UNICAMP

1150059496
IQ
T/UNICAMP M571t

Técnicas Modernas em Espectrometria de Massas: Aplicações Analíticas e no Estudo de Reações Íon/Molécula na Fase Gasosa.

Tese de Doutorado

Eduardo César Meurer

Orientador: Marcos Nogueira Eberlin

Campinas – Dezembro/2003

Thomson MS Lab

UNIDADE IQ
Nº CHAMADA
V EX
TOMBO BC/ 59496
PROC. 16.27.04
C D
PREÇO 11,00
DATA 13.7.04
Nº CPD

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA UNICAMP

M571t

Meurer, Eduardo César.
Técnicas modernas em espectrometria de massas: aplicações analíticas e no estudo de reações íon/molécula na fase gasosa. / Eduardo César Meurer. -- Campinas, SP: [s.n], 2003.

Orientador: Marcos Nogueira Eberlin.

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

1. Reações Íon-Molécula. 2. ESI-MS. 3. Pentaquadrupolo. 4. FIMS. I. Eberlin, Marcos Nogueira. II. Universidade Estadual de Campinas. III. Título.

Sábio é aquele que conhece os limites da própria ignorância. (Sócrates)

Dedico esta tese aos meus pais Ilse e Balduíno
e especialmente minha esposa Vivian pelo
amor e carinho e dedicação que foram o suporte
fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradecimentos

Ao Marcos, pela orientação, amizade e presteza na elaboração deste trabalho.

Aos meus colegas do laboratório "Thomson" de espectrometria de massas (Lílian, Renato, Daniela, Adriana, Adão, Alexandra, Leonardo, Liliane, Dena, e Rafael) pela amizade e força e especialmente aos primeiros espectrometristas de massas formados no laboratório, Regina, Betão e Fabio que juntamente com o Marcos ensinaram tudo que sei de espectrometria de massas.

Aos laboratórios dos Professores Pilli e Luiz Carlos pela colaboração e empréstimo (algumas vezes sem retorno) de algumas "gotinhas" de reagentes.

Ao IQ da UNICAMP e em especial ao Cidão e Zelinda.

Ao pessoal da república (César, Rogério, Altair e Anísio) pela grande amizade que guardarei para o resto da vida.

A Fapesp pelo apoio financeiro.

Curriculum Vitae

1- Dados Pessoais

1 Nome: Eduardo César Meurer
Filiação: Balduíno Meurer e Ilse Valéria Mallmann Meurer
Data de Nascimento: 06 de abril de 1977
Local: Maringá, PR-Brasil
Estado Civil: Casado
Endereço Profissional: Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, CP 6154, CEP 13083-970, Campinas-SP, Fone: (019) 37883049
E-mail: edmeurer@bol.com.br

2- Educação Superior

2.1- Curso de Gradução

Bacharelado em Química
Universidade Estadual de Maringá-UEM
Maringá, PR 1995-1998

2.2- Curso de Pós-Graduação

2.2.1 Mestrado em Química Orgânica

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP
Campinas, SP 1999-2000
Orientador: Professor Doutor Marcos N. Eberlin

Tese: "Espectrometria de Massas Pentaquadrupolar e suas Aplicações Analíticas, Sintéticas e em Medidas Termodinâmicas"

2.2.2 Doutorado em Química Orgânica

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP
Campinas, SP 2000-2003
Orientador: Professor Doutor Marcos N. Eberlin

Tese: "Técnicas Modernas em Espectrometria de Massas: Aplicações Analíticas e no Estudo de Reações Íon/Molécula na Fase Gasosa."

2.2.3 Estágio no Exterior

Laboratório Aston de Espectrometria de Massas da Universidade de Purdue
West Lafayette, IN-EUA
de abril a setembro de 2003
Orientador: Professor Dr. R. Graham Cooks

Projetos Desenvolvidos nos EUA:

1) Ion /Molecule Reactions Performed in a Miniature Cylindrical Ion Trap Mass Spectrometer *Analyst* **2003**, *128*, 1112-1118

2) Meerwein Reaction of Phosphonium Ions with (Thio)epoxides in the Gas Phase *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2003**, *0*, 0-0 (accepted)

3) Solid phase micro-extraction in a Miniature Ion Trap Mass Spectrometer *Analyst* **2003**, *128*, 1119-1122

4) Isomeric Differentiation and Quantification of alpha, beta-Amino Acid-Containing Tripeptides by the Kinetic Method: Alkali Metal-Bound Dimeric Cluster Ions *International Journal of Mass Scpectrometry: Jean-Claude Tabet Honor Issue* **2003**, *0*, 0-0 (accepted)

5) Gas-Phase Reactions for Selective Detection of the Explosives TNT and RDX *Chemical Communications* **2003**, *0*, 0-0 (accepted)

6) Chiral and Isomeric Analysis Using the Dissociation Kinetics of Metal-Bound Complexes by Electrospray Ionization and Sonic Spray Ionization Tandem Mass Spectrometry *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2003**, *0*, 0-0 (accepted)

7) Chiral Morphing and Enantiomeric Quantification in Matrices by Mass Spectrometry *Anal. Chem.* **2003**, *0*, 0-0 (accepted)

3- Relatório de Atividades Científicas

3.1 Bolsas

- Bolsista do Programa Especial de Treinamento (PET) de 01/96 até 12/98, 2970 horas.
- Bolsista de Mestrado (CNPq) de 04/99 até a defesa em 09/2000.
- Bolsista de Doutorado (FAPESP) de 09/2000 até a defesa em 12/2003.
- Bolsista de Doutorado "Sandwich" (FAPESP) de 04/2003 até 09/2003.

4 Artigos em Periódicos Internacionais

1) Lianming, W., Meurer, E. C., Yang, P., Eberlin, M. N., Cooks R. G. "Chiral and Isomeric Analysis Using the Dissociation Kinetics of Metal-Bound Complexes by Electrospray Ionization and Sonic Spray Ionization Tandem Mass Spectrometry" *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2003**, *0*, 0-0 (accepted)

2) Meurer, E. C., Chen, H., Riter, L., Cotte-Rodriguez, I., Eberlin, M. N., Cooks, R. G. "Gas-Phase Reactions for Selective Detection of the Explosives TNT and RDX" *Chemical Communications* **2003**, *0*, 0-0 (accepted)

3) Wu, L., Meurer, E. C., Young, B., Yang, P., Eberlin, M. N., Cooks, R. G. "Isomeric Differentiation and Quantification of alpha, beta-Amino Acid-Containing Tripeptides by the Kinetic Method: Alkali Metal-Bound Dimeric Cluster Ions" *International Journal of Mass Scpectrometry: Jean-Claude Tabet Honor Issue* **2003**, *0*, 0-0 (accepted)

4) Meurer, E. C., Chen, H., Riter, L. S., Eberlin, M. N., Cooks, R. G. "Meerwein Reaction of Phosphonium Ions with (Thio)epoxides in the Gas Phase" *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2003**, *0*, 0-0 (accepted)

5) Wu, L., Meurer, E. C., Cooks, R. G. "Chiral Morphing and Enantiomeric Quantification in Matrices by Mass Spectrometry" *Anal. Chem.* **2003**, *0*, 0-0 (accepted)

6) Meurer, E. C., Sparrapan, R., Eberlin, M. N. "Gas-phase polar [4^+ + 2] cycloaddition with ethyl vinyl ether: a structurally diagnostic ion-molecule reaction for 2-azabutadienyl cations" *Journal of Mass Spectrometry* **2003**, 38(10), 1075-1080

7) Meurer, E. C., Gozzo, F. C., Augusti, R., Eberlin, M. N. "The kinetic method as a structural diagnostic tool: ionized alpha-diketones as loosely one-electron bonded diacylium ion dimmers" *Eur. J. Mass Spectrom.* **2003**, 9(4), 295-304

8) Meurer, E. C., Sabino, A. A., Eberlin, M. N. "Ionic transacetalization with acylium ions: A class-selective and structurally diagnostic reaction for cyclic acetals performed under unique electrospray and atmospheric pressure chemical ionization in-source ion-molecule reaction conditions" *Anal. Chem.* **2003**, 75(17), 4701-4709

9) Riter, L. S., Meurer, E. C., Handberg, E. S., et al. "Ion/molecule reactions performed in a miniature cylindrical ion trap mass spectrometer" *Analyst* **2003**, 128(9), 1112-1118

10) Riter, L. S., Meurer, E. C., Cotte-Rodriguez, I., et al. "Solid phase micro-extraction in a miniature ion trap mass spectrometer" Analyst **2003**, 128(9), 1119-1122

11) Meurer, E. C., Santos, L. S., Pilli, R. A., et al. "Probing the mechanism of the petasis olefination reaction by atmospheric pressure chemical ionization mass and tandem mass spectrometry" *Org. Lett* **2003**, 5 (9), 1391-1394

12) Kauppila, T. J., Kuuranne, T., Meurer, E. C., et al. "Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. Ionization mechanism and the effect of solvent on the ionization of naphthalenes" *Anal. Chem.* **2002**, 74(21), 5470-5479

13) Meurer, E. C., Tomazela, D. M., Silva, R. C., et al. "Fiber introduction mass spectrometry: Fully direct coupling of solid-phase microextraction with mass spectrometry" *Anal. Chem.* **2002**, 74(21), 5688-5692

14) Meurer, E. C., Eberlin, M. N. "Mono and double polar [4+2$^+$] Diels-Alder cycloaddition of acylium ions with *O*-heterodienes" *J. Mass Spectrom.* **2002**, 37(2), 146-154

15) Meurer, E. C., Moraes, L. A. B., Eberlin, M. N. "Cyclization of acylium ions with nitriles: gas-phase synthesis and characterization of 1,3,5-oxadiazinium ions" *Int. J. Mass Spectrom.* **2001**, 212(1-3), 445-454

16) Meurer, E. C., Eberlin, M. N. "Gas-phase polar [4$^+$+2] cycloaddition of cationic 2-azabutadienes with enol ethers" Int. J. Mass Spectrom. **2001**, 210(1-3), 469-482

5- Patente

Espectrometria de Massas por Introdução via Fibra, depósito número PI0200365-1

Resumo

"Técnicas Modernas em Espectrometria de Massas: Aplicações Analíticas e no Estudo de Reações Íon/molécula na Fase Gasosa."

Autor: Eduardo C . Meurer
Orientador: Marcos Nogueira Eberlin

Neste trabalho nós utilizamos o espectrômetro de massas pentaquadrupolar, tempo de vôo e quadrupolar para o estudo de reações entre íons e moléculas neutras (via experimentos MS^2 e MS^3) como também no desenvolvimento de uma nova técnica analítica denominada FIMS. Algumas novas reações entre íons acílios com nitrilas, aldeídos e cetonas alfa-beta insaturadas foram descritas. Cicloadição polar [4^++2] com etil-vinil-éter foi utilizada como uma reação íon-molécula para diagnóstico estrutural de cátions 2-azabutadienos. Mono e Dupla Cicloadição Diels-Alder polar [4+2^+] de íons acílios com O-heterodienos foi realizada com intuito de estudos fundamentais de reação. Ciclização de íons acílios com nitrilas foi realizados com o intuito de realizar pela primeira vez síntese na fase gasosa e caracterização de íons 1,3,5-oxadiazínios como estudos fundamentais sem interferência de contra-íons e solventes. Foram realizados cálculos teóricos para confirmar as estruturas propostas para os produtos. Uma nova metodologia de reações íon/molécula em pressão atmosférica foi desenvolvida sendo testado o seu potencial para reações com moléculas mais pesadas que as usuais (limitadas por EI). A reação utilizada e a reação de Eberlin como prova da metodologia.

Outro trabalho consistiu em se contruir a primeira interface direta entre Espectrometria de Massas e Micro-Extração em Fase Sólida tanto para um sistema EI-quadrupolo com para um mini-"Ion-trap".

Abstract

"Modern Techniques in Mass Spectrometry: Analytical Applications and the Ion/Molecule Reaction Studies in Gas Phase."

Author: Eduardo C . Meurer
Adviser: Marcos Nogueira Eberlin

Herein we report the use of the pentaquadrupole, monoquadrupole and time-of-flight mass spectrometers to study ion/molecule reactions (via MS^2 and MS^3 experiments) and to develop a new analytical technique named FIMS (fiber introduction mass spectrometry). Some new reactions were reported between acylium ions and nitriles, α,β-insaturated aldehydes and ketones. Polar cycloaddition of 2-azabutadienyl with ethyl vinyl ether were used as a class-selective ion/molecule reaction to identify 2-azabutadienes moieties. Mono e double polar cycloaddition [4+2$^+$] of acylium ions and *O*-heterodienes were systematically studied. Cyclization of acylium ions with nitriles forms 1,3,5-oxadiazinium ions, the first gas-phase synthesis of this aromatic compound with no counter-ions and solvent influence; similar reactivity was observed when compared to the in-solution synthesis. Theoretical calculations were used to characterize the proposed mechanisms and confirm the obtained products. We report a new methodology to perform in-source ion/molecule reactions using ESI or APCI. The last work describes the development of a new technique named fiber introduction mass spectrometry (FIMS) used here to introduce a commercial solid-phase micro extraction fiber of PDMS directly in the ionization region of the monoquadrupole mass spectrometer.

1 INTRODUÇÃO: 1

1.1 BREVE HISTÓRICO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS 2
1.1.1 J.J. Thomson 2
1.1.2 A.J. Dempster 3
1.1.3 F.W. Aston 4
1.1.4 Munson e Field 5
1.1.5 R.G.Cooks 6
1.1.6 Koichi Tanaka, Hillenkamp e Karas 6
1.1.7 J. Fenn 8
1.2 ESTUDO DE REAÇÕES ENTRE ÍONS E MOLÉCULAS NA FASE GASOSA. 10
1.2.1 Espectrometria de massas pentaquadrupolar (QqQqQ-MS) 13
1.3 ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA ESTUDOS EM QUÍMICA ANALÍTICA 20
1.3.1 MIMS 21
1.3.2 SPME-GC-MS 22

2 OBJETIVO: 25

3 PARTE EXPERIMENTAL 26

3.1 ESPECTRÔMETRO QUADRUPOLARES 26
3.1.1 Pentaquadrupolo 26
3.1.2 Monoquadrupolo 27
3.1.3 Qtof 27
3.2 SIMBOLOGIA DOS EXPERIMENTOS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQÜENCIAL 28

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES 30

4.1 CICLOADIÇÃO POLAR [4^++2] COM ETIL-VINIL-ÉTER: UMA REAÇÃO ÍON-MOLÉCULA PARA DIAGNÓSTICO ESTRUTURAL DE CÁTIONS 2-AZABUTADIENOS 30
4.1.1 Introdução: 30
4.1.2 Parte Experimental 33
4.1.3 Resultados e Discussão 34
4.1.4 Conclusão 43
4.2 MONO E DUPLA CICLOADIÇÃO DIELS-ALDER POLAR [4+2^+] DE ÍONS ACÍLIOS COM O-HETERODIENOS 44
4.2.1 Introdução: 44
4.2.2 Parte Experimental 46
4.2.3 Resultados e Discussão 48
4.2.4 Conclusão 63
4.3 CICLIZAÇÃO DE ÍONS ACÍLIOS COM NITRILAS: SÍNTESE NA FASE GASOSA E CARACTERIZAÇÃO DE ÍONS 1,3,5-OXADIAZÍNIOS 64
4.3.1 Introdução: 64
4.3.2 Parte Experimental 65
4.3.3 Resultados e Discussão 66
4.3.4 Conclusão 79
4.4 REAÇÕES DE TRANSACETALIZAÇÃO ENTRE ÍONS ACÍLIOS E ACETAIS POR APCI/ESI ... 80
4.4.1 Introdução: 80

4.4.2 Parte Experimental *82*
4.4.3 Resultados e discussão *83*
4.4.4 Conclusão: *100*
4.5 ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR INTRODUÇÃO VIA FIBRA DE MICRO-EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA 101
4.5.1 Introdução: *101*
4.5.2 Parte Experimental *103*
4.5.3 Resultados e Discussão *105*
4.5.4 Conclusão: *114*
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS. 115

1 Introdução:

A espectrometria de massas (MS, "mass spectrometry")[1] é nos dias de hoje, reconhecidamente uma das técnicas instrumentais mais úteis e poderosas em investigações científicas e com ampla aplicação em várias áreas das ciências e entre as mais importantes se encontram as ciências biológicas, biomédicas e naturais (química e física). A vasta aplicabilidade da MS decorre da grande variedade de suas técnicas de formação de íons como ionização por elétrons (EI, "electron-ionization"), ionização química (CI, "chemical-ionization"), bombardeamento por átomos rápidos (FAB, "Fast-atom-bombardment"), ionização por laser assistida por matriz (MALDI, "matrix assisted laser dessorption ionization"), ionização por eletrospray (ESI, "electrospray ionization"), ionização química à pressão atmosférica (APCI, "atmospheric pressure chemical ionization"), etc; e de suas técnicas de análise de razões massa/carga (*m/z*) como analisadores quadrupolares (Q, "quadrupole"), tempo de vôo (Tof, "time-of-flight), armazenadores de íons (IT, "íon-trap"); e de sistemas de detecção, como multiplicadores de elétrons. Cada módulo destes (ionização, análise e detecção) pode ser combinado de diversas maneiras, gerando várias técnicas em espectrometria de massas (EI-Q, ESI-IT, MALDI-TOF, etc). A MS tem se beneficiado também do desenvolvimento cada vez maior da eletrônica, alcançando grande agilidade na aquisição de dados uni-, bi- e tridimensionais tornando as análises mais rápidas, sensíveis e seletivas, além de se beneficiar do desenvolvimento de novos programas de computadores mostrando novas ferramentas que tornam a interpretação dos dados mais ágil.

As aplicações de MS abrangem áreas muito distintas, tão diferentes quanto, por exemplo, a geologia do petróleo e seus biomarcadores, os produtos naturais, o sequenciamento de proteínas e peptídeos, os estudos fundamentais como mecanismos de processos catalíticos orgânicos e inorgânicos, a química da atmosfera, a cosmoquímica,[2] o estudo mecanístico de reações orgânicas, a síntese orgânica, a análise estrutural orgânica e inorgânica, a diferenciação de diasteroisômeros e enantiômeros e as medidas de propriedades termodinâmicas como potencial de ionização (PI), afinidade por elétrons e por prótons.

1.1 Breve Histórico da Espectrometria de Massas

1.1.1 J.J. Thomson

A MS teve seu inicio com os trabalhos pioneiros de Joseph John Thomson (Figura ao lado mostra uma fotografia de J.J. Thomson no seu escritório no laboratório Cavendish em Cambridge),[3] que em 1897 utilizou um aparelho no qual feixes de corpúsculos acelerados (mais tarde denominados elétrons) eram sujeitos, seqüencialmente, a deflexões por um arranjo de campos magnéticos e elétricos. Desta forma Thomson determinou a razão massa/carga (*m/z*) destes corpúsculos e determinou que estes eram milhões de vezes mais leves que o átomo de hidrogênio. Este é o experimento mais conhecido de Thomson e lhe proporcionou o Prêmio Nobel de 1906, utilizando tubos com vácuo chamados de tubos de raios catódicos.

Junto com a idéia chocante da existência de partículas sub-atômicas que veio com a descoberta do elétron, os primeiros espectrômetros de massas estavam começando a ser construídos no intuito de medir a *m/z* de átomos e moléculas simples. Dois anos mais tarde em 1899 Thomson[4] iniciou seus primeiros experimentos com íons positivos sendo que estes íons eram separados por um campo magnético e colidiam em uma chapa fotográfica (utilizada como detector) ao longo de uma parábola (Figura 01). Dessa forma, através de experimentos de dissociação induzida por colisão (CID, "collisional induced dissociation") de H_2^+, Thomson conseguiu pela primeira vez medir a razão *m/z* de um íon, o próton. A partir daí veio a idéia de obter espectros de massas de vários outros gases e se iniciou a utilização da técnica de espectrometria de massas como ferramenta analítica. Assim, a base onde se fundamentaram os alicerces para o crescimento e estabelecimento da poderosa técnica de MS foram os trabalhos de Thomson, e mais tarde, o trabalho de seus seguidores Dempster[5] e Aston.[6]

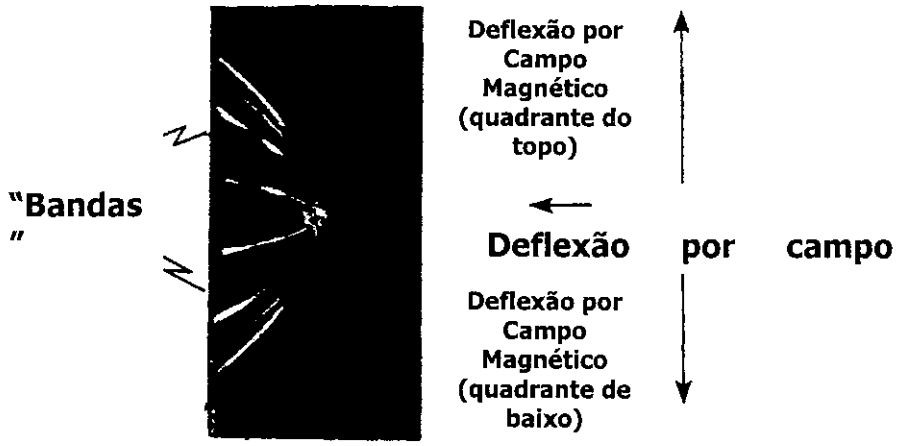


Figura 1 Imagem de íons em forma de parábola obtida por Thomson, mostrando as bandas que representam a primeira evidência para o processo de CID do íon H_2^+ formando o íon H^+.

1.1.2 A.J. Dempster

Em 1918, Dempster desenvolveu o primeiro espectrômetro de massas, utilizando como analisador de massas, um setor magnético no formato de 180° em relação ao feixe.[5] A análise das razões *m/z* foi possível, pois a energia cinética média dos íons na fonte era conhecida, sendo assim o raio da trajetória do íon no setor magnético revelava, através de uma simples fórmula composta por equações de física básica, as relações *m/z* dos íons.

$$\frac{m}{z} = \frac{r^2.B^2}{2V_s}$$

Nesta fórmula, *m/z* é a relação massa/carga do íon que passa no interior do campo magnético, r é o raio característico do íon que tem uma trajetória circular, B o valor do campo magnético e V_s a diferença de potencial aplicado no setor magnético. Como os íons formados na fonte apresentavam pronunciada dispersão de energia cinética (distribuição Gaussiana) centrada na energia da fonte, a medida de *m/z* apresentava incerteza elevada.

1.1.3 F.W. Aston

O problema da dispersão de energia cinética foi solucionado por Francis W. Aston (Fotografia ao lado),[6] aluno de Thomson que desenvolveu o primeiro espectrômetro com seleção de velocidade (ou energia cinética) dos íons na fonte, utilizando campos elétricos (Figura 02). Também em 1919, usando o primeiro espectrógrafo de massas, Aston confirmou que os íons de Neônio descobertos por Thomson eram realmente isótopos, como havia previsto.

Figura 2 Fotografia do espectrômetro de massas desenvolvido por Aston

A confirmação dos dois isótopos de neônio é tida como o primeiro experimento do estudo de relação isotópica por espectrometria de massas (IRMS). Aston utilizou detectores de silicato de zinco para detectar além dos íons de energia alta e multiplamente carregados, também íons de baixa energia carregados negativamente e produtos com a metade da massa do gás hidrogênio (H_2), mas com a mesma velocidade translacional, isto é, o H^+ (Figura 3).

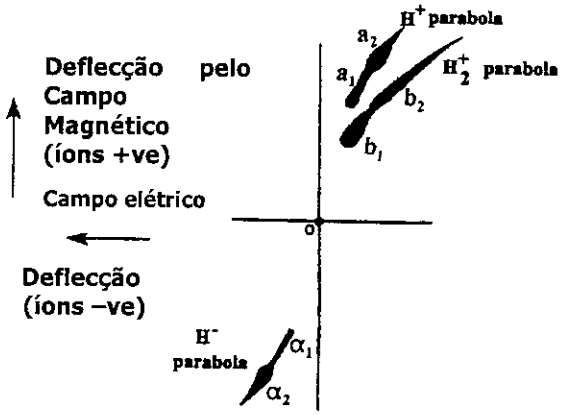


Figura 3 Parábolas formadas pelos íons hidrogênio atômico e molecular obtidos por Aston.

1.1.4 Munson e Field

Um marco para a MS foi a descoberta da ionização química (CI) por Munson e Field[7] em 1966, que permitiu a obtenção de espectros de massas com fragmentações menos extensas que os espectros de massas por EI (EI, "electron ionization").[1] Os espectros obtidos apresentavam íons das moléculas neutras protonadas, o que permitia a análise de misturas. Assim foi possível caracterizar peptídeos, açúcares e até fazer diferenciações estereoquímicas de uma variada gama de compostos, que eram mais difíceis de ser analisados por ionização por elétrons.

Aplicações tradicionais da espectrometria de massas de estágio simples (MS), como os espectros obtidos de amostras puras, principalmente através das técnicas de EI, CI e FAB, já são largamente reconhecidas e estão entre as técnicas mais poderosas em análises estruturais de uma variedade de classes de compostos. Análises elementares podem também ser realizadas, mesmo de quantidades muito pequenas de amostras, através da MS de alta exatidão.

