10,0	500	6,4
02	473,4 ± 7,0	500,4 ± 12,5	650	5,7
03	583,0 ± 12,0	577,4 ± 15	500	1,0

^a Titulação das amostras realizadas utilizando a Farmacopéia Brasileira, 1959.

^b Diferença percentual entre os valores de concentração obtidos por DIMP/T&R-MIMS e por titulação.

Observando a Tabela 2, podemos verificar que para as amostras 01 e 03 que os valores obtidos por DIMP/T&R-MIMS e titulação estão em concordância com as especificações do fabricante para estas amostras. Porém, quando verificamos os resultados obtidos para a amostra 02 podemos perceber que os valores obtidos tanto por DIMP/T&R-MIMS como por titulação estão abaixo das especificações do fabricante. Em amostras de preparações farmacêuticas a dosagem de cada princípio ativo contido nas mesmas pode variar de 90 a 120% do conteúdo especificado pelo fabricante. No caso da amostra 02, as concentrações de AAS obtidas inferiores obtidas em relação às especificadas pelo fabricante poderiam ser provavelmente devido ao fato da concentração de AAS adicionada às amostras analisadas ser menor a estipulada na embalagem do medicamento e/ou o conjunto de amostras estar próximo ao vencimento de sua data de validade, o que ocasionaria um decréscimo da concentração do princípio ativo no medicamento. É importante salientar, neste caso, que mesmo que o medicamento esteja próximo do fim de sua data de validade que este conjunto de medicamentos possui concentrações de AAS que não está na faixa permitida de concentração para as amostras analisadas pelos dados obtidos tanto por DIMP/T&R-MIMS como por titulação.

Para caracterizar a repetibilidade, medidas em triplicata foram realizadas, mostrando um desvio padrão relativo de 5,0% entre as amostras.

IV.2.5 – CONCLUSÃO

O consumo crescente dos analitos quantificados e de suas associações em preparações farmacêuticas mostra a importância do desenvolvimento de novas metodologias analíticas para sua determinação. Uma vez que a técnica DIMP/T&R-MIMS é uma técnica simples e rápida, ela poderia ser uma alternativa para métodos mais complexos e morosos para a determinação de vitamina C (ácido ascórbico), ácido acetilsalicílico (AAS) e cafeína em amostras de preparações farmacêuticas especialmente para amostras complexas. O método utilizado é versátil e permite a realização da análise combinada destes analitos em uma mesma amostra. Os dados obtidos na determinação de AAS nos mostram que a utilização da técnica de DIMP/T&R-MIMS também poderia ser utilizada para

a verificação de fraudes em medicamentos, onde uma concentração menor de um determinado princípio ativo foi adicionada.

IV.3 - TIPIFICAÇÃO DE DIFERENTES TIPOS DE CERVEJAS NACIONAIS E IMPORTADAS UTILIZANDO A TÉCNICA DE ESI-MS.

A cerveja é uma solução âmbar aquosa que contém um gás (CO₂), álcool etílico, vários sais inorgânicos, e aproximadamente 800 compostos orgânicos. A Tabela 4 divide os constituintes da cerveja em várias categorias por tipo químico. Todos estes compostos são decorrentes de quatro ingredientes essenciais: água, malte (cevada germinada), lúpulo (que confere o amargor característico do produto) e leveduras (responsáveis pela fermentação do produto). A diversidade das técnicas de mistura e de fermentação permite obter uma infinidade de cervejas diferentes.⁸²

Tabela 4 – Divisão dos constituintes da cerveja em várias categorias por tipo químico.

Substância	Concentração	Número de compostos	Fonte
Água	90-94%	1	-
Álcool	2,5-5,0%	1	Levedura, malte
Dióxido de Carbono	2,1-2,9v/v	1	Levedura, malte
Outros álcoois	0,1-0,3%	15	Levedura, malte
Carboidratos	1,0-5,0%	±100	Malte, adjunto
Sais Inorgânicos	0,5-0,8%	26	Água, Malte
Compostos Nitrogenados	0,26-0,45%	±100	Levedura, malte
Ácidos Orgânicos	0,17-0,22%	±200	Levedura, malte
Aldeídos	30-40 mgL ⁻¹	±50	Levedura, lúpulo
Ésteres, Cetonas	0,03-0,06%	±150	Levedura, malte
Compostos Sulfurados	2,0-3,0 mgL ⁻¹	41	Levedura, malte
Derivados do Lúpulo	30-60 mgL ⁻¹	>100	Lúpulos
Compostos de Vitamina B	5,0-11,0 mgL ⁻¹	13	Levedura, malte

Embora as cervejas sejam fabricadas de materiais similares, cervejas fabricadas pelo mundo inteiro têm estilos distintos. Sua singularidade vem do conteúdo mineral da água utilizada, os tipos de ingredientes empregados, e as diferenças nos métodos de fabricação. Em um sentido restrito, há dois estilos clássicos de cerveja, as cervejas do tipo “ale” (fermentação de topo) e as cervejas do tipo “lager” (fermentação de base). Contudo, em adição a “ales” e “lagers”, há outros estilos clássicos de cerveja tais como cervejas do tipo “wheat”, “porters”, “stouts” e “lambics” - para citar algumas delas.⁸³

A estabilidade do sabor é um fator de qualidade importante da cerveja. Comparada a outros produtos, a cerveja apresenta uma estabilidade muito pequena do sabor e sua degradação a partir de processos oxidativos produz um sabor característico causado principalmente por uma série de compostos carbonílicos. Portanto, é compreensível que este aspecto tenha sido objeto de investigações minuciosas de modo a controlar e melhorar o processo de fermentação e a estabilidade do sabor. Entretanto, a composição química da cerveja não é totalmente conhecida e muito menos os compostos resultantes da degradação pela luz, temperatura, agitação e oxigênio. A solução é evitar a exposição das cervejas a estes agentes que induzem as mudanças químicas antes do produto chegar nas mãos do consumidor.⁸⁴

A análise sensorial é muito utilizada pelas indústrias de alimentos e bebidas, entretanto, esta pode ser insuficiente, especialmente quando se trata de problemas da classificação de amostras. A análise multivariada é uma ferramenta que pode ajudar a lidar com a complexidade e sutilezas confrontadas por pesquisadores ao tentar analisar, caracterizar e classificar análises sensoriais como: sabor, aroma, textura e aparência. Pode-se dizer que estas propriedades são multivariadas, ou seja, são uma mistura de sensações que devem ser avaliadas para que possa ser classificado um certo tipo de alimento ou bebida. Entretanto, estas propriedades são subjetivas e podem levar a dúvidas e induzir a erros de avaliação, quando se trata de um grande volume de amostras. Métodos baseados em respostas de medidas instrumentais são objetivos e podem ser uma alternativa para verificar a qualidade de um alimento ou bebida.⁸⁵ Entre as

técnicas mais utilizadas para este tipo de amostra temos a espectrometria de massas, a cromatografia gasosa, a eletroforese e a cromatografia líquida.^{86, 87}

Recentemente, um estudo sobre a caracterização de amostras de cervejas de acordo com suas características minerais foi realizado utilizando-se espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-AES) utilizando-se um conjunto de 32 amostras. Neste caso, cervejas do tipo “lager”, cervejas escuras e cervejas de baixo teor alcoólico foram consideradas.⁸⁸ Em um outro estudo realizado, espectrometria de massas, utilizando um espectrômetro de massas de ressonância ciclôtrônica de íons por transformada de Fourier (FT-ICR) utilizaram electrospray tanto no modo positivo como no modo negativo para análise direta de vinhos sem nenhum tratamento prévio da amostra.⁸⁹

IV. 3. 1 – Análise por ESI-MS das amostras de cerveja selecionadas.

Electrospray se mostrou uma técnica de ionização conveniente para a introdução direta (sem prévia separação cromatográfica) de cerveja, uma matriz aquosa de pH caracteristicamente ácido ($\text{pH} \approx 4,0 - 4,5$), dentro do espectrômetro de massas, uma vez que muitas moléculas que possuem sítios ácidos ou básicos serão detectadas como um íon contendo somente uma carga (mono carregado), na sua forma protonada $(\text{M-H})^+$ ou desprotonada $(\text{M-H})^-$. Devido a estas características apropriadas, ESI-MS com introdução direta da amostra foi utilizada com o objetivo de se realizar a tipificação de amostras de diferentes tipos de cervejas de modo a promover uma rápida caracterização destas amostras e juntamente com a aplicação da análise de componentes principais (PCA) fornecer uma alternativa para o controle de qualidade das mesmas. A Tabela 5 nos fornece a relação das 29 amostras de cerveja analisadas.

As cervejas do tipo “lager” são uma família inteira de cervejas que variam das cervejas suaves e claras conhecidas como “pilsen”, até as escuras, do tipo “munich” aromáticas identificadas como “dunkels” e as cervejas fortes conhecidas como “bock”. Caracteristicamente, cervejas do tipo “lager” têm baixa concentração de ésteres e baixo conteúdo de lúpulo, como exceções importantes temos as

cervejas “pilsen” e alemã tipo exportação. Cervejas do tipo “lager” estão disponíveis ao consumidor na forma de chopp ou engarrafadas.⁸³

As amostras de cervejas “pilsen” e as amostras de cerveja do tipo “draff” analisadas apresentam espectros de ESI(+)-MS similares indicando grande semelhança entre estas amostras (Figura 25a). Os espectros de ESI(+)-MS deste conjunto de amostras mostram íons intensos na faixa de razão massa/carga (m/z) de 70 a 705. A mesma semelhança aparece quando estas amostras são analisadas no modo de ESI(-)-MS. Os espectros de ESI(-)-MS deste conjunto de amostras mostram íons intensos na faixa de razão massa/carga (m/z) de 78 a 763 e espectros de massas representativos de todas as amostras analisadas podem ser vistas na Figura 26a.

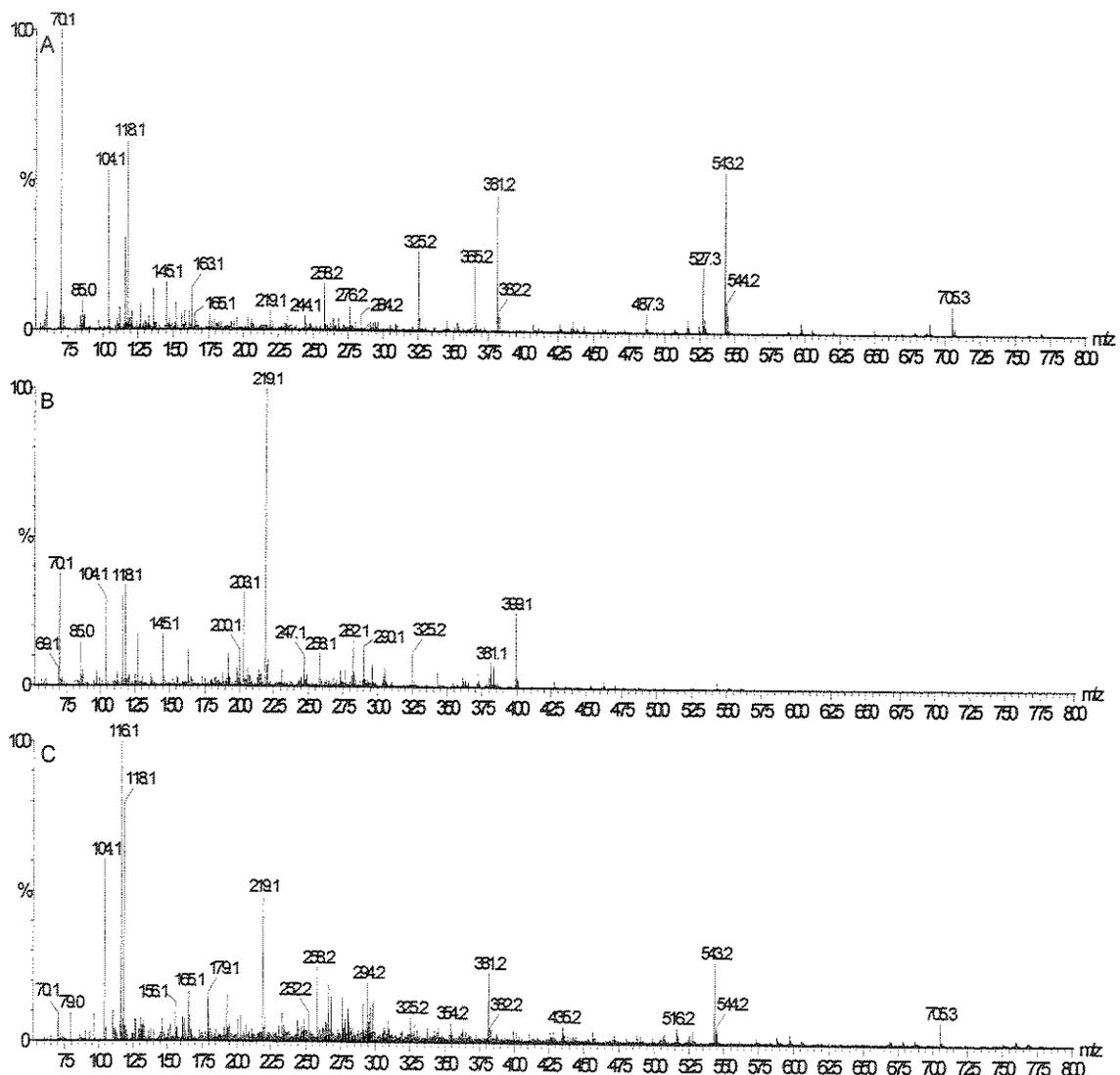


Figure 25- Espectro de massas de ESI(+)-MS característico de: a) cervejas “pilsen” e “draff”, b) cerveja “malzbier” e c) outras cervejas escuras.

Um outro tipo de cerveja do tipo “lager” muito comum no Brasil, chamada “malzbier”, foi analisada. A singularidade das cervejas do tipo “malzbier” é certamente um resultado da adição de certo “corante caramelo” e de seu gosto adocicado que é bem diferente das cervejas “pilsen”, por exemplo. Apesar deste tipo de cerveja ser fabricado basicamente com os mesmos ingredientes das cervejas “pilsen”, a adição de outros ingredientes, como citado acima, faz com que elas apresentem espectros de ESI-MS muito característicos, tanto no modo positivo (Figura 25b) como no modo negativo (Figura 26b). Observe que estas amostras também possuem espectros de massas distintos de outras amostras de cerveja do tipo “lager” mostrados anteriormente (Figura 25a e Figura 26a). Para este tipo de cerveja podemos verificar que em seus espectros de ESI(+)-MS o íon mais intenso e mais característico é o íon de m/z 219, mas podemos observar a presença de outros íons como os íons de m/z 200, 203, 247 e 399 que estão presentes apenas neste grupo de amostras. O íon mais intenso nos espectros de massas de ESI(-)-MS é o íon de m/z 179, da mesma forma a presença dos íons de m/z 215, 277 e 359 é bem característica neste grupo.

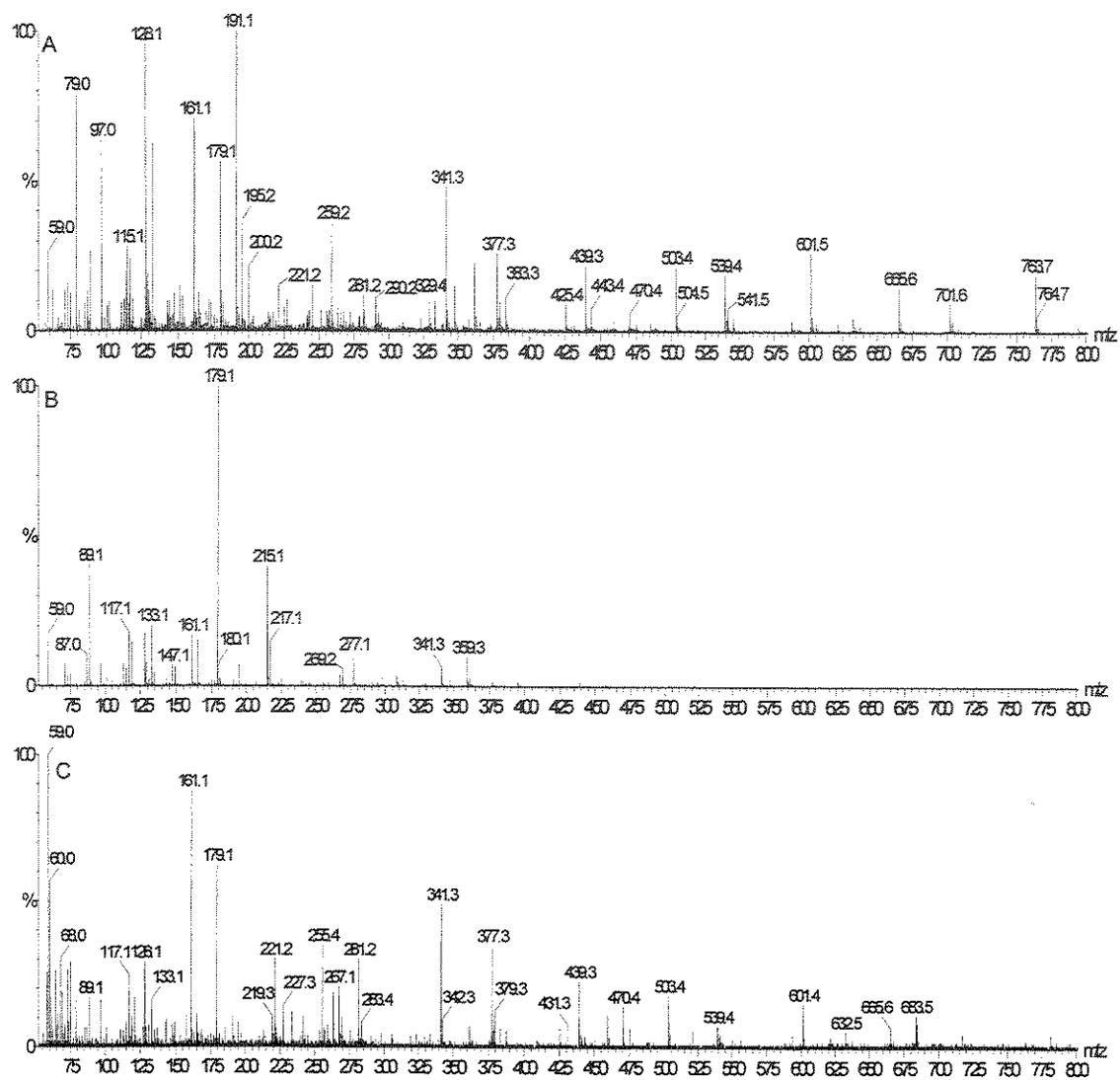


Figure 26- Espectro de massas de ESI(-)-MS característico de: a) cervejas "pilsen" e "draft", b) cerveja "malzbier" e c) cervejas escuras.

Tabela 5 – Conjunto de amostras analisadas por ESI-MS.

Amostra	Cerveja	Código da Amostra
01	Schincariol	P1
02	Primus	P2
03	Dado	P3
04	Antarctica	P4
05	Brahma	P5
06	Skol	P6
07	Heineken	P7
08	Budweiser	P8
09	Warsteiner	P9
10	Sapporo Draft	P10
11	Miller	P11
12	Summer Draft	P12
13	Antarctica Malzbier	M1
14	Schincariol Malzbier	M2
15	Brahma Malzbier	M3
16	Xingu	M4
17	Sweetheart	D1
18	Warsteiner Premium Dunkel	D2
19	Schincariol Munich	D3
20	Ruddles County	D4
21	Murphy's	D5
22	Abbot Ale	D6
23	Baden Baden Bock	D7
24	Baden Baden Stout	D8
25	Bohemia Escura	D9
26	Caracu	D10
27	Guinness	D11
28	Kaiser Bock	D12
29	Mãe Preta	D13

Outros tipos de cervejas escuras foram analisados (Tabela 5) e este grupo contém amostras de cervejas do tipo “*stout*” e do tipo “*bock*”. Como observado para os outros dois grupos, este grupo de amostras apresenta espectros de ESI-MS tanto no modo positivo (Figura 25c) como no modo negativo (Figura 26c) similar para todas as amostras analisadas. Os espectros de massas para estas amostras apresentam alguns íons observados para as cervejas do tipo “*lager*” analisadas anteriormente. Observe a presença de íons como o de m/z 219, característico de amostras de cervejas “*malzbier*”, e os íons de m/z 381, 543 e 705, característicos de amostras de cervejas “*pilsen*”. Por outro lado, a presença dos íons de m/z 79, 179 e 252 e ausência dos íons de m/z 163 e 365 torna este grupo distinto dos dois outros grupos de amostras mostrados anteriormente. Da mesma forma, seus espectros de ESI(-)-MS mostram íons característicos de amostras de cervejas “*pilsen*”, mas apresentam também íons distintos como os íons de m/z 255, 267 e 683 e, comparados com as amostras do primeiro grupo (Figura 26a), este último grupo não apresenta os íons de m/z 290, 701 e 763, por exemplo. Na verdade, estas amostras são fabricadas de forma diferente das amostras de cervejas “*pilsen*” e “*malzbier*”. Fermentação de topo é utilizada em alguns casos, a levedura utilizada é diferente daquela utilizada para produzir cervejas “*pilsen*” e “*malzbier*” e, além disso, algumas delas contém malte tostado ou caramelo (ou ambos). Desta forma, estas amostras de cerveja poderiam ter um espectro de ESI-MS diferente dos outros grupos de cerveja apresentados anteriormente devido a sua composição particular e devido a forma que estas amostras foram produzidas.