1.1.5 R.G.Cooks

Cooks e col.[8] em 1973 desenvolveram a "tandem MS/MS" ou espectrometria de massas seqüencial de duplo estágio, onde um íon precursor tem sua massa selecionada e é tipicamente fragmentado por dissociação induzida por colisão (CID) seguido da análise por massas dos produtos iônicos resultantes. A técnica requer dois analisadores de massas em série para analisar os precursores e os produtos iônicos. A técnica de MS/MS fornece importantes informações estruturais, ao estabelecer a relação entre os íons precursores e seus fragmentos. Assim, Cooks combinou métodos de ionização brandos (tal como CI) com experimentos de CID (MS/MS), o que permitiu detalhar a análise de misturas. Cooks através de decomposições metaestáveis de íons (MIKES) aplicou a técnica em medidas termodinâmicas, usando o método cinético.

1.1.6 Koichi Tanaka, Hillenkamp e Karas

No final dos anos 80 MALDI foi utilizado como um substituto para a ionização por FAB. A técnica de MALDI foi desenvolvida por Hillenkamp e Karas,[9] e se mostrou com melhor sensibilidade (femtomols) e menor extensão em fragmentação e ruído quando comparado com FAB, isto devido à ionização mais branda obtida do aquecimento seletivo da matriz. Koichi Tanaka aplicou a técnica de MALDI para análise de proteínas intactas com até 35.000 u e revolucionou a técnica. Tanaka apresenta em duas publicações e palestras nos anos de 1987-1988 a ionização de proteínas como quimotripsinogênio (25,717 Da), carboxipeptidase-A (34,472 Da) e citocrome C (12,384 Da).[10] Este trabalho foi premiado com o Nobel de química de 2002, dividido com John Fenn descobridor da técnica de ESI apresentada mais à frente.

A técnica de MALDI leva os íons para fase gasosa, utilizando um feixe de laser (UV ou IR). O laser é absorvido seletivamente pela matriz sólida (ácido nicotínico devido a alta absorção no IR) com a amostra, a qual é volatilizada na forma de uma pluma arrastando o analito e ionizando a amostra na fase gasosa. Depois disso os íons são

dirigidos para o analisador de massas através de um alto campo elétrico aplicado no anteparo da amostra.

A Figura 4 mostra um feixe de laser pulsado bombardeando um anteparo com amostra e matriz sólida, de onde a amostra é ejetada na forma ionizada (protonada, desprotonada, catiônica e aniônica) para a fase gasosa através de um alto campo elétrico aplicado no prato, direcionando os íons para a análise de *m/z*. Após a análise de *m/z*, a abundância de cada íon com sua razão *m/z* específica é mostrada através do espectro de massas (Figura 4).

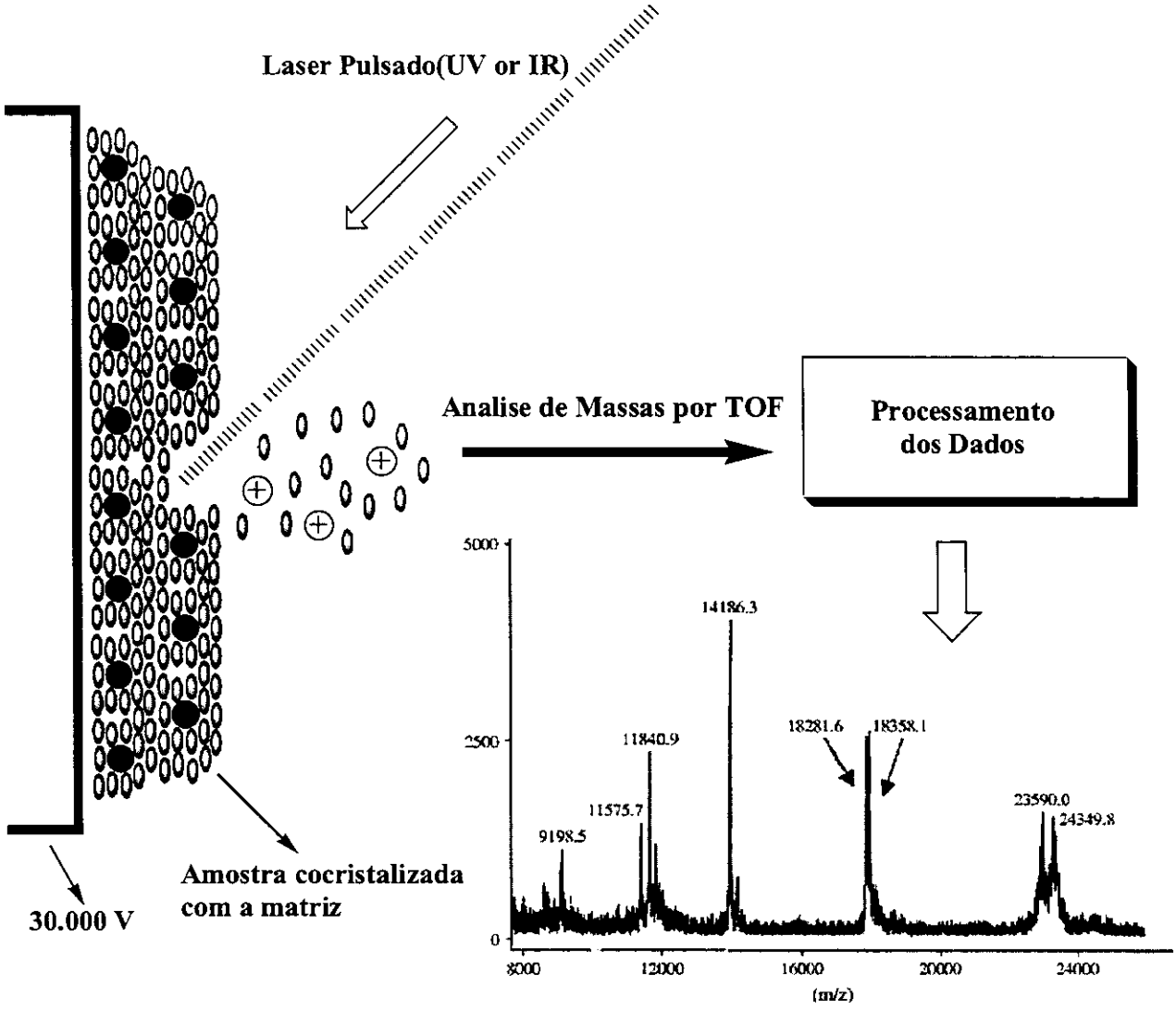


Figura 4 Ionização na fonte de MALDI e análise de *m/z* para a aquisição do espectro de massas.

1.1.7 J. Fenn

Os primeiros experimentos de electrospray (ESI) foram conduzidos pelo físico John Zeleny em 1917 e a primeira descrição é datada de 1968 por Malcolm Dole,[11] incluindo o modelo da carga residual (CRM, "charge residue model"). No modelo CRM,[12] o solvente das gotas carregadas evaporam até o ponto onde as cargas eletrostáticas na superfície começam a se repelir fortemente umas com as outras até que a gota explode ("explosão de Rayleigh") formando gotas carregadas menores contendo cargas elétricas.[13,14]

O avanço mais importante da ionização por eletrospray veio em 1988 no simpósio em São Francisco, nos Estados Unidos, quando John Fenn apresentou a identificação de polipeptídeos e proteínas de massas moleculares de até 40 kDa em massa. Fenn obteve massas moleculares com precisão de 0.01% aplicando o método das médias dos sinais nos íon multiplamente carregados, formados no processo de ESI. Os trabalhos de ESI de Fenn começaram em 1984[15] quando eletrospray e espectrometria de massas foram acopladas pela primeira vez. O processo de ESI apresenta um variado número de parâmetros químicos e físicos que determinam juntos o sucesso do processo. O sistema ESI-MS pode ser definido por um circuito elétrico que dirige os íons formados em solução para a fase gasosa (Figura 5). Nesse processo as proteínas inicialmente estão em solução e terminam formando uma série de íons multiplamente carregados, apresentando uma distribuição de cargas que são analisados de acordo com suas respectivas razões massa/carga no espectrômetro de massas.

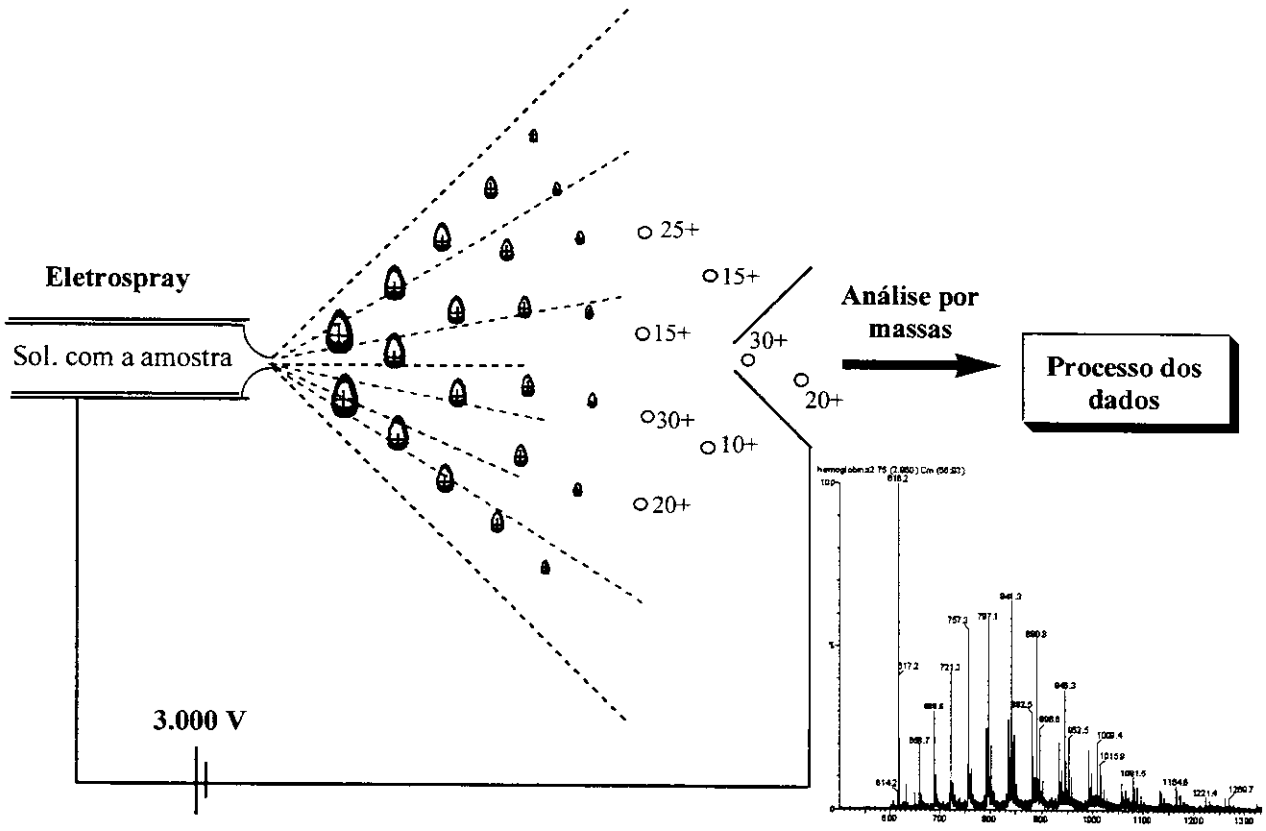


Figura 5 Formação dos íons na fonte de ESI, e análise dos íons com suas respectivas razões massa/carga para a aquisição dos espectros de massas.

Ao contrário dos íons mono carregados formados por MALDI, os íons formados sob condições de ESI são multiplamente carregados. Este padrão de cargas pode ser visto como aumento na complexidade do espectro, no entanto, em 1987, Fenn encontrou uma equação matemática que rege a distribuição de cargas no padrão de íons multiplamente carregados e é diretamente relacionado com a massa nominal da proteína. Esta equação mostrada por Fenn pode ser utilizada com vantagens aumentando a precisão na determinação das massas moleculares. As equações de Fenn assumem que estados de cargas diferentes devem ser interpretados como medidas independentes e que um método de média baseado na solução de vários pares de equações simultâneas podem melhorar a precisão da medida das massas moleculares para moléculas grandes.

ESI é conhecido como um dos métodos de ionização mais brandos servindo de maneira elegante no estudo de compostos com interações não covalentes fracas, como por exemplo, interações proteína-proteína, enzima-substrato ou interações entre ligantes e metais em complexos inorgânicos.

1.2 Estudo de Reações entre Íons e Moléculas na Fase Gasosa.

A reações entre íons e moléculas são etapas chaves de vários processos químicos importantes na natureza, entre eles, se destacam a química da ionosfera e a química orgânica sintética em solução. Alguns exemplos bem conhecidos da importância das reações de espécies iônicas para a química orgânica em solução, é a participação de íons acílio como intermediários-chave nas reações de Friedel-Craftz (acilação e alquilação), os íons imínios nas reações de Mannich, os íons cíclicos bromônio e clorônio nas reações de adições às duplas ligações C=C, os carbocátions em geral, intermediários-chaves em várias reações, entre tantos outros. Portanto, o estudo de reações íon/molécula na fase gasosa se torna muito importante para o estudo mecanístico e de reatividade, pois estas reações apresentam certas peculiaridades que não se observam em solução devido à presença de solvente e de contra-íons. Uma das principais diferenças encontradas em reações íon/molécula entre a fase gasosa e condensada é apresentado pela Figura 06, que faz uma comparação entre os respectivos diagramas de energia de reações mostrando o perfil energético de reações íon/molécula.

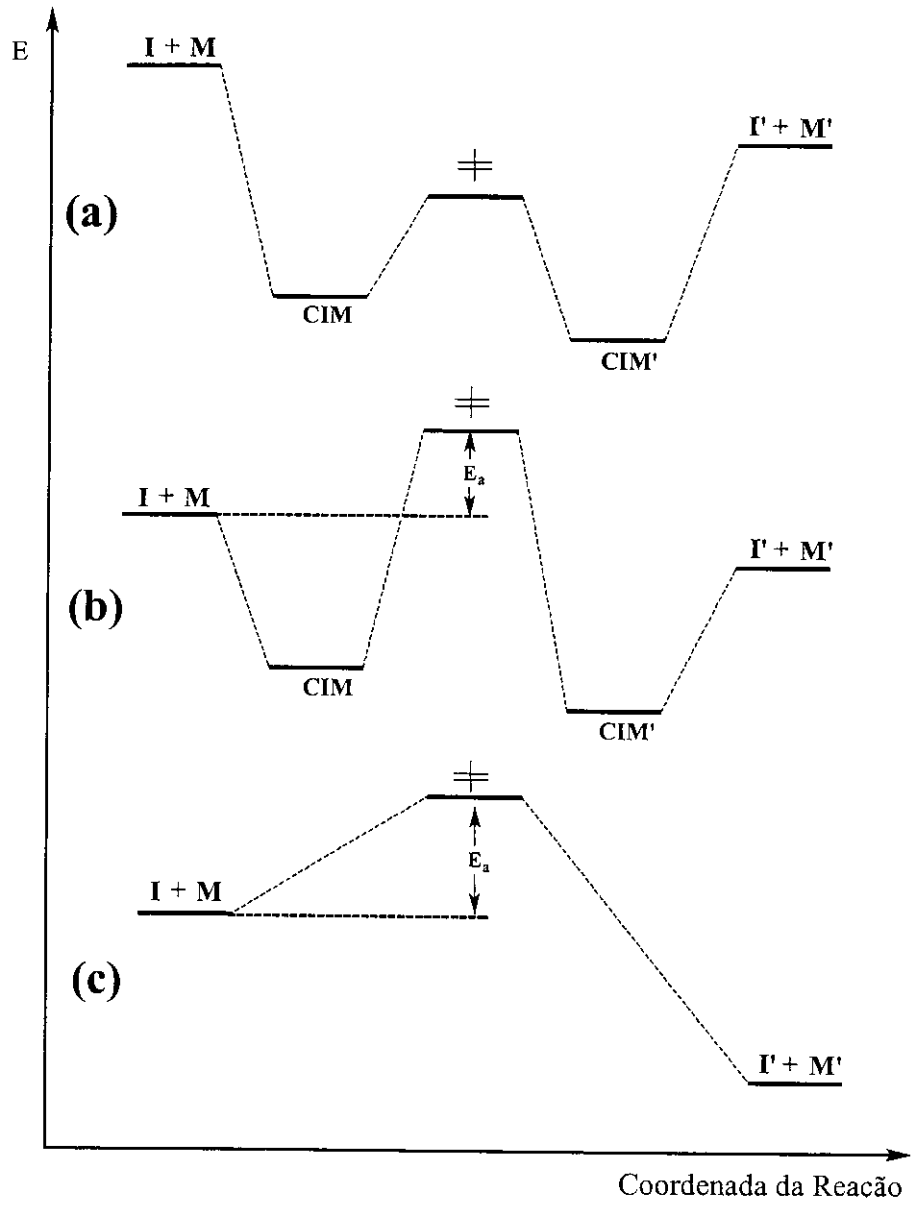


Figura 6 Diagramas de energia de uma reação íon/molécula (a) na fase gasosa sem energia de ativação (E_a), (b) na fase gasosa com E_a e (c) em solução.

A Figura 06 nos apresenta o perfil energético de reações íon/molécula (a) na fase gasosa sem energia de ativação, (b) na fase gasosa com energia de ativação, e (c) em solução. Observa-se que as reações íon/molécula na fase gasosa têm um perfil energético diferenciado daquele observado em fase condensada. Na fase condensada não se verifica poço de potencial entre o estado de transição e os produtos e reagentes. Este duplo poço de potencial em reações íon/molécula na fase gasosa se deve à

interação entre o íon e a molécula neutra, porém, na fase condensada, as interações intermoleculares entre o solvente e os reagentes (solvatação) são mais favorecidas e impedem a estabilização do "complexo íon-molécula" (Esquema 01) e devido a isso não diagramas energias de reações na fase gasosas· não apresentam um duplo poço de potencial. O complexo íon-molécula (CIM) a que nos referimos consiste em um agregado onde há uma atração forte entre a nuvem eletrônica da molécula neutra (dipolo ou dipolo induzido) e o a íon em questão.

$$I^{+}\text{--------}M$$

Esquema 1 Complexo íon-molecula.

As Figuras 06a e 06b exibem diagramas de duplo poço de potencial, porém, somente o diagrama da Figura 03b corresponde a uma reação com energia de ativação, isto é, com uma diferença de energia positiva entre o estado de transição e os reagentes. Assim, a formação de produtos será cineticamente menos favorecida para a reação representada na Figura 06b do que aquela da Figura 06a.

A espectrometria de massas se destaca dentre os métodos que permitem o estudo na fase gasosa da química intrínseca de íons se apresentando como uma das mais apropriadas e poderosas técnicas para este fim. As técnicas de ionização disponíveis em MS permitem a obtenção em fase gasosa de uma grande variedade de íons das mais diferentes classes, os quais, na ausência de solvente no ambiente de alto vácuo dos espectrômetros de massas, apresentam geralmente tempos de vida suficientemente longos, permitindo assim que estes íons sejam facilmente selecionados, reagidos e detectados dentro da estreita faixa de tempo requerida por MS para a execução destes processos.

Reações entre íons e moléculas podem, por exemplo, ser realizadas por MS através do método de ionização conhecido como CI. Várias reações entre íons e moléculas têm sido estudadas por CI-MS e suas aplicações práticas estabelecidas. As limitações principais para o estudo de reações íon/molécula pela técnica CI decorrem, porém, da formação de múltiplos íons na fonte, ou da presença, muitas vezes indesejável do gás precursor do íon gerado. Isto faz com que existam diversas reações

íon/molécula competitivas com a reação de interesse que não se pode eliminar. Outro grande problema apresentado por CI é o pouco controle das condições de reação tais como da pressão dos reagentes e da energia de colisão. Reações íon/molécula à pressão atmosférica, também podem ser realizadas e é objeto de parte dos estudos descritos nesta tese.

Outra técnica mais elaborada para estudos de reações íon/molécula na fase gasosa se constitui da MS seqüencial ou de múltiplos estágios (MS^n) ("tandem mass spectrometry"). As técnicas MS^n no espaço resolvem os principais problemas enfrentados na técnica CI, pois através de MS seqüencial, por exemplo, íons podem ser formados por intermédio de vários métodos de ionização disponíveis em MS, pré-selecionados através de um analisador da razão massa/carga (*m/z*) utilizado como filtro de massas, reagidos com uma substância neutra em uma câmara de colisão e os produtos analisados por um segundo analisador de *m/z*, sendo, em seguida, detectados. A inclusão de mais um estágio de seleção no segundo analisador de *m/z*, utilizando-o como filtro de massas, e reação em uma segunda câmara de colisão seguido da análise por um terceiro analisador de *m/z*, pode ainda levar ao estudo da química dos íons produtos da reação. Podem-se tanto realizar reações íon/molécula consecutivas (baixa energia de colisão ~0 V) como reações dissociativas através de processos de dissociação induzida por colisão (CID) (alta energia de colisão > 0V).

1.2.1 Espectrometria de massas pentaquadrupolar (QqQqQ-MS)

Desde os trabalhos marcantes na história da química e física realizados por Thomson e depois Dempster e Aston, a MS vem crescendo rapidamente desde o início do século passado, e junto com esse crescimento surgiu em 1986 o primeiro pentaquadrupolo[16a] (QqQqQ), resultado do desenvolvimento natural da espectrometria de massas mono e tiploquadrupolar (QqQ).[17] O pentaquadrupolo (Figura 07) foi construído para expandir as aplicações de triploquadrupolos, que em processos de dissociação ou reações íon-molécula não podiam fornecer informações estruturais sobre os produtos iônicos formados. Assim, o arranjo pentaquadrupolar se tornou uma alternativa natural e em 1986 Morrison[16a] e Rolando e col.[16b] apresentaram trabalhos

descrevendo os dois primeiros pentaquadrupolos. Mais tarde, em 1990, Cooks e col. [16c] propuseram um novo arranjo e em 1996 Eberlin e col.[16d] descreveram o primeiro Pentaquadrupolo capaz de realizar com rapidez e eficiência todos os modos de varredura MS^3.[18]

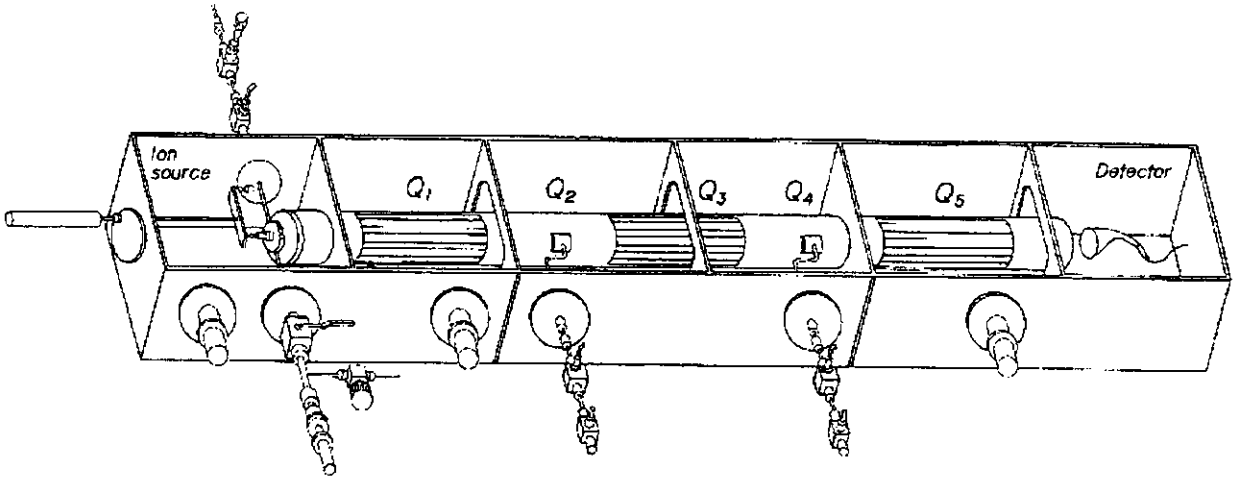


Figura 7 Esquema do Pentaquadrupolo descrito por Eberlin e col.[16d]

O espectrômetro de massas Pentaquadrupolar (QqQqQ) emprega 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 (q2 e q4) e que são monitoradas pelos três analisadores de massas (Q1, Q3 e Q5). 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 iônicas e moleculares, como suas conectividades, seus grupos funcionais, suas reatividades intrínsecas, acidez, eletrofilicidade e nucleofilicidade. Estas informações podem ainda encontrar aplicações analíticas, sintéticas e em medidas de propriedades termodinâmicas.[19]

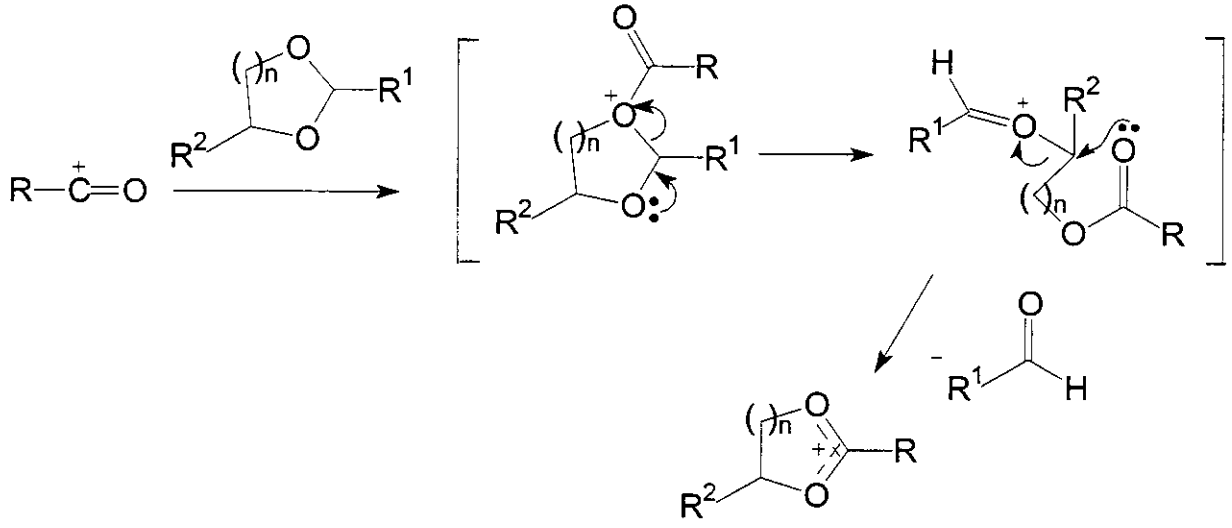
Além de fornecer informações sobre a reatividade de íons e moléculas,[19] experimentos MS^3 em pentaquadrupolos são feitos na ausência de solvente e contra-

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.