IV.3.2 - Análise quimiométrica dos dados obtidos.

Depois de realizada uma breve discussão observando os espectros de ESI-MS utilizou-se a análise dos componentes principais (PCA) para uma melhor separação das amostras, baseada nas diferenças de intensidade dos sinais. Quando PCA é aplicada, foi verificada uma boa classificação entre as amostras analisadas, possibilitando a separação entre as diferentes variedades de cerveja. Dois destes tratamentos quimiométricos aplicados aos espectros de massas de ESI-MS serão mostrados: um a partir de espectros de ESI(+)-MS e outro a partir

de espectros de ESI(-)-MS. Neste caso, um grupo dos 20 sinais mais intensos foi selecionado e os valores de intensidades relativas utilizados para a construção da matriz de dados foram obtidos da razão entre as intensidades de cada pico e a intensidade do maior pico em cada espectro de massas em particular.

A Figura 27 mostra o gráfico de escores da CP_1 versus a CP_2 da matriz de dados obtida a partir dos espectros de massas de ESI(-)-MS. Podemos observar que as amostras analisadas foram separadas em três grupos distintos. As CP_1 e CP_2 tem 57% e 17% da variância da matriz original de dados, respectivamente.

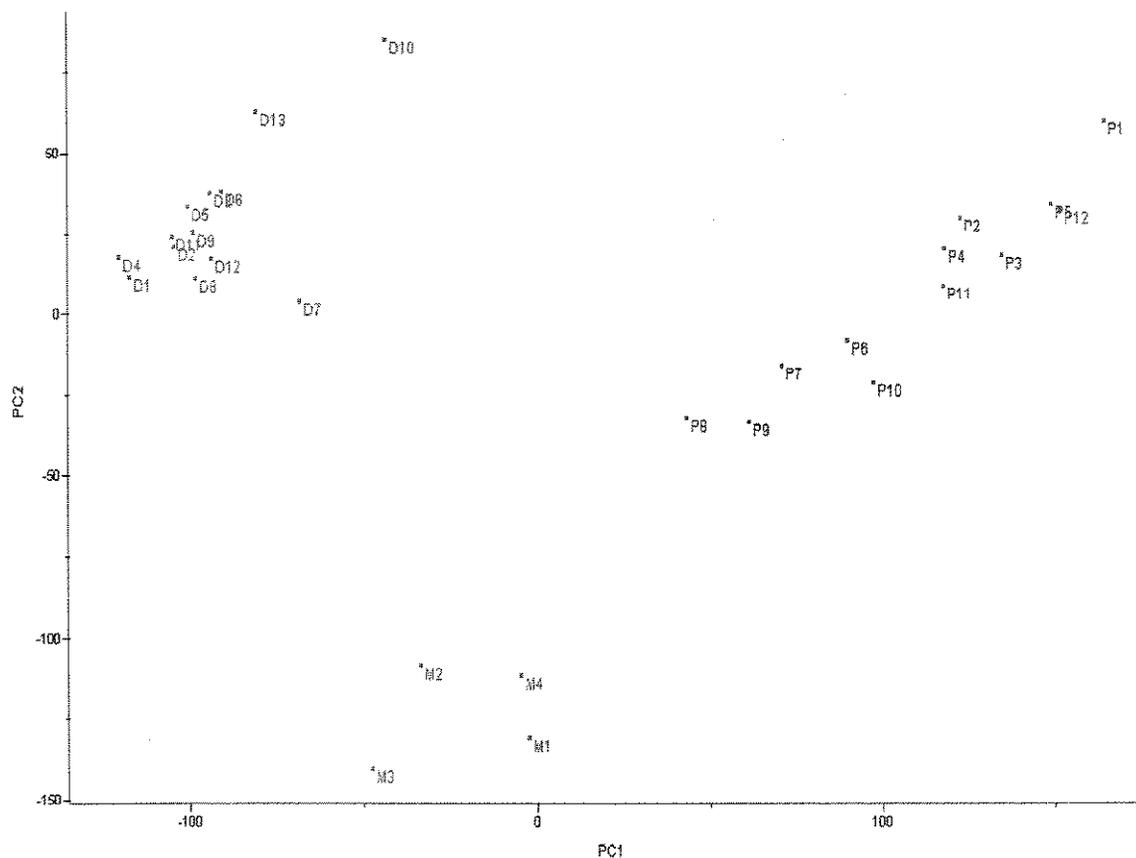


Figura 27 – Gráfico de escores da CP_1 (57%) versus a CP_2 (17%) para as 29 amostras de cerveja analisadas quando a análise quimiométrica é aplicada aos espectros de massas de ESI(-)-MS. Neste gráfico: **P**=amostras de cerveja “pilsen” e “drift”; **M**= amostras de cerveja “malzbier” e **D**= outras amostras de cerveja escura.

A Figura 28 mostra no modo de ESI(+)-MS no gráfico dos escores (CP_1 versus a CP_2) que as amostras de cerveja são separadas em três grupos característicos como observado anteriormente. Neste caso, CP_1 e CP_2 tem 42% e 27% da variância da matriz original de dados, respectivamente.

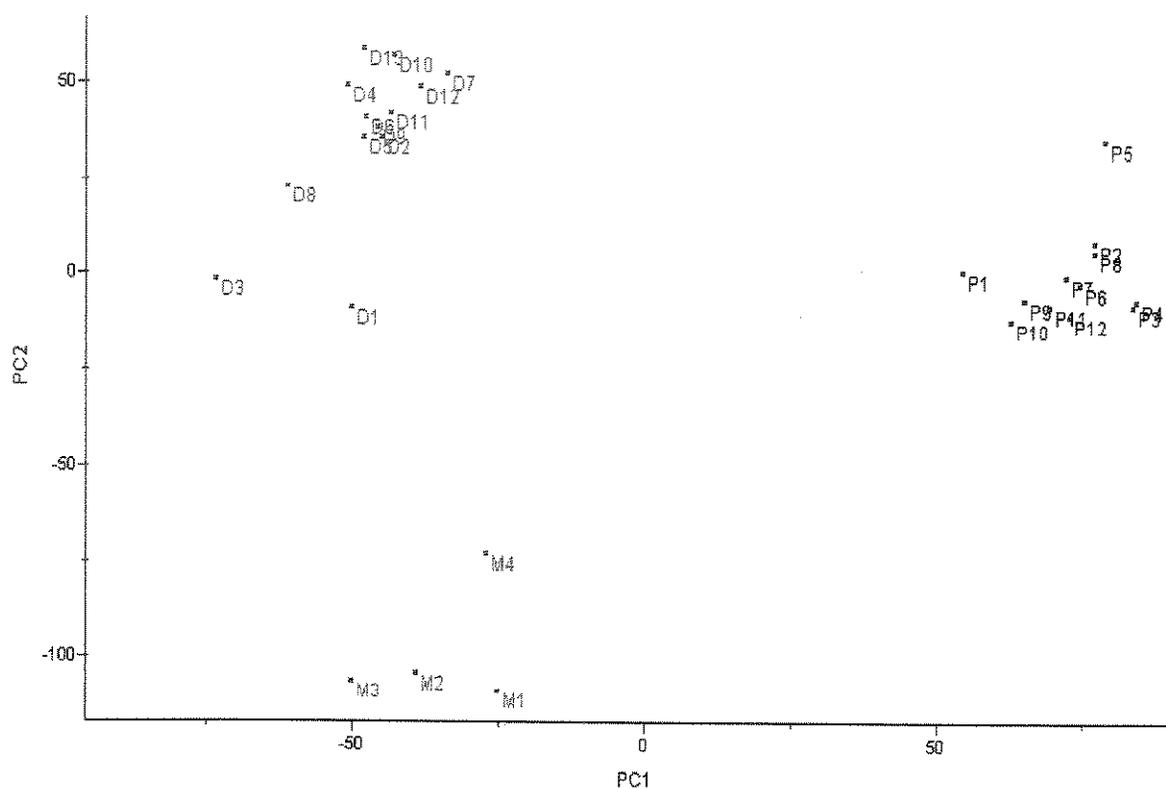


Figure 28 – Gráfico de escores da CP_1 (42%) versus a CP_2 (27%) para as 29 amostras de cerveja analisadas quando a análise quimiométrica é aplicada aos espectros de massas de ESI(+)-MS. Neste gráfico: **P**=amostras de cerveja “pilsen” e “drafft”; **M**= amostras de cerveja “malzbier” e **D**= outras amostras de cerveja escura.

Na Figura 27 [ESI(-)-MS] é mostrado que as cervejas escuras (representadas por **D**) estão localizadas no lado esquerdo da CP_1 (valores negativos de CP_1) e que as cervejas “pilsen” e “drafft” (representadas por **P**) estão localizadas do lado direito de CP_1 (valores positivos de CP_1). Observando a Figura 29a, podemos observar que o valor mais negativo da CP_1 é o do íon de m/z 59 que também é o sinal mais intenso em todos os espectros de massas das amostras das cervejas escuras (Figura 26c). Este íon distingue então as amostras

de cervejas escuras das cervejas “pilsen” e “draft” através da CP₁. Em contrapartida, as variáveis tais como os íons de *m/z* 78, *m/z* 96, *m/z* 101, *m/z* 128, *m/z* 130, *m/z* 161, *m/z* 191 e *m/z* 363 possuem valores positivos no gráfico de pesos de CP₁ e são as variáveis que mais influenciam a separação das amostras de cervejas “pilsen” e “draft” por CP₁ (em relação às cervejas escuras). As amostras de cerveja “malzbier” são separadas das outras amostras por CP₂. Elas estão localizadas em valores negativos da CP₂ e as variáveis mais importantes para sua distinção das outras amostras de cerveja são: *m/z* 89, *m/z* 179, *m/z* 215, *m/z* 217 e *m/z* 277. Estes íons são característicos de seus espectros de massas.

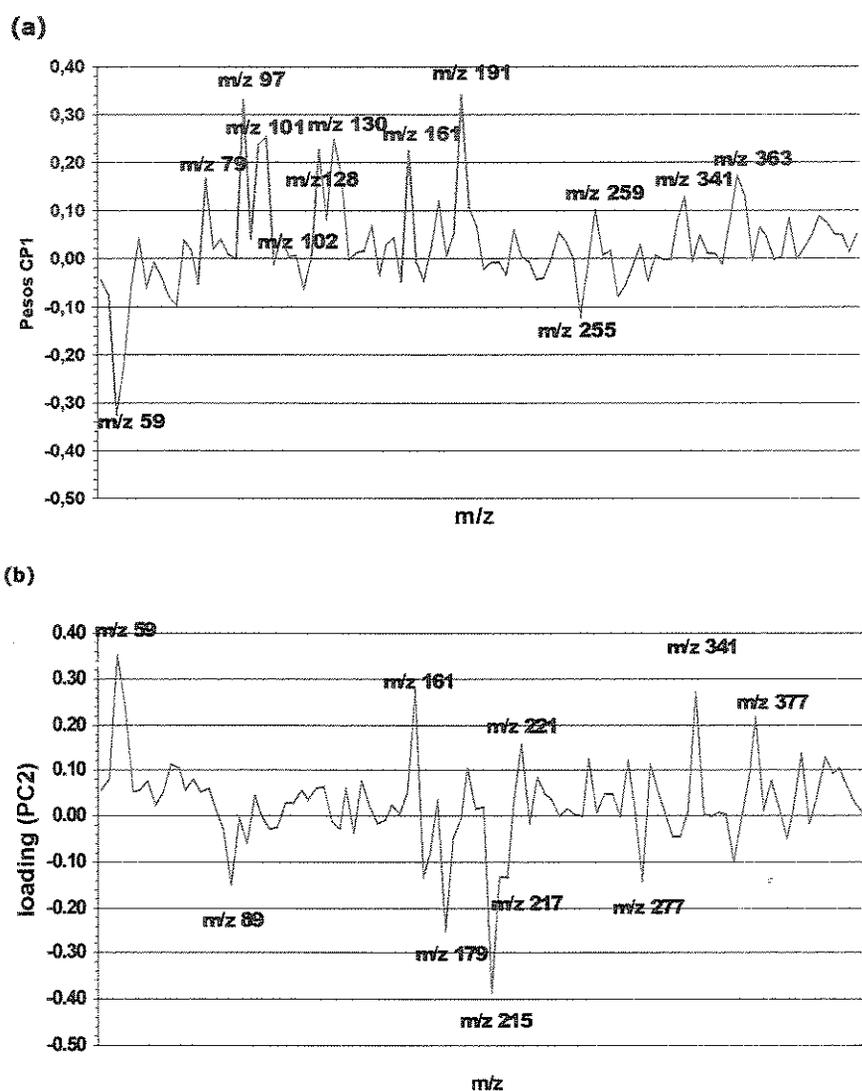


Figura 29 - Gráfico de pesos da CP₁ (57%) versus a CP₂ (17%) para as 29 amostras de cerveja analisadas quando análise quimiométrica é aplicada aos espectros de massas de ESI(-)-MS.

Na Figura 28 [ESI(+)-MS] é mostrado que as cervejas escuras (representadas por D) estão localizadas no lado esquerdo da CP₁ (valores negativos de CP₁) e que as cervejas “pilsen” e “draff” (representadas por P) estão localizadas do lado direito de CP₁ (valores positivos de CP₁). Observando a Figura 30a, podemos observar que os valores negativos da CP₁, ou seja, os íons de m/z 116 e m/z 219 são os responsáveis pela distinção das amostras de cervejas escuras das cervejas “pilsen” e “draff” através da CP₁. Observe que estes íons estão entre os íons mais intensos no espectro de massas das amostras de cervejas escuras. Em contrapartida, as variáveis tais como os íons de m/z 70, m/z 118, m/z 206, m/z 325 possuem valores positivos no gráfico de pesos de CP₁ e são as variáveis que mais influenciam a separação das amostras de cervejas “pilsen” e “draff” por CP₁ (em relação às cervejas escuras). As amostras de cervejas “malzbier” são separadas das outras amostras pela CP₂. Elas estão localizadas em valores negativos da CP₂ e as variáveis mais importantes para sua distinção das outras amostras de cerveja são os íons de m/z 70, m/z 203 e m/z 219. Estes íons são característicos de seus espectros de massas.

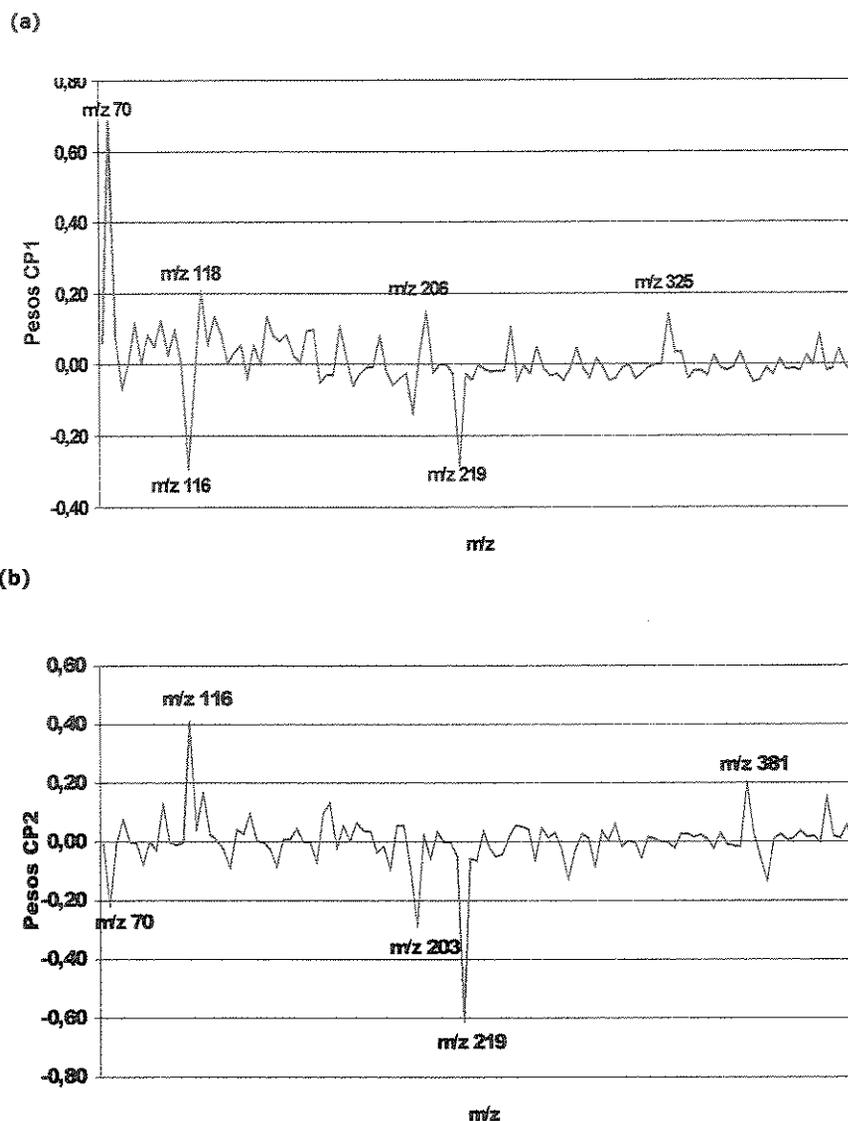


Figura 30 - Gráfico de pesos da CP₁ (42%) versus a CP₂ (27%) para as 29 amostras de cerveja analisadas quando análise quimiométrica é aplicada aos espectros de massas de ESI(+)-MS.

Na Tabela 6 estão as variâncias explicadas para as 10 componentes principais obtidas para as amostras analisadas no modo de ESI(-)-MS e na Tabela 7 são mostradas as variâncias explicadas para as 10 componentes principais obtidas para as amostras analisadas no modo de ESI(+)-MS.

Tabela 6 - Porcentagem da variância explicada pelos 10 componentes principais para as amostras analisadas no modo de ESI(-)-MS .

Componente Principal	% Variância explicada para cada CP	% Variância total explicada
1	57,2	57,2
2	17,2	74,4
3	8,8	83,2
4	4,3	87,5
5	2,9	90,4
6	1,7	92,1
7	1,3	93,4
8	1,2	94,6
9	0,9	95,5
10	0,7	96,1

Observe que as componentes principais 1, 2 e 3 explicam aproximadamente 83% dos dados.

Tabela 7 – Porcentagem da variância explicada pelos 10 componentes principais para as amostras analisadas no modo de ESI(+)-MS .

Componente Principal	% Variância explicada para cada CP	% Variância total explicada
1	41,6	41,6
2	27,0	68,6
3	8,0	76,6
4	5,4	82,1
5	4,1	86,2
6	3,2	89,4
7	1,8	91,2
8	1,6	92,8
9	1,3	94,0
10	1,0	95,0

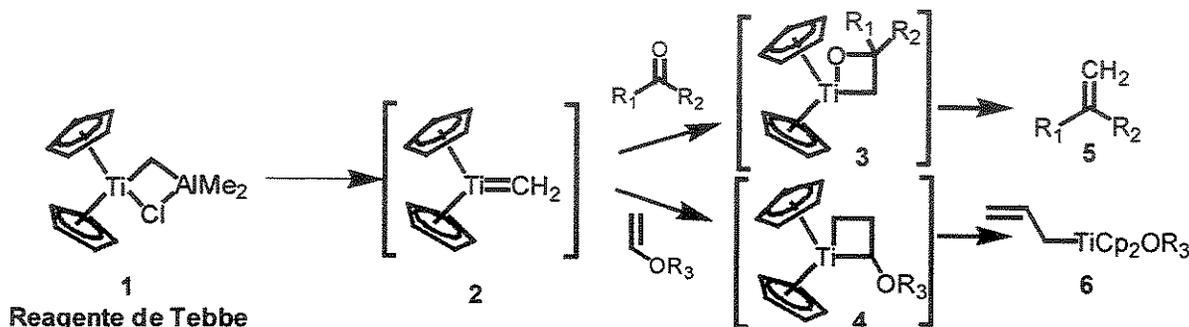
Observe que as componentes principais 1, 2 e 3 explicam aproximadamente 77 % dos dados.

IV.3.3 - CONCLUSÕES

Neste trabalho a técnica de ESI-MS foi testada pela primeira vez como um método para a análise da composição química de cervejas. Foi possível verificar a eficácia desta técnica como um instrumento rápido para a caracterização de diferentes tipos de cerveja. Dos resultados obtidos por ESI-MS para a análise de amostras de cerveja juntamente com a análise por PCA, pode-se dizer que esta técnica poderia ser uma alternativa utilizada no controle de qualidade do processo de fabricação de cervejas no qual alterações durante o processo de fabricação do produto poderiam ser detectadas.

IV.4 - INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE REAÇÃO ENTRE O REAGENTE DE TEBBE E VINIL-ÉTERES UTILIZANDO AS TÉCNICAS DE APCI-MS E APCI-MS/MS.