1.2.1.1 Aplicação Analítica de Reações Íon-molécula

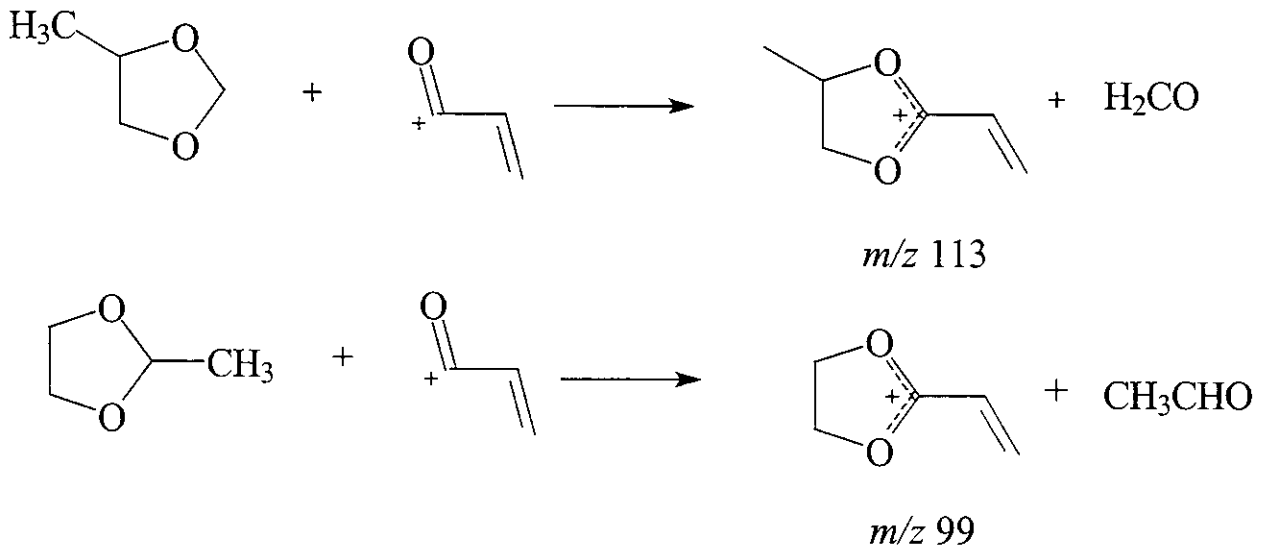
A aplicabilidade da espectrometria de massas pentaquadrupolar é muito variada.[19] Na área analítica, por exemplo, podemos citar a identificação de grupos funcionais, localização da posição de substituintes e a diferenciação de isômeros.[20] As análises são rápidas e utilizam quantidades muito pequenas de amostras.

Várias aplicações analíticas de reações íon/molécula têm sido desenvolvidas em pentaquadrupolos: um exemplo é o uso de reações íon/molécula para o diagnóstico estrutural de acetais e cetais cíclicos em fase gasosa.[21] Neste trabalho foram investigadas reações de transacetalização via QqQqQq-MS e marcação isotópica com ^{18}O. As reações entre íons acílios e acetais e cetais cíclicos apresentaram uma grande generalidade, formando adutos que se fragmentam espontaneamente, resultando em uma cetona ou em um aldeído neutro contendo o grupo R^1 do acetal ou cetal inicial e um acetal ou cetal iônico contendo o grupo R do íon acílio (Esquema 02).



Esquema 2 Mecanismo da "reação de Eberlin"[20] entre um íon acílio e um cetal ou acetal cíclico.

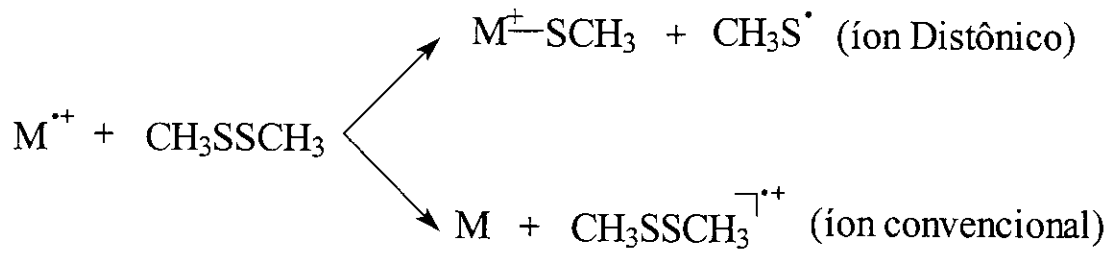
Com a reação íon/molécula descrita pelo Esquema 02, pode-se diagnosticar tanto a estrutura do íon acílio como do acetal ou cetal cíclico. Pela diferença de massas entre o cetal ou acetal conhecido e o íon dioxolanílio formado, calculamos a massa do grupo R ligado ao grupo acílio. Por outro lado, se conhecermos a massa do íon acílio utilizado, podemos prever qual grupo está ligado ou na posição C2 ou em qualquer outra posição do anel do cetal ou acetal cíclico. Essa informação estrutural detalhada permite a distinção de isômeros de posição, como por exemplo, do 2-metil-dioxolano e o 5-metil-dioxolano (Esquema 03).



Esquema 3 Reação entre o íon acílio α,β-insaturado de *m/z* 55 e a) 5-metil-dioxolano e b) 2-metil-dioxolano.

Outro exemplo da aplicação de reações íon molécula é o trabalho realizado por Kenttamaa e col.[22] que propuseram as reações entre íons radicalares e dimetil-dissulfeto como capazes de diferenciar íons distônicos (espécies iônicas com carga e radical localizados formalmente em dois átomos diferentes na mesma molécula) de cátions radicalares convencionais.

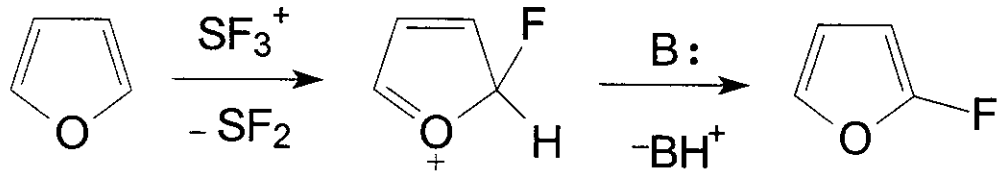
Cátions radicalares convencionais transferem carga para o dimetil-dissulfeto; porém cátions radicalares distônicos abstraem $CH_3S^{\cdot}$ do dimetil-dissulfeto (Esquema 04). Assim, a abstração de $CH_3S^{\cdot}$ é característica para íon com estrutura distônica.



Esquema 4 Reação de íons distônicos e cátions radicalares convencionais com dimetil-dissulfeto.

1.2.1.2 Aplicação no Estudo de Reatividade

Outro campo onde as reações íon/molécula são utilizadas, é na síntese formal em fase gasosa.[23] Como as reações em fase gasosa no ambiente dos espectrômetros de massas não dependem de fatores externos, estuda-se a reatividade intrínseca das espécies envolvidas (íons, radicais e moléculas neutras). Assim, é possível determinar reatividades que serão observadas quando não há interferência do meio reacional. Por exemplo, Gozzo e col.[24] relataram recentemente um método eficiente de monofluoração de heteroaromáticos de cinco membros em fase gasosa (Esquema 05) utilizando SF_3^+. Neste trabalho, foi descrita em fase gasosa a primeira síntese formal do 2-fluoro-furano, entre outros.

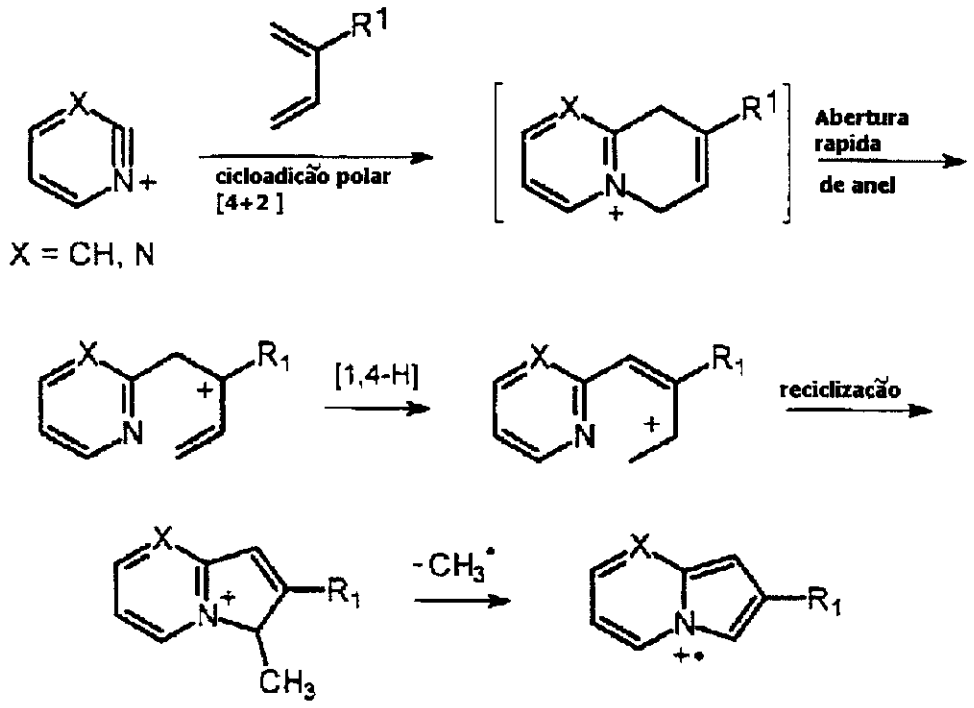


Esquema 5 Síntese de heterocíclicos monofluorados de cinco membros através da reação em fase gasosa com SF_3^+.

Outro exemplo foi apresentado recentemente por Sparrapan e col.[23] que realizaram a fusão formal de anéis de pirrol a cátions 2-piridil e 2-pirimidil

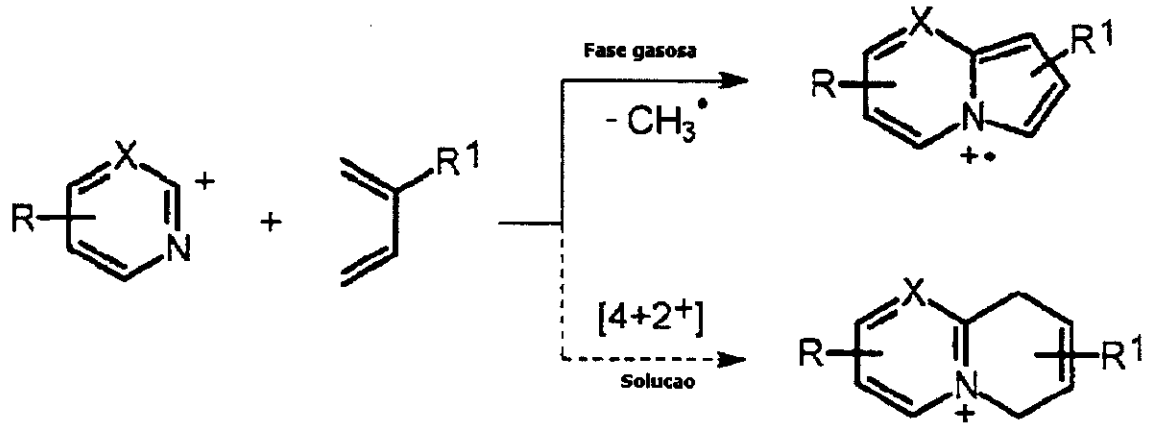
respectivamente apresentados abaixo, através da reação com 1,3-dienos. Foram sintetizados, em uma etapa, a indolizina e seus derivados.

O Esquema 06 apresenta o mecanismo proposto para a formação de indolizina e seus derivados; este mecanismo consiste em uma cicloadição, abertura rápida de anel, transferência 1,4 de hidrogênio, reciclização e perda do radical metila.



Esquema 6 Mecanismo proposto para reação de cicloadição entre os cátions 2-piridil e 2-pirimidil com 1,3-dienos.

Um estudo teórico da reação entre cátions *O*-hetarinos e 1,3-dienos na fase gasosa e na fase condensada mostra que diferentes produtos podem ser obtidos na síntese realizada na fase gasosa e na fase condensada (Esquema 07). Essas reações apresentam potencialidade em química sintética, pois estes intermediários podem ser gerados em solução química ou eletroquimicamente.[25]



Esquema 7 Reações de cicloadição de cátions o-hetarinos e 1,3-dienos na fase gasosa em solução.

Portanto, a síntese formal de compostos em fase gasosa pode ter aplicação na química sintética, pois podem ser sintetizados muitos intermediários iônicos de difícil acesso no meio condensado, servindo para o estudo de suas reatividades intrínsecas, guiando assim os processos que poderão ser testados com maior possibilidade de sucesso em solução.

1.2.1.3 Cálculos teóricos

Os recursos computacionais são uma das ferramentas mais úteis e importantes para os químicos na maioria de suas áreas. Junto com as técnicas de IV, RMN, cromatografia e MS os cálculos teóricos se tornaram poderosos na inferência de mecanismos de reação e de vários processos químicos. A atividade biológica de compostos inéditos pode ser estimada através de modelagem molecular e o trabalho experimental dirigido para a síntese dos compostos mais promissores. As propriedades físico-químicas de substâncias, seus espectros eletrônicos e vibracionais, entre outros, os

efeitos de solventes sobre suas reatividades, todos podem ser previstos com excelente precisão antes mesmo destas substâncias serem conhecidas ou sintetizadas em laboratório através de cálculos teóricos.

Portanto, a química computacional, através do fornecimento de métodos que permitem o estudo das propriedades eletrônicas e estruturas químicas das mais variadas substâncias. Agora ao invés de especular utilizando conceitos ou modelos qualitativos úteis, mas passíveis de falhas, os químicos têm agora a alternativa de modelar e analisar quantitativamente as estruturas moleculares através de cálculos teóricos.

Os cálculos teóricos têm sido empregados intensamente nos estudos de reações íon/molécula, e cálculos *ab initio* de alto nível têm permitido uma melhor interpretação e/ou previsão dos resultados experimentais obtidos na fase gasosa. Estes cálculos envolvem normalmente a otimização das estruturas dos reagentes, intermediários e produtos (neutros ou iônicos) e a determinação de suas estabilidades termodinâmicas relativas, cálculos de coeficientes e energias de HOMO-LUMO para prever a direção das reações e além de cálculos de propriedades termodinâmicas como a afinidade de moléculas neutras por próton e por outras espécies iônicas.

1.3 Espectrometria de Massas para Estudos em Química Analítica

Desde a concepção da técnica de Espectrometria de Massas, ela surgiu para a comunidade científica como uma técnica analítica para análise de átomos e moléculas de razões massa/carga diferentes. Existe um conceito antigo e errôneo que vê MS como uma técnica analítica complementar para química orgânica. Porém desde o primeiro acoplamento de MS com cromatografia gasosa (CG) alcançada por Fred McLaffety a espectrometria se mostra muito útil para estudos analíticos.

Assim várias técnicas analíticas, utilizando espectrometria de massas, têm se destacado: como espectrometria de massas por introdução via membrana (MIMS)[26] e agora a técnica de micro-extração em fase sólida acoplada à cromatografia gasosa com analisador de massas SPME-CGMS.[27]

1.3.1 MIMS

Esta técnica analítica foi introduzida por Hoch e Kok[28] em 1963 e denominada Espectrometria de Massas por Introdução Via Membrana (MIMS), sendo esta utilizada no monitoramento de gases dissolvidos em água para estudo da cinética de reações fotossintéticas em água. Anos depois Cooks[26a] de forma mais elegante elaborou um novo sistema onde a membrana era inserida diretamente da câmara de ionização que aumentava a sensibilidade da técnica e após isto, surgiram várias configurações da técnica visando ao aumento na sensibilidade e da permeação de compostos mais pesados e mais polares.

1.3.1.1 Princípios de MIMS

Esta técnica utiliza uma membrana constituída de polidimetilsiloxano (PDMS) não somente como uma interface vácuo/ambiente, mas também para extrair seletivamente e concentrar os compostos presentes em solução aquosa. A análise de traços de compostos orgânicos voláteis (VOC, "volatile organic compounds") em água podem ser realizados de modo "on-line"por MIMS onde uma membrana é conectada diretamente na fonte de íons do espectrômetro de massas. A amostra que é usualmente água, é bombeada através da sonda e em contato com a membrana, os compostos voláteis permeiam a membrana e são ionizados e analisados por um espectrômetro de massas (Figura 08).

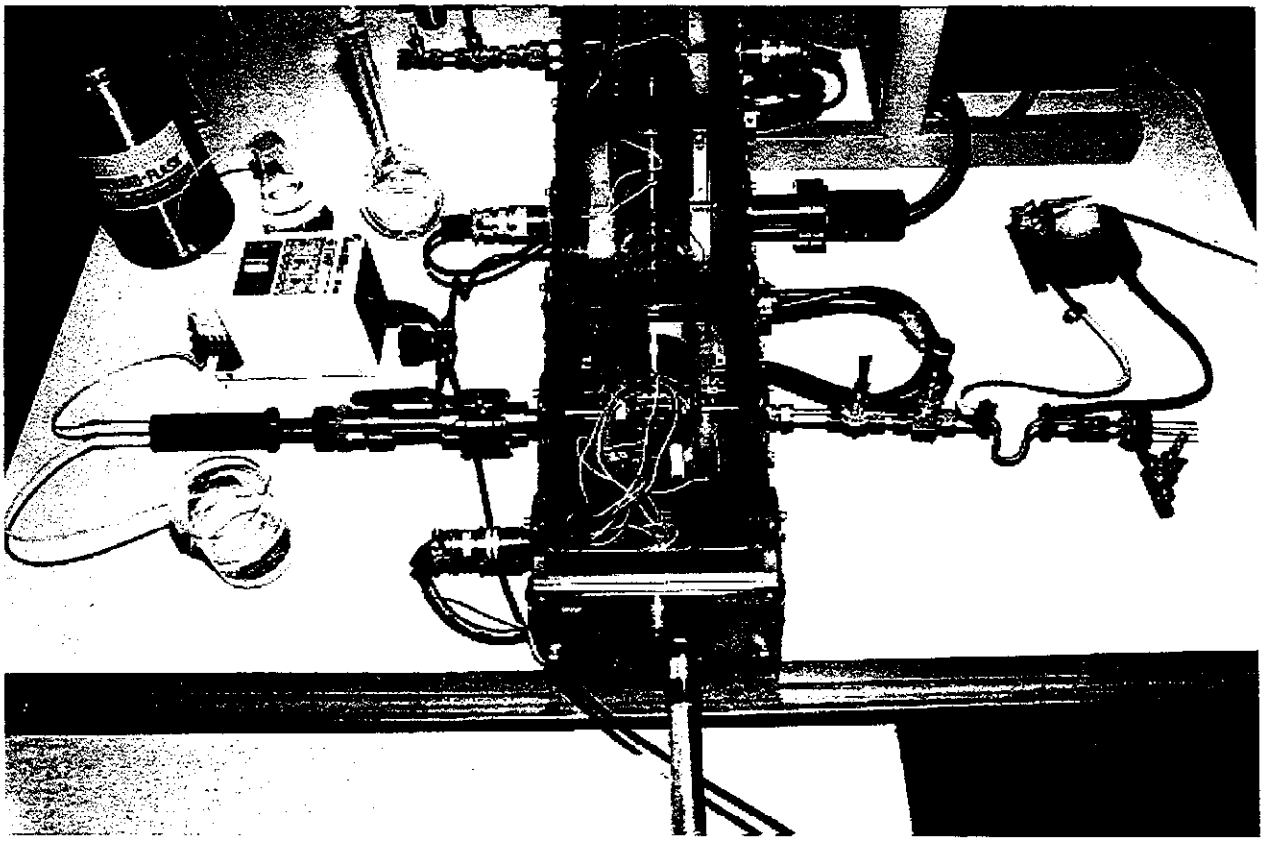


Figura 8 Fotografia do sistema de MIMS.

Mais recentemente através das técnicas de "trap&release" MIMS (T&R-MIMS),[29] e "single-sided"MIMS (SS-MIMS),[30] compostos semi-voláteis (SVOC) consideravelmente polares podem ser analisados com alta sensibilidade através de uma pré-concentração na membrana seguida por uma rápida e eficiente dessorção térmica, que ocorre em um só lado da membrana.

1.3.2 SPME-GC-MS

Outra técnica analítica que vem se destacando ultimamente no cenário da química analítica, tanto para compostos VOC e SVOC, é a micro-extração em fase sólida (SPME, "solid phase microextraction"). Esta é uma técnica recente de extração seletiva e pré-concentração de analitos em soluções geralmente aquosas. A extração seletiva ocorre devido à dependência com a interação analito com a superfície da fibra. Por exemplo, se a superfície utilizada é PDMS compostos, menos polares se "solubilizam" melhor na fibra.[27]

O sistema de SPME consiste em um pedaço de fibra ótica (sílica fundida) de 1 cm de comprimento recoberto com materiais sorventes como PDMS, poliacrilato ou carbowax; materiais adsorventes como carvão ativo, Carboxen e divinilbenzeno. Uma fibra de SPME está representada na Figura 9.[31]

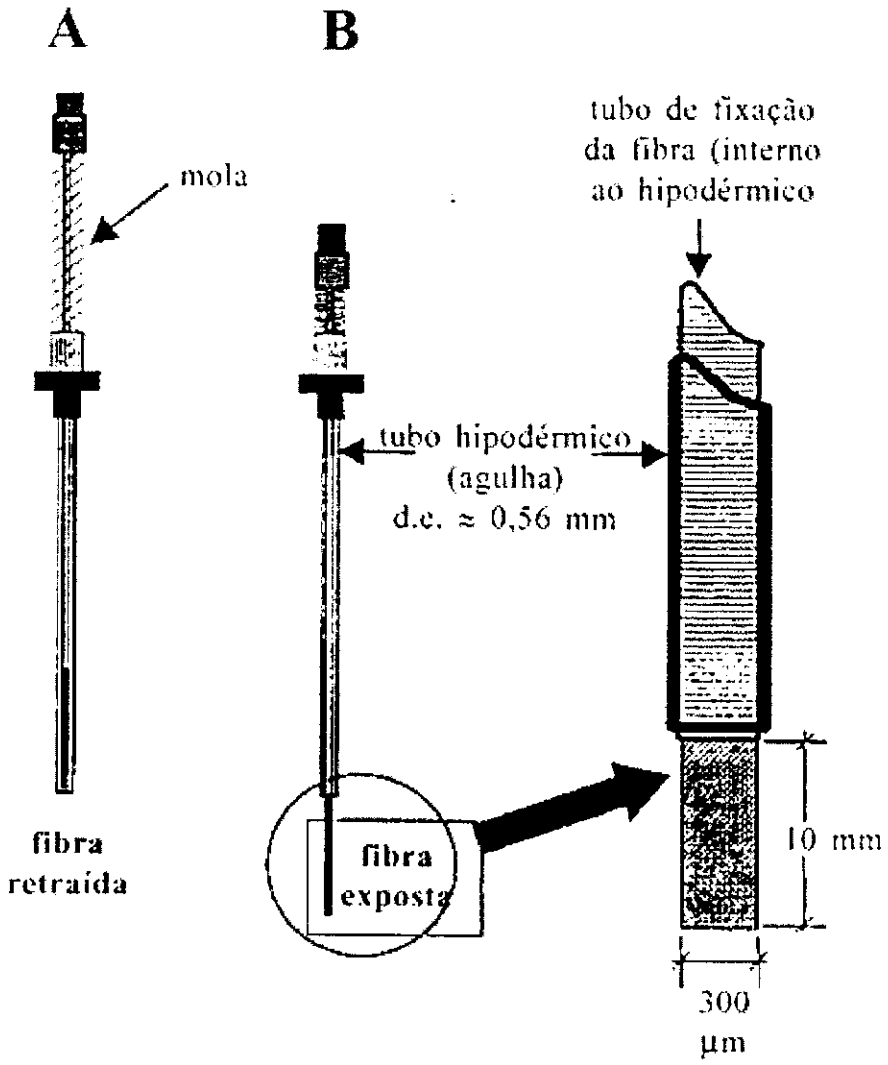


Figura 9 Dispositivo da fibra de SPME: (A) Posição com a fibra retraída na agulha, (B) posição com a fibra exposta. No detalhe são mostradas as dimensões típicas da seção com recobrimento de 100 µm de espessura.[31]

O sistema de SPME-GC se baseia na extração e pré-concentração do analito de interesse na fibra exposta na matriz que contém o analito (podendo ser por "headspace"

ou em solução) retração da fibra e exposição da fibra dentro do injetor do GC. Após estas etapas há uma separação cromatográfica, e detecção dos compostos separados no GC (Figura 10) conforme descrito por Augusto.[31]

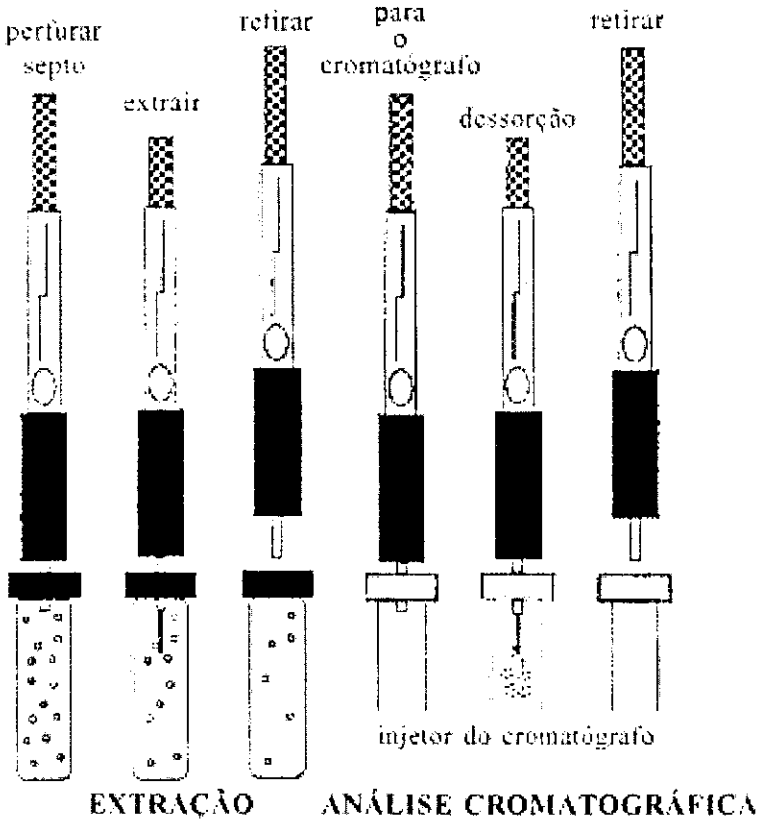


Figura 10 Uso do amostrador de SPME para o processo de extração e o de dessorção do material extraído para análise por GC.

A utilização de MS na análise dos compostos separados aumenta a eficiência na análise por SPME-GC devido à especificidade da determinação da massa dos compostos e da fragmentação que nos dá informação estrutural.[32]

2 Objetivo:

Nesta tese foram buscados três objetivos: o primeiro deles foi explorar as potencialidades da espectrometria de massas pentaquadrupolar e das reações íon/molécula ou processos dissociativos induzidos por colisão (CID) em experimentos MS/MS (MS^2) e MS^3; o segundo objetivo foi utilizar o equipamento de eletrospray ESI e ionização química à pressão atmosférica APCI com o espectrômetro de massas por tempo de vôo para reações íon/molécula sob pressão atmosférica; e finalmente explorar as potencialidades da espectrometria de massas monoquadrupolar para a criação de uma nova técnica, a espectrometria de massas por introdução via fibra (FIMS, "fiber introduction mass spectrometry").

No primeiro capítulo procuramos demonstrar uma nova aplicação analítica através de reações íon/molécula para o diagnóstico estrutural de cátions 2-azabutadienos utilizando etil vinil éter como reagente neutro. No segundo capítulo exploramos uma reação de íons acílios com aldeídos e cetonas α,β-insaturados formando-se *O*-heteodienos. No terceiro capítulo demonstramos a síntese de íons 1,3,5-oxadiazínios através de reações entre íons acílos e nitrilas substituídas. No quarto capítulo apresentamos uma nova metodologia para reações íon/molécula sob pressão atmosférica utilizando as técnicas de ESI e APCI para transportar para fase gasosa reagentes mais pesados e polares do que o utilizado convencionalmente utilizando EI. No último capítulo descrevemos a nova técnica de FIMS, um acoplamento direto da técnica de micro-extração em fase sólida (SPME) com espectrometria de massas (MS)

3 Parte Experimental

3.1 Espectrômetro quadrupolares

3.1.1 Pentaquadrupolo

O espectrômetro de massas pentaquadrupolar EXTREL [Pittsburgh, PA][16] foi utilizado neste trabalho para realizar experimentos MS^2 e MS^3 seqüenciais no espaço. Este aparelho é composto basicamente por:

- Uma fonte de formação de íons que pode operar por ionização eletrônica (EI) ou por ionização química (CI).
- Cinco quadrupolos, sendo três analisadores de massas rf/DC (Q1,Q3 e Q5) e dois focalizadores de íons (q2 e q4) que operam somente com aplicação de voltagem na rádio freqüência (rf).
- Um multiplicador de elétrons usado como detector.

A pressão de fundo do aparelho é de aproximadamente $1x10^{-7}$ Torr, mantida por três conjuntos de bombas turbo-moleculares e bombas mecânicas.

As reações íon/moléculas seqüenciais são realizadas por experimentos MS^2 através da seleção de um íon no quadrupolo **Q1** e posterior reação deste com moléculas neutras inseridas em **q2**. Estas reações são realizadas com íons de energia translacional de aproximadamente 1 eV, valor este medido pela diferença de voltagem entre a fonte de ionização e **q2** e calibrado através da razão *m/z* 39/41 da reação do etileno/etileno ionizado.[33] Os produtos desta reação são analisados pela varredura de massas em **Q5**, enquanto **Q3** é mantido no modo "rf-only" como focalizador de íons. A introdução de um gás neutro em **q2** ocasiona o aumento da pressão nessa câmara e a atenuação do feixe de íons em aproximadamente 50 - 70%. Nestas condições ocorrem múltiplas colisões que favorecem os produtos de reações íon/molécula ao promover o resfriamento ("quenching") de produtos e reagentes.

Para experimentos MS^3, **Q3** é operado no modo rf/DC (filtro de massa), selecionando assim os produtos da reação íon/molécula, os quais são dissociados em **q4** por colisão com um gás inerte (por exemplo, argônio) com energia de colisão de 5 a 15eV. A energia de colisão é medida pelo ΔV entre a fonte de íons e o quadrupolo **q4**.

3.1.2 Monoquadrupolo

Foi utilizado, para os trabalhos de FIMS, um espectrômetro de massas Extrel (Pittsburg, PA) equipado com um quadrupolo de alta transmissão de ¾ de polegada. realizar experimentos MS^2 e MS^3 seqüenciais no espaço. Este aparelho é composto basicamente por:

- Uma fonte de formação de íons que pode operar por ionização eletrônica (EI) ou por ionização química (CI).
- Um quadrupolo, analisador de massas rf/DC
- Um multiplicador de elétrons usado como detector.

A pressão de fundo do aparelho é de aproximadamente $1x10^{-7}$ Torr, mantida por uma bomba turbo-moleculare e bombas mecânicas.

As varreduras de massas são realizadas por experimentos MS através do aumento linear dos potenciais rf/DC.

3.1.3 Qtof

O espectrômetro seqüencial híbrido quadrupolo, cela de colisão hexapolar, e o analisador por tempo de vôo (Qtof, Manchester, U.K.) foi utilizado neste trabalho para realizar experimentos MS e MS^2 seqüenciais no espaço. Este aparelho é composto basicamente por:

Duas fontes de formação de íons uma por eletrospray (ESI) e outra por ionização química à pressão atmosférica (APCI).

- Um quadrupolo (Q) com a capacidade de seleção de íons e dois focalizadores de íons que operam somente com aplicação de voltagem de rádio-freqüência.
- Uma cela de colisão hexapolar que opera somente com aplicação de voltagem na rádio freqüência (rf).
- Um analisador por tempo de vôo ortogonal que opera em alta resolução.
- Um MCP usado como detector.

A pressão do aparelho é de aproximadamente $1x10^{-7}$ Torr no Tof, mantida por três conjuntos de bombas turbo-moleculares e uma mecânica.

Para experimentos MS^2, **Q** é operado no modo rf/DC (filtro de massa), selecionando assim íons de interesse, os quais são dissociados no hexapolo **h** por colisão com um gás inerte (por exemplo, argônio) com energia de colisão de 5 a 30 eV. A energia de colisão é medida pelo ΔV entre a fonte de íons e o hexapolo **h**.

3.2 Simbologia dos experimentos de espectrometria de massas seqüencial

Cooks e col.[18] definiram a simbologia para descrever os diversos experimentos seqüenciais em MS de múltiplos estágios. Esta simbologia é descrita resumidamente na Figura 11.

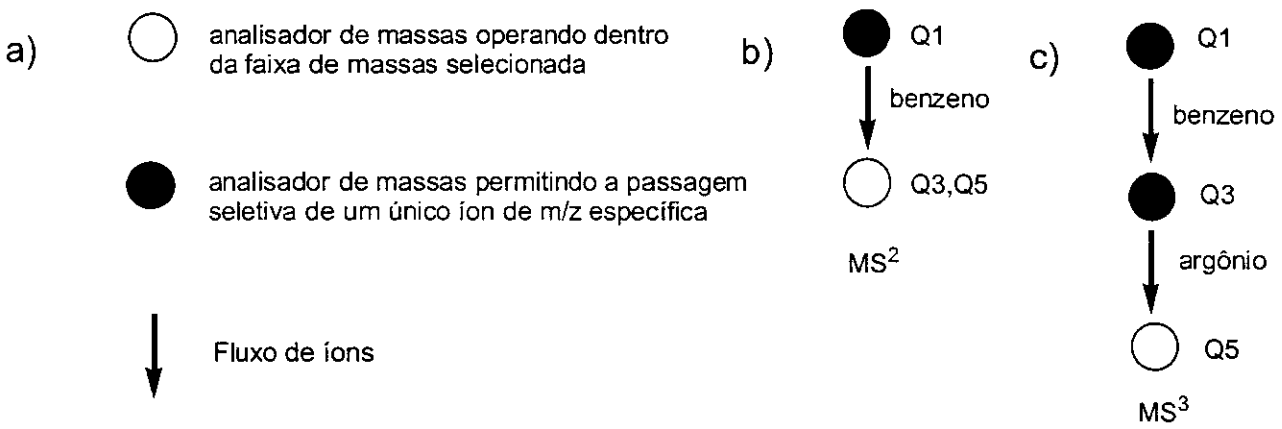


Figura 11 a) Representação dos símbolos usados em um experimento b) MS^2 e c) MS^3.

Na Figura 11a, o círculo vazio representa um analisador de massas no modo varredura rf/DC que analisa assim as razões *m/z* dos íons que por ele são transmitidos. O círculo cheio representa um analisador de massas selecionando um íon com uma determinada *m/z* e a seta representa o fluxo dos íons por uma câmara de colisão onde pode ocorrer, tanto ganho como perda de massas, decorrente da reação ou fragmentação. A Figura 11b mostra a representação para os experimentos MS^2, onde o quadrupolo **Q1** está sendo utilizado na seleção e o quadrupolo **Q3** ou **Q5** está analisando os produtos formados na reação com uma molécula neutra (benzeno, por exemplo) em **q2**. Para experimentos MS^3 (Figura 11c), o quadrupolo **Q1** seleciona o íon

reagente formado na fonte, o quadrupolo **Q3** seleciona o produto específico formado na reação com a molécula neutra no quadrupolo **q2**, e o quadrupolo **Q5** analisa os fragmentos ou produtos iônicos provenientes da dissociação (com argônio, por exemplo) ou reação em **q4**, respectivamente.

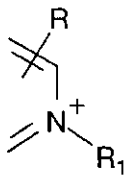
4 Resultados e Discussões

4.1 Cicloadição polar [4$^+$+2] com etil-vinil-éter: Uma reação íon-molécula para diagnóstico estrutural de cátions 2-azabutadienos

4.1.1 Introdução:

Reações de cicloadição são de grande importância na química na fase condensada por serem altamente utilizadas em síntese orgânica.[34] Nessas reações, duas moléculas insaturadas se combinam de forma regioseletiva e algumas vezes estereoseletiva para formar produtos cíclicos. Cicloadições são altamente seletivas, pelo tipo de grupos funcionais e geometria das moléculas, portanto este tipo de reação é um dos primeiros candidatos para reações classe-seletivas e para diagnósticos estruturais. Na fase gasosa, muitas reações de cicloadição polares vêm sendo observadas e seus mecanismos estudados,[35] mas o potencial deste tipo de reação íon-molécula para ions gasosos e moléculas neutras não tem sido totalmente explorado.[36]

Azabutadienos e análogos, geralmente sob catálise ácida (portanto na forma *N*-protonada), ou azabutadienos complexados com cátions, têm sido vastamente utilizados em cicloadições Diels-Alder neutras [4+2] e polares [4$^+$+2], e essas reações são etapas-chave em importantes estratégias para síntese de heterocíclicos.[37] Muitos azabutadienos na fase gasosa nas formas protonadas ou cationizadas são facilmente formados, utilizando dissociação induzida por ionização por elétrons de compostos nitrogenados. Nosso grupo mostrou um exemplo,[36e] onde o cátion 2-azabutadienila mais simples é formado por ionização por elétrons da piperidina e este íon reage através de cicloadição polar [4$^+$+2] com etil-vinil-éter seguida pela instantânea dissociação do cicloaduto formado através de perda de etanol formando o íon *N*-protonado 2,3-dehidro-piridíneo. Em outro trabalho,[36f] nós observamos que o cátion *N*-metil-2-azabutadienila reage similarmente, e de forma geral com vários alquil-enól-éteres (Esquema 9), e da mesma forma com análogos silonil- e tio-enol-éteres formando cicloadutos intactos por cicloadição polar [4$^+$+2].

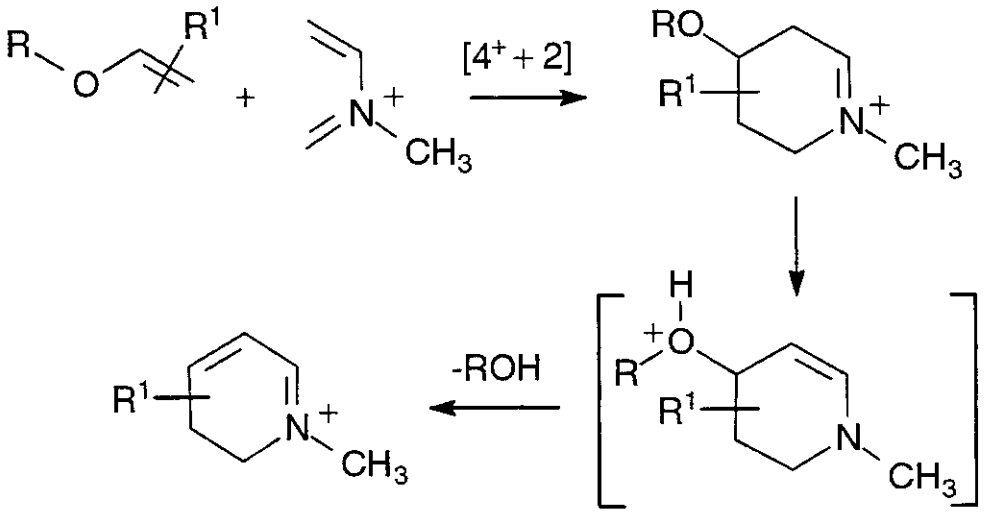


1

a; R = R_1 = H, *m/z* 56
b; R = H, R_1 = CH_3, *m/z* 70
c; R = 3-CH_3, R_1 = H, *m/z* 70
d; R = 4-CH_3, R_1 = H, *m/z* 70
e; R = H, R_1 = C_2H_5, *m/z* 84
f; R = H, R_1 = Ph, *m/z* 132
g; R = H, R_1 = COCN, *m/z* 109
h; R = H, R_1 = CO_2CH_3, *m/z* 114

Esquema 8 Estrutura geral dos cátions 2-azabutadienos estudados.

A dissociação induzida por colisão dos cicloadutos intactos formados pelo cátion *N*-metil-2-azabutadienila ocorre através de uma competição de dois caminhos: um por retro-Diels Alder (RDA) e a outro por perda dos neutros: ROH (para alquil-enóis-éteres), R_3SiOH (para silil-enol-éteres) ou RSH (para tio-enol-éteres) que são diagnósticas para essas classes de heterodienos.



Esquema 9 Reação de cicloadição entre o íon N-metil-2-azabutadieno com enol-éteres.

Os cicloadutos formados de enol-éteres acíclicos, que não têm em sua estrutura substituintes na dupla ligação formam sob condições de CID um produto por perda de R(Si)O(S)H, com *m/z* característica de 96. Para cicloadutos de enol-éteres com substituintes na dupla ligação (R^1), a massa do produto de perda de R(Si)O(S)H muda proporcionalmente para massa de *m/z* [R^1-H]. Enol-éteres endocíclicos também reagem abundantemente com o cátion *N*-metil-2-azabutadienila, mas se não for afetado por substituintes do anel,[36f] a dissociação dos cicloadutos é dominado por RDA. A partir desse modelo de reação-dissociação nós alcançamos um bom nível de informação estrutural dos enol-éteres e seus análogos, sendo que os isômeros de posição são facilmente distinguidos. Esta interessante e eficiente reação de cicloadição polar [4^++2] na fase gasosa foi portanto demonstrada como sendo classe-seletiva, tanto para a função química dos enol-éteres neutros como para diagnóstico estrutural de enol-éteres e seus análogos com enxofre e silício.[36f]

Nós reportamos nesse capítulo de tese a cicloadição polar [4^++2] com enol-éteres (selecionamos etil-vinil-éter por ser simples, volátil e facilmente obtido) como altamente seletiva e geral para os íons reagentes: os cátions 2-azabutadienila, que depois de reagidos com etil-vinil-éter perdem etanol neutro em condições de CID. Então através da reação seletiva à função, e a posterior dissociação como teste de diagnóstico estrutural, nós temos uma "assinatura química" dos íons 2-azabutadienila com *N*-H, *N*-alquila, *N*-arila. Cátions *N*-acil-2-azabutadienilas, mais comumente chamados cátions *N*-acilimínios, são exceções, pois formam cicloadutos intactos com etil-vinil-éter os quais se dissociam em condições de CID exclusivamente por RDA.

4.1.2 Parte Experimental

Os íons gasosos foram produzidos, reagidos, e seus produtos analisados por espectrometria de massas de duplo e triplo estágio (MS^2 e MS^3, respectivamente) em um espectrômetro de massas pentaquadrupolar ($Q_1q_2Q_3q_4Q_5$) da marca Extrel (Pittsburg, PA).[16] Os íons foram formados por EI à 70 eV da piperidina, *N*-metil-piperidina, 2-metil-piperidina, 3-metil-piperidina, *N*-etil-piperidina, *N*-fenil-piperidina, acetonitrila-1-oxopiperidina e o éster metílico do ácido carboxílico-1-piperidina. Para as reações íon-molécula MS^2, Q_1 foi utilizado para seleção de massa do íon de interesse para posterior reação em q_2 com etil-vinil-éter. A energia translacional dos íons foram acertadas para aproximadamente 1 eV. O espectro de massas dos produtos iônicos foram adquiridos utilizando Q_5, sendo que Q_3 e q_4 foram utilizados no modo focalizador de íons ("rf-only mode"). Foram utilizadas condições de múltiplas colisões em q_2, indicadas pela atenuação do feixe de íons de 50-70%, as quais aumentam o rendimento das reações e promovem o resfriamento dos reagentes e produtos.[19]

Os experimentos MS^3,[19] foram executados selecionando por *m/z* os produtos de interesse formados em q_2 (através de Q_3), para a dissociação induzida por colisão (CID) a 15 eV com argônio e Q_5 foi utilizado para adquirir os espectros. A energia de 15 eV foi escolhida como a diferença de energia entre a fonte de íons e o quadrupolo de colisão q_4. As pressões indicadas em cada região foram tipicamente 2×10^{-6} (fonte de íons), 8×10^{-6} (q_2) e 8×10^{-5} (q_4) Torr, respectivamente. Foi utilzado o programa GAUSSIAN98[38] para cálculo da energia total das moléculas utilizadas nos experimentos. O método de cálculo foi o híbrido de HF/DFT ("Hartree-Fock/Density-funcional-theory") chamado Becke3LYP[39] com as bases 6-311+G(d,p).

4.1.3 Resultados e Discussão

4.1.3.1 Reações Íon-molecula:

Os experimentos de reação íon-molécula foram realizados utilizando um espectrômetro de massas pentaquadrupolar ($Q_1q_2Q_3q_4Q_5$),[19] onde oito cátions 2-azabutadienos foram formados por EI à 70 eV com os respectivos precursores (veja secção experimental para detalhes), selecionados por massa em Q_1, e então reagidos sob praticamente mesmas condições com etil-vinil-éter em q_2, sendo que Q_5 é utilizado para a obtenção dos espectros de massas. A Tabela 1 apresenta os principais produtos e rendimentos (abundâncias relativas) para as reações.

Tabela 1 Principais produtos iônicos observados no espectro de massas para reação dos cátions 2-azabutadienilas 1a-h com o etil-vinil-éter neutro.

	Produtos iônicos *m/z* (abundância em % relativa)		
Ion[a]	Cicloaduto[b]	[Cicloaduto – C_2H_5OH[c]]$^+$	CH_2=CH-O$^+$ - $(C_2H_5)_2$[d]
1[a]	None	82(100)	101(20)
1b	142(100)	96(7)	101(58)
1c	142(40)	96(1)	101(100)
1d	142(40)	-	101(100)
1e	156(100)	-	101(50)
1f	204(90)	-	101(100)
1g	181(60)	-	101(100)
1h	186(4)	-	101(10)

[a] Para as estruturas dos íons 1a-h, veja texto. [B] Veja Esquema 2. [c]Veja Esquema 3. [d]Etil-vinil-éter etilado, veja texto e Ref. 37f. [e]Ions 1g (perda de HCN para formar o íon de *m/z* 82) e 1h (perda de CO_2 para formar o íon de *m/z* 70) se dissociam facilmente sob condições de colisão muito amenas próximo de 1eV que é utilizada para realizar-se reações íon-molécula. O fragmento de *m/z* 70 é o produto principal (abundância de 100%) no espectro de massas dos produtos utilizando 1h como reagente

Note que os cátions 2-azabutadienos tem diferentes grupos substituintes com diferentes efeitos doadores e retiradores de elétrons sobre o íon reagente, e isso permitiu o estudo do efeito dos substuintes na reatividade dos íons sobre a cicloadição polar [4^++2]. Aqui devemos enfatizar que embora nós assumimos que a reação dos cátions 2-azabutadienos com enol-éteres seja uma cicloadição concertada, em parte por analogia com estudos desse tipo de reação com 2-azabutadienos em solução,[37,39] o ponto se temos uma reação realmente concertada ou se é por etapas ainda está aberto a discussão.

Normalmente, em cicloadição de compostos com camada eletrônica fechada existe barreiras de energia que podem ser ultrapassadas pela conversão de energia cinética para energia interna durante as colisões. Em um mecanismo de duas etapas, como é o nosso caso, existe uma barreira de energia para o estado de transição do movimento do intermediário de cadeia aberta toda *trans* para a cadeia fechada (Figura 15) com conformação gauche, mas como esta barreira é relativamente baixa, ela deve ser compensada pela alta exotermicidade da primeira etapa da adição.

De uma forma geral, o que realmente importa para a aplicação do diagnóstico estrutural enfocado neste capítulo é que os produtos cíclicos são formados e e favorecem uma perda de ROH seletiva (veja Esquema 10) aos reagentes utilizados, e que, se o processo por etapas dominar, a estrutura aberta e a estrutura fechada como anel não competem entre elas, mas são ligadas por um caminho de forma consecutiva e sem mínimos locais (veja Figura 15 e a secção de cálculos teóricos).