Entre os derivados metálicos do grupo (IV), catalisadores ou mediadores de titânio, tais como cloreto de titânio, são especialmente atrativos uma vez que eles são mais baratos e até mesmo convenientes para serem manuseados. Na década de 1970, Tebbe descobriu a primeira reação sinteticamente importante de um composto organotitânio.⁹⁰ Sob a ação de uma base de Lewis, o Reagente de Tebbe **1** é postulado ser transformado em uma espécie metilenotitanoceno **2** transiente que é provavelmente o intermediário reativo, o qual interage com compostos orgânicos (esquema 6).⁹⁰

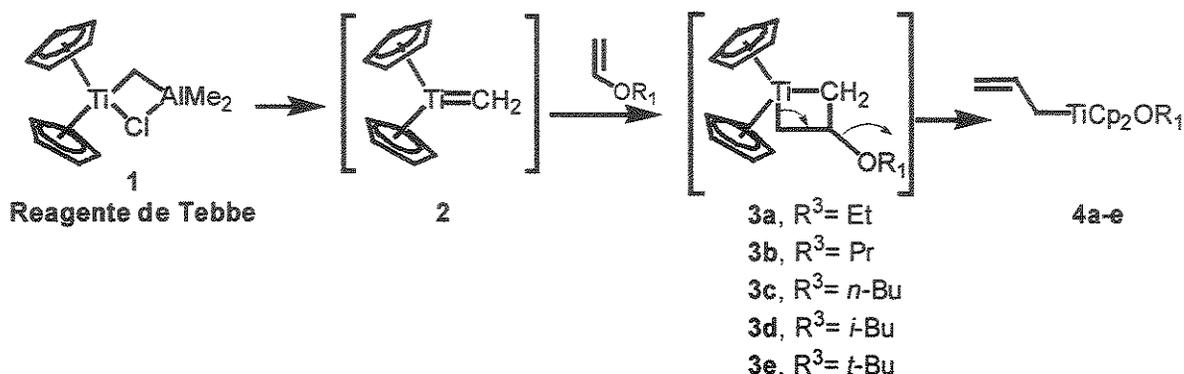


Esquema 6

O intermediário **2** não é isolado como um composto puro, contudo, ele foi caracterizado pela primeira vez utilizando APCI-MS e APCI-MS/MS como uma espécie transiente derivada do reagente de Petasis.⁹¹

Neste estudo, as técnicas de APCI-MS e APCI-MS/MS foram utilizadas para estudar a reação [2+2] de vinil éteres com o Reagente de Tebbe dando origem a alil titanocenos e para transferir os intermediários da reação de Tebbe diretamente da solução contendo estas espécies para a fase gasosa. Foi estudada a geração de complexos titanocenos alílicos a partir de materiais de partida não alílicos derivados de vinil éteres. Esta reação é também interessante do ponto de vista mecanístico devido ao fato que os intermediários desta reação são apenas postulados. Além disto, pela primeira vez, estes intermediários foram

interceptados, isolados, detectados e então caracterizados estruturalmente (esquema 7).



Esquema 7

Em APCI, moléculas neutras são transferidas da solução para a fase gasosa, onde são ionizadas a pressão atmosférica por processos de abstração de elétrons, protonação ou desprotonação promovidos por uma série de reações íon-molécula iniciadas pela ação de uma descarga corona. Portanto, quando a detecção destas moléculas é feita por espectrometria de massas na fase gasosa espera-se que a composição da solução inicial seja preservada. Reagentes, intermediários e produtos presentes na solução seriam todos transferidos de forma intacta para a fase gasosa e então ionizados e analisados. Como os intermediários postulados tem sítios básicos (presença de oxigênio), no mecanismo proposto para a reação estudada (Esquema 7), selecionamos o modo de ionização positivo para monitorar as moléculas protonadas, $(M + H)^+$, formadas na fase gasosa.

As reações com o Reagente de Tebbe foram realizadas pela dissolução direta de 1 nos vinil éteres utilizados [etil (m/z 265), propil (m/z 279), *n*-butil (m/z 293), *i*-butil (m/z 293) e *t*-butil (m/z 293) vinil éteres], espectros não mostrados], e então as soluções preparadas foram introduzidas através de uma fonte de APCI aquecida. Nenhum outro solvente foi utilizado para concentrar possíveis intermediários transientes, particularmente 2 e 3, ou ambos, concebivelmente presentes na mistura reacional em concentrações muito baixas. A Figura 31 mostra o espectro parcial dos intermediários titanocíclicos.

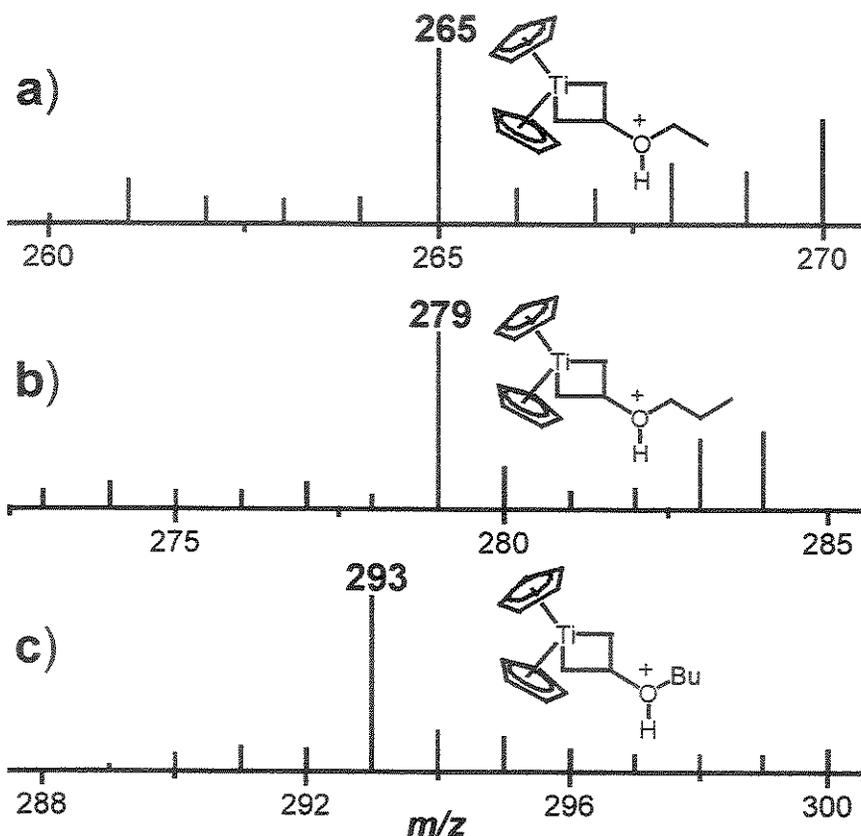


Figura 31 – Espectros parciais dos íons detectados das reações com o Reagente de Tebbe e: **a)** etil-viniléter, m/z 265; **b)** propil-viniléter, m/z 279 e **c)** butil-viniléter, m/z 293.

A Figura 32 mostra os experimentos de MS/MS realizados para caracterizar estruturalmente os intermediários **3** protonados via CID. Os espectros de CID da Figura 32 mostram para **3a** (m/z 265) um comportamento previsível e diagnóstico que, de forma interessante, se compara ao equilíbrio em solução envolvendo reagentes e produtos na fase condensada. O intermediário titanociclo **3a** perde etanol neutro e o radical etila, desta forma gerando a espécie de titânio alílico de m/z 219 e o álcool de m/z 236, respectivamente (Figura 32). Com isto, **3a** também se dissocia para o intermediário **2** protonado de m/z 193 via retro-adição. Comportamento similar é observado para as outras espécies **3b-e** com a perda dos álcoois correspondentes gerando as espécies de m/z 219. Além disto, pela primeira vez, o titanoceno [Cp_2Ti] de m/z 178 foi observado.

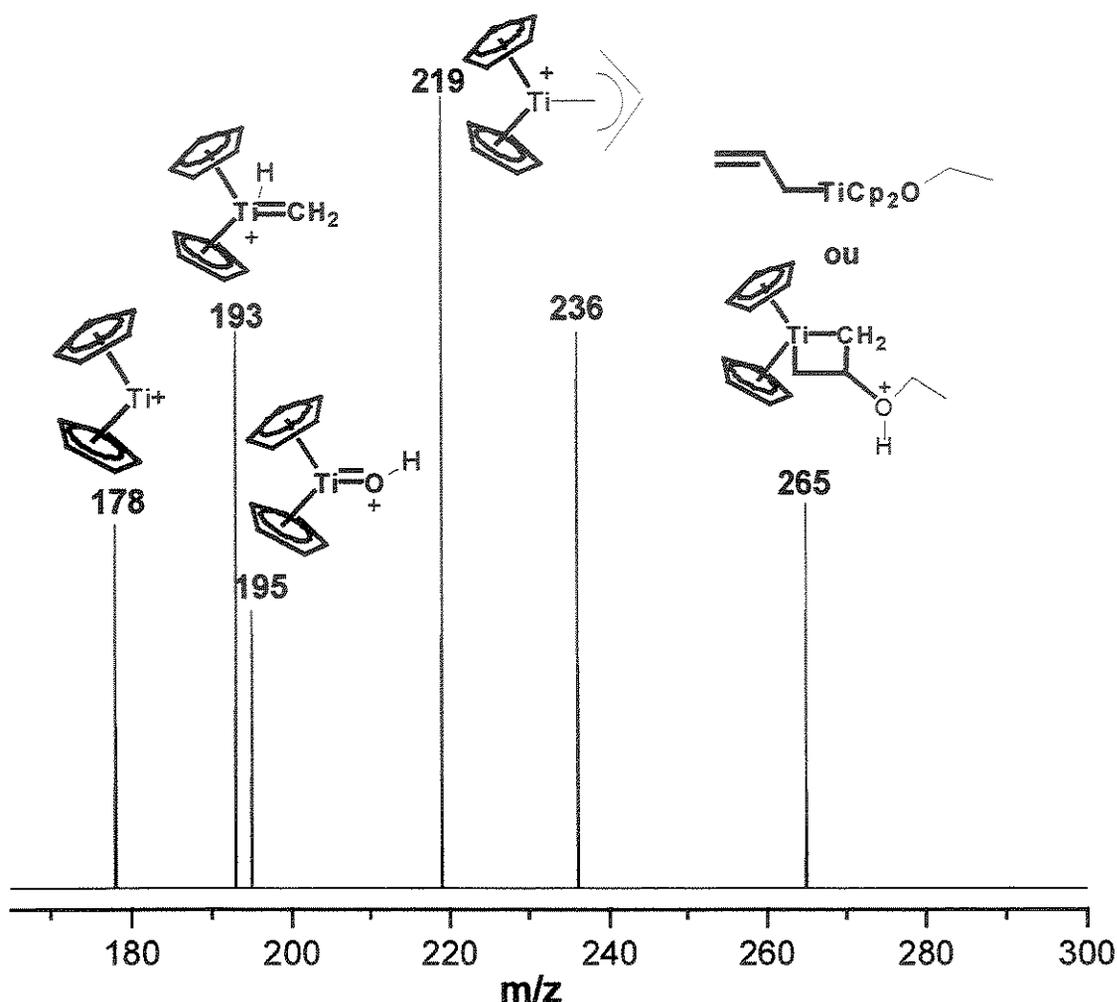
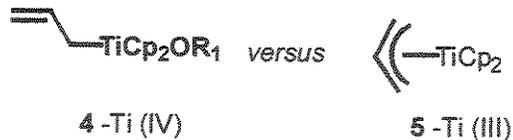


Figura 32 – Espectros representativos de CID dos titanocenos 3a protonado (m/z 265).

Um caráter intrínseco do metal titânio é dois estados de valência dos derivados titanoceno alílicos [o complexo 4 de Ti σ -alílico e o complexo 5 de Ti π -alílico] são conhecidos. Estas duas espécies alílicas reagem com carbonilas gerando álcoois homoalílicos. É sabido que o complexo 5 de Ti π -alílico não sobrevive sob tratamento de CH_2Cl_2 , enquanto o complexo 4 de Ti σ -alílico na presença de CH_2Cl_2 permanece inalterado. Assim, a adição de algumas gotas de CH_2Cl_2 no frasco de reação após a análise não levou a decomposição dos intermediários nestes experimentos, sugerindo a presença de espécies de Ti(IV) (4) ao invés de Ti (III) (5).⁹²



IV.4.1 - CONCLUSÃO

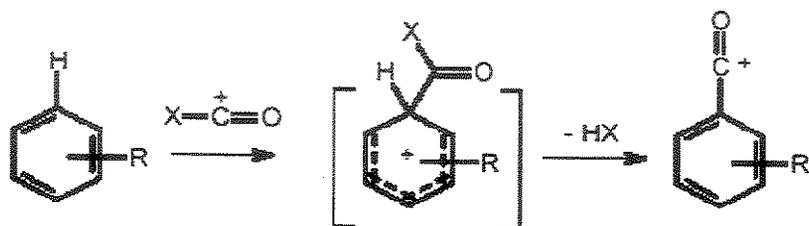
Os resultados mostram que experimentos utilizando APCI-MS e APCI-MS/MS no estudo de espécies transientes, o que tem sido postulado em fase condensada, provando o mecanismo para a reação de alilação de Tebbe pela caracterização das massas de seus intermediários chave titanociclos **3** (Esquema 7).⁹² Estes estudos indicam o grande potencial para espectrometria de massas no campo de mecanismos de reação orgânicas, e ilustra a conveniência das técnicas de APCI-MSⁿ para isolar e caracterizar intermediários chaves de reação organometálicos transientes que são transferidos da solução para a fase gasosa, um campo vasto mas ainda pouco explorado.

IV.5- REAÇÕES DE FUNCIONALIZAÇÃO DE LIGAÇÕES INERTES C-H POR CARBONILAÇÃO ATIVADA POR ÍONS XCO^+ (X= F, Cl, Br) COM COMPOSTOS AROMÁTICOS UTILIZANDO ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUÊNCIAL

Moléculas não reativas podem ser quimicamente ativadas e então convertidas em produtos úteis por funcionalização seletiva de suas ligações inertes utilizando uma variedade de reações tais como halogenação, oxidação e carbonilação. A fase gasosa fornece um ambiente adequado para estudar a reatividade intrínseca dos íons com moléculas neutras e para realizar um rápido “screening” para reações modelo potenciais.⁹³ Na fase gasosa, no ambiente do espectrômetro de massas livre de solventes,⁹⁴ muitas reações íon/molécula capazes de funcionalizar uma variedade de ligações inertes tem sido descritas. Em particular, H. Schwarz⁹⁵ e seus colaboradores tem estudado a ativação em fase gasosa de uma variedade de ligações intrinsecamente inertes por uma série de cátions metálicos e seus derivados. Para mencionar alguns exemplos, foi recentemente relatada a ativação hidrolítica das ligações C-F por cátions de cromo intrinsecamente não reativos,^{95a} a ativação régio- e diastereoseletiva da ligação C-H de valeramida e 3-metil-valeramida por íons contendo Fe^+ ,^{95b} a ativação da ligação P-H de fosfana^{95c} por Fe^+ , Co^+ , Ni^+ , Ru^+ , Rh^+ , Pd^+ , Os^+ , Ir^+ , e Pt^+ e a ativação da ligação C-H em metano por FeS^+ resultando na conversão de metano para metanotiol.^{95d}

A carbonilação de benzeno, a funcionalização seletiva e ativação de sua ligação C-H inerte por CO, tem sido extensivamente investigada tanto por razões experimentais como fundamentais. Muitas estratégias têm sido desenvolvidas para realizar a carbonilação de benzeno. Dentre estas estratégias podemos incluir a formilação de Gatterman-Koch e técnicas baseadas em catalisadores contendo metais de transição, reagentes organometálicos e processos fotoquímicos e radicalares.⁹⁶ Os íons acílios ($R-C^+=O$) constituem uma classe de cátions estáveis, de vida longa, versáteis e reativos e uma variedade de novas reações de íons acílios gasosos de importância sintética e analítica tem sido descritas.⁹⁷ A reação de carbonilação iônica de benzeno e seus derivados com cátions halocarbonila, por exemplo, o cátion clorocarbonila gasoso ($ClCO^+$) foi primeiro relatada por Eberlin e colaboradores.⁹⁸ Esta reação íon/molécula inédita resulta na

funcionalização seletiva por CO de uma ligação inerte C-H de benzeno e alguns dos seus derivados com a formação de cátions benzoila (Esquema 8, X = Cl). Observe que esta reação pode também ser classificada como uma reação de transcarbonilação devido ao fato de um íon haloacílio ser convertido a um íon aril acílio ($XCO^+ \rightarrow ArCO^+$).



Esquema 8

Mais recentemente, Grandinetti e colaboradores⁹⁹ utilizaram NF_2^+ gasoso para formar FCO^+ via um processo de fluoração iônica de CO, e descoberto que o cátion fluorcarbonil também promove a carbonilação iônica da ligação C-H em benzeno e tolueno (esquema 8, X=F). FCO^+ é facilmente disponível em fase gasosa, e também tem sido caracterizado em uma "liquid nitrogen cooled negative glow discharge",¹⁰⁰ mas em solução parece que FCO^+ não pode ser adequadamente estabilizado com os ácidos de Lewis conhecidos.¹⁰¹ Para $ClCO^+$, contudo, um sal estável ($ClCO^+SB_3F_{16}^-$) tem sido recentemente sintetizado.¹⁰¹ Além disso, $ClCO^+$, $BrCO^+$ e ICO^+ tem sido observados em soluções de SO_2ClF por espectroscopia de RMN de ^{13}C mas tentativas para observar FCO^+ falharam.¹⁰² Portanto, parece que a carbonilação iônica em fase condensada seria mais praticável utilizando-se os análogos de halogênios mais pesados (por exemplo, na forma de sais ácidos de Lewis), em particular os estáveis e bem caracterizados¹⁰³ cátion clorocarbonila $ClCO^+$.

Neste trabalho, realizamos reações em fase gasosa de três cátions halocarbonila FCO^+ , $ClCO^+$ e $BrCO^+$ com benzeno, furano, tiofeno e pirrol (e alguns de seus derivados alquila) para comparar as habilidades intrínsecas de XCO^+ para promover carbonilação iônica de ligações inertes aromáticas C-H. Por analogia com FCO^+ , também formamos e testamos a habilidade do cátion

fluorsulfinil FSO^+ , um íon altamente eletrofílico, para realizar sulfonilação iônica inerte inédita de ligações aromáticas C-H.

IV.5.1 - Preparação direta de FCO^+ gasoso.

Embora FCO^+ seja formado rapidamente a 70 eV a partir de vários compostos neutros adequados (mas não facilmente disponíveis),¹⁰⁴ bem como por fluoração iônica de CO por NF_2^+ ,⁹⁹ temos usado uma reação íon/molécula inédita em fase gasosa para preparar FCO^+ . Utilizando-se um espectrômetro de massas pentaquadrupolar (QqQqQ),¹⁰⁵ FC^+ de m/z 31 foi formado a 70 eV por EI de CF_4 e então selecionado pelo primeiro quadrupolo analisador de massas (Q_1). As reações em q_2 com N_2O sob baixa energia, próxima a 1 eV, e condições de múltiplas colisões permitiram quase exclusivamente a formação de FCO^+ de m/z 47 via uma reação eficiente de abstração de oxigênio (Figura 33).

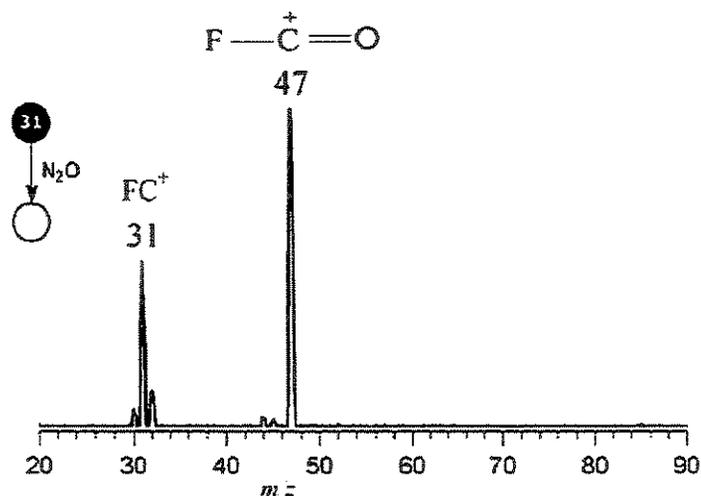


Figura 33 – Espectro de massas do produto iônico para a reação de FC^+ de m/z 31 com N_2O . Uma reação inédita, altamente eficiente e exclusiva de abstração de oxigênio gerando FCO^+ gasoso de m/z 47.

IV.5.2 - Reações de três cátions halocarbonila com benzeno.

Os cátions halocarbonila isotopoméricos $^{35/37}\text{ClCO}^+$ e $^{79/81}\text{BrCO}^+$ foram obtidos por EI a 70 eV a partir de cloreto de acetila e brometo de acetila, respectivamente, dois de seus precursores neutros apropriados e facilmente disponíveis. A Figura 34 mostra os espectros de massas dos produtos iônicos para a reação dos três íons selecionados FCO^+ , $^{35}\text{ClCO}^+$ e $^{79}\text{BrCO}^+$ com benzeno. Na verdade, um experimento de MS^3 foi realizado (Figura 34a) para FCO^+ desde que este íon foi preparado “*on-line*” em q_2 via reações dos íons FC^+ selecionados em Q_1 (Figura 33), selecionado em Q_3 , e adicionalmente reagido com benzeno em q_4 , enquanto Q_5 operava no modo de varredura para adquirir os espectros de massas seqüenciais dos produtos iônicos resultantes desta reação (Figura 34a). Para os três cátions XCO^+ três reações competitivas (Esquema 9) são observadas: i) carbonilação iônica que gera o cátion benzoila (PhCO^+) de m/z 105, ii) abstração de elétrons que gera benzeno ionizado de m/z 78 e iii) transferência de X^+ que gera o correspondente fluorbenzeno protonado de m/z 97, clorobenzeno protonado de m/z 113 e bromobenzeno protonado de m/z 157 (esquema 9 e Figura 34).

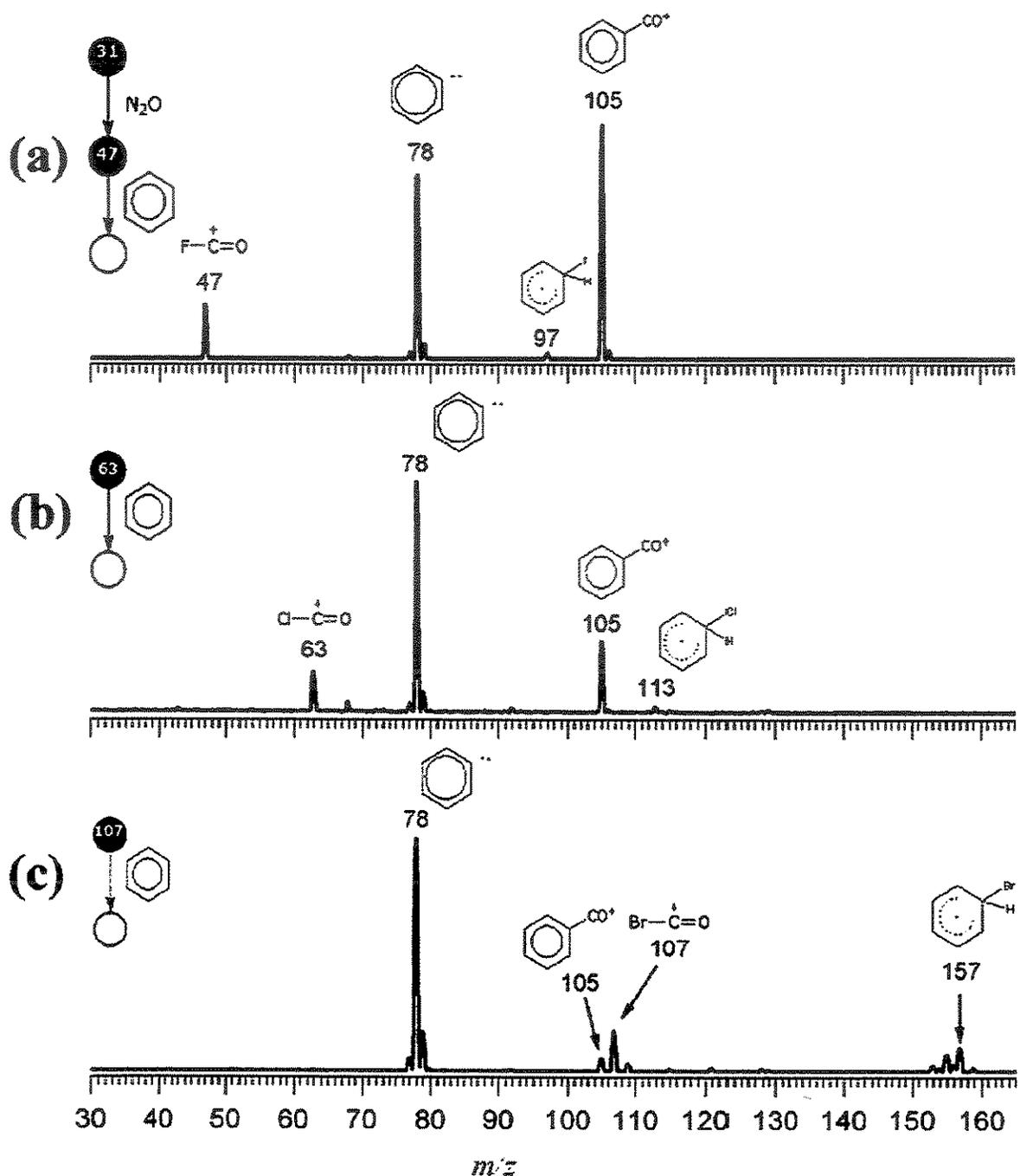
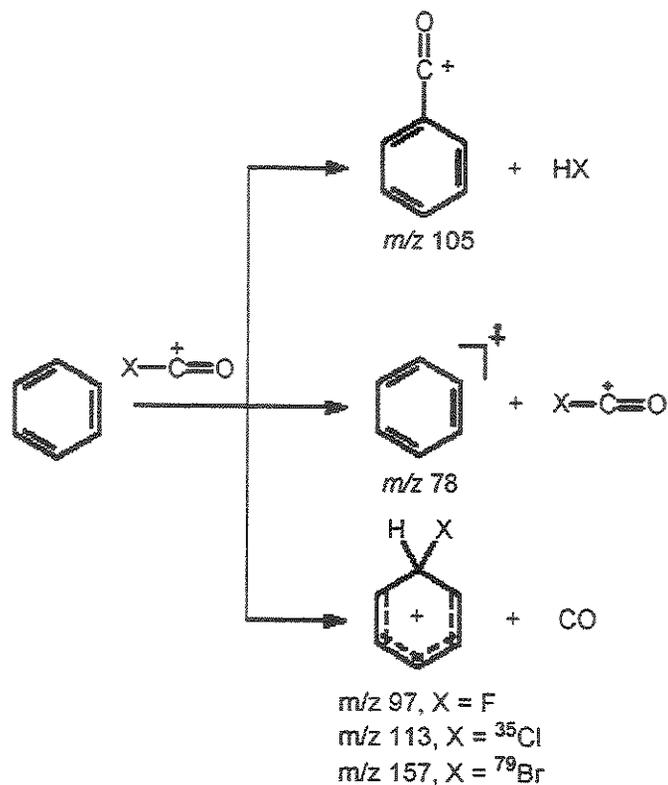


Figura 34 – (a) Espectros de massas sequenciais dos produtos iônicos para a reação de FCO^+ (selecionado em Q_1) de m/z 47 (formado via reação de FC^+ de m/z 31 com N_2O , veja Figura 33) com benzeno. Espectro de massas dos produtos iônicos para a reação com benzeno dos íons selecionados (b) ClCO^+ de m/z 63 e (c) BrCO^+ de m/z 107.



Esquema 9

Para FCO^+ (Figura 34a), carbonilação iônica ocorre em grande extensão, e PhCO^+ de $m/z\ 105$ é o produto iônico majoritário da reação. Abstração de elétrons ($m/z\ 78$) é a segunda reação mais favorecida enquanto a reação de transferência de F^+ é a menos favorecida ($m/z\ 97$).¹⁰⁶ O rendimento da reação de carbonilação iônica relativa a abstração de elétrons ($m/z\ 105: m/z\ 78$) diminui de FCO^+ (Figura 34a) para ClCO^+ (Figura 34b) e é ainda menor para BrCO^+ (Figure 34c), enquanto a transferência de X^+ ocorre em pequena extensão em todos os casos. Portanto, a habilidade dos íons XCO^+ para promover carbonilação iônica de benzeno em relação à reação competitiva de abstração de elétron, diminui na ordem: $\text{FCO}^+ > \text{ClCO}^+ > \text{BrCO}^+$. Para racionalizar tal reatividade e a tendência dos íons para sofrer a reação competitiva de abstração de elétrons, as energias de recombinação dos três cátions halocarbonila devem ser comparadas. As energias de recombinação de FCO^+ foram experimentalmente medidas: $9,3 \pm 0,1\ \text{eV}$,¹⁰⁷ o que faz a abstração de elétrons de benzeno ($\text{IE} = 9,25\ \text{eV}$) apenas ligeiramente exotérmica, mas não é possível encontrar energias de recombinação experimentais corretos para ClCO^+ e BrCO^+ . Devido, contudo, a diminuição da eletronegatividade dos átomos de

halogênio, a energia de recombinação provavelmente diminui de FCO^+ para ClCO^+ e então para BrCO^+ assim desfavorecendo a abstração de elétrons e favorecendo indiretamente a carbonilação iônica em uma ordem de reatividade reversa da observada experimentalmente. Uma estimativa teórica utilizando cálculos com a base B3LYP/6-311++G(d,p) fornece as seguintes energias de recombinação adiabáticas: FCO^+ (8,49 eV), ClCO^+ (7,62 eV) e BrCO^+ (7,57 eV), e uma IE (energia de ionização) para benzeno de 8,08 eV. Como a abstração de elétrons ainda ocorre para ClCO^+ e BrCO^+ , a conversão da energia translacional para energia interna provavelmente ocorre e conduz estas reações endotérmicas durante as colisões de baixa energia dos íons com benzeno. Ao mesmo tempo, contudo, a diminuição da eletronegatividade dos átomos de halogênio fazem os íons menos eletrofílicos de FCO^+ para ClCO^+ e então para BrCO^+ ; portanto, a adição eletrofílica que leva a carbonilação de benzeno é desfavorecida.

Cálculos Teóricos:

Para ajudar a racionalizar as tendências de reatividade observadas nas reações dos três cátions halocarbonila com benzeno cálculos teóricos no nível B3LYP/6-311G++(d,p) foram realizados. A Figura 35 mostra um diagrama de energia potencial para a reação dos três cátions halocarbonila com benzeno. Para FCO^+ , a adição eletrofílica ao benzeno é altamente exotérmica ($-65,1 \text{ Kcal mol}^{-1}$), enquanto que a perda adicional de HF ocorre via um estado de transição localizado a $-31,6 \text{ Kcal mol}^{-1}$ em energia abaixo dos reagentes e gera os produtos de carbonilação iônica final, PhCO^+ e HF, em um processo exotérmico cuja energia é $-82,7 \text{ Kcal mol}^{-1}$. Para ClCO^+ e BrCO^+ , contudo, a adição eletrofílica ao benzeno é muito menos exotérmica, $-33,9 \text{ Kcal mol}^{-1}$ para ClCO^+ e $-26,9 \text{ Kcal mol}^{-1}$ para BrCO^+ , enquanto que a perda adicional de HX ocorre via estados de transição que se localizam acima dos reagentes ($+10,3 \text{ Kcal mol}^{-1}$ para ClCO^+ e $+7,5 \text{ Kcal mol}^{-1}$ para BrCO^+) embora os produtos finais de carbonilação sejam formados em reações exotérmicas, $-54,4 \text{ Kcal mol}^{-1}$ para ClCO^+ e $-46,5 \text{ Kcal mol}^{-1}$ para BrCO^+ (Figura 35). O acesso (ligeiramente) endotérmico aos estados de transição (TS) está então de acordo, portanto com a reduzida reatividade para carbonilação iônica de ClCO^+ e BrCO^+ , conseqüentemente com o domínio da

reação de abstração de elétron competitiva, embora as energias de recombinação de ClCO^+ e BrCO^+ sejam mais baixas que FCO^+ .

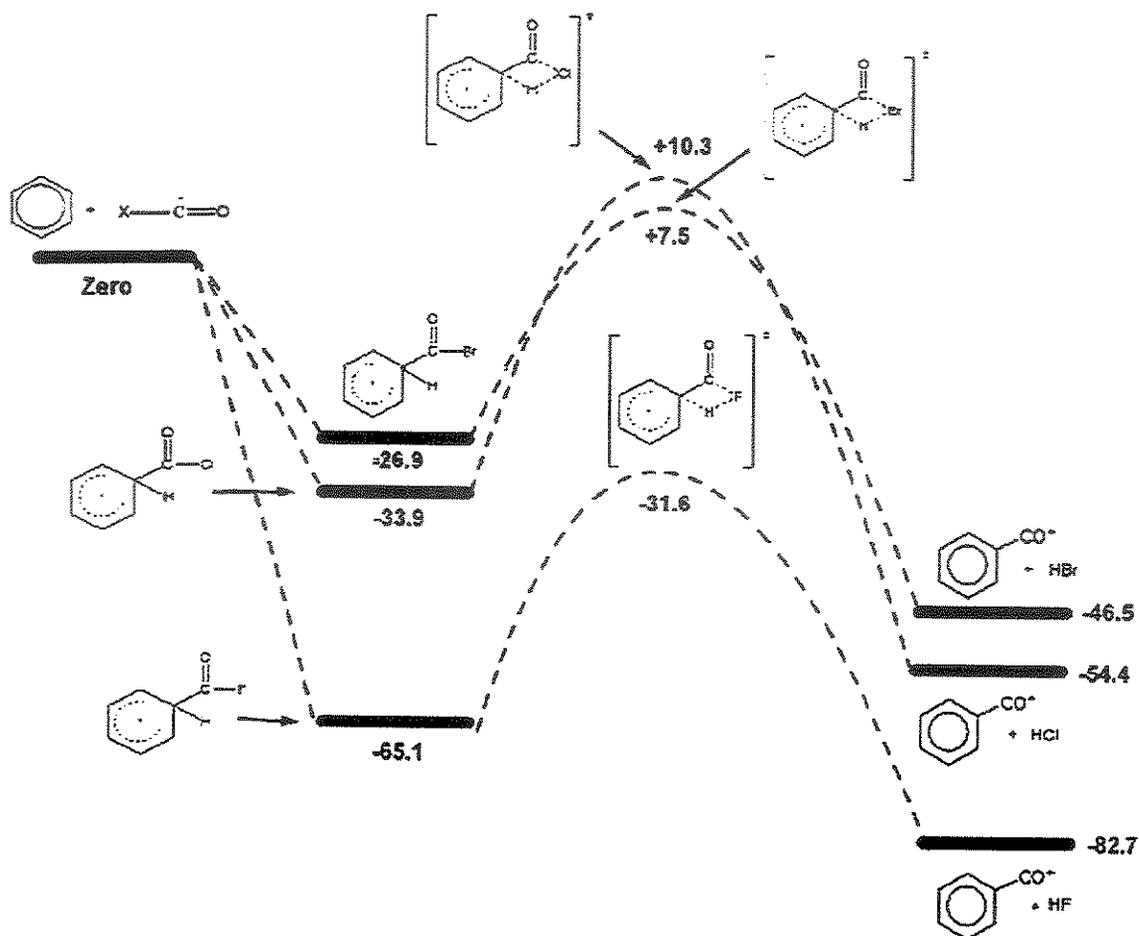


Figura 35 – Diagrama de energia potencial para reações de cátions XCO^+ com benzeno. As energias são dadas em Kcal mol^{-1} . As energias dos estados de transição (TS) foram caracterizadas por uma frequência vibracional negativa: TS for FCO^+ (-1462 cm^{-1}), ClCO^+ (-1254 cm^{-1}), BrCO^+ (-1195 cm^{-1}).

IV.5.3 - Reações de íons FCO^+ com tiofeno, pirrol e furano.

Em reações de substituição eletrofílica, que acontecem predominantemente na posição 2, anéis heterocíclicos de 5 membros são muito mais reativos que benzeno, e assemelham-se aos derivados mais reativos de benzeno. A Figura 36 mostra os espectros de massas dos produtos para as reações de FCO^+ (o cátion halocarbonila mais eletrofílico) com tiofeno (e 2,5-dimetiltiofeno), pirrol e furano. As

três reações competitivas observadas para benzeno são também observadas para os três heterocíclicos de cinco membros estudados, mas apesar da altamente esperada reação de carbonilação eletrofílica iônica, a reação de abstração de elétrons é a reação principal em todos os casos. A reação de abstração de elétrons gera os respectivos heterocíclicos ionizados: tiofeno ionizado de m/z 84 (Figura 36a), 2,5-dimetiltiofenopirrol ionizado de m/z 112 (Figura 36b), pirrol ionizado de m/z 67 (Figura 36c) e furano ionizado de m/z 68 (Figura 48d). Para tiofeno e pirrol, a carbonilação iônica também ocorre em considerável extensão formando os respectivos íons acílios $M-CO^+$ de m/z 111 e m/z 94. Para furano, carbonilação iônica que gera $M-CO^+$ de m/z 95 ocorre em uma extensão bastante limitada. De forma similar às reações com benzeno (Figura 36a), exceto para furano, a reação de transferência de F^+ é em todos os casos a reação menos favorecida e gera provavelmente 2-fluortiofeno protonado de m/z 103, 2-fluorpirrol protonado de m/z 86, e 2-fluorfurano protonado de m/z 87. Portanto, para carbonilação iônica com FCO^+ , a ordem de reatividade dos compostos aromáticos testados é: benzeno > tiofeno > pirrol > furano.

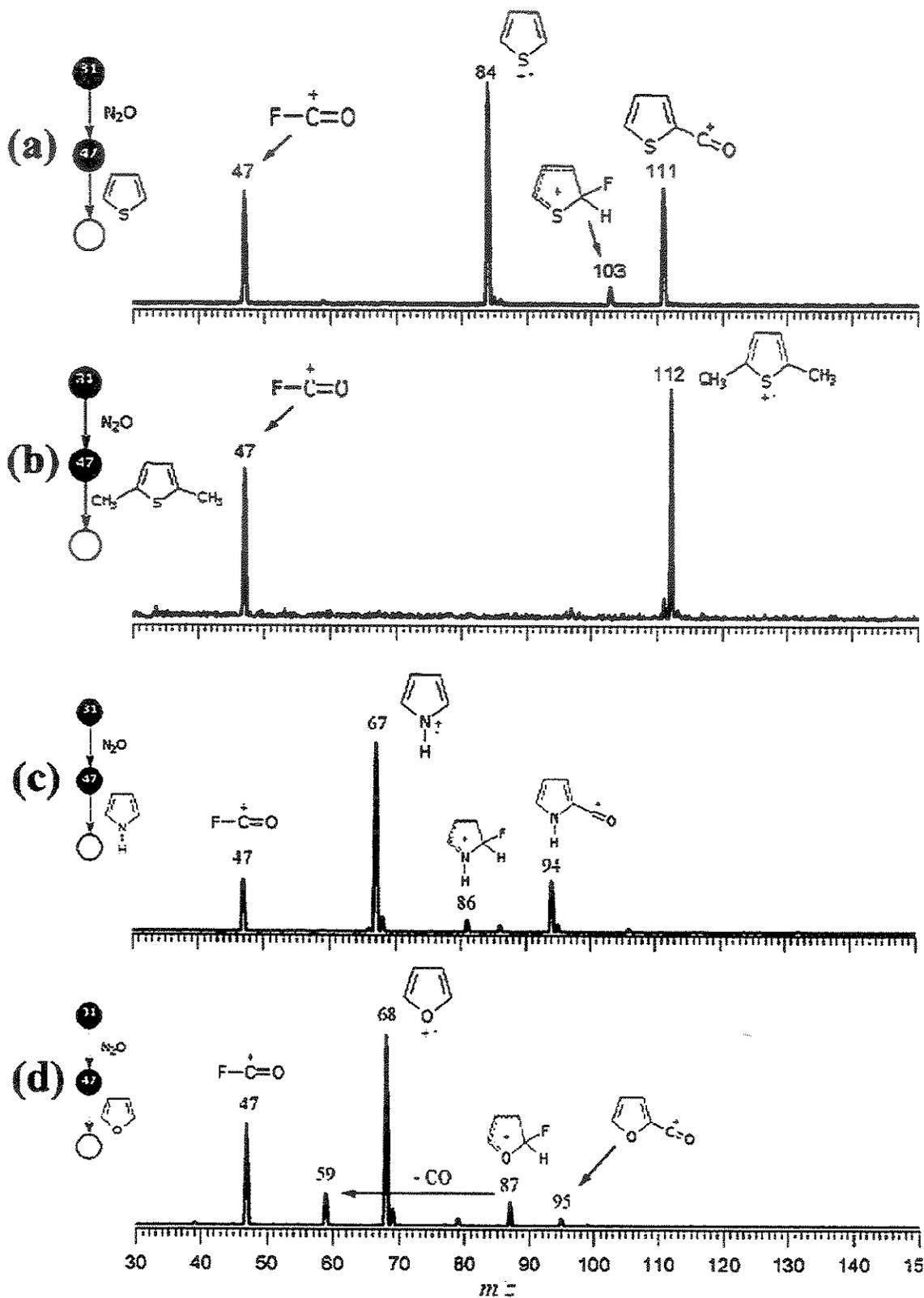


Figura 36 – Espectros de massas seqüenciais dos produtos iônicos para a reação de FCO^+ (selecionado em Q_1) de m/z 47 (formado via reação de FC^+ de m/z 31 com N_2O , veja Figura 33) com (a) tiofeno, (b) 2,5-dimetiltiofeno, (c) pirrol e (d) furano.

IV.5.4 - Substituições alquílicas

Dois efeitos opostos são esperados pela presença de substituintes alquila em anéis aromáticos. As substituições alquílicas resultam tanto em uma maior densidade eletrônica da nuvem de elétrons π , o que deveria favorecer carbonilações iônicas eletrofílicas, e menores IE's (Energias de Ionização), o que deveria favorecer a abstração de elétrons competitiva. Em geral, a substituição alquílica para os heterocíclicos de cinco membros favorece a abstração de elétrons. Por exemplo, enquanto FCO^+ reage com tiofeno (8,87 eV) por carbonilação iônica em uma extensão considerável (Figura 36a), ele forma em menor proporção um produto de carbonilação iônica com 2-metil-tiofeno (8,61 eV) reagindo principalmente por abstração de elétrons (espectro não mostrado). Além disso, FCO^+ reage com 2,5-dimetil-tiofeno exclusivamente por abstração de elétrons (Figura 36b). N-metilpirrol é também um tanto menos reativo do que pirrol em relação a carbonilação iônica (espectro não mostrado).