A Figura 12 exemplifica para **1e**, e como para todos os cátions 2-azabutadienilas estudados neste trabalho (o qual inclue *N*-H-, *N*-alquil-, *N*-fenil-, e íons *N*-acil-substituídos), que quando reagindo com etil-vinil-éter forma os supostos cicloadutos polares [4^++2] **2** (Esquema 11). O principal produto secundário é de *m/z* 101 (Tabela 1). Este íon, etil-vinil-éter etilado, é um produto secundário de transferência de próton para o etil-vinil-éter.[40]

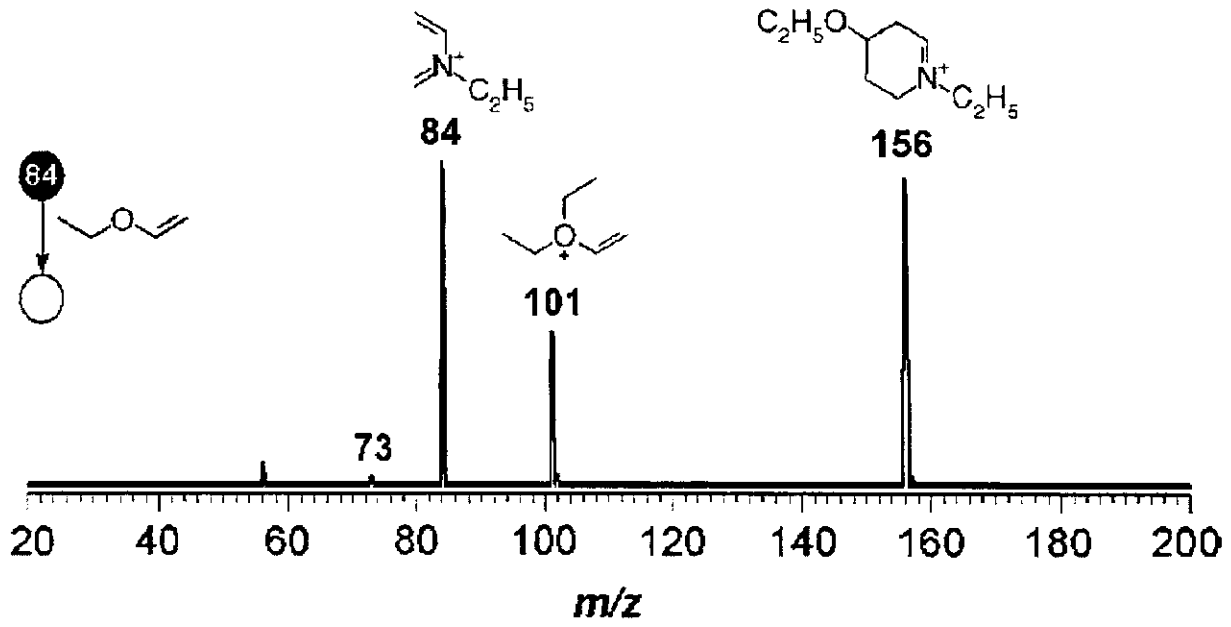
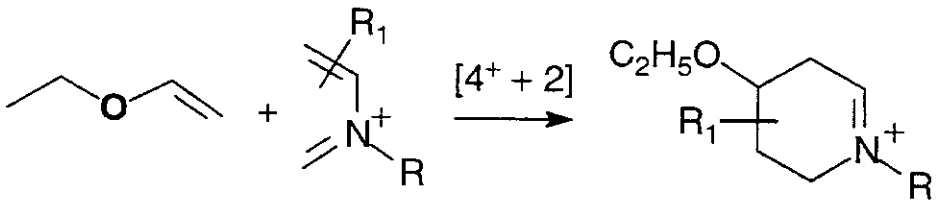


Figura 12 Espectro de massas MS^2 dos produtos da reação do cátion *N*-etil-2-azabutadienila **1e** com etil-vinil-éter. Note o abundante produto de cicloadição polar [4^++2] **2e** de *m/z* 156, o produto de transferência de próton (etil-vinil-éter protonado de *m/z* 73), e o produto secundário por transferência de próton para o etil-vinil-éter de *m/z* 101 (etil-vinil-éter etilado, veja Ref. 11).

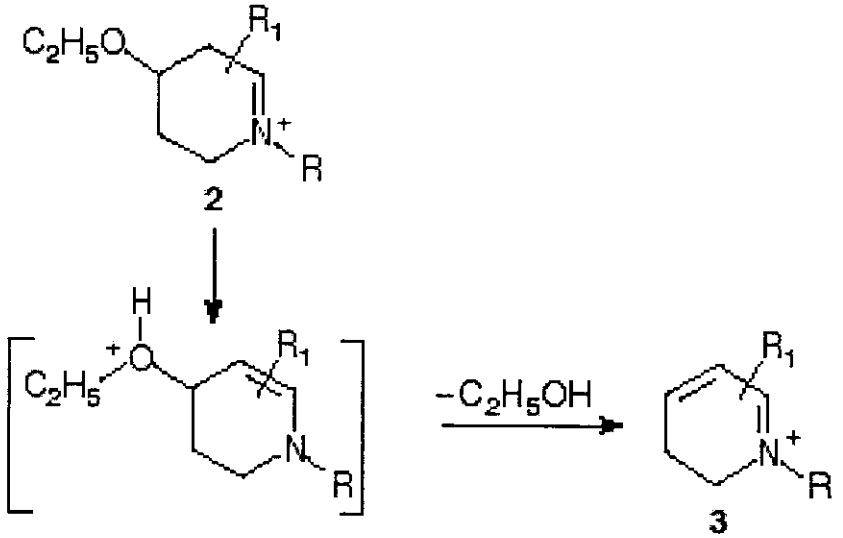
O íon *N*-carboximetil-substituído **1h** também forma o aduto **2h** de *m/z* 186, mas em uma extensão limitada (Tabela 1), devido pelo menos em parte, se não exclusivamente, pela sua alta labilidade através de CID a qual ocorre principalmente por perda de CO_2. O cátion 2-azabutadienila mais simples **1a** reage fortemente por cicloadição polar [4^++2],[36f] mas o seu cicloaduto intacto **2a** de *m/z* 128 não é observado. O cátion **2a** se dissocia totalmente por perda de etanol (Esquema 12) para formar **3a** de *m/z* 82 (Tabela 1).[36f] A perda de etanol também ocorre em menor extensão para os cicloadutos **2b** e **2c** em condição de reação íon-molécula que consiste em energias de colisão próximas à 1 eV, porém essa perda de etanol é suprimida para os outros cicloadutos.



1 **2**

a; R = R_1 = H, *m/z* 128
b; R_1 = H, R = CH_3, *m/z* 142
c; R_1 = 3-CH_3, R = H, *m/z* 142
d; R_1 = 4-CH_3, R = H, *m/z* 142
e; R_1 = H, R = C_2H_5, *m/z* 156
f; R_1 = H, R = Ph, *m/z* 204
g; R_1 = H, R = COCN, *m/z* 136
h, R_1 = H, R = CO_2CH_3, *m/z* 140

Esquema 10 Reação de cicloadição entre os íons 2-azabutadieno com etil-vinil-éter.



3

a; R = R_1 = H, *m/z* 82
b; R = CH_3, R_1 = H, *m/z* 96
c; R = H, R_1 = 3-CH_3, *m/z* 96
d; R = H, R_1 = 4-CH_3, *m/z* 96
e; R = C_2H_5, R_1 = H, *m/z* 110
f; R = Ph, R_1 = H, *m/z* 158

Esquema 11 Dissociação do cicloaduto formando 2 por perda de etanol.

4.1.3.2 Elucidação Estrutural

Para testar se nas reações íon-molécula, são formados adutos cíclicos ou acíclicos, foram realizados experimentos MS^3 nos quais os supostos cicloadutos **2** foram selecionados por massa em Q_3 e então dissociados por 15eV de energia de colisão com argônio em q_4, sendo o Q_5 utilizado para adquirir o espectro de massas sequencial de CID. Como exemplificado, na Figura 2 **2c-f** dissociam por RDA, e mais interessantemente, pela perda característica de moléculas etanol com massa 46 u formando íons 2,3-dihidropiridíneos 3 (Esquema 12). A perda de etanol pode ser facilmente racionalizada somente para produtos cíclicos,[36f] e esta perda serve, portanto, como diagnóstico para estruturas cíclicas.

Em contraste, a Figura 13 exemplifica que para os cicloadutos intactos **2g** e **2h**, sob condições de CID, se dissociam exclusivamente por RDA. Os adutos **2g** e **2h** foram formados a partir dos cátions *N*-carboxiciano (**1g**) e *N*-carboximetila. Em solução, íon *N*-acilimínios[41] são vastamente utilizados em reações de condensação de Mannich, sendo os grupos acilas[42] responsáveis pela ativação sobre a adição nucleofílica no carbono vinílico vicinal. Portanto, íons **1h** e **1g** deveriam se comportar mais pronunciadamente como íons *N*-acilimínios (não tipicamente como cátions 2-azabutadienilas), e por isso eles deveriam reagir com etil-vinil-éter pela adição simples para formar adutos acíclicos. Já era esperado que estes adutos acíclicos, sob condições de CID, dissociassem predominantemente, se não esclusivamente, pela retro-adição. Outra possibilidade seria que os grupos *N*-acila competem mais favoravelmente por próton com os grupos etoxilas então suprimindo a perda de etanol (Esquema 13). Os adutos cíclicos com *N*-acilas protonados **2g,h** deveriam falhar em dissociar por perda de etanol sob condições de CID, sendo a retro-adição dominante. A última alternativa tem suporte de cálculos teóricos (veja secção de cálculos).

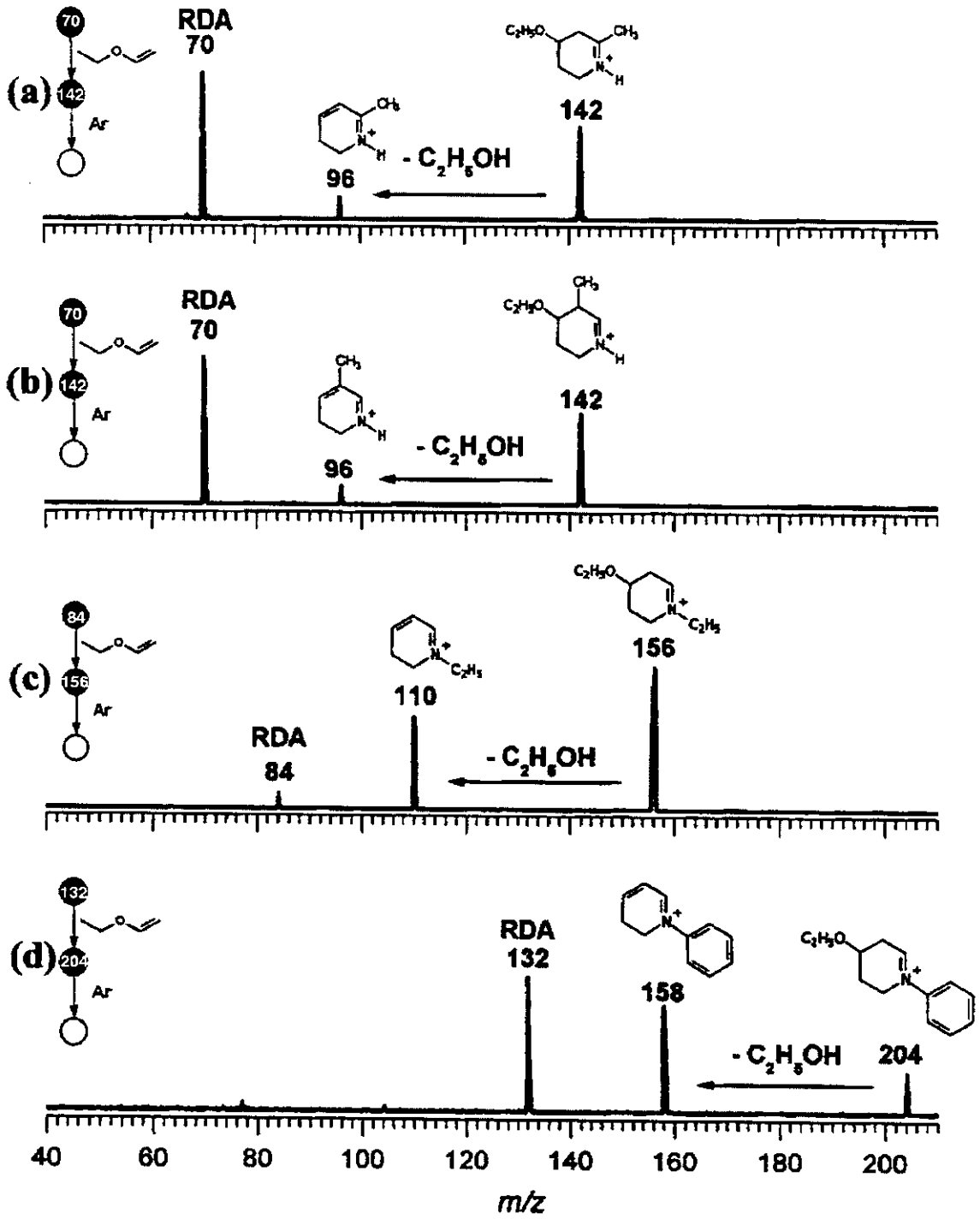


Figura 13 Espectro de massas de triplo estágio MS^3 utilizando 15 eV de energia de colisão com argônio dos cicloadutos intactos por cicloadição polar [4^++2], formados pela reação de etil-vinil-éter com cátions 2-azabutadienilas (a) **1c**, (b) **1d**, (c) **1e** e (d) **1f**. Note as dissociações características por RDA e perda de etanol mostradas para todos os quatro cicloadutos exemplificados.

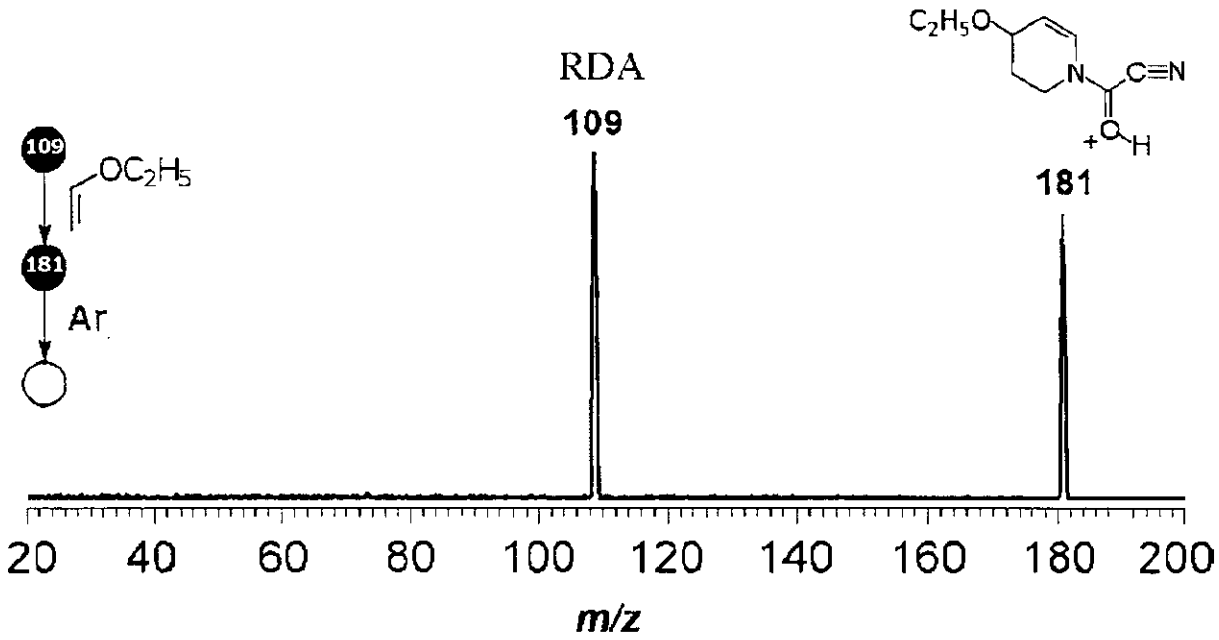
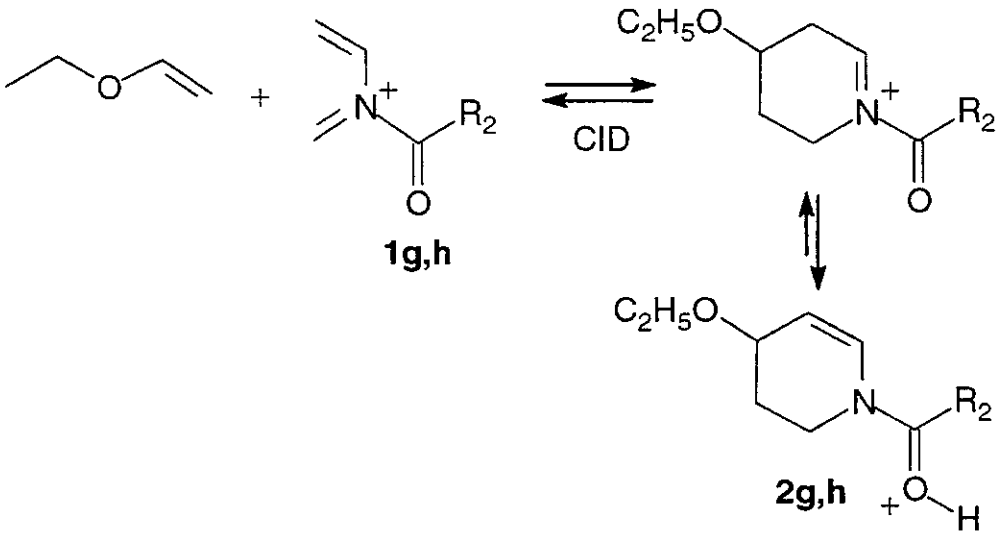


Figura 14 Espectro de massas de triplo estágio MS^3 utilizando 15 eV de energia de colisão com argônio do aduto intacto **2g** formados pela reação de etil-vinil-éter com o cátion 2-azabutadienila **1g** (um íon N-aciliminio) de m/z 109. Note a discussão exclusiva do íon **2g** por RDA, formando o íon m/z 109 permitido pela provável protonação no grupo *N*-acila.



Esquema 12 Proposta de equilíbrio entre estruturas 2g,h para os produtos de cicloadição

4.1.3.3 Cálculos Teóricos

A Figura 15 mostra o diagrama da superfície de energia calculado, utilizando o método Becke3LYP com as bases 6-311++G(d,p) para as reações dos cátions 2-azabutadienilas **1e** e **1g** com etil-vinil-éter. A cicloadição é a reação mais favorecida para o íon *N*-etil-substituído **1e** (Figura 4a), que mostrou exotermicidade de –45,8 kcal/mol em comparação com os reagentes, enquanto a adição simples é menos favorecida com uma exotermicidade de somente –11,9 kcal/mol. Desta maneira **1e** tem mais características de cátion 2-azabutadieno como um dieno positivamente carregado do que como um íon *N*-acil-imínio. Seu produto de cicloadição **2e**, após uma transferência intramolecular de próton para o grupo etoxila, forma um íon instável o qual durante a otimização de geometria perde espontaneamente o grupamento etanol para formar o produto iônico 2,3-dihidropiridíneo num processo exotérmico de -40,6 kcal/mol no total.

O estado de transição para (TS,"transition-state") a transferência de próton interna no cicloaduto **1e,** não foi estimado, mas como mostrado para **2b**,[36f] a energia de ativação fica um pouco acima dos reagentes; então a perda de etanol deve ser induzida por colisão e compete com a RDA. O íon *N*-acil-imínio **1g** (o cátion 2-azabutadienila *N*-carboxiciano) apresenta um espectro de massas parecido com o visto na Figura 4b: a cicloadição muito mais favorecida termodinamicamente (-52,1 kcal/mol) que a adição simples (-36,9 kcal/mol).

Assim o cicloaduto **2g**, através de uma transferência interna de próton para o grupo etóxido, forma um íon instável que perde etanol num processo exotérmico (-48,4 kcal/mol). A maior diferença para este cicloaduto *N*-acila é relacionada com outra possibilidade de transferência de próton para o grupo *N*-carboxiciano. Tal transferência interna de próton forma um íon que está –54,4 kcal/mol abaixo dos reagentes, o qual é portanto –2,3 kcal/mol mais estável que o isômero *C*-protonado.

XXXXXXXXEmbora não tenham sido estimado os estados de transição para as transferências de próton, eles podem ser estimados, a grosso modo, a partir dos cálculos elaborados para **2b**,[36f] daí é razoável assumir a partir de estabilidades termodinâmicas e predizer que os TSs para transferência de próton prevalece para o

cicloaduto **2g**, o qual, sob condições de CID, suprime a perda de etanol, favorecendo a dissociação por RDA.

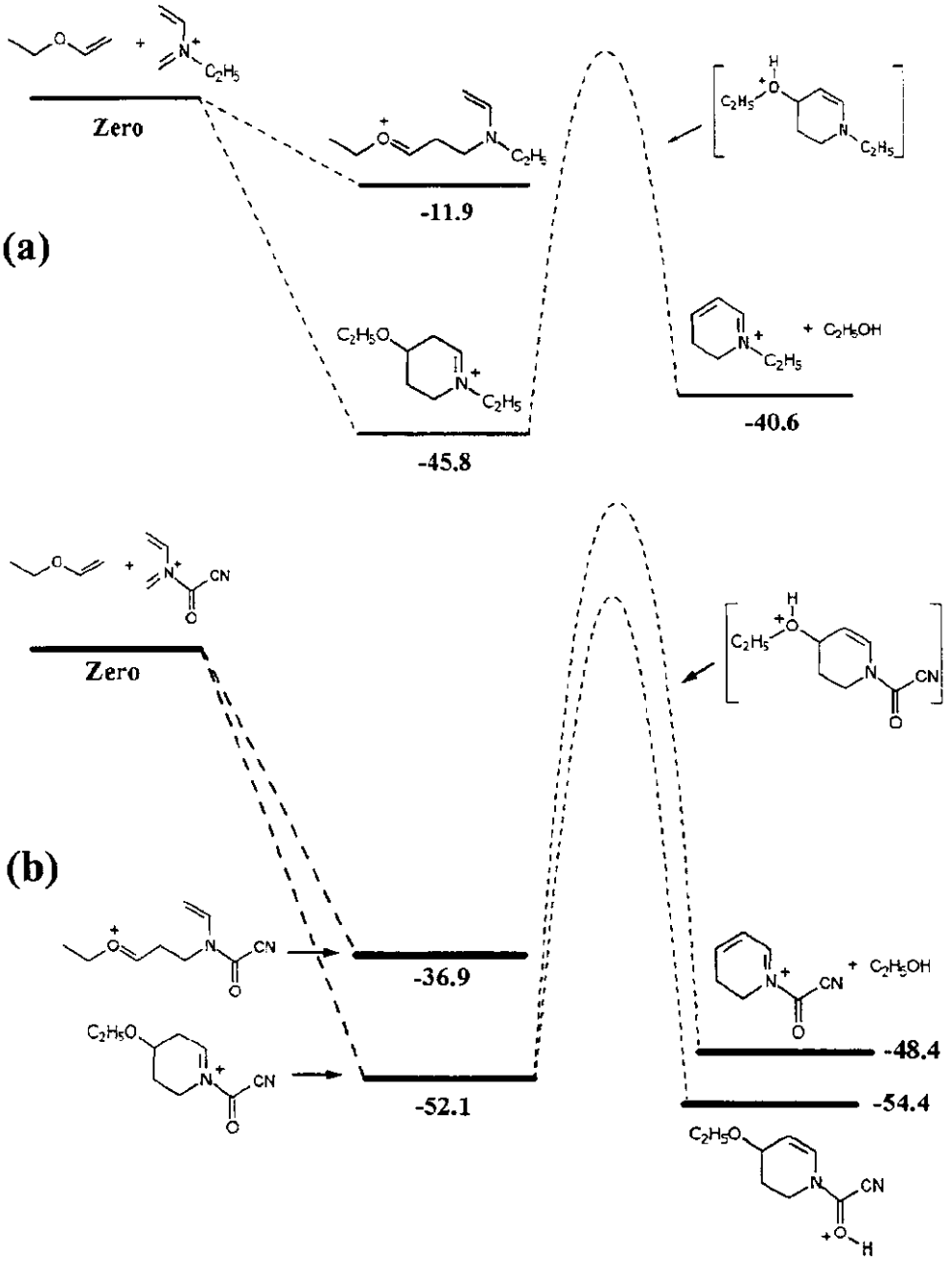


Figura 15 Diagrama de energia potencial Becke3LYP/6-311++G(d,p) para as reações de (a) *N*-etil e (b) *N*-carboxiciano 2-azabutadienila com etil-vinil-éter. As energias são dadas em kcal/mol. As energias dos estados de transição para as transferências de próton não foram calculadas, mas elas foram estimadas, a grosso modo, a partir do cicloaduto análogo *N*-metil **1b**; veja referência 6.

4.1.4 Conclusão

Cátions 2-azabutadienilas gasosos reagem prontamente com etil-vinil-éter (como demostrado previamente,[36f] também com uma variedade de outros enol-éteres e seus análogos de silício e enxofre) por cicloadição polar [4^{+}+2]. Todos os cicloadutos dos cátions *N*-H, *N*-alquila e *N*-arila testados, dissociaram-se sob condições de CID por RDA e por uma perda seletiva de etanol. Íons *N*-acilimínios (e provavelmente qualquer outro cátion 2-azabutadienila com grupos *N*-substituídos relativamente ácidos) reagem por cicloadição com etil-vinil-éter, porém sob condições de CID, a perda de etanol é suprimida para favorecer a transferência de prótons intramolecular para o grupo *N*-acila. Portanto a perda de etanol dos cicloadutos [4^{+}+2] polares intactos funciona como um teste diagnóstico estrutural (ganho neutro de 72u seguido de uma perda neutra de 46 u), uma "assinatura química", dos cátions *N*-H, *N*-alquil e *N*-aril 2-azabutadienilas proporcionada pela reação íon-molécula/CID. Os íons *N*-acilimínios são exceções e seus cicloadutos após a reação com etil-vinil-éter se dissociam exclusivamente por RDA.