Cálculos teóricos

O diagrama da Figura 37 compara as predições teóricas para as reações de FCO^+ com benzeno, furano, 2-metil-tiofeno e N-metil-pirrol. A adição eletrofílica de FCO^+ para furano, 2-metil-tiofeno e N-metil-pirrol são até mesmo mais exotérmicas (-77,8, -90,0 e 101,1 Kcal mol⁻¹, respectivamente) que para benzeno (-65,1 Kcal mol⁻¹), enquanto a adicional perda de HF ocorre a -74,8, -88,7 e -92,1 Kcal mol⁻¹ através de processos altamente exotérmicos via estados de transição favoráveis muito próximos ou abaixo do que o do benzeno. Portanto, quando comparados com o benzeno, e quando considerados separadamente, a carbonilação iônica com FCO^+ para furano, tiofeno e pirrol é, em teoria, igual ou até mesmo mais favorável. Mas os compostos aromáticos de cinco membros, apesar destes prognósticos e sua grande reatividade em substituições eletrofílicas, não reagem eficientemente por carbonilação iônica com FCO^+ . Uma reatividade tão limitada é provavelmente um resultado da altamente favorável reação de abstração de elétrons competitiva devido às relativamente baixas IE's dos reagentes neutros: benzeno (9,25 eV) > tiofeno (8,87 eV) > pirrol (8,21 eV). Furano (8,88 eV) com uma IE relativamente alta, próxima da IE do tiofeno, apresenta uma reatividade muito

baixa em relação a carbonilação iônica. Sua alta tendência em reagir por transferência de F^+ (Figura 36d) pode estar suprimindo a carbonilação iônica.

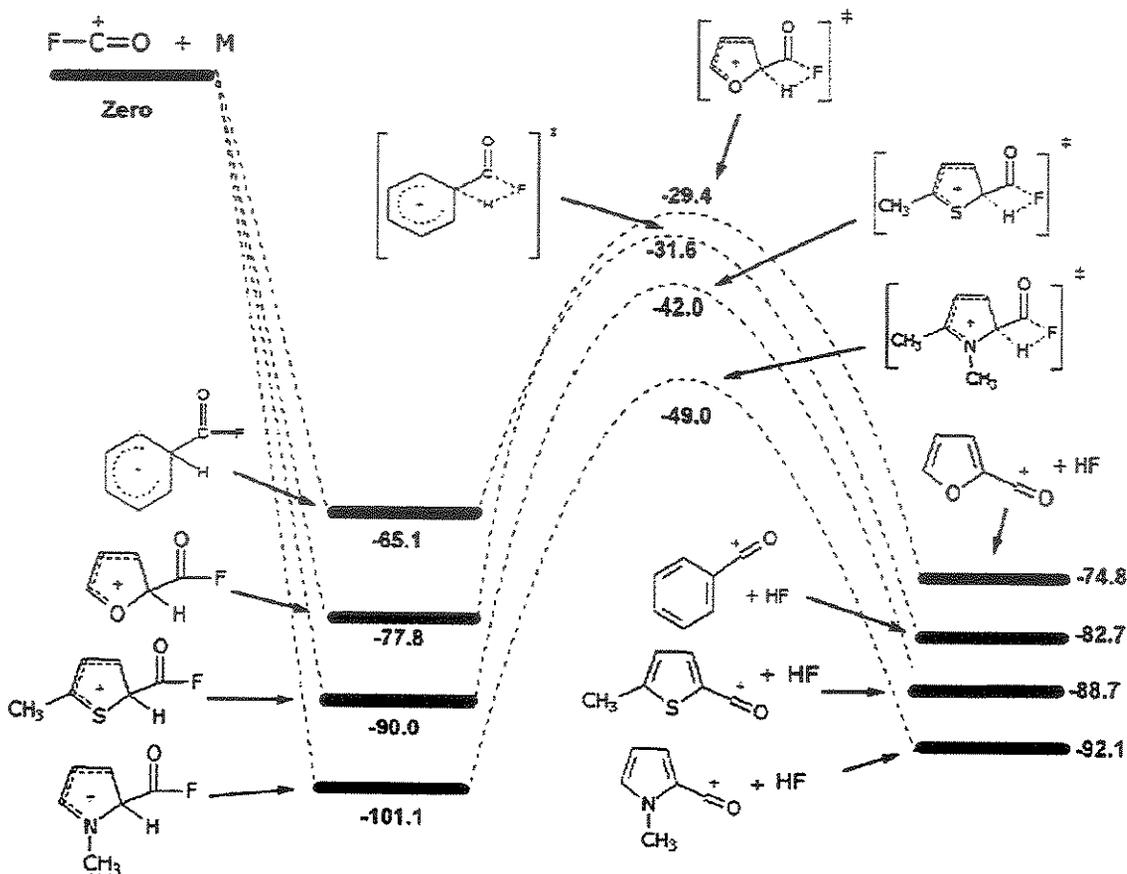


Figura 37 – Diagrama de energia potencial utilizando a base B3LYP/6-311G++(d,p) para as reações de FCO^+ com benzeno, furano, 2-metil-tiofeno e N-metil-pirrol. As energias são dadas em $Kcal\ mol^{-1}$. As energias dos estados de transição (TS) foram caracterizadas por uma frequência vibracional negativa: TS for benzeno ($-1462\ cm^{-1}$), furano ($-1616\ cm^{-1}$), 2-metil-tiofeno ($-1617\ cm^{-1}$) e N-metilpirrol ($-1636\ cm^{-1}$).

IV.5.5 - FSO^+ : Em analogia com FCO^+ , o cátion fluorsulfonila FSO^+ , altamente eletrofílico, poderia reagir, em princípio, por adição eletrofílica seguida pela perda de HF, assim como resultar na sulfonilação iônica inédita das ligações inertes C-H de compostos aromáticos (Esquema 10). Para testar, portanto esta possibilidade, o cátion fluorsulfonila FSO^+ foi preparado também via uma reação de abstração de oxigênio,¹³ de FS^+ com N_2O (Figura 38).

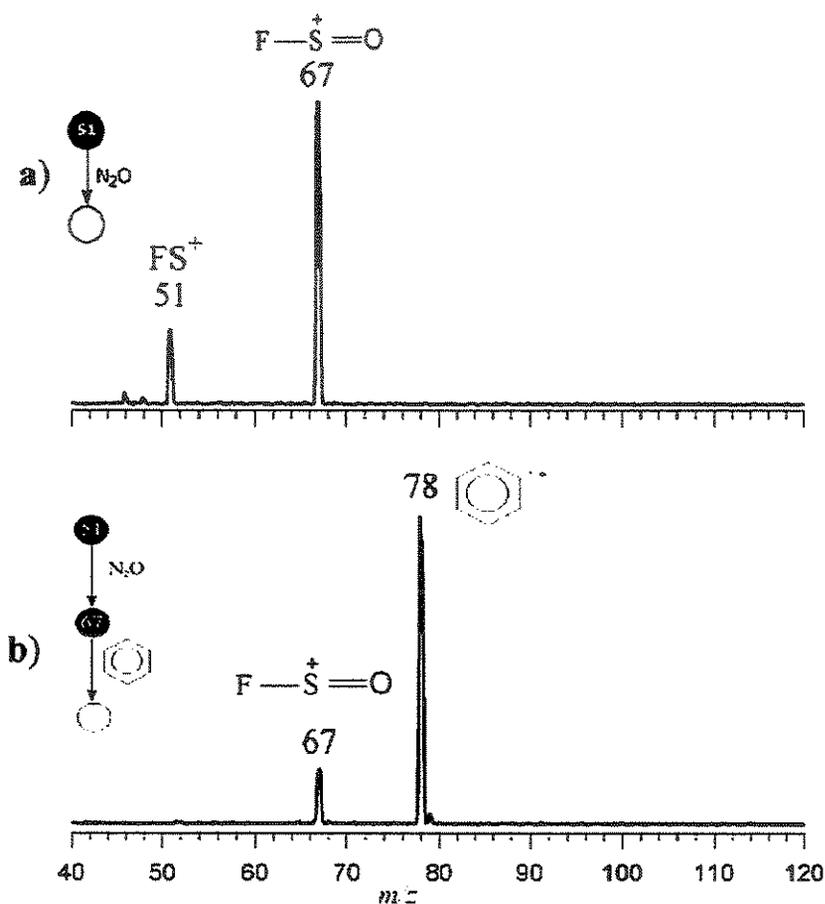
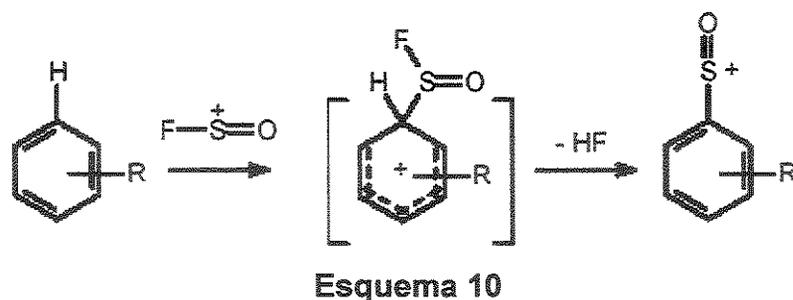


Figura 38 – (a) Espectro de massas dos produtos iônicos para a reação de FSO^+ (selecionado em Q1) de m/z 67 (formado pela reação de FS^+ de m/z 51 com N_2O). Uma nova, altamente eficiente e praticamente exclusiva reação de abstração de oxigênio forma FSO^+ de m/z 67. (b) Espectros de massas sequenciais dos produtos iônicos para a reação de FSO^+ com benzeno; o íon age como um potente agente oxidante e abstração de elétron ocorre exclusivamente gerando benzeno ionizado de m/z 78.

O espectro de massas seqüencial dos produtos iônicos da Figura 38b mostra, contudo, que FSO^+ reage com benzeno somente por abstração de elétrons para formar benzeno ionizado de m/z 78. Abstração de elétrons é também a reação dominante de FSO^+ com furano, pirrol e tiofeno (espectro não mostrado).

Cálculos Teóricos. FCO^+ versus FSO^+ : O diagrama da Figura 39 compara as predições teóricas para a reação de FCO^+ e FSO^+ com benzeno. Quando sulfonilação iônica é considerada separadamente, FSO^+ é prognosticado ser um eletrófilo altamente eficiente (mais do que FCO^+) e um agente de sulfonilação iônica potencialmente efetivo desde que sua adição eletrofílica a benzeno é consideravelmente mais exotérmica ($-102,8 \text{ Kcal mol}^{-1}$) do que FCO^+ ($-65,1 \text{ Kcal mol}^{-1}$) enquanto a adicional perda de HF é em geral altamente exotérmica está a $-114,0 \text{ Kcal mol}^{-1}$ ($-82,7 \text{ Kcal mol}^{-1}$ para FCO^+). Mesmo utilizando a base no nível B3LYP/6-311++G(d,p) não conseguimos localizar o TS para perda de HF para sulfonilação com FSO^+ , esperamos por analogia com FCO^+ que tal TS tenha uma energia consideravelmente abaixo dos reagentes (Figura 39). A sulfonilação iônica de FSO^+ com benzeno é, portanto, por ela mesma, tanto cinética como termodinamicamente favorável. A sulfonilação iônica é provavelmente suprimida, contudo, pela competição desfavorável com abstração de elétrons devido a relativamente alta energia de recombinação de FSO^+ . Nossos cálculos no nível B3LYP/6-311++G(d,p) indica as seguintes energias de recombinação adiabáticas: 8,47 eV para FCO^+ e 9,49 eV para FSO^+ . A energia de recombinação de FSO^+ é, portanto, consideravelmente maior que de benzeno (9,25 eV), furano (8,88 eV), tiofeno (8,87 eV) e pirrol (8,21 eV), portanto FSO^+ é um potente agente oxidante e não é surpreendente que a abstração de elétrons domine.

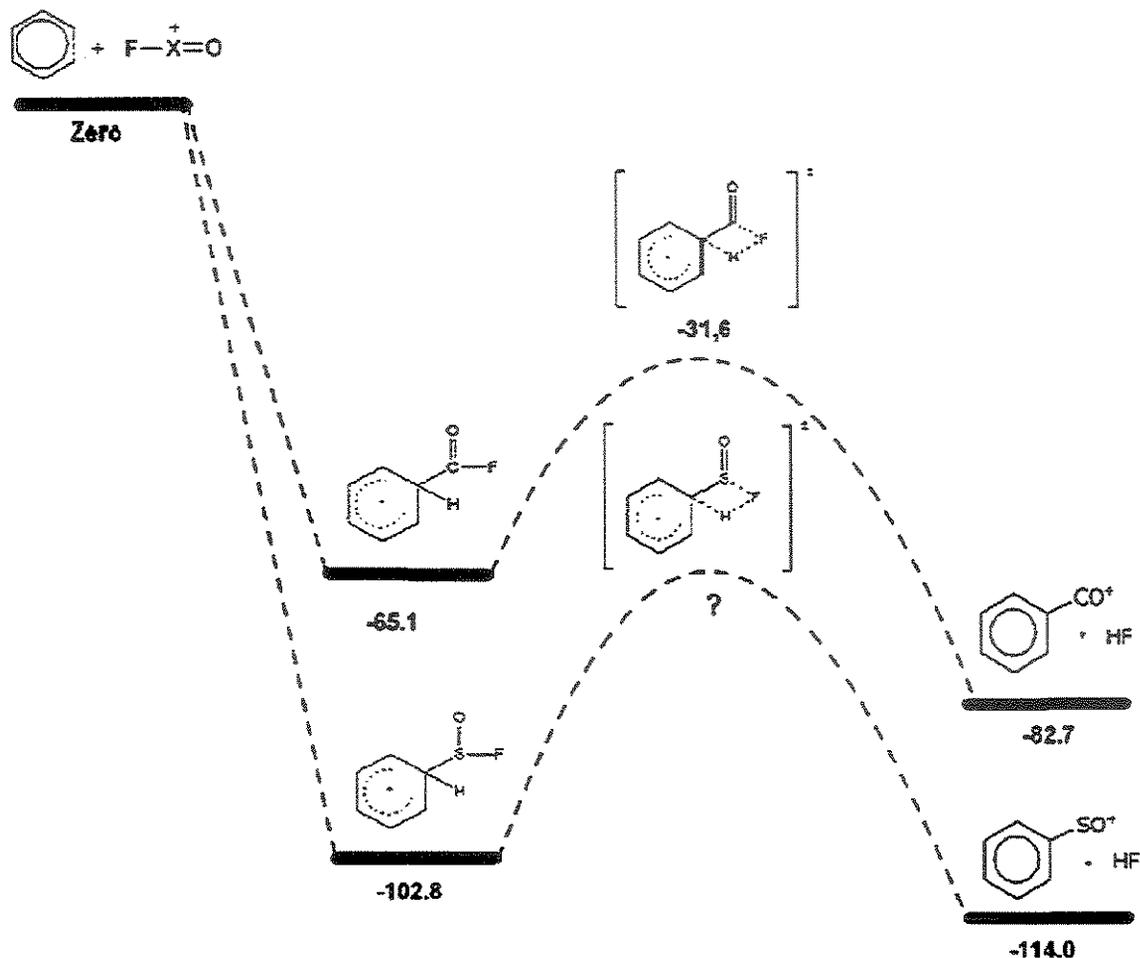


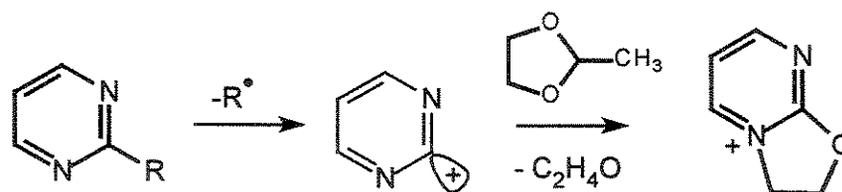
Figura 39 – Diagrama de energia potencial utilizando a base B3LYP/6-311G++(d,p) para as reações de FCO^+ e FSO^+ com benzeno. As energias são dadas em Kcal mol^{-1} . O TS para a perda de HF do produto de adição de FSO^+ a benzeno não pode ser localizado, e sua energia é, aproximadamente estimada por analogia com aquele do FCO^+ . O estado de transição para FCO^+ foi caracterizado por uma frequência vibracional negativa de -1462 cm^{-1} .

IV.5.6 - CONCLUSÃO

Na ativação da ligação C-H de compostos aromáticos (M—H) via (trans)carbonilação, a ordem de reatividade intrínseca do três cátions halocarbonila gasosos testada é: $\text{FCO}^+ > \text{ClCO}^+ > \text{BrCO}^+$. Em solução, desde que o cátion clorocarbonila ClCO^+ é prontamente disponível,^{101,103} tal reação poderia ser testada para executar semelhante carbonilação iônica de compostos aromáticos. Na fase gasosa, a abstração de oxigênio por FC^+ de N_2O foi demonstrada ser uma reação direta para a preparação do cátion fluorcarbonila FCO^+ altamente eletrofílico, e para seu uso "on-line" na ativação de ligações inertes C-H de compostos aromáticos via carbonilação iônica em fase gasosa. Embora, previsto para funcionar como um agente de sulfonilação iônica efetivo, como também mostrado por cálculos utilizando a base B3LYP/6-311G++(d,p), FSO^+ age como um potente agente oxidante devido a sua energia de recombinação relativamente alta. Então, em reações de FSO^+ com compostos aromáticos, a reação de abstração de elétrons predomina.

IV.6- LOCALIZAÇÃO DO SÍTIO DE CARGA EM CÁTIONS HIDROXI- E AMINO-BENZOILA POR REAÇÕES DIAGNÓSTICAS EM FASE GASOSA COM ACETONITRILA

A distinção de isômeros de posição tem sido uma tarefa desafiadora em espectrometria de massas. Idealmente, para uma elucidação estrutural inequívoca, a molécula ionizada (ou alternativamente a molécula protonada, desprotonada ou cationizada) de cada isômero deveria dissociar para formar um íon fragmento diagnóstico único. Alternativamente, a molécula neutra ou ionizada de cada isômero deveria reagir para formar um íon diagnóstico único resultante. Uma alternativa interessante e geralmente aplicável é se realizar dissociação induzida por colisão (CID)¹⁰⁸ ou recorrer a reações íon-molécula diagnósticas¹⁰⁹ para íons fragmentos que preservam a informação da posição dos substituintes presentes nos íons moleculares isoméricos precursores. Isto ocorre, por exemplo, para cátions piridila e pirimidila. Para estes cátions heteroaromáticos isoméricos, a informação na posição dos substituintes no anel é retida sobre a perda do grupo R porque a carga positiva está posicionada em um orbital sp_2 localizado (Esquema 11).¹¹⁰



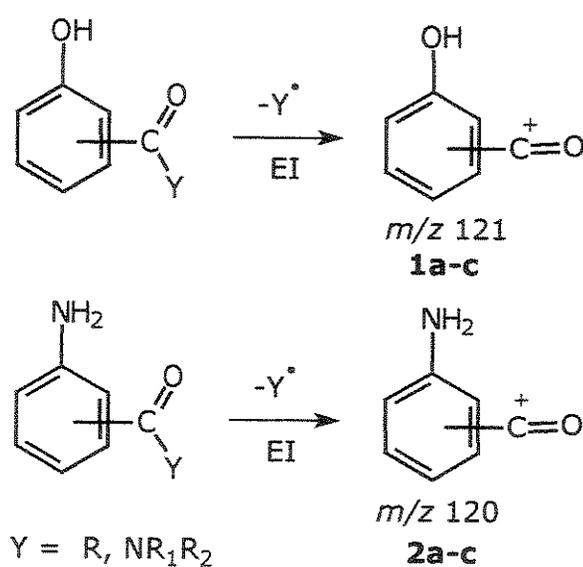
Esquema 11

Um comportamento de dissociação único ou uma reatividade íon-molécula seletiva, ou ambos, revelariam, portanto, a localização do sítio de carga de fragmentos catiónicos heteroaromáticos assim determinando conseqüentemente a posição original de qualquer substituinte R no anel dos íons geradores destes cátions. Esta atraente e genérica metodologia poderia ser aplicada, então, não só a um conjunto particular de isômeros de posição, mas para séries inteiras de

isômeros análogos, indiferente de substituintes comuns no anel, desde que eles formem íons fragmentos diagnósticos comuns.

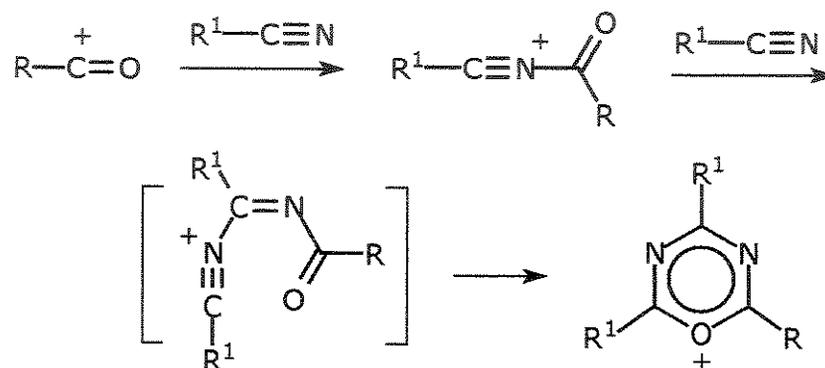
Por exemplo, foi recentemente demonstrado¹¹¹ que tanto experimentos de CID como reações de transcetalização¹¹² iônica seletiva ocorrendo mais pronunciadamente para os isômeros com substituintes na posição 2 (Esquema 11) podem ser usados para distinguir muitos conjuntos de isômeros de posição monossubstituídos de pirimidinas neutras pela localização do sítio de carga em seus respectivos cátions isoméricos 2-, 4-, e 5-pirimidila formados por ionização por elétrons (EI) a 70 eV de seus respectivos isômeros ionizados.

O presente estudo foi motivado pelo desafio de se distinguir, por espectrometria de massas, as séries de isômeros *orto*-, *meta*- e *para*- de anilinas e fenóis isoméricos monossubstituídos com grupos acila (O=C-R) e amidila (O=C-NR₁R₂), respectivamente, que apresentam espectros de massas a 70 eV quase idênticos e indistinguíveis. Entre os muitos conjuntos de isômeros indistinguíveis por EI-MS dentro destas classes podemos destacar, por exemplo, os conjuntos *orto*-, *meta*- e *para*- de acetilanilinas e fenóis e amino-benzamidas. Esperando aplicar a estratégia alternativa baseada na caracterização de um íon fragmento comum e diagnóstico, notamos que estes isômeros formam por EI a 70 eV conjuntos de cátions hidróxi-(**1a-c**) e amino-(**2a-c**) benzoila isoméricos de *m/z* 121 e 120, respectivamente (Esquema 12).



Esquema 12

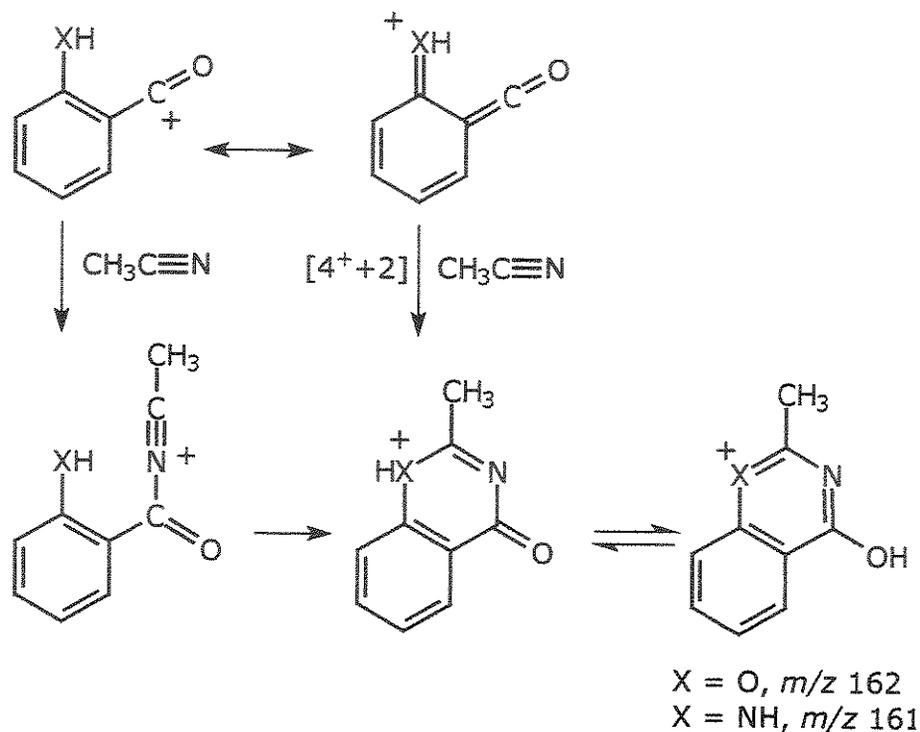
Os precursores isoméricos (nesse caso qualquer conjunto de *o,m,p*-isômeros desde que eles formem estes respectivos cátions benzoíla) poderiam então ser alternativamente distintos se **1a-c** e **2a-c** apresentassem o mesmo comportamento diante de experimentos de CID ou uma reatividade íon-molécula específica, ou ambos. Os cátions hidroxi- e amino-benzoíla pertencem a classe mais geral dos íons acílios, e vários estudos recentes de espectrometria de massas tem investigado extensivamente a química íon-molécula em fase gasosa de tais íons.¹¹³ Uma variedade de reações inéditas para íons acílios gasosos têm sido encontradas; por exemplo, a adição de nitrilas a íons acílios em um processo de ciclização para gerar íons 1,3,5-oxadiazínicos (Esquema 13).¹¹⁴



Esquema 13

Para os cátions benzoíla isoméricos **1a-c** e **2a-c**, as reações com nitrilas apresentam-se bastante promissoras. Particularmente para os isômeros orto-, a adição de nitrila tanto ao cátion 2-hidroxi-benzoíla (**1a**) quanto ao cátion 2-amino-benzoíla (**2a**) no sítio de carga de CO⁺, poderia ser seguida, não por uma adição intermolecular de uma segunda molécula de nitrila (tal como no Esquema 13), mas por uma rápida ciclização intramolecular promovida pelo grupo *orto*-hidroxi ou *orto*-amino. A transferência intramolecular de próton poderia, então, formar cátions aromáticos altamente estáveis, isto é, as formas protonadas dos heterociclos 2-metil-1H-quinazolina-4-ona e 2-metil-benzo[e][1,3]oxazina-4-ona (Esquema 14). Observe que, dependendo das formas canônicas usadas para tais íons, a reação

com nitrilas (acetonitrila no Esquema 14) pode ser alternativamente racionalizado como uma cicloadição concertada [4⁺+2].¹¹⁵



Esquema 14

Desta forma relatamos um estudo realizado em um espectrômetro de massas de múltiplos estágios (QqQqQ)^{109c} em que a habilidade diagnóstica das reações com acetonitrila foram testadas para localizar o sítio de carga dos cátions benzoíla isoméricos **1a-c** e **2a-c**; portanto, para funcionar como um método para distinguir muitos conjuntos indistinguíveis por EI de isômeros *orto*, *meta* e *para*-acila e amidila de anilinas e fenóis.

IV.6.1 - Comportamento em experimentos de CID.

Todos os três cátions hidroxí- (**1a-c**) e amino- (**2a-c**) benzoíla mostram em experimentos de CID um comportamento quase idêntico e indistinguível sob colisões a 15 eV com argônio (espectros não mostrados). Os cátions hidroxí-benzoíla isoméricos **1a-c** de m/z 121 dissociam imediatamente e de forma similar pela perda de CO para formar os íons fragmento de m/z 93, os cátions isoméricos

2-, 3-, e 4-hidroxi-fenila, respectivamente, e então pela perda de uma segunda molécula de CO para formar um fragmento de m/z 65, o cátion ciclopentadienila. Os cátions amino-benzoíla isoméricos **2a-c** dissociam facilmente e de forma similar em experimentos de CID a 15 eV pela perda de CO para formar os íons de m/z 92, os cátions isoméricos 2-, 3-, e 4-amino-fenila, respectivamente, e então pela perda de uma molécula de HCN para formar um íon fragmento de m/z 65, novamente o cátion ciclopentanodienila.

IV.6.2 - Reações com acetonitrila.

Cada cátion hidroxi-benzoíla isomérico **1a-c** reage com acetonitrila de uma forma distinta (Figura 40). O isômero orto- (**1a**) forma, quase exclusivamente, o aduto de m/z 162 (Figura 40a). A abundância relativamente alta de tal aduto pode, portanto, resultar, como antecipamos (Esquema 14), da formação de um cátion aromático, isto é, uma 2-metil-1H-quinazolina-4-ona protonada de m/z 162.

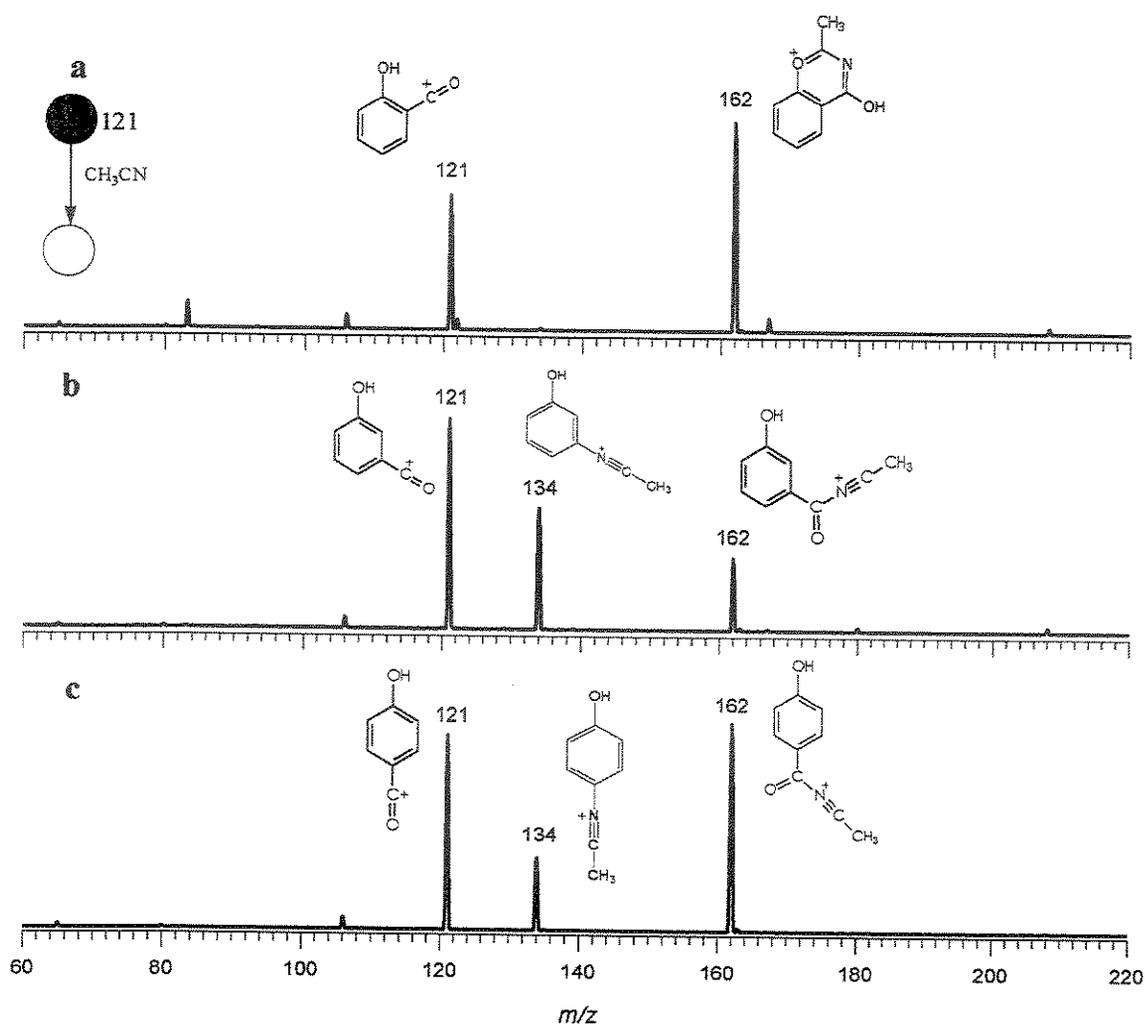
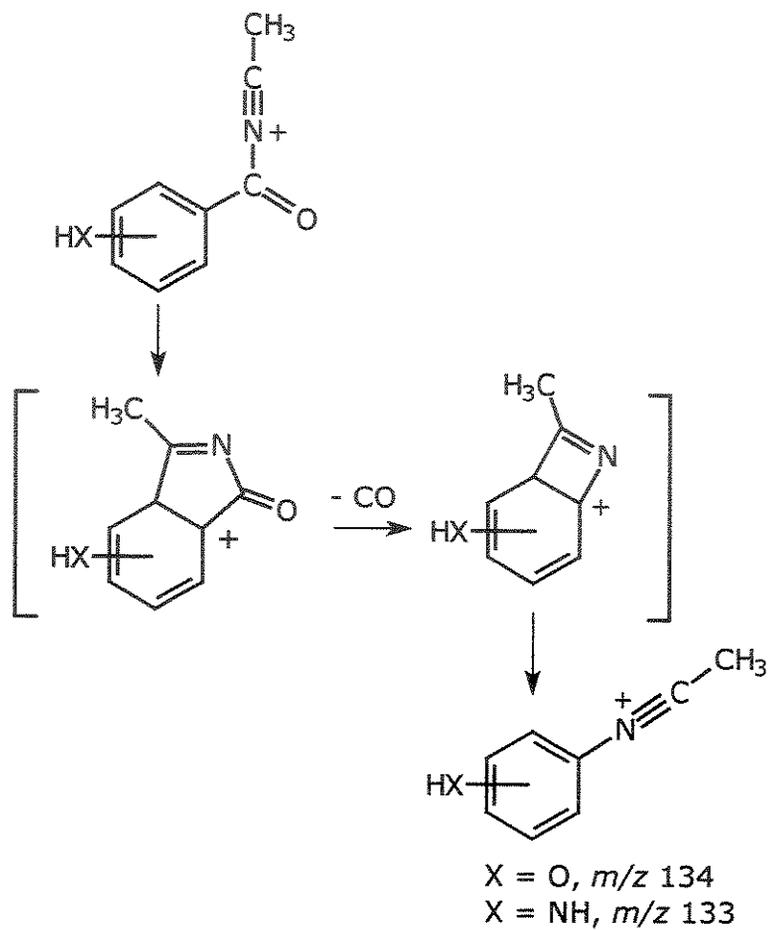


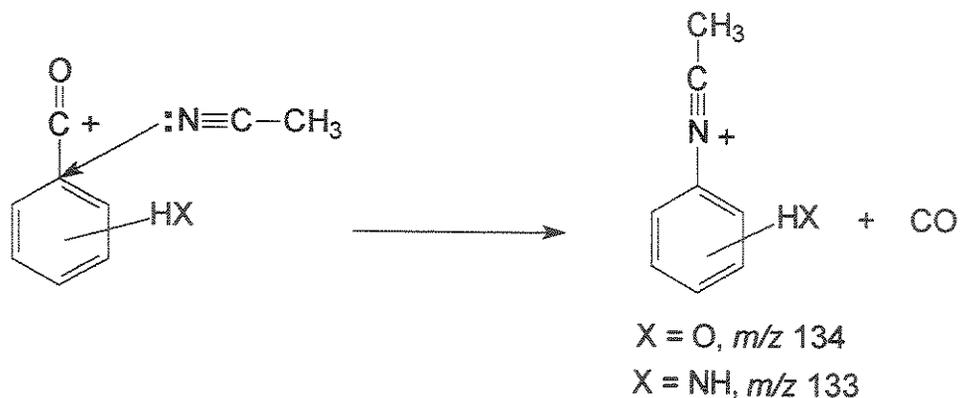
Figura 40 – Espectro de massas dos produtos iônicos para as reações dos cátions hidroxi-benzoíla isoméricos **1a-c** de m/z 121 com acetonitrila. Observe para cada isômero a distribuição característica dos dois maiores produtos iônicos: o aduto intacto de m/z 162 e o produto de perda iônica de CO de m/z 134.

O isômero meta-(**1b**) também forma um aduto de m/z 162, mas de forma interessante, um produto iônico competitivo de m/z 134 é também formado, e em uma maior extensão. Este produto adicional formalmente surge da perda de CO do aduto intacto, e o Esquema 15 ($X=O$) propõe uma racionalização para tal processo. Observe que os adutos cíclicos com acetonitrila para **1b** e **1c** podem ser intermediários no processo de perda de CO. Finalmente, o isômero para- (**1c**) também forma tanto os produtos iônicos de m/z 134 e de m/z 162, mas, para **1c**, m/z 162 é mais abundante do que m/z 134. Outra hipótese, além da proposta do esquema 15 para a formação do íon de m/z 134 (e também de m/z 133 a partir

dos isômeros amino-benzofila isoméricos 2a-c) para a perda de CO é o possível ataque "ipso" ao grupo acila de 1b-c e 2a-c, de forma a haver a perda direta de CO, sem passar por nenhum processo de ciclização com acetonitrila, como no esquema 15 (esquema 16).



Esquema 15



Esquema 16

Os cátions isoméricos 2-, 3-, e 4-amino-benzoíla (**2a-c**) reagem com acetonitrila (Figura 41) de uma forma bastante distinta, mais particularmente para o isômero orto- **2a** (Figura 41). Em reações com acetonitrila, **2a** forma tanto o aduto de m/z 161 como o produto de perda de CO de m/z 133 (Esquema 15 e esquema 16, X= NH). De maneira oposta ao que acontece para **2a**, na reação de **2b** e **2c** com acetonitrila quase não é formado um aduto intacto de m/z 161, e a perda de CO dos produtos iônicos de m/z 133 domina. As seguintes razões de intensidade m/z 161: m/z 133 são calculadas para os três isômeros: **2a** (1,50), **2b** (0,04) e **2c** (0,09). Portanto, tal razão é quase 30 vezes maior para **2a** em relação às razões obtidas para **2b** e **2c**. Portanto, **2a**, provavelmente devido ao grupo amino- vicinal, reage com acetonitrila tanto por ciclização intramolecular ou ciclização polar $[4^+ + 2]$ para gerar o heterocíclico aromático e estável 2-metil-benzo[e][1,3]oxazina-4-ona de m/z 161 em sua forma protonada (Esquema 14, X=NH). Da mesma forma, o produto de m/z 133 na reação com **2a** (Esquema 17) sofre uma ciclização adicional, via um ataque intramolecular do grupo amino, formando, após transferência de próton intramolecular, o heterocíclico 2-metil-1H-benzoimidazol protonado. Observe que todos os processos de ciclização propostos são suportados por cálculos "ab initio".

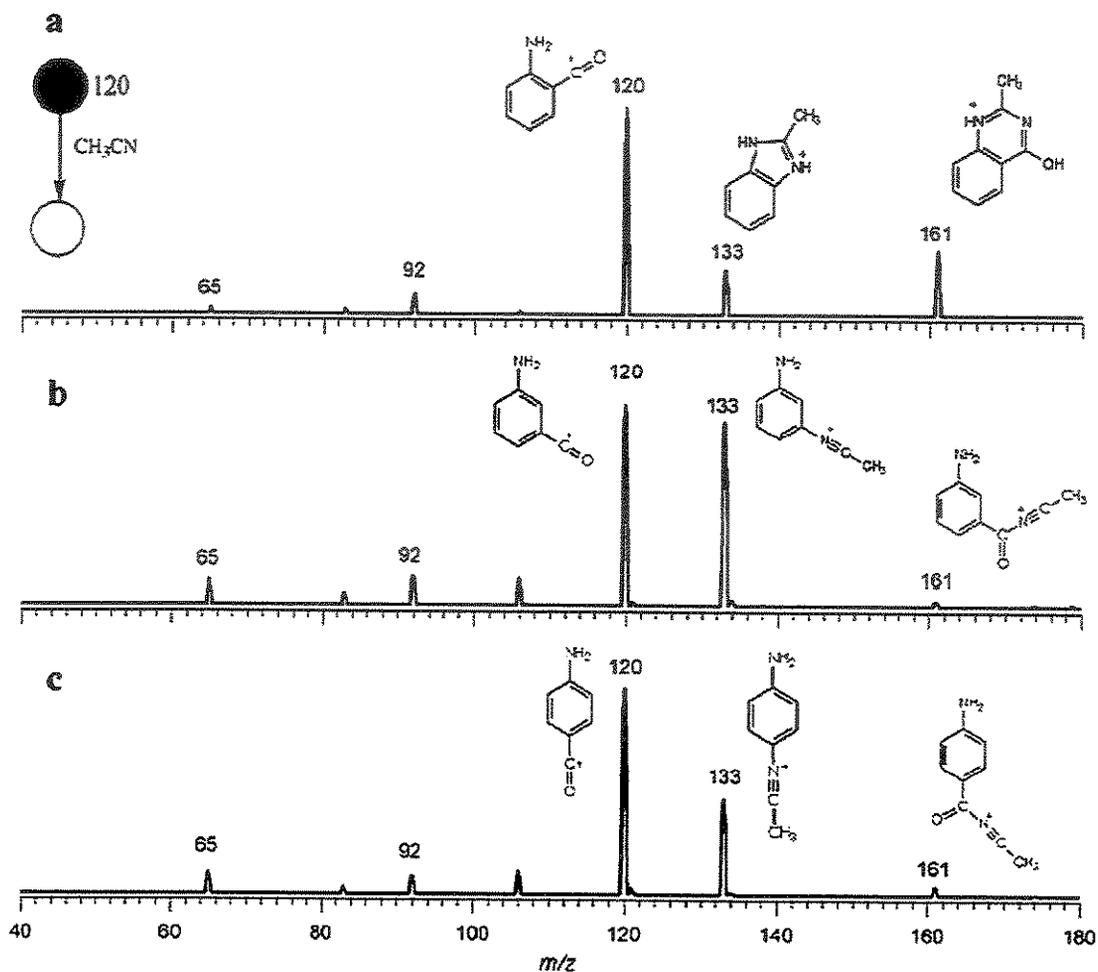
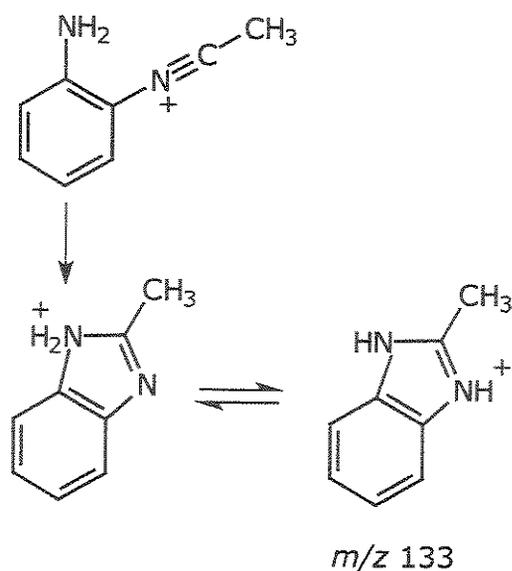


Figura 41 - Espectro de massas para as reações dos cátions amino-benzoíla isoméricos **2a-c** de m/z 120 com acetonitrila. Observe a reatividade distinta do isômero orto- **2a**, que forma tanto o aduto de m/z 161 e o produto de perda de CO de m/z 133, enquanto **2b** e **2c** geram, predominantemente, os produtos de perda de CO de m/z 133.