4.2 Mono e Dupla Cicloadição Diels-Alder polar [4+2$^+$] de íons acílios com *O*-heterodienos

4.2.1 Introdução:

Íons acílios são espécies iônicas importantes e comuns em solução[43] e em fase gasosa.[44] Quando estes íons são isolados no ambiente a alto vácuo de um espectrômetro de massas, eles são estáveis e com longo tempo de vida; portanto da mesma forma como os seus correspondentes sais iônicos em solução,[45] íons acílios gasosos podem ser facilmente formados e isolados de forma que podemos inverstigar suas propiedades intrínsecas e reatividade química. Estudos recentes de espectrometria de massas vem estudando sistematicamente a reatividade intrínseca de íons acílios e tem demonstrado a aplicação sintética e analílica de suas reações na fase gasosa.[36f,46,47,48, ,49,50,51,52]

Íons acílios gasosos reagem através cetalização com dióis e análogos[46] e transacetalização com acetais contendo anéis de seis membros.[47] Nos acetais com anéis de sete membros, os íons acílio reagem através de contração de anel,[48] com epóxidos, ocorre a *O*-acetilação seguida por uma expansão de anél que forma íons 1,3-dioxolanílios.[49] Íons acílios ativados por halogênios X-CO$^+$ (F > > Cl > Br) promovem a carbonilação de benzeno.[50] Íons acílios gasosos também reagem com amino-ácidos neutros por derivatização *N*-terminal seguido pela dissociação que produz íons b_1 estruturalmente modificados.[51] Com aminas (M), o cátion benzoila PhCO$^+$ produz íons característicos [M + PhCO]$^+$, [M - NH_2]$^+$ e [PhCONH_3]$^+$ com distribuições características, dependendo do substituinte da amina.[52] Em solução, as cicloadições são de grande utilidade em síntese, e vêm sendo objetos de vários estudos teóricos e mecanísticos.[34b] Embora cicloadição ocorra eficientemente para muitos reagentes apolares e não-carregados, dienos e dienófilos positivamente e negativamente carregados são também utilizados como reagentes ativados em reações chamadas de cicloadições polares.[53] Na fase gasosa, cicloadições polares também são observadas, e seus mecanismos estudados.[35h]

Íons acílios na fase gasosa ($R\text{-}C^{+}=O$) se mostraram fortemente eletrodeficientes e portanto quando reagidos com *O*-heterodienófilos ativados, formam íons 2,5-dihidropirílios via cicloadições polares Diels-Alder [4+2^{+}].[36a,54] Recentemente foram observadas evidências adicionais para a formação de cicloadutos quando se reage dienos contendo o grupo 1-acetóxido com íons acílios. Após a cicloadição ocorre a aromatização via perda de uma molécula neutra de ácido acético formando o íon pirílio aromático.[55] Cicloadições polares [4+2^{+}] análogas foram observadas na reação de íons nitrílios e imônios[35] de compostos carbonílicos protonados e metilados,[56] com diversos dienos.

Reações de cicloadição em solução tem sido muito utilizadas para síntese de heterocíclicos via heterodienos.[34] Este trabalho trata de reações na fase gasosa de íons acílios (*O*-heterodienófilos) com *O*-heteodienos, ou seja, compostos carbonílicos α,β-insaturados. Foi observado mono cicloadição e também uma dupla cicloadição Diels-Alder polar [4+2^{+}], nunca reportada na literatura. A mono cicloadição ocorre na ligação $C^{+}=O$ do íon acílio para formar o íon 1,3-dioxinílios estabilizados por ressonância. A dupla cicloadição é regioseletiva, e ocorre na dupla ligação C=C do cicloaduto de mono cicloadição em uma cicloadição polar à longa distância da carga ("charge-remote type").[57]

4.2.2 Parte Experimental

Foram utilizados neste trabalho experimentos de espectrometria de massas de duplo (MS^2) e triplo (MS^3) estágios, realizados em um espectrômetro de massas pentaquadrupolar ($Q_1q_2Q_3q_4Q_5$)[16] da marca Extrel (Pittsburg, PA, EUA). Foram formados íons acílios gasosos, que por sua vez foram reagidos com compostos carbonílicos α,β-insaturados e após isto foi utilizada mais uma etapa de espectrometria de massas para caracterizar estruturalmente os produtos iônicos formados. Assim, os precursores apropriados foram utilizados para formar os íons reagentes por ionização eletrônica a 70 eV formando **1** e **3** (utilizando metil-fenil-cetona), **2** (utilizando etil-vinil-cetona), **4** (utilizando tetra-metil-uréia) e **5** (utilizando tetra-metil-tiouréia).

As reações foram realizadas através de experimentos MS^2 nos quais os íons acílios de interesse foram selecionados, utilizando o quadrupolo Q_1 para posteriores reações no quadrupolo q_2 com os compostos carbonílicos neutros. A energia translacional dos íons foi acertada para aproximadamente 1 eV utilizando a reação entre etileno neutro/ etileno ionizado, calibrando a razão entre os sinais de m/z 39/41.[33] O quadrupolo Q_5 foi utilizado no modo DC/rf para adquirir os espectros de massas enquanto o quadrupolo q_4 foi utilizado no modo rf como focalizador de íons (utilizando somente voltagem alternada em banda larga de rádio frequência). Foram utilizadas também nos experimentos de reações íon/molécula as condições de múltiplas colisões em q_2, que causam um típico efeito de atenuação do feixe de íons reagentes de 50 a 70%. Estas condições causam um resfriamento colisional dos reagentes e dos produtos.[19]

Para os experimentos MS^3,[18] os produtos iônicos formados em q_2 foram selecionados por massa em Q_3 e posteriormente dissociados em q_4 com uma energia de colisão de 15 eV com argônio ("CID, collision-induced-dissociation";dissociação induzida por colisão), e Q_5 foi utilizado para adquirir os espectros. A energia de colisão de 15 eV foi ajustada como a diferença de energia entre a fonte de íons e os quadrupolos de colisão. As pressões indicadas em cada diferente região foram tipicamene 2×10^{-6} (fonte de íons), 8×10^{-6} (q_2) e 8×10^{-5} (q4) torr (1 torr = 133,3 Pa).

As geometrias otimizadas e a energia das conformações idealizadas foram obtidas por cálculos teóricos sem restrição de simetria utilizando Becke3LYP,[39] um híbrido funcinal DFT/HF e o conjunto de bases 6-311++G(d,p) implementados no Gaussian98.[38]

4.2.3 Resultados e Discussão

4.2.3.1 MS^2

Foram selecionados quatro íons acílios (Ac^+, $R\text{-}C^+{=}O$): o cátion acetila **1** (R = CH_3), cátion acrilila **2** (R = $CH_2{=}CH$), cátion benzoila 3 (R = fenila) e o cátion dimetil carbamila **4** (R = $N(CH_3)_2$), e três reagentes neutros *O*-heterodienos comuns (M, $R^1(CO)C(R^2){=}CH_2$), chamados acroleína (R^1, R^2 = H), metacroleína (R_1=H, $R_2{=}CH_3$) e etil-vinil-cetona ($R^1 = C_2H_5$, R^2 = H). A Tabela 2 apresenta os espectros de massas dos produtos correspondentes a reação dos íons acílios com *O*-heterodienos neutros e a Figura 16 mostra o exemplo da reação de **4** com metacroleína.

Tabela 2 Principais produtos iônicos (*m/z* com abundâncias relativas (%) em parênteses) para reação dos íons acílios selecionados por massas (Ac^+) **1-4** com compostos carbonílicos α,β-insaturados (M).

Reagente	Acroleína	Metacroleína	Etil-vinil-cetona
Íon	MAc^+, M_2Ac^+, MH^+, M_2H^+	MAc^+, M_2Ac^+, MH^+, M_2H^+	MAc^+, M_2Ac^+, MH^+, M_2H^+
1	99(4),167(15),57(3),113(100)	113(14),183(6),71(36),141(100)	none, none, 85(75), 169(100)
2	111(14),155(26),57(1),113(100)	125(20),195(100)[a],none,141(65)	139(100), 223(9), 85(1), 169(36)
3	161(5),217(36),57(3),113(100)	175(1),245(100),none,141(51)	189(100), none, 85(2), 169(80)
4	128(100),184(20),none,113(1)	142(100),212(20),none,141(25)	156(100), 249(20), none, 169(9)

[a] Na reação de **2** com metacroleína, a perda de neutron (100u) do íon M_2Ac^+ de *m/z* 195 ocorre com alto rendimento para formar um produto de *m/z* 95

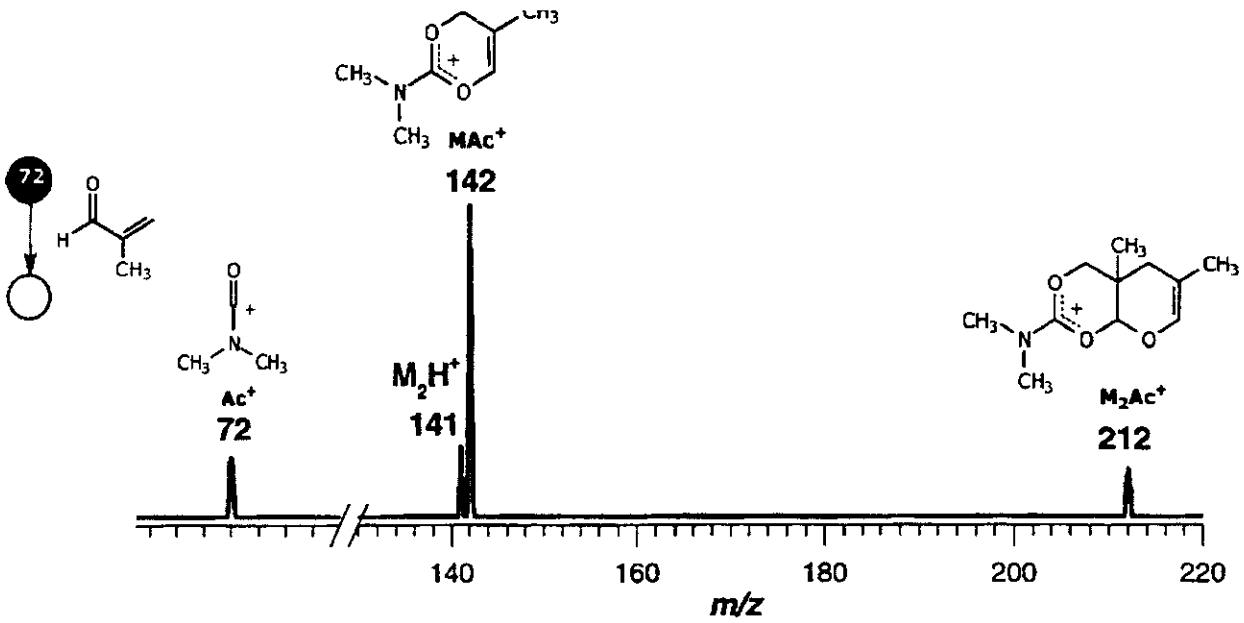
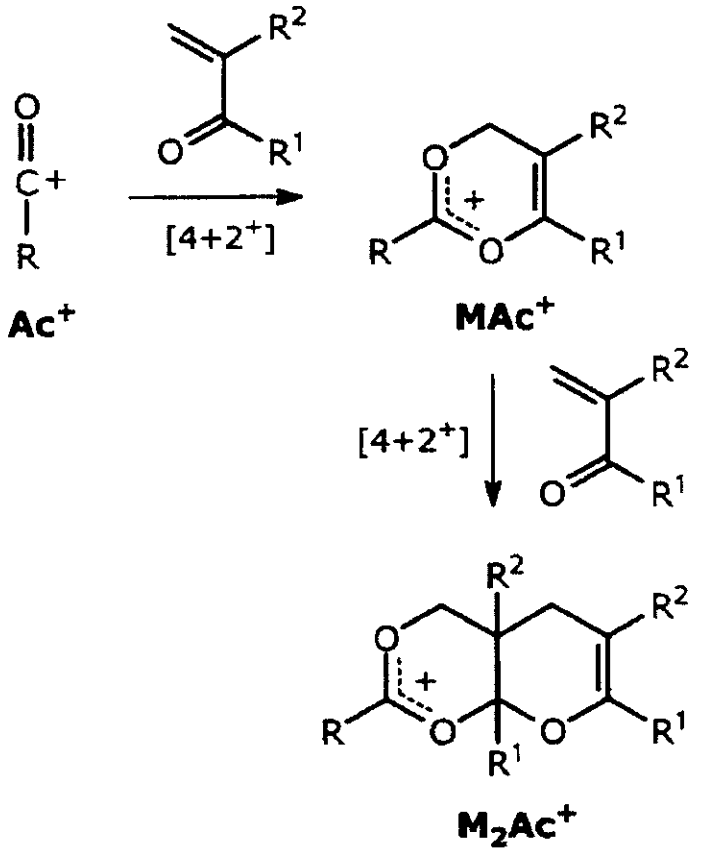


Figura 16 Espectro de massas de duplo estágio MS^2 dos produtos da reação do íon acílio **4** com metacroleína.

Foram utilizadas condições de múltiplas colisões, onde os três principais produtos observados foram: mono cicloadição polar Diels-Alder [4+2$^+$] (MAc^+) seguida de uma segunda cicloadição (M_2Ac^+) e transferência de próton que forma MH^+ e subseqüentemente M_2H^+. Como evidenciado pela dissociação característica dos cicloadutos marcados isotópicamente com ^{18}O e predito pelos cálculos teóricos (veja secção de cálculos deste capítulo), a mono cicloadição ocorre, como esperado,[36] na ligação dupla C^+=O do íon acílio para formar o os íons 1,3-dioxinílios, estabilizados por ressonância, o qual sofre a dupla cicloadição específica na ligação C=C com a regioseletividade mostrada no Esquema 13. Como o sítio de carga no mono cicloaduto é consideravelmente estabilizada por ressonância, a segunda adição é direcionada para a dupla ligação C=C, a qual é ativada pelo substituinte carregado positivamente por efeito retirador de elétrons. A reação pode ser considerada, portanto, como uma reação do tipo distante da carga.[57]



Esquema 13 Reação de um íon acílio com uma cetona ou aldeído α,β-insaturado

Como exemplificado para **4**, de *m/z* 72 (Figura 16), a reação de mono cicloadição com metacroleína forma um produto muito abundante MAc^+ de *m/z* 142, o qual reage novamente com uma segunda molécula de metacroleína pela dupla cicloadição formando o íon M_2Ac^+ de *m/z* 212. O principal produto de transferência de próton é M_2H^+ de *m/z* 141. A transferência de prótons que resulta no *O*-hererodieno protonado (MH^+) pode ocorrer através de reações secundárias dos íons reagente e/ou dos seus produtos com as moléculas neutras **M**, devido às múltiplas colisões que os íons sofrem dentro da câmara de colisão quadrupolar. MH^+ reage eventualmente com outra molécula **M** para formar o dímero ligado por prótons M_2H^+.

Os quatro íons acílios testados reagiram com acroleína e metacroleína em extensões variadas por ambas mono e dupla cicloadições (Tabela 2). Quanto à tendência de reagir por cicloadição sobre transferência de prótons: **1** é o menos reativo, **2** e **3** apresentam uma reatividade intermediária e **4** é o mais reativo. Com etil-vinil-

cetona, **1** reage exclusivamente por transferência de próton, **3** forma somente o mono cicloaduto e **2** e **4** reagem extensivamente por mono e dupla cicloadição.

4.2.3.2 MS^3

As estruturas dos supostos cicloadutos de mono e dupla cicloadições foram investigadas adquirindo seus espectros de massas seqüenciais de triplo estágio. Como observado freqüentemente para cicloadutos de íons acílios com dienos,[36] os mono cicloadutos se dissociam exclusivamente por retro-adição para retornar ao íon acílio precursor. A dissociação dos cicloadutos **2** e **4** de dupla adição (Figura 17(c)) com etil-vinil-cetona também ocorre exclusivamente por retro-adição, formando o mono cicloaduto e então o íon acílio por perda sequencial de duas moléculas de etil-vinil-cetona.

Por outro lado, a dissociação dos adutos de dupla cicloadição com metacroleína e acroleína foram mais ricas em informação e elucidativas estruturalmente, como exemplificado na Figura 17(a) e 17(b) para os cicloadutos formados por **2**. As dissociações ocorrem principalmente por retro-adição que reforma o íon **2** de *m/z* 55 e exceto para **1** (Figuras 17(a) e 19(b)), esta dissociação é aparentemente direta, isto é, ela ocorre com muito pouco ou nenhum intermédio do mono cicloaduto. A dissociação também ocorre por um caminho dissociativo único envolvendo a perda de uma molécula neutra de 100 u formando fragmentos iônicos de *m/z* 67 e *m/z* 95. Esta dissociação (Esquema 14) é estruturalmente elucidativa se for racionalizada somente com o cicloaduto de dupla cicloadição polar [4 + 2^+] formado quando a segunda cicloadição ocorre na dupla ligação C=C do anel (Esquema 13).

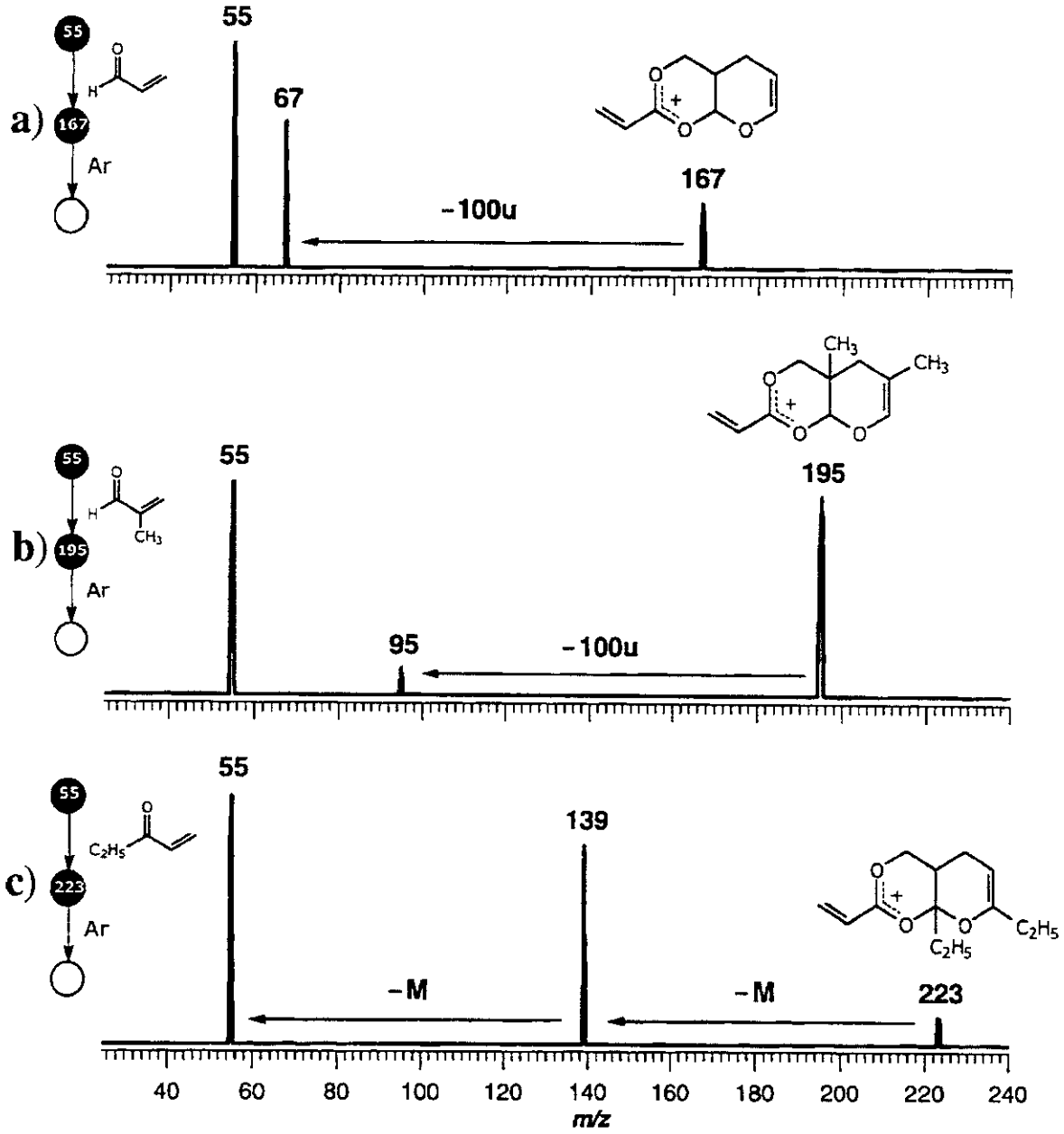
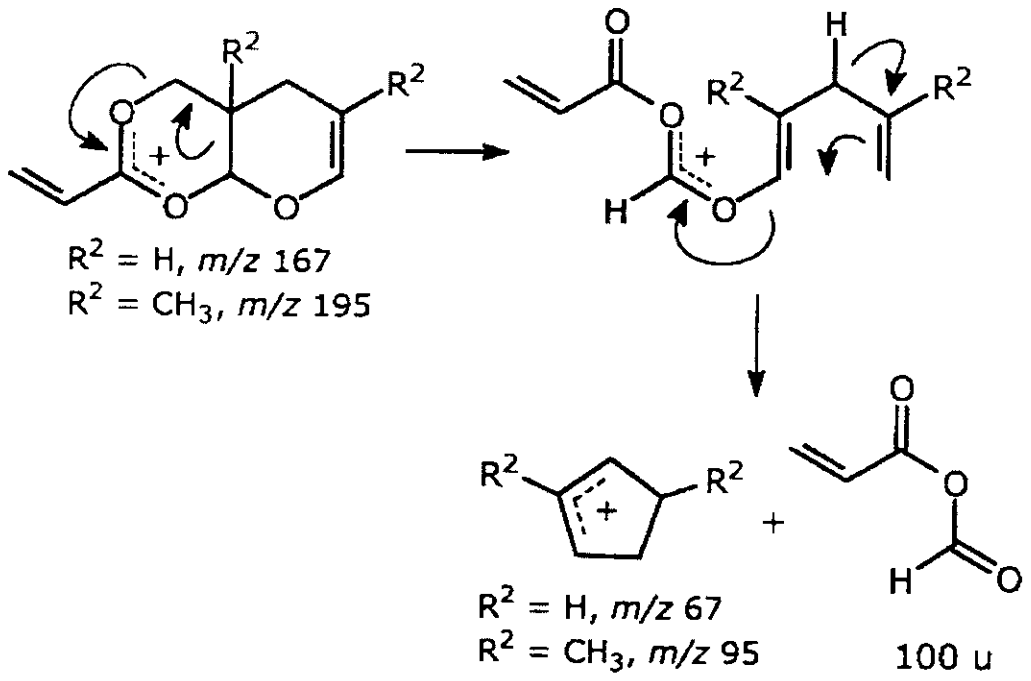
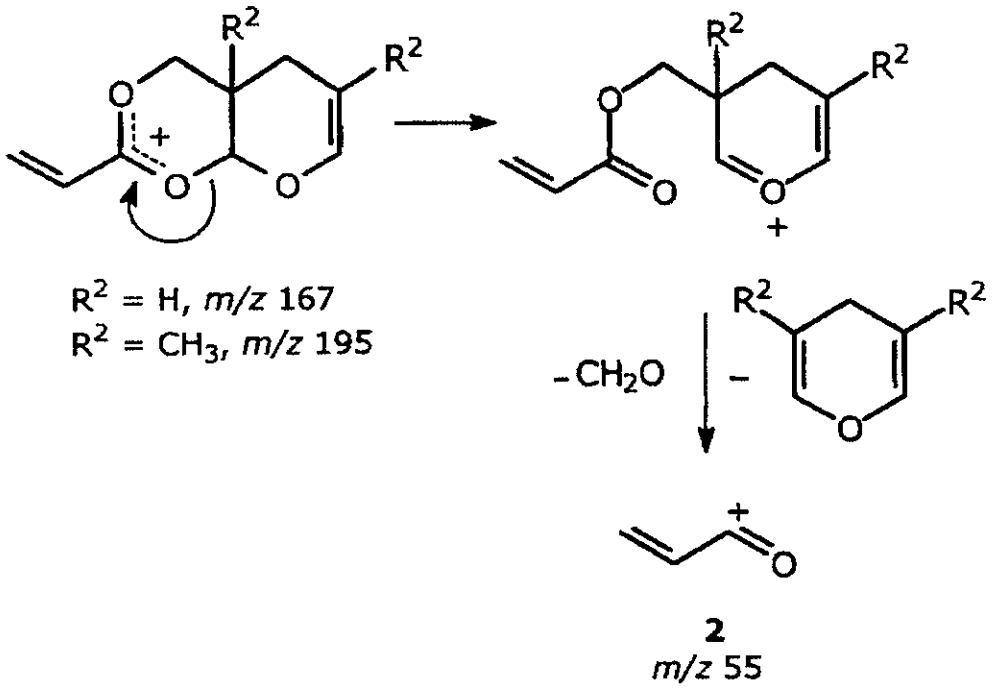


Figura 17 Espectros de massas de triplo estágio MS^3 de CID dos cicloadutos formados por dupla cicloadição nas reações do íon acílio **2** (*m/z* 55) com (a) acroleína, (b) metacroleína e (c) etil-vinil-cetona.