ESQUEMA 17

Cálculos “*ab initio*”:

Cálculos teóricos de orbital molecular “*ab initio*” foram realizados empregando Gaussian 98. A otimização da geometria dos reagentes e produtos foi realizada utilizando o nível de cálculo MP2/6-31G(d,p)//6-31G(d,p).

Estes cálculos nos mostram que o aduto acíclico do cátion 2-hidroxi-benzoíla (**1a**) com acetonitrila situa-se $-18 \text{ Kcal mol}^{-1}$ abaixo da energia dos reagentes, enquanto o aduto cíclico aromático de m/z 162, isto é a 2-metil-1H-quinazolina-4-ona protonada (Esquema 14, X=O) situa-se $-45 \text{ Kcal mol}^{-1}$ abaixo dos reagentes. Portanto, a formação do aduto cíclico, é sem dúvidas, o processo termodinamicamente favorecido.

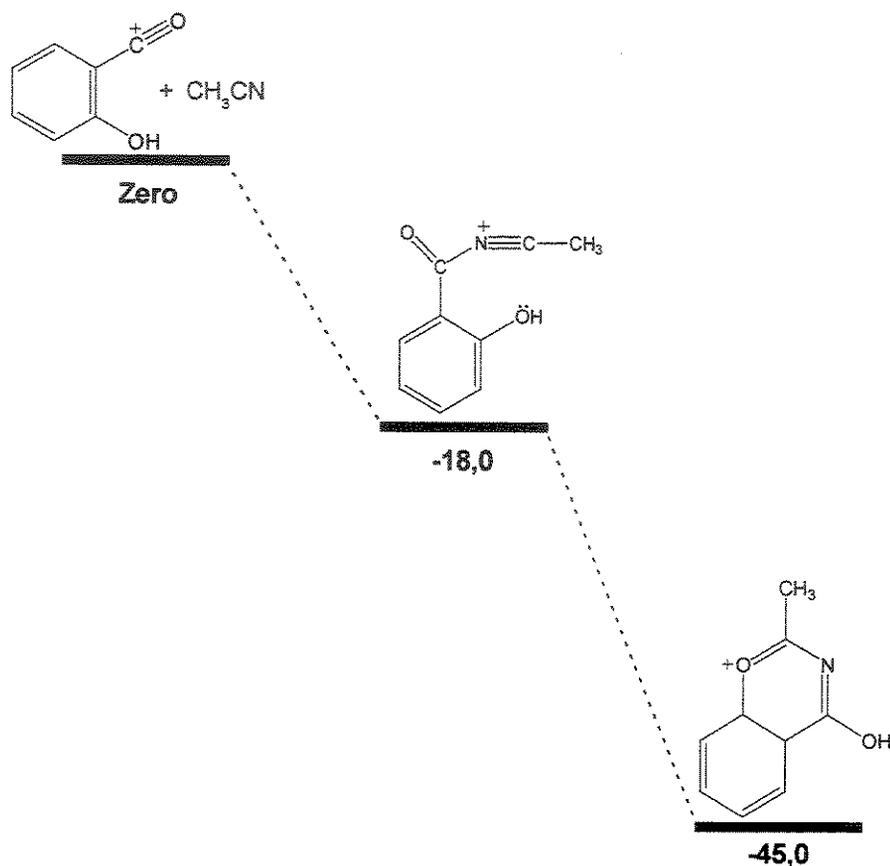


Figura 42 – Diagrama de energia potencial utilizando o nível de teoria MP2/6-31G(d,p)//6-31G(d,p) para as reações do cátion 2-hidroxi-benzoíla (**1a**) com acetonitrila. As energias são dadas em Kcal mol^{-1} .

De forma similar, o aduto acíclico para reações do cátion 2-amino-benzoíla (**2a**) com acetonitrila situa-se $-13,0 \text{ Kcal mol}^{-1}$ abaixo dos reagentes, enquanto o aduto cíclico aromático 2-metil-benzo[e][1,3]oxazina-4-ona *N*-protonado (Esquema14, X=NH) está localizado $-54 \text{ Kcal mol}^{-1}$ abaixo (Figura 43).

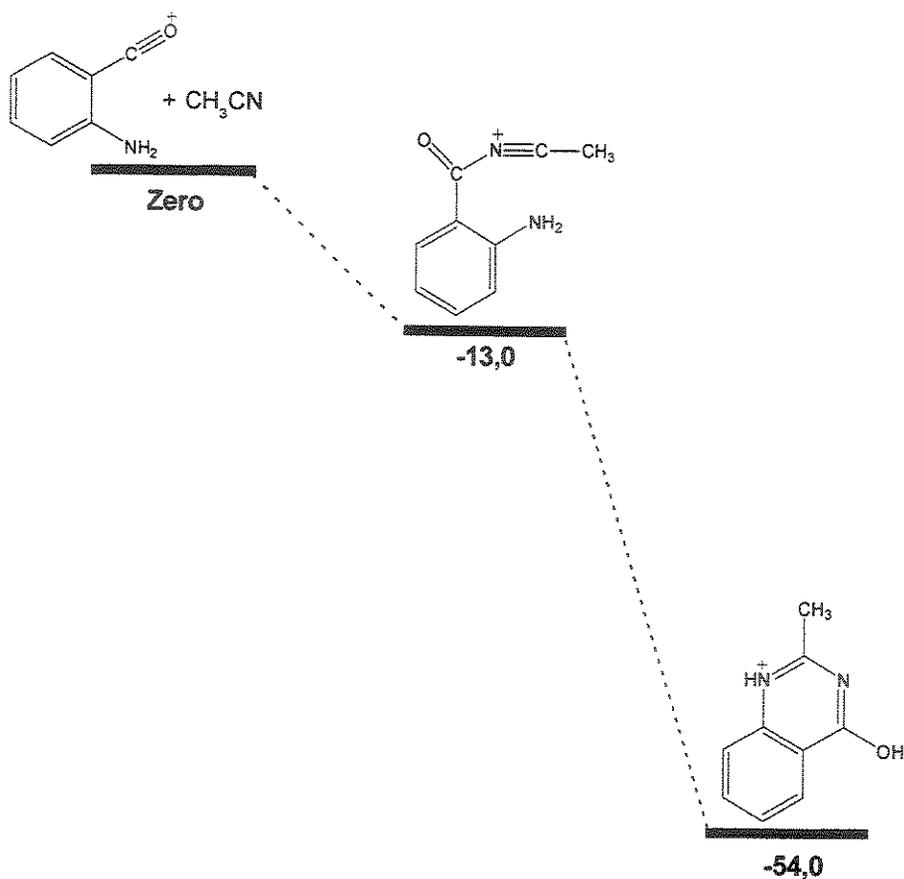


Figura 43 – Diagrama de energia potencial para as reações do cátion 2-amino-benzoíla (**2a**) com acetonitrila. As energias são dadas em Kcal mol^{-1} .

A formação do íon de m/z 134 pela perda direta de CO através de um ataque “*ipso*” ao grupo acila de **1c** (esquema 16) leva a um processo que passa por um estado de transição (TS) que é acessível e está a 60 Kcal mol^{-1} dos reagentes. Observe que, apesar de o TS ser endotérmico, o produto de adição direta de acetonitrila é ligeiramente exotérmico (Figura 44).

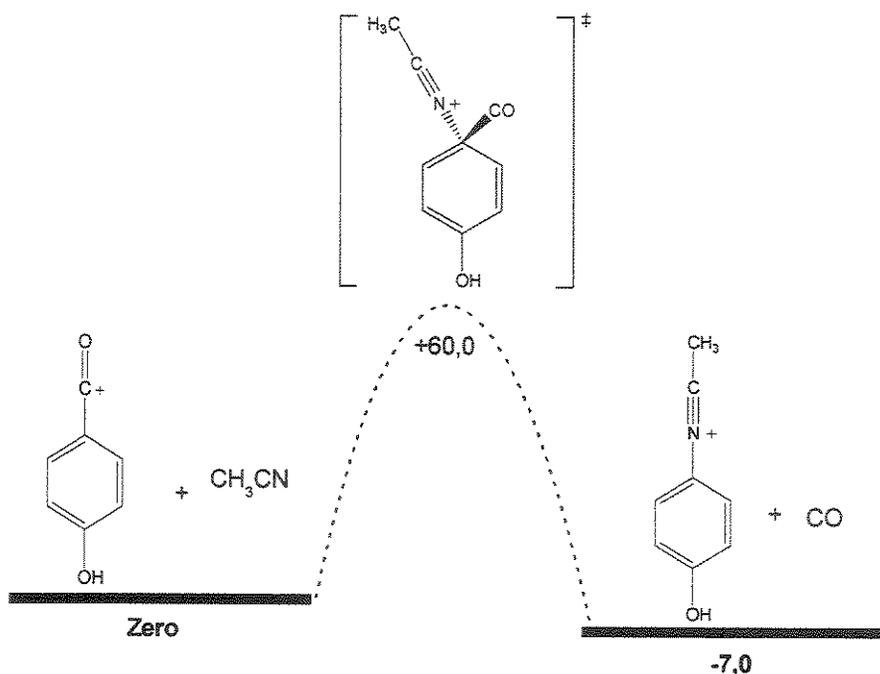


Figura 44 – Diagrama de energia potencial utilizando o nível de teoria MP2/6-31G(d,p)//6-31G(d,p) para as reações entre o cátion **1c** e acetonitrila. As energias são dadas em Kcal mol⁻¹. A energias do estado de transição (TS) foi caracterizada por uma frequência vibracional negativa: -156,2 cm⁻¹.

Estes cálculos também mostram que a ciclização do produto iônico acíclico de perda de CO de *m/z* 133 para **2a** (esquema 15) é muito favorecida termodinamicamente: enquanto o íon acíclico está localizado a -6,0 Kcal mol⁻¹ abaixo dos reagentes, o produto cíclico N-protonado 2-metil-1*H*-benzoimidazol está localizado a -48,0 Kcal mol⁻¹ abaixo dos reagentes.

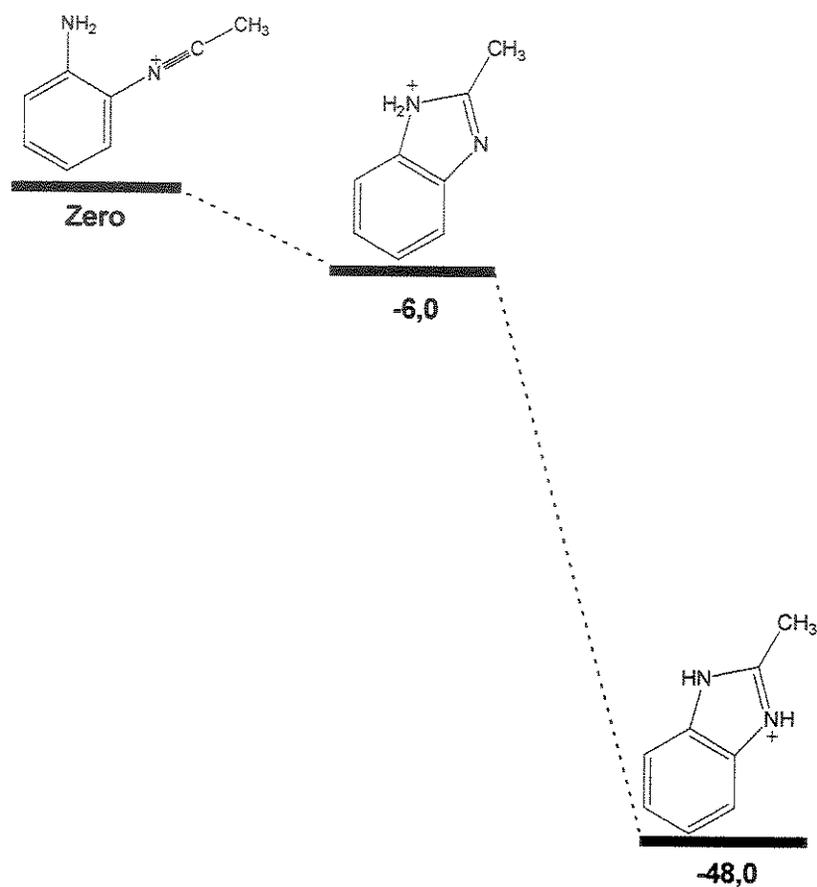


Figura 45 – Diagrama de energia potencial utilizando a base B3LYP/6-311G++(d,p) para a ciclização do produto acíclico por perda de CO do cátion **2a** de m/z 133. As energias são dadas em Kcal mol^{-1} .

IV.6.3 - Conclusões

Enquanto os espectros de CID a 15 eV são quase idênticos, as reações íon-molécula em fase gasosa dos três cátion isoméricos 2-, 3-, e 4-hidroxi-benzoila com acetonitrila fornecem razões características dos produtos iônicos, as quais localizam o sítio de carga de cada isômero. Para os cátions 2-, 3-, e 4-amino-benzoila, o isômero orto- é claramente distinto tanto do isômero meta- como do isômero para-, os quais mostram uma reatividade similar. Os isômero orto- mostram reatividades mais características porque eles provavelmente sofrem, após a adição de nitrila ao sítio de carga de CO^+ , um ataque intramolecular tanto do grupo vicinal hidroxi- como do grupo vicinal amino-, para formar cátions aromáticos altamente estáveis. As reações em fase gasosa com acetonitrila fornecem, portanto, um método de MS^2 em fase gasosa para distinguir, parcialmente ou completamente, muitos conjuntos de anilinas e fenóis orto, meta e para- acila e amidila isoméricos baseados na distinção alternativa de íons fragmentos diagnósticos.

CAPÍTULO V

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- 1 – Smith, R. D.; Loo, J. A.; Loo, R. O.; Busman, M.; Udseth, H. R. *Mass Spectrom. Rev.*, **1991**, *10*, 359-451.
 - 2 - (a) Mendes, M. A.; Pimpim, R. S.; Kotiaho, T.; Barone, J. S.; Eberlin, M. N. *Química Nova*, **1996**, *19(5)*, 480-485. (b) Moraes, L. A. B., Eberlin, M. N.; Cagnon, J. R.; Urbano, L. H. *Analyst*, **2000**, *125*, 1529-1531.
 - 3 – (a) Mendes, M. A.; Eberlin, M. N. *Analyst*, **2000**, *125*, 21-24. (b) Lauritsen, F. R.; Ketola, R. A. *Anal. Chem.*, **1997**, *69*, 4917-4922.
 - 4 - (a) Lauritsen, F. R.; Mendes, M. A.; Aggerholm, T. *Analyst*, **2000**, *125*, 211-215. (b) Lauritsen, F. R.; Rose, J. *Analyst*, **2000**, *125*, 1577-1581.
 - 5 – Riter, L. S.; Takats, Z.; Cooks, R. G. *Analyst*, **2001**, *126(11)*, 1980-1984.
 - 6 – Riter, L. S.; Takats, Z.; Charles, L.; Cooks, R. G. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2001**, *15(17)*, 1520-1524.
 - 7 – Alberici, R. M.; Sparrapan, R.; Jardim, W. F.; Eberlin, M. N. *Environ. Sci. Technol.*, **2001**, *35*, 2084-2088.
 - 8 – Alberici, R. M.; Zampronio, C. G.; Poppi, R. J.; Eberlin, M. N. *Analyst*, **2002**, *127*, 230-234.
 - 9 – Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Eberlin, M. N. *Anal. Chem.*, **2000**, *72 (9)*, 2166-2170.
 - 10 - Allen, T. M.; Falcone, T. M.; Cisper, M. E.; Borgerding, A. J.; Wilkerson, C. W. *Anal. Chem.*, **2001**, *73(20)*, 4830-4835.

-
- 11 - Kostiainen, R.; Kotiaho, T.; Mattila, I.; Mansikka, T.; Ojala, M.; Ketola, R. A. *Anal. Chem.*, **1998**, *70*(14), 3028-3032.
- 12 - Silva, A. C. B.; Augusti, R.; Dalmazio, I.; Windmoller, D.; Lago, R. M. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **1999**, *1*, 2501-2504.
- 13 - Augusti, R.; Turowski, M.; Cooks, R. G. *Analyst*, **2003**, *128*, 61-64.
- 14 - Burgos, A. E.; Sinisterra, R. D.; Augusti, R.; Lago, R. M. *J. Inclusion Phenomena Macrocyclic Chem.*, **2003**, *45*, 149-154.
- 15 - Lago, R. M.; Silva, A. C. B.; Teixeira, A. C. M.; Augusti, R. *Analyst*, **2003**, *128*(7), 884-888.
- 16 - Kotiaho, T.; Hayward, M. J.; Cooks, R. G. *Anal. Chem.*, **1991**, *63*(17), 1794-1801.
- 17 - Shang, C.; Blatchley, E. R. *Environ. Sci. Technol.*, **1999**, *33*, 2218-2223.
- 18 - Shang, C.; Blatchley, E. R. *Water Res.*, **2000**, *35*, 244-254.
- 19 - Rios, R. V. R. A.; Da Rocha, L. L.; Vieira, T. G.; Lago, R. M.; Augusti, R. *J. Mass Spectrom.*, **2000**, *35*, 618-624.
- 20 - Augusti, R.; Dias, A. O.; Rocha, L. L.; Lago, R. M. *J. Phys. Chem. A.*, **1998**, *102*, 10723-10727.
- 21 - Wong, P. S. H.; Srinivasan, N.; Kasthurikrishnan, N.; Cooks, R. G.; Pincock, J. A.; Grosset, J. S. *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*(19), 6627-6632.
- 22 - Johnson, R. C.; Koch, K.; Cooks, R. G. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **1999**, *38*, 343-351.
- 23 - Lago, R. M.; Nagem, N. F.; Dalmázio, I.; Augusti, R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2003**, *17*, 1507-1510.

-
- 24 - Hoch, G.; Kok, B. *Archives of Biochemistry*, **1963**, *101*, 160-170.
- 25 – Ollinger, O.; Radmer, R. *Biochim. and Biophys. Acta*, **1981**, *637*, 80.
- 26 – Heinzle, E.; Lafferty, R. M. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotech.*, **1980**, *11*, 8.
- 27 – Lloyd, D.; James, K., Williams, J.; Williams, N. *Anal. Biochem.*, **1981**, *116*, 17.
- 28 - (a) Llewellyn, P. M.; Littlejohn, D. P. *Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy*, June 1966, Denver, CO. (b) Llewellyn, P. M.; Littlejohn, D. P., *U. S. Patent* **1966**, 3429105. (c) Stuart, T. S.; Herold, E. W.; Gaffron Jr., H. *Anal. Biochem.*, **1972**, *40*, 91. (d) Jones, P. R.; Yang, S. K. *Anal. Chem.*, **1975**, *47*(7), 1000-1003.
- 29 – (a) Calvo, K. C.; Weisenberger, C. R.; Anderson, L. B.; Klapper, M. H. *Anal. Chem.*, **1981**, *53*(7), 981-985. (b) Calvo, K. C.; Weisenberger, C. R.; Anderson, L. B.; Klapper, M. H. *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, *105*(23), 6935-6941.
- 30 – Degn, H.; Kristensen, B. J. *J. Biochim. Biophys. Meth.*, **1986**, *12*(5-6), 305-310.
- 31 - Westover, L. B.; Tou, J. C.; Mark, J. H. *Anal. Chem.*, **1974**, *46*(4), 568 – 571.
- 32 – Hayward, M. J.; Kotiaho, T.; Lister, A. K.; Cooks, R. G.; Austin, G. D.; Narayan, R.; Tsao, G. T. *Anal. Chem.*, **1990**, *62*(17), 1798-1804.
- 33 – Hayward, M. J.; Riederer, D. E.; Kotiaho, T.; Cooks, R. G.; Austin, G. D.; Syu, M. J.; Tsao, G. T. *Proc. Contr. Quial.*, **1991**, *1*, 105.
- 34 – Srinivasan, N.; Kasthurikrishnan, N.; Cooks, R. G.; Krishnan, M. S.; Tsao, G. T. *Anal. Chim. Acta*, **1995**, *316*(2), 269-276.