Esquema 14 Dissociação do produto de dupla adição de nitrila no íon acílio por perda de um anidrido de massa 100 u

A dissociação direta dos íons de *m/z* 167 e *m/z* 195 para reformar o íon reagente de *m/z* 55 é também consistente com a estrutura proposta dos cicloadutos de dupla cicloadição (Esquema 13) devido a esta dissociação indicar que a segunda cicloadição não ocorre nem no grupo vinila muito menos no grupo carbonila, e portanto dessa forma o íon reagente pode ser reformado diretamente do cicloaduto de dupla cicloadição com dissociação característica de íons 1,3-dioxonílios cíclicos (Esquema 15).[45,46]



Esquema 15 Retro-dupla adição do produto

O comportamento dos cicloadutos de dupla cicloadição sob condições de CID são similares para metacroleína e acroleína com **1**, **3** e **4**, como exemplificado na Figura 18 para metacroleína.

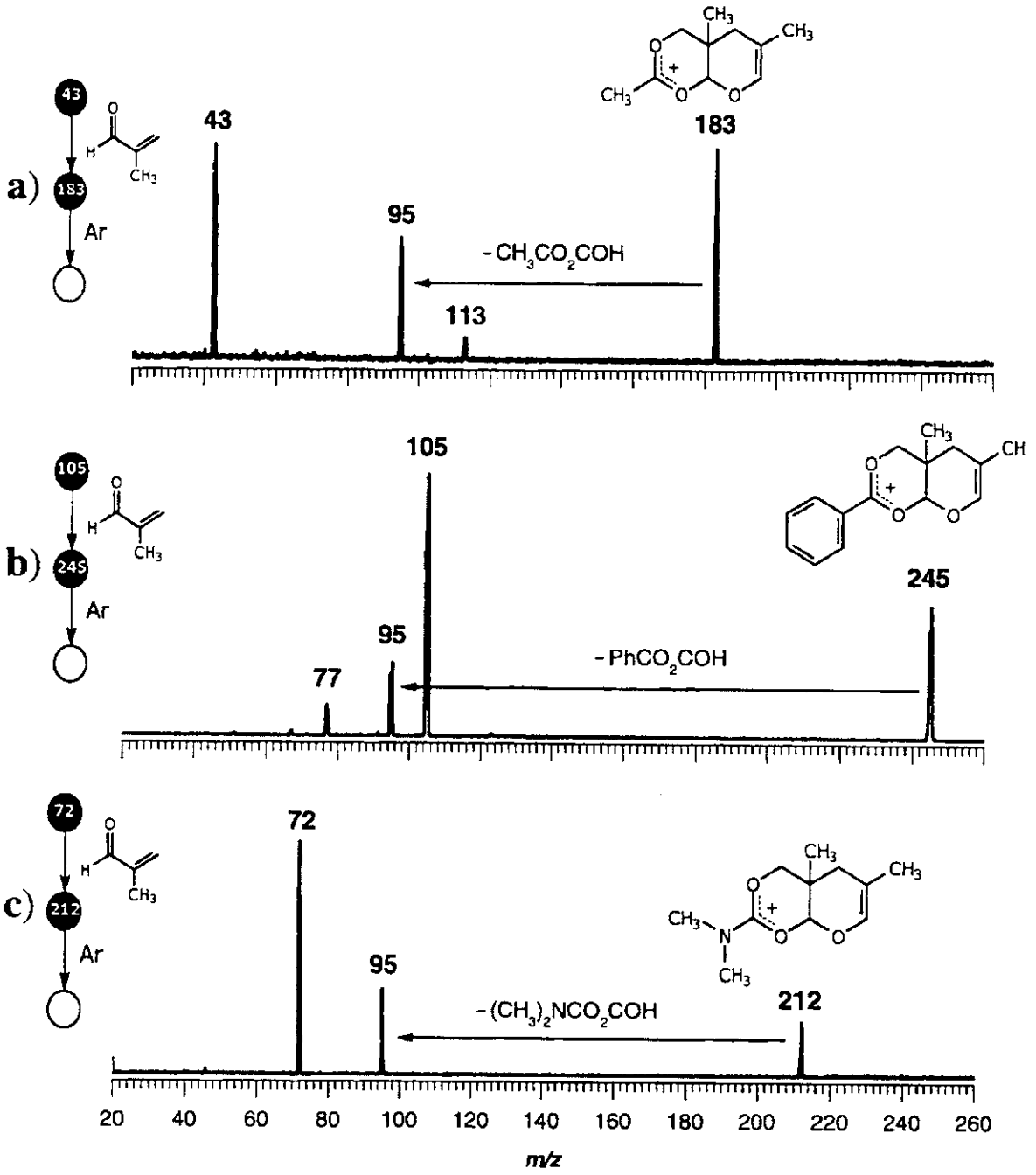
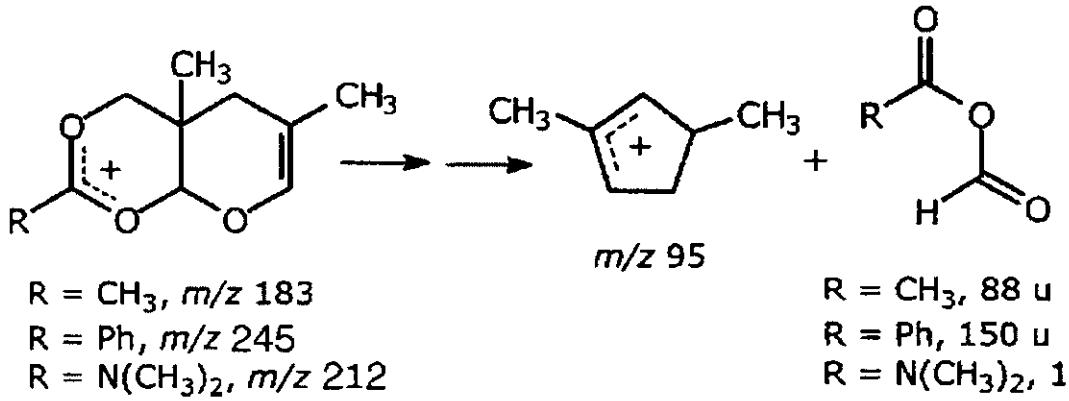


Figura 18 Espectros de massas seqüenciais MS^3 de CID dos cicloadutos formados por dupla cicloadição de metacroleína com (a) **1**, (b) **2** e (c) **4**.

A dissociação direta reforma os correspondentes íons acílios através da perda da correspondente molécula neutra RCO_2COH, resultando em fragmentos comuns de m/z 95 (Esquema 16).



R = CH_3, *m/z* 183
R = Ph, *m/z* 245
R = $N(CH_3)_2$, *m/z* 212

R = CH_3, 88 u
R = Ph, 150 u
R = $N(CH_3)_2$, 117 u

Esquema 16 Dissociação do produto por dupla adição perdendo um anidrido neutro

4.2.3.3 ^{18}O marcado

Mais uma evidência da estrutura cíclica para os cicloadutos de dupla cicloadição foi observada pela marcação isotópica de ^{18}O. O cátion acetila marcado CH_3-C^+=^{18}O de *m/z* 45 foi formado por EI à 70 eV da [^{18}O]-acetona.[36a] Após formado o íon acílio este foi reagido com acroleína e metacroleína, e o espectro de massas sequencial foi adquirido para os produtos de mono e dupla cicloadição. Como mostrado na Figura 19 para os produtos formados com acroleína, o mono cicloaduto dissocia-se exclusivamente para reformar o íon CH_3-C^+=^{18}O de *m/z* 45 (Figura 19(a)) como esperado. O duplo cicloaduto se dissocia para íon de *m/z* 101, 67 e 45, e mais interessantemente para o íon de *m/z* 43. A dissociação para o íon de *m/z* 67 (Esquema 17) confirma a regioquímica e a perda característica de RCO_2COH (Esquema 15). A retro-dissociação reforma o mono cicloaduto com ^{18}O de m/z 101, o qual se dissocia exclusivamente (veja Figura 19(a)) para CH_3-C^+=^{18}O de *m/z* 45. O fragmento de *m/z* 43 é muito interessante, pois este corresponde ao íon CH_3-C^+=O não marcado e sua formação (Esquema 17) e é facilmente racionalizado com o intermédio dos mono e duplo cicladutos, os quais, através de suas formações, promovem troca de O,[19] e a dissociação direta do duplo cicloaduto reforma o íon não marcado como mostrado no Esquema 17.

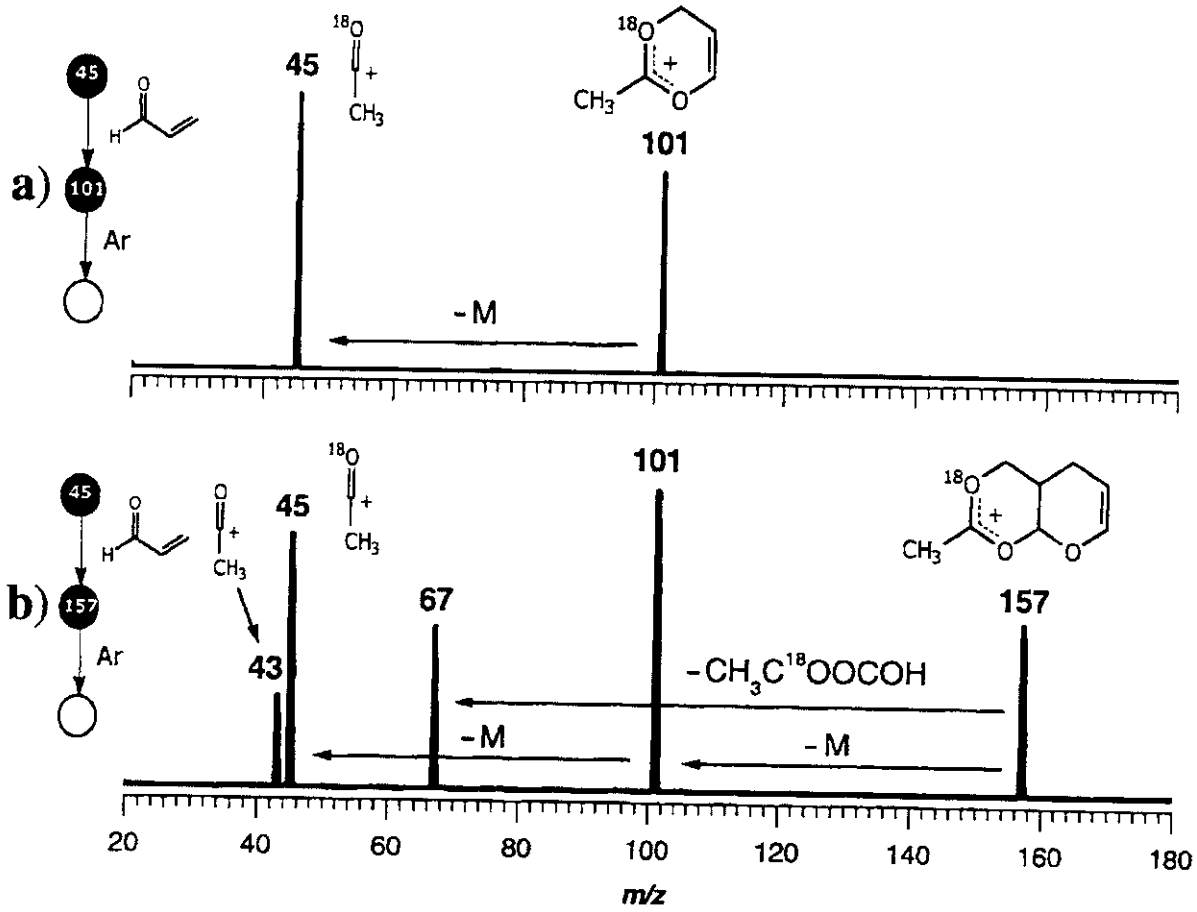
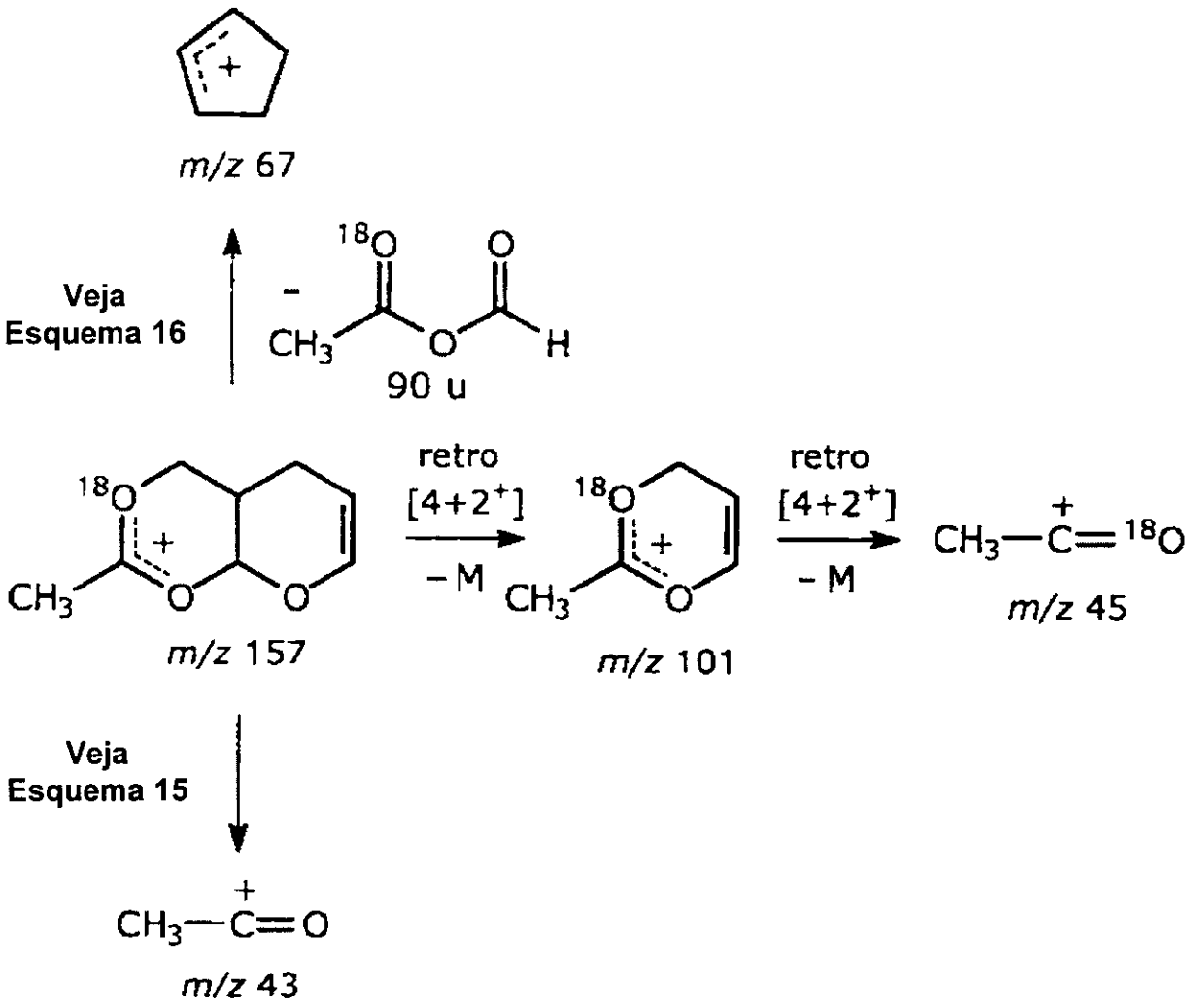


Figura 19 Espectro de massas de triplo estágio MS^3 de CID dos produtos (a) de mono cicloadição e (b) dupla cicloadição formados nas reações do íon acílio **1** marcado (CH_3-C^+=^{18}O) com acroleína.



Esquema 17 Proposta de dissociação para o produto de dupla adição formado com o íon acílio marcado com ^{18}O

4.2.3.4 Troca de Enxofre por Oxigênio

Outra evidência experimental de que os adutos são cíclicos foi obtida reagindo um íon tio-acílio. O íon **5**, $(CH_3)_2N\text{-}C^+{=}S$, formado por EI a 70 eV da tetrametil-tio-uréia, foi reagido com acroleína, e neste caso foram obtidos os cicloadutos de mono- (*m/z* 158, 100%), dupla- (*m/z* 228, 18%) e até mesmo tripla cicloadição (*m/z* 298, 33%) foi formada com grande abundância (espectro não apresentado).

A Figura 20 mostra o espectro de massas seqüencial MS^3 de CID do produto de dupla cicloadição de *m/z* 228. A dissociação formando o íon de *m/z* 95 ocorre via perda

característica de uma parte da molécula $(CH_3)_2NCSOCOH$ de 133 u, mas o produto de dupla cicloadição dissocia-se também para o ácido dimetil-tio-carbâmico protonado de *m/z* 106 (Esquema 18).

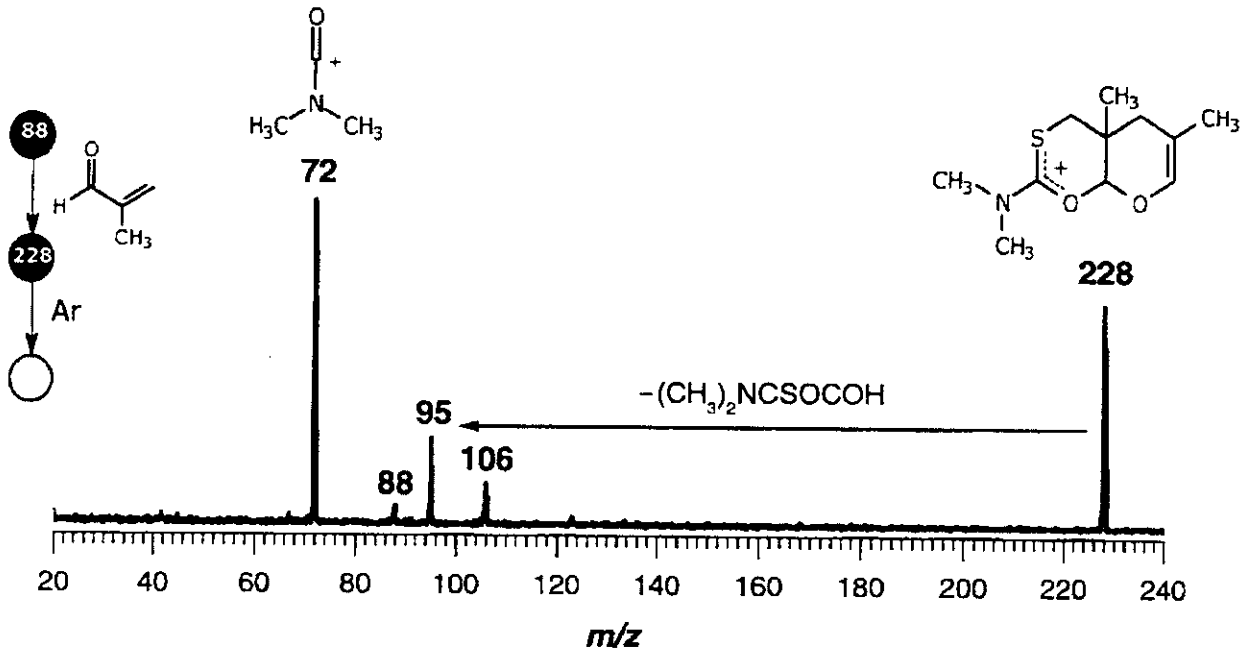
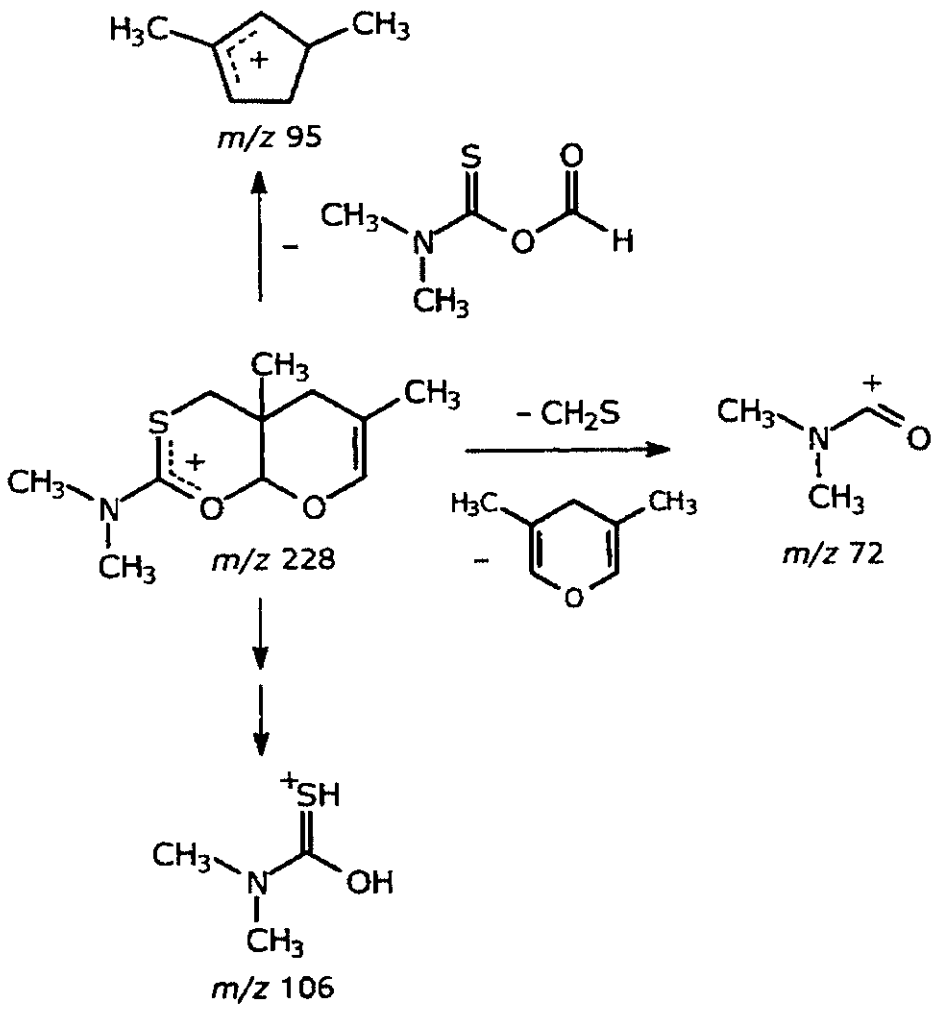


Figura 20 Espectro de massas seqüencial de triplo estágio MS^3 de CID do produto de dupla cicloadição formado na reação do íon tio-acílio **5** (*m/z* 88) com metacroleína.



Esquema 18 Proposta de dissociação para o produto de dupla adição formado com o íon tio-acílio

O fragmento principal que revela a estrutura do produto de dupla cicloadição do íon **5** com metacroleína é o íon de *m/z* 72, que corresponde a **4**, o íon acílio análogo ao reagente tio-acílio **5**. A formação do íon de *m/z* 72 pode ser racionalizada novamente pelo intermédio dos produtos de mono e dupla cicloadição, sendo que dessa forma a fragmentação favorece a troca de S por O,[58] com a dissociação direta do produto de dupla cicloadição para **4** (Esquema 18). Os produtos de mono e tripla cicloadições de **5** com metacroleína também dissociam predominantemente para **4**, o que mostra uma evidência adicional para dar suporte aos produtos cíclicos.

4.2.3.5 Cálculos Teóricos: Entalpia das reações

A Figura 21 mostra um diagrama de energia para uma reação modelo, a qual o íon **2** reage com duas moléculas de acroleína. A mono cicloadição é favorecida exotermicamente por uma energia de –34,5 kcal/mol mais baixa que a energia dos reagentes (1 kcal = 4,184 kj).

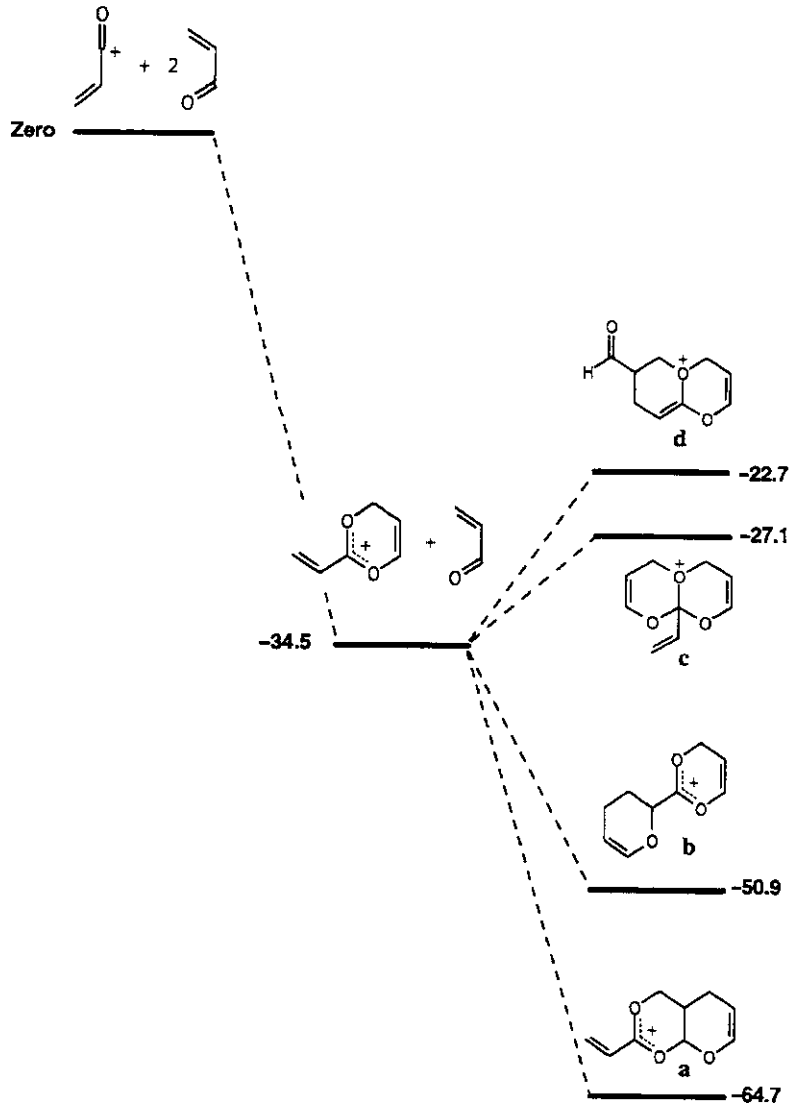


Figura 21 Diagrama de energia potencial Becke3LYP/6-311++G(d,p) para cicloadições sequenciais no íon acílio **2** de duas moléculas de acroleína. As barreiras de reação não foram estimadas. As energias das espécies são as que seguem: **2**, -191,06336; acroleína, -191,97079; mono cicloaduto, -575,05995; **a**, -575,10811; **b**, -575,08611; **c**, -575,04813; e **d**, -575,04114 hartree.