-
- 35** - Degn, H.; Lauritsen, F. R.; Hansen, K. F. *Biotechnol. Bioeng*, **1994**, *44*(3), 347-353.
- 36** - Cisper, M. E.; Garret, A. W.; Comeron, D.; Hemberg, P. H. *Anal. Chem.*, **1996**, *68*, 2097-2101.
- 37** - Wong, P. S.; Cooks, R. G.; Cisper, M. E.; Hembergr, P. H. *Environmental Science & Technology*, **1995**, *29* , 213 A-218 A.
- 38** - (a) Tsai, G. J.; Austin, G. D.; Syu, M. J.; Tsao, G. T.; Hayward, M. J.; Kotiaho, T.; Cooks, R. G. *Anal. Chem.*, **1991**, *63*, 2460.
- 39** - (a) Kotiaho, T.; Lauritsen, F. R.; Choudhury, T. K.; Cooks, R. G.; Tsao, G. T. *Anal. Chem.*, **1991**, *63*(18), 875A. (b) Ketola, R. A.; Kotiaho, T.; Cisper, M. E.; Allen, T. M. *J. Mass Spectrom*, **2002**, *37*, 457-476.
- 40** - Cole, R. B. *Electrospray Ionization Mass Spectroscopy*, John Wiley & Sons Inc.: New York, 1997.
- 41**- Aramendia, M. A.; Borau, V.; Garcia, I.; Jimenez, C.; Lafont, F.; Marinas, J. M.; Porras, A.; Urbano, F. J. *J. Mass Spectrom.*, **1995**, S153.
- 42** – Kerwin, J. L.; Wiens, A. M.; Ericsson, L. H. *J. Mass Spectrom.*, **1996**, *31*, 184.
- 43** – Kotiaho, T.; Eberlin, M. N.; Vainiotalo, P.; Kostianen, R. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* ,**2000**, *11*, 526.
- 44** – Wolfender, J. L.; Waridel, P.; Ndjoko, K.; Hobby, K. R.; Major, H. J.; Hostettmann, K. *Analisis*, **2000**, *28*, 895.
- 45** – Potterat, O.; Wagner, K.; Haag, H. *J. Chromatogr. A*, **2000**, *872*, 85.

-
- 46 – Cooks, R. G.; Zhang, D. X.; Koch, K. J.; Gozzo, F. C.; Eberlin, M. N. *Anal. Chem.* **2001**, *73*(15), 3646.
- 47 - Rioli, V.; Gozzo, F. C.; Shida, C. S.; Krieger, J. E.; Heimann, A. S.; Linardi, A.; Almeida, P. C.; Hyslop, S.; Eberlin, M. N.; Ferro, E. S. *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278* (10), 8547-8555.
- 48 - Koch, K. J.; Gozzo, F. C.; Nanita, S. C.; Takats, Z.; Eberlin, M. N.; Cooks, R. G. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2002**, *41*(10), 1721.
- 49- Colton, R.; Dagostino, A.; Traeger, J. C. *Mass Spectrom. Rev.*, **1995**, *14*(2), 79-106.
- 50 – Arakawa, R.; Tachiyashiki, S.; Matsuo, T. *Anal. Chem.*, **1995**, *67*(22), 4133-4138.
- 51 – Plattner, D. A. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2001**, *207*(3), 125-144.
- 52 – Griep-Raming, J.; Meyer, S.; Bruhn, T.; Metzger, J. O. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2002**, *41*, 2738.
- 53 – Eberlin, M. N.; Meurer, E.; Santos, L. S.; Pilli, R. A. *Org. Lett.*, **2003**, *5*(9), 1391-1394.
- 54 – Toma, S. H.; Nikolaou, S.; Araki, K.; Toma, H. E.; Tomazela, D. M.; Eberlin, M. N. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **submitted**.
- 55 – Cerchiaro, G; Tomazela, D. N; Eberlin, M. N; Ferreira, A. M. C. *Inorg. Chim. Acta*, **submitted**.
- 56 – Henderson, W.; Nicholson, B. K.; McCaffrey, L. J. *Polyhedron*, **1998**, *17*(25-26), 4291-4313.
- 57 – Johnson, B. F. G.; McIndoe, J. S. *Coord. Chem. Rev.*, **2000**, *200*, 901-932.

-
- 58** – Henderson, W.; Oliver, A. G.; Rickard, C. E. F.; Baker, L. J. *Inorg. Chim. Acta*, **1999**, *292*(2), 260-265.
- 59** - Duffy, D. N.; Mackay, K. M.; Nicholson, B. K.; Thomson, R. A. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1982**, 1029-1034.
- 60**- Mauri, P.; Pietta, P. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2000**, *23*(1), 61-68.
- 61** - He, X. J. *Chromatogr. A*, **2000**, *880*(1-2), 203-232.
- 62** – Sawaya, A. C. A. F; Tomazela, D. M., Cunha, I. B. S; Bankova, U. S.; Marcucci, M. C.; Custodio, A. R.; Eberlin, M. N., **submitted**.
- 63** - Strege, M. A. *J. Chromatogr. B*, **1999**, *725*(1), 67-78.
- 64** - Bruins, A. P. *Trends in Anal. Chem.*, **1994**, *13* (1), 37-43.
- 65** - "Basic theory of mass spectrometry", *Clin. Mass Spectrom.*, **1995**, 15-71.
- 66** - Bruins, A. P. *Mass Spectrom. Rev.*, **1991**, *10*, 53-77.
- 67** - Rosenberg, E. *J. Chromatogr. A*, **2003**, *1000*, 841-889.
- 68** - Gozzo, F. C; Sorrilha, A. E. P. M; Eberlin, M. N. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1996**, 587-596.
- 69** - Bush, K. L.; Glish, G. L.; McLuckey, S. A., *Mass Spectrometry/Mass Spectrometry Techniques and Applications of Tandem Mass Spectrometry*, VHC Publishers INC., New York, 1988.

-
- 70 - (a) Rodgers, M. T.; Armentrout, P. B. *Mass Spectrom. Rev.*, **2000**, *19*(4), 215-247. (b) Cooks, R. G.; Koskinen, J. T.; Thomas, P. D. *Mass Spectrom. Rev.*, **1999**, *34*, 85.
- 71 - Eberlin, M. N. *Mass Spectrom. Rev.*, **1997**, *16*(3), 113-144.
- 72 - Brauman, J. I. *J. Mass Spectrom.*, **1995**, *30*(12), 1649-1651.
- 73 - Morrison, J. D.; Stanney, D. A.; Tedder, J. *In Proc. 34th ASMS Conf. Mass Spectrom. And Allied Topics*, Cincinnati, OH, 222, 1986.
- 74 - Yost, R. A.; Enke, C. G.; McLafferty, F. W. *In Tandem Quadrupole Mass Spectrometry*, Ed. Wiley, New York, 1983.
- 75 - Beaugrande, C.; Devant, G.; Nemag, S. N.; Rolando, C.; Joaunen, D. *In Proc. 34th ASMS Conf. Mass Spectrom. And Allied Topics*, Cincinnati, OH, 220, 1986
- 76 - (a) Brodbelt, J. S.; Cooks, R.G. *Anal. Chim. Acta*, 1988, 239. (b) Kenttämää, H. I.; Cooks, R.G. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 4122. (c) Kascheres, Cooks, R.G. *Anal. Chim. Acta*, **1988**, 239.
- 77 - Szabo, A.; Ostlund, N. S.; *Modern Quantum Chemistry*, Dove Publications Inc., **1989**.
- 78 - Rodrigues, J. A. R; Moran, P. J. S. *Quim. Nova*, **2001**, *24*(6), 893-897.
- 79 – Zhao, Y.; Lunte, C. E. *J. Chromatogr.*, **1997**, *688*, 265-274.
- 80 – (a) Pérez-Ruíz, T.; Martínez-Lozano, C.; Sanz, A. *Anal. Chim. Acta*, **1995**, *308*, 299-307. (b) Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 1976, volume1, 295.
- 81 – (a) Rover, L; Garcia, C. A. B; Oliveira, G.; Kubota, L. T.; Galembeck, F. *Anal. Chem. Acta*, **1998**, *366*, 103-109. (b) Farmacopéia Brasileira, São Paulo, 1959, 43-44.

-
- 82** - Handbook of Brewing. In: Hardwick, W. A. (Eds). Marcel Dekker, New York, 1995.
- 83** - The Brewers' Handbook. In: Ted Goldammer, United States, 2000, 367-368.
- 84** - (a) Narziss, L.; Miedaner, A. *Chemie Mikrobiologie Technologie der Lebensmittel*, **1993**, *15*, 107. (b) Araki, S.; Kimura, T.; Shimizu, C.; Furusho, S.; Takashio, M.; Shinotsuka, K. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **1999**, *57*, 34.
- 85** - C. Zervos, R. H. Albert, Chemometrics: The use of multivariate methods for the determination and characterization of off-flavors, G. Charalambous, Off-Flavors in Foods and Beverages, 1992 Elsevier.
- 86** - (a) Masuda, S.; Kikuchi, K.; Harayama, K.; Sakay, K.; Ikeda, M. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **2000**, *58(4)*, 152-154. (b) Lermusieau, G.; Noël, S.; Liégeois, C.; Collin, S. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **1999**, *57(1)*, 29-33. (c) Shimizu, C.; Nakamura, Y.; Miyai, K.; Araki, S.; Takashio, M.; Shinotsuka, K. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **2001**, *59(2)*, 51-58. (d) Madigan, D.; Perez, A.; Clements, M. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **1998**, *56(4)*, 146-151.
- 87** - (a) Mauri, P.; Minoggio, M.; Simonetti, P.; Gardana, C.; Pietta, P. *Rapid Commun Mass Spectrom.*, **2002**, *16(8)*, 743-748. (b) Alcázar, A.; Pablos, F.; Martín, M. J.; González, A. G. *Talanta*, **2002**, *57*, 45-52.
- 88** - Alcázar, A.; Pablos, F.; Martín, M. J.; González, A. G. *Talanta*, **2002**, *57*, 45-52.
- 89** - Cooper, H. J.; Marshall, A. G. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, *49*, 5710-5718.
- 90** - (a) Tebbe, F. N.; Parshall, G. W.; Reddy, G. S. *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, *100(11)*, 3611-3613. (b) Tebbe, F. N.; Guggenberger, L. J. *J. Am. Chem. Soc., Chem. Commun*, **1973**, 227. (c) Hanzawa, Y.; Kowase, N.; Momose, S.; Taguchi, T. *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 11387-11398.

91 – Meurer, E. C.; Santos, L. S.; Pilli, R. A.; Eberlin, M. N. *Organic Letters*, **2003**, 5(9), 1391-1394.

93 - (a) Graul, S. T.; Squires, R. R. *Mass Spectrom. Rev.*, **1988**, 7, 263. (b) Riveros, J. M.; Jose, S. M.; Takashima, K. *Adv. Phys. Org. Chem.*, **1985**, 21, 197. (c) Brodbelt, J. S. *Mass Spectrom. Rev.*, **1997**, 16, 91. (d) Eberlin, M. N. *Mass Spectrom. Rev.*, **1997**, 16, 113. (e) Schalley, C. A.; Hornung, G.; Schroder, D.; Schwarz, H. *Int. J. Mass Spectrom.*, **1998**, 181, 172. (f) Filippi, A.; Giardini, A.; Piccirillo, S.; Speranza, M. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2000**, 198, 137.

94 – Para exemplos mais recentes veja: (a) Moraes, L. A. B.; Gozzo, F. C.; Eberlin, M. N.; Vainiotalo, P. *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 5096. (b) Williamson, B. L.; Creaser, C. S. *Eur. Mass Spectrom.*, **1998**, 4, 103. (c) Gerbaux, P.; Haverbeke, Y. V.; Flammang, R. *Int. J. Mass Spectrom.*, **1998**, 184, 39. (d) Wang, F.; Tao, W. A.; Gozzo, F. C.; Eberlin, M. N.; Cooks, R. G. *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 3213. (e) Cacace, F.; de Petris, G.; Pepi, F.; Rosi, M.; Sgamellotti, A. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, 38, 2408. (f) Frank, A.; Turecek, F. *J. Phys. Chem. A.*, **1999**, 103, 5348. (g) Brönstrup, M.; Schröder, D.; Schwarz, H. *Organometallics*, **1999**, 18, 1939. (h) O'Hair, R. A. J.; Andrautsopoulos, N. K. *Org. Lett.*, **2000**, 2, 2567. (i) Moraes, L. A. B.; Gozzo, F. C.; Laali, K. K.; Eberlin, M. N. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 7776. (j) D'Oca, M. G. M.; Moraes, L. A. B.; Pilli, R. A.; Eberlin, M. N. *J. Org. Chem.*, **2001**, 35, 2088. (k) Wesendrup, R.; Schwarz, H. *Organometallics*, **1997**, 16, 461.

95 – Para alguns exemplos selecionados veja: (a) Mazurek, U.; Schroder, D.; Schwarz, H. *Ang. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 2538. (b) Loos, J.; Schroder, D.; Zummack, D.; Schwarz, H. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2002**, 217, 169. (c) Mazurek, U.; Schwarz, H. *Chem. Eur. J.*, **2002**, 8, 2057. (d) Barsch, S.; Schroder, D.; Schwarz, H.; Armentrout, P. B. *J. Phys. Chem. A*, **2001**, 105, 2005. (e) Schwarz, H.; Schroder, D. *Pure Appl. Chem.*, **2000**, 72, 2319. (f) Bronstrup, M.; Trage, C.; Schroder, D.; Schwarz, H. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 699. (g) Hornung, G.;

Barsch, S.; Schroder, D.; Schwarz, H. *Organometallics*, **1998**, *17*, 2271. (h) Shaik, S.; Filatov, M.; Schroder, D.; Schwarz, H. *Chem. Eur. J.*, **1998**, *4*, 193. (i) Schroder, D.; Heinemann, C.; Koch, W.; Schwarz, H. *Pure Appl. Chem.*, **1997**, *69*, 273. Hornung, G. Schroder, D.; Schwarz, H. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 2273.

96 - (a) Klaui, W.; Schramm, D.; Peters, W. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2001**, 3113. (b) Kiss, G. *Chem. Rev.*, **2001**, *101*, 3435. (c) Ie, Y.; Chatani, N.; Ogo, T.; Marshall, D. R.; Fukuyama, T.; Kakiuchi, F.; Murai, S. *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 1475. (d) Clingenpeel, T. H.; Biaglow, A. I. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 5077. (e) Ryu, I.; Sonoda, N. *Ang. Chem. Int. Ed.*, **1996**, *35*, 1050. (f) Rosoini, G. P.; Boese, W. T.; Goldman, A. S. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 9498.

97 - (a) Eberlin, M. N.; Cooks, R. G. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 9226. (b) Eberlin, M. N.; Majumdar, T. K.; Cooks, R. G. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 2884. (c) Sharifi, M.; Einhorn, J. *Int. J. Mass Spectrom.*, **1999**, *190/191*, 253. (d) Grützmacher, H. F.; Dohmeier-Fischer, S. *Int. J. Mass Spectrom. Ion. Proc.*, **1998**, *179/180*, 207. (e) Moraes, L. A. B.; Eberlin, M. N. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 11136. (f) Reid, G. E.; Tichy, S. E.; Pérez, J.; O'Hair, R. A. J.; Simpson, R. J.; kenttämää, H. I. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 1184. (g) Meurer, E. C.; Moraes, L. A. B.; Eberlin, M. N. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2001**, *212*, 445. (h) Moraes, L. A. B.; Eberlin, M. N. *J. Mass Spectrom.*, **2002**, *37*, 162. (i) Eberlin, M. N.; Sabino, A.; Meurer, E. C. *Anal. Chem.*, **submitted**.

98 - Kotiaho, T.; Shay, B. J.; Cooks, R. G.; Eberlin, M. N. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 1004.

99 - Grandinetti, F.; Pepi, F.; Ricci, A. *Chem. Eur. J.*, **1996**, *2*, 495.

100 - Botschwina, P.; Sebald, P.; Bogey, M.; Demuyne, C.; Destombes, J. L. *J. Mol. Spectrosc.*, **1992**, *153*, 255.

101 - Christe, K. O.; Hoge, B.; Boatz, J. A.; Prakash, G. K. S.; Olah, G. A.; Sheehy, J. A. *Inorg. Chem.*, **1999**, *38*, 3132.

102 - Prakash, G. K. S.; Bausch, J. W.; Olah, J. A. *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 3203. A minor ^{13}C NMR signal attributed to FCO^+ has been observed at -78°C in the protolytic ionization of tert-butyl fluoroformate with a 5-fold excess of $\text{FSO}_3\text{H}/\text{SbF}_5$, veja: Olah, G. A.; Burrichter, A.; Mathew, T.; Vankar, Y. D.; Rasul, G. ; Prakash, G. K. S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1977**, *36*, 1875.

103 - Bernhardt, E.; Willner, H.; Aubke, F. *Ang. Chem. Int. Ed.*, **1999**, *38*, 823.

104 - Karpas, Z.; Klein, F. S. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.*, **1977**, *24*, 137.

105 - Eberlin, M. N. *Mass Spectrom. Rev.*, **1997**, *16*, 113.

106 - Uma reação similar de monofluoração para compostos heteroaromáticos de cinco membros empregando SF_3^+ muito mais eficiente para a transferência de F^+ tem sido recentemente descrita, veja: Gozzo, F. C.; Ifa, D. R.; Eberlin, M. N. *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 3920.

107 - Buckley, T. J.; Johnson III, R. D.; Huie, R. E.; Zhang, Z.; Kuo, S. C.; Klemm, R. B. *J. Phys. Chem.*, **1995**, *99*, 4879.

108 - (a) McLafferty, F.W. *Tandem Mass Spectrometry*, Wiley, New York, 1983. (b) Levsen, K.; Schwarz, H. *Mass Spectrom. Rev.* **1983**, *2*, 77. (c) Holmes, J. L. *Org. Mass Spectrom.* **1985**, *20*, 169. (d) Busch, G.; Glish, G.; McLuckey, S. A. *Mass Spectrometry/Mass Spectrometry: Techniques and Applications of Tandem Mass Spectrometry*, VCH, New York, 1988.

109 - (a) Brodbelt, J. S. *Mass Spectrom. Rev.*, **1997**, *16*, 91 (b) Green, M. K.; Lebrilla, C. B. *Mass Spectrom. Rev.*, **1997**, *16*, 53 (c) Eberlin, M. N. *Mass Spectrom. Rev.*, **1997**, *16*, 113. (d) Filippi, A.; Giardini, A.; Piccirillo, S.; Speranza,

M. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2000**, *198*, 137. (e) Gronert, S. *Chem. Rev.*, **2001**, *101*, 329. (f) Nibbering, N. M. M. *Int J Mass Spectrom.*, **2000**, *200*, 27. (g) Takashima. K.; Riveros, J. M. *Mass Spectrom. Rev*, **1998**, *17*, 409.

110 - Gozzo, F.C.; Eberlin, M. N. *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 2188.

111 – Moraes, L. A. B.; Gozzo, F. C.; Eberlin, M. N.; Vainiotalo, P. *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 5096.

112 – Carvalho, M.; Gozzo, F. C.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Karcheres, C.; Eberlin, M. N. *Chem. Eur. J.*, **1998**, *4* (7), 1161.

113 - Para exemplos selecionados veja: (a) Eberlin, M. N.; Cooks, R. G. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 9226 (b) Grandinetti, F.; Pepi, F.; Ricci, A. *Chem. Eur. J.*, **1996**, *2*, 495. (c) Creaser, C. S.; Williamson, B. L. *Eur. Mass Spectrom.*, **1998**, *4*, 103. (d) Sharifi, M.; Einhorn, J. *Int. J. Mass Spectrom.*, **1999**, *190/191*, 253. (e) Grützmacher, H. F.; Dohmeier-Fischer, S. *Int. J. Mass Spectrom. Ion. Proc.*, **1998**, *179/180*, 207. (f) Reid, G. E.; Tichy, S. E.; Pérez, J.; O'Hair, R. A. J.; Simpson, R. J.; Kenttämä, H. I. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 1184. (g) Moraes, L. A. B.; Pimpim, R.S.; Eberlin, M. N. *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 8726; (h) Moraes, L. A. B.; Eberlin, M. N. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2001**, *12*, 150. (i) Moraes, L. A. B.; Eberlin, M. N. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 11136. (j) Lemos, A. A.; Sparrapan, R.; Eberlin, M. N. *J. Mass Spectrom.*, **2003**, *38*, 305. (k) Moraes, L. A. B.; Eberlin, M. N. *J. Mass Spectrom.*, **2002**, *37*, 162.

114 - Meurer, E. C.; Moraes, L. A. B.; Eberlin, M. N. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2001**, *212*, 445.

115 – Para exemplos recentes de reações de cicloadição polares diagnósticas [$4^+ + 2$] veja: (a) Meurer, E. C.; Sparrapan, R.; Eberlin, M. N. *J. Mass Spectrom.*, **2003**, *38*, 305. (b) Meurer, E. C.; Eberlin, M. N. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2001**, *210*, 469. (c) Augusti, R.; Gozzo, F. C.; Moraes, L. A. B.; Sparrapan, R.; Eberlin, M. N. *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 4889.