A dupla cicloadição pode levar a vários cicloadutos, mas somente as quatro mais prováveis estruturas (**a**-**d**) foram consideradas. A cicloadição na dupla ligação C=C (**a**) é prevista como sendo a mais favorecida termodinamicamente, sendo que a reação total leva a uma exotermicidade de –64,7 kcal/mol em relação aos reagentes. A cicloadição polar [4 + 2^+] na ligação C=C do grupo 2-vinila (b) ou na ligação C^+=O do anel (c) e também a cicloadição polar [4^++2] na ligação C=C da acroleína (d) não são tão favorecidas, provavelmente devido aos cicloadutos correspondentes apresentarem um decrescente grau de delocalização da carga.

Os produtos iônicos de mono cicloadição têm carga extremamente estabilizada pelos grupos 1,3-dioxônios, e estes íons têm se mostrado, espécies quimicamente inertes.[19, 47] Portanto a presença adicional de uma dupla ligação C=C não conjugada no anel e ainda ativada pelo forte efeito retirador de elétrons pelo grupo iônico carregado positivamente 1,3-dioxônio, confere ao íon de mono cicloadição um forte caráter dienófilo. Suas ligações C=C no anel são também corretamente polarizadas por efeitos indutivos para cicloadição polar [4+2^+] com os *O*-heterodienos na observada regioseletividade (Esquema 13).

4.2.4 Conclusão

Íons acílios gasosos reagem em diferentes extensões com compostos carbonílicos α,β-insaturados (*O*-heterodienos) por mono e dupla cicloadição Diels-Alder polar [4 + 2$^+$]. Os íons acílios carregados positivamente são *O*-heterodienófilos ativados e a mono cicloadição ocorre através da ligação C$^+$=O para formar produtos estabilizados por ressonância, os íons 1,3-dioxônios os quais se dissociam em condições de CID principalmente por retro-adição. Os mono cicloadutos são também dienófilos ativados pelo grupo positivamente carregado 1,3-dioxônio que é estabilizado por ressonância e inerte quimicamente; assim a dupla ativada reage novamente através de uma segunda cicloadição. O reagente iônico com ^{18}O marcado forma um cicloaduto que se dissocia de forma característica e revela a reação como regioseletiva na segunda cicloadição, o que que está de acordo com os cálculos teóricos Becke3LYP/6-311++G(d,p).

Cátions com sítios de carga estabilizados são conhecidos por se fragmentarem através de fragmentação distante da carga ("charge-remote fragmentation"),[57] cujas fragmentações ocorrem independentemente e a longas distâncias da carga. Por analogia, portanto, os produtos de mono ciclaoadição com carga estabilizada e com sítio de carga quimicamente inerte podem ser vistas como um tipo de reação à longa distância da carga ("charge-remote reaction"), ou mais especificamente cicloadição Diels-Alder polar [4 + 2$^+$] à longa distância da carga.

4.3 Ciclização de Íons Acílios com Nitrilas: síntese na fase gasosa e caracterização de íons 1,3,5-oxadiazínios

4.3.1 Introdução:

Íons acílios em solução reagem via ciclização com nitrilas, cianamidas, alquenos e alquinos, produzindo vários tipos de heterocíclicos iônicos.[45] Como mostrado por Eitner e Kraft em 1892,[59] e mostrado novamente mais tarde por Meerwein *et. al*[60] e Schmidt,[61] dois equivalentes de aril nitrilas adicionadas a um de íons acílios formam íons 1,3,5-oxadiazínios, os quais são de utilidade para várias sínteses de heterocíclicos em solução.[45]

Mesmo com sua vasta aplicabilidade em reações em solução, e o fácil acesso a esses íons acílios gasosos, a reação de ciclização nunca havia sido investigada na fase gasosa. Neste capitulo nós mostramos uma investigação sistemática da reatividade intrínseca da reação de ciclização entre íons acílios com nitrilas, através da formação, isolamento e caracterização dos produtos cíclicos iônicos 1,3,5-oxadiazínios por espectrometria de massas pentaquadrupolar.[19]

4.3.2 Parte Experimental

Experimentos espectrométricos de massas seqüenciais de duplo (MS^2) e de triplo (MS^3) estágios foram realizados com um espectrômetro de massas pentaquadrupolar ($Q_1q_2Q_3q_4Q_5$)[19] para formar íons acílios gasosos para reação em uma segunda etapa de massas com nitrilas desumidificadas (utilizando pentóxido de fósforo, P_2O_5) e para caracterizar estruturalmente os produtos iônicos em uma terceira etapa de massas. Os precursores apropriados foram utilizados para formar os íons reagentes por ionização por elétrons a 70 eV: **1** e **3** a partir de metil-fenil-cetona, **2** a partir de etil-vinil-cetona e **4** a partir de tetra-metil-uréia.

As reações foram procedidas em experimentos MS^2 através da seleção por massas do íon acílio de interesse no quadrupolo Q_1 para a seguinde reação em q_2 com a nitrila neutra. As energias translacionais dos íons foram ajustadas para ~1 eV, utilizando a razão de íons *m/z* 39:41 da reação de etileno com etileno ionizado para calibração.[33] O quadrupolo Q_5 foi utilizado para análises de massas enquanto o quadrupolo Q_3 foi utilizado como focalizador de íons para aquisição dos espectros MS^2. Foram utilizadas condições de múltiplas colisões que causam uma atenuação característica na intensidade do íon reagente em 50% a 70% em q_2 de forma tal que aumenta a abundância dos produtos de reação e promove o resfriamento colisional de ambos reagentes e produtos.[19]

Para os experimentos MS^3,[18] cada íon 1,3,5-oxadiazínio formado foi selecionadpo por massas em Q_3 e depois dissociado por dissociações colisionais a 15 eV de energia com o gás argônio, onde a energia de colisão é determinada pela diferença de energia entre a fonte de íons e os quadrupolos de colisão. As pressões indicadas em cada região com diferentes condições de vácuo foram tipicamente 2×10^{-6} (fonte de íons), 8×10^{-6} (q_2) e 8×10^{-5} (q_4) torr, respectivamente.

Geometrias otimizadas e energias eletrônicas foram obtidas de conformações idealizadas sem restrição de simetria utilizando o método Becke3LYP,[39] um híbrido dos métodos DFT e HF e o conjunto de bases 6-311+G(d,p) como implementado no Gaussian98.[38]

4.3.3 Resultados e Discussão

Foram selecionados quatro íons acílios (Ac^+): o cátion acetila **1**, o cátion acrilila **2**, o cátion benzoila **3,** o cátion dimetil-carbamila **4** e quatro das nitrilas mais comuns (M), acetonitrila, propionitrila, acrilonitrila e benzonitrila. A Tabela 3 mostra os dados dos espectros de massas dos produtos iônicos, onde a Figura 22 apresenta dois destes espectros como exemplos.

Tabela 3 Principais produtos iônicos (*m/z* com abundâncias relativas (%) em parênteses) para reação dos íons acílios selecionados por massas (Ac^+) **1-4** com as nitrilas (M).

Reagente	acetonitrila	propionitrila	acrilonitrila	benzonitrila
Íon	MAc^+, M_2Ac^+, MH^+, M_2H^+	MAc^+, M_2Ac^+, MH^+, M_2H^+	MAc^+, M_2Ac^+, MH^+, M_2H^+	MAc^+, M_2Ac^+, MH^+, M_2H^+
1	84(4),none,42(22),83(100)	98(12),153(1),56(18), 111(100)	96(26),149(2),54(11), 107(100)	146(3), 249(100), 104(3),207(23)
2[a]	96(28),none,42(35),96(28)	none,none,56(89),111(100)	108(23), 161(1), 54(8), 107(100)	158(12),261(38),104(8),207(100)
3[b]	146(3),none,none,none	160(12),none,56(4),111(3)	158(3),none, 54(4), 107(22)	208(36),311(43),104(2),207(45)
4[a]	113(1),154(100),42(1),83(28)	127(3),182(100),56(2),111(13)	125(2), 178(100), 54(1), 107(22)	175(4), 278(100),104(2),207(8)

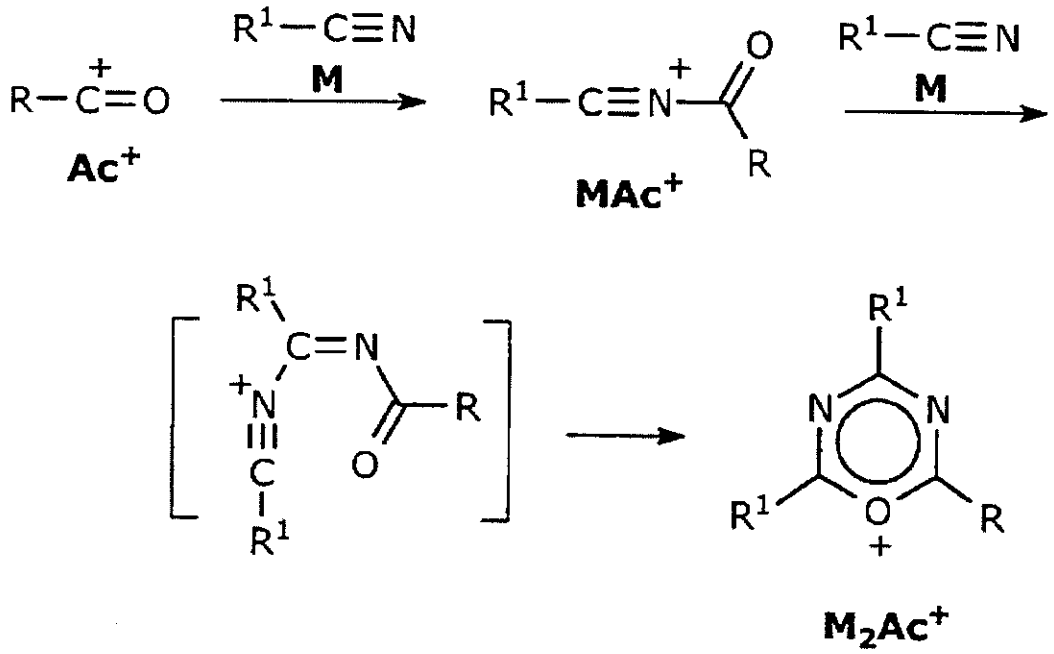
Nota. MH^+ denota a nitrila protonada; M_2H^+, o dímero de nitrila ligado por próton; MAc^+ o aduto; M_2Ac^+ os íons cíclicos 1,3,5-oxadiazínios.

[a] Exceto para benzonitrila, a água contamina as outras nitrilas higroscópicas e se adiciona nos íons acílios **2** e **4** para formar H_2OAc^+, o qual reage com a nitrila para formar MH_2OAc^+ em diferentes extensões dependendo da umidade da nitrila. Para nitrilas recém secas estes produtos são minoritários.

[b] O principal produto iônico quando **3** reage com as nitrilas é MPh^+. Dissociação de 3 por perda de CO forma Ph^+, e suas subseqüentes reações de adição com as nitrilas forma MPh^+

Sob condições de colisões múltiplas, duas principais reações são observadas: a primeira, é a transferência de prótons, que sob as condições utilizadas podem ocorrer entre o íon reagente (Ac^+) e as moléculas neutras, entre os produtos iônicos e as moléculas neutras ou ambos processos, formando as nitrilas protonadas (MH^+) e subseqüentemente, o dímero de nitrilas ligadas por prótons (M_2H^+); e a segunda, a adição simples e dupla de nitrila (Esquema 19). A adição simples de nitrila no íon acílio

(Ac^+) forma os adutos MAc^+ e após uma segunda adição de nitrila forma o dímero M_2Ac^+, que é o íon cíclico 1,3,5-oxadiazínio como demonstrado à frente. Note que o íon M_2Ac^+ pode ser também descrito com íon diazapirílios.



Esquema 19 Mecanismo proposto para mono- e dupla-adição de nitrila no íon acílio reagente.

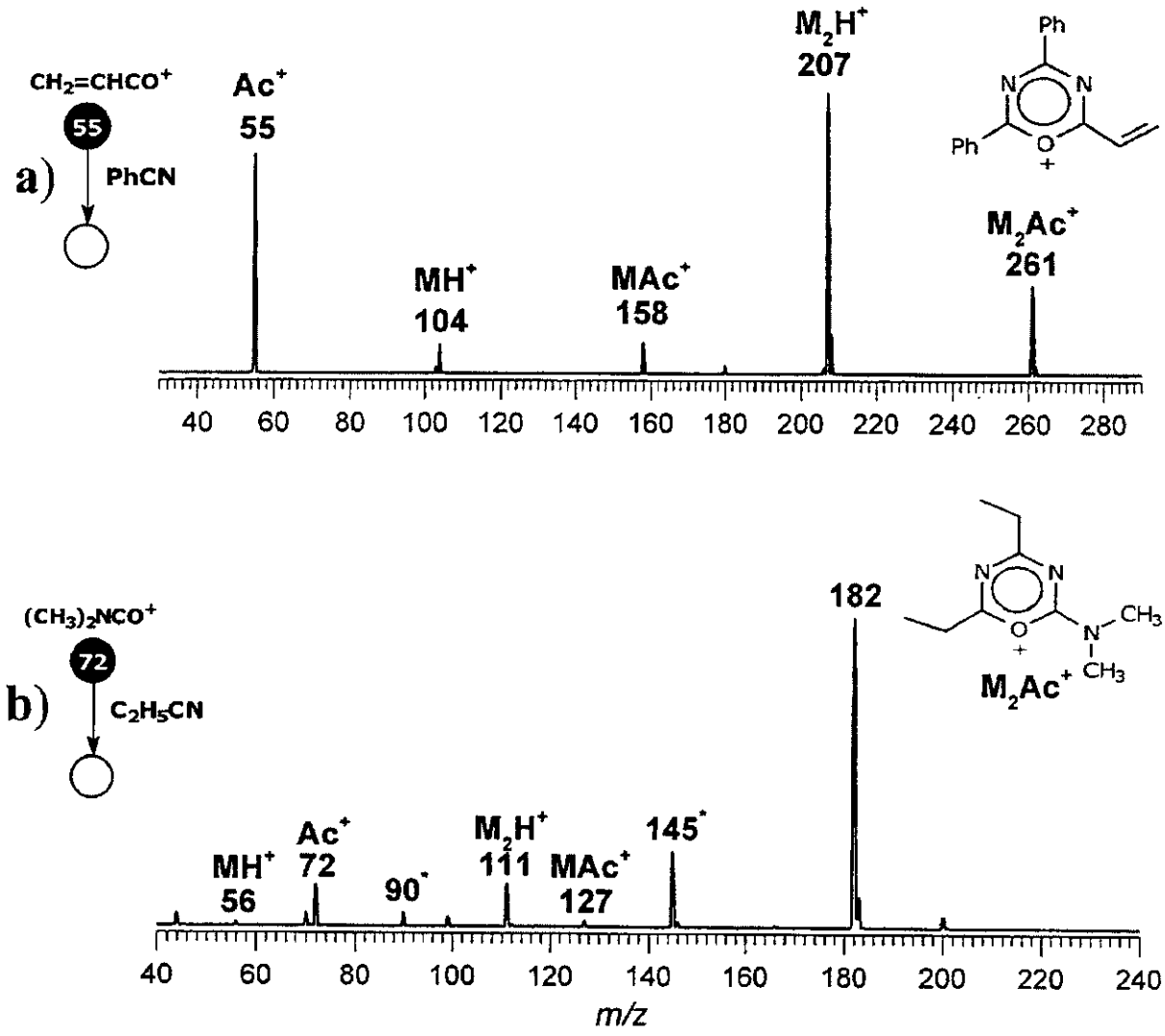


Figura 22 Espectro de massas de duplo estágio MS^2 dos produtos da reação (a) do íon acílio **2** com benzonitrila e (b) do íon acílio **4** com propionitrila . M denota a nitrila e Ac^+ do íon acílio. Os produtos marcados em (b) são formados por adição de água (um contaminante da propionitrila que é higroscópica) no íon **4**, o qual forma o íon de *m/z* 90 e por adição subseqüente a este íon formando o íon de *m/z* 145.

4.3.3.1 Reatividade dos íons acílios através da ciclização

Como mostrado na Tabela 3, os íons acílios **1** e **2** são as espécies menos reativas através da ciclização com nitrilas; os íons **1** e **2** reagem predominantemente por transferência de próton formando os íons MH^+ e M_2H^+, e somente as reações com benzonitrilas formam dímeros abundantes M_2Ac^+. A Figura 22a mostra o espectro de massas dos produtos iônicos para reação de **2** com benzonitrila. O íon cíclico 1,3,5-oxadiazínio de *m/z* 261 é formado a partir dos monômeros *N*-acilados de *m/z* 158, mas a transferência de prótons que forma os íons MH^+ de *m/z* 104 e principalmente M_2H^+ de *m/z* 207, ocorre com grande abundância. A grande tendência dos íons **1** e **2** para reagir por transferência de prótons é comum devido à alta acidez.[19] Os íons **1** e **2** são formas protonadas do ceteno e da 1,2-propadienona respectivamente.

O cátion benzoila **3** de *m/z* 105 é muito menos ácido que **1** e **2**[19] mas MH^+ e M_2H^+ ainda são formados na reação com as nitrilas (Tabela 3), a que indica que a transferência de prótons ocorre principalmente através dos produtos iônicos formados. Da mesma forma que para **1** e **2**, a reação do íon **3** com as nitrilas forma os produtos M_2Ac^+ por ciclização, porém somente para a reação com benzonitrila. Exclusivamente para **3** há uma terceira reação que se observa predominante (mesmo em condições suaves de colisão) por perda de CO para formar o cátion fenila, e então se adiciona uma nitrila para formar um íon MPh^+ relativamente abundante.

O íon **4** foi a espécie mais reativa entre os íons acílios testados através da reação com as nitrilas (Tabela 3). O íon **4** reage abundantemente com todas as nitrilas testadas, predominantemente por ciclização via dupla adição, formando os íons 1,3,5-oxadiazínios, M_2Ac^+. A Figura 22b mostra o espectro de massas dos produtos iônicos formados da reação de **4** com propionitrila. Esta reação ocorre através da acilação da acrilonitrila formando a acrilonitrila *N*-acilada de *m/z* 127 (MAc^+); o íon cíclico 1,3,5-oxadiazínio de *m/z* 182 é formado em grande abundância, enquanto os produtos de transferência de prótons de *m/z* 56 e *m/z* 111 são minoritários. Embora as nitrilas utilizadas serem secas antes da reação, produtos secundários de reação com água parecem ser formados por uma seqüência de reações iniciada por adição de água (um contaminante comum em nitrilas higroscópicas) no íon **4**, o qual forma H_2OAc^+ de *m/z*

90, e por adição de propionitrila o íon **4** hidratado H_2OAc^+ forma MH_2OAc^+ de *m/z* 145. Uma seqüência de reação similar também foi observada para **2** em reações com nitrilas higroscópicas.

4.3.3.2 Reatividade de MAc^+ para a segunda adição de nitrila

As nitrilas *N*-aciladas (MAc^+) de *m/z* 158 na Figura 22a e de *m/z* 127 na Figura 22b são detectadas em menores abundâncias que M_2Ac^+, o que indica alta reatividade destes adutos MAc^+ através de uma segunda adição de nitrila. Esta alta reatividade foi testada reagindo **4** com benzonitrila e fazendo um gráfico da abundância de MAc^+ de *m/z* 175 e M_2Ac^+ de *m/z* 278 como funções do consumo de **4** (Figura 23).

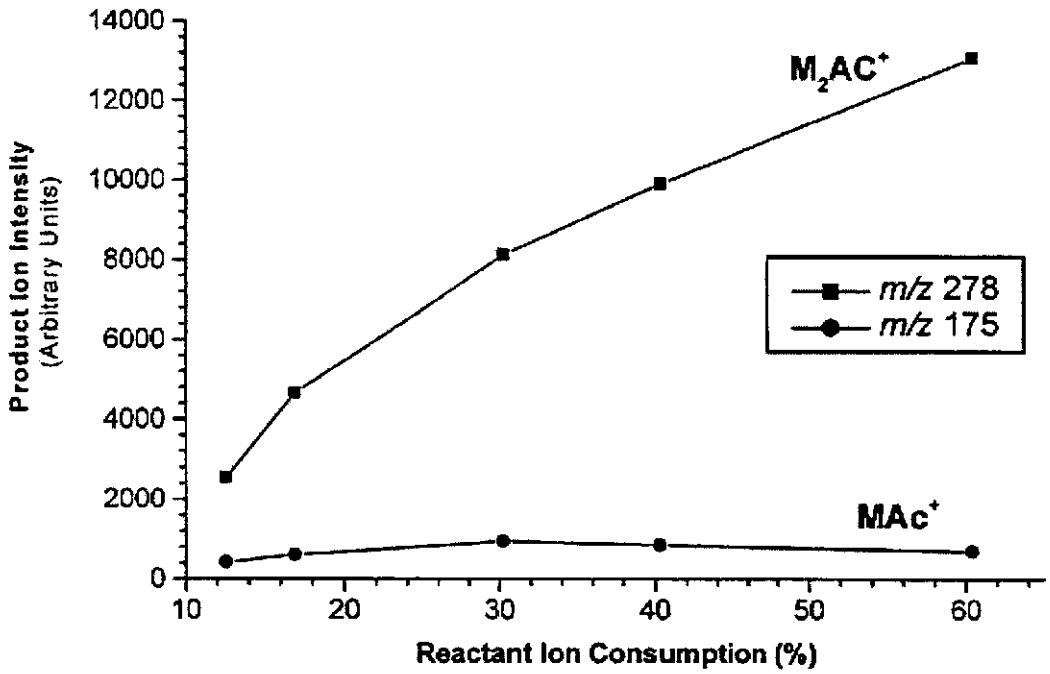


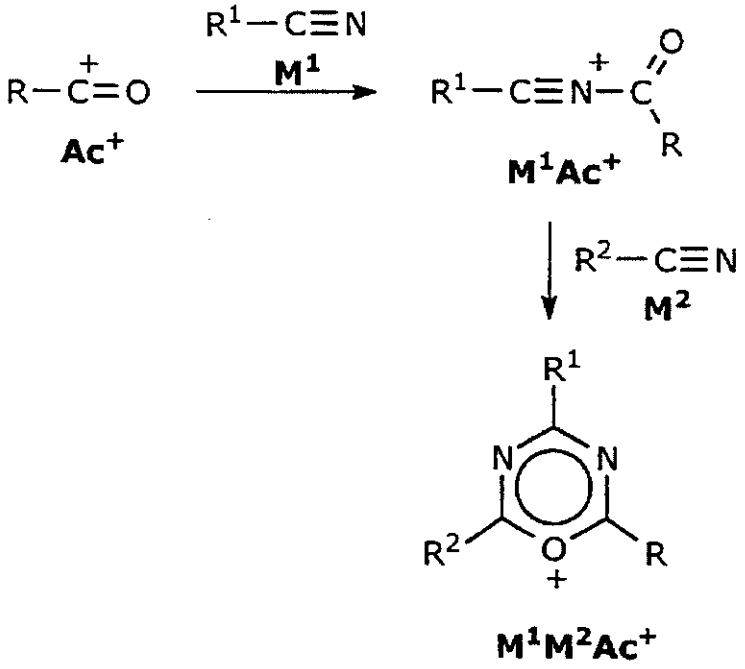
Figura 23 Gráfico das abundâncias relativas dos produtos MAc^+ (*m/z* 175) e M_2Ac^+ (*m/z* 278) formados em reações de **4** com benzonitrila como função da pressão no interior da cela de reação q_2.

O consumo do íon reagente mostra uma medida indireta mas precisa das pressões relativas de benzonitrila no interior da cela de reação q_2. Mesmo a baixas pressões de benzonitrila o íon M_2Ac^+ domina, e suas abundâncias aumentam rapidamente e continuamente com a pressão. A abundância relativa de MAc^+ é sempre

baixa e tende a diminuir mesmo a altas pressões de benzonitrila. Estas tendências confirmam, portanto, a alta reatividade de MAc^+ sob uma segunda adição de nitrila, como esperado se o produto é considerado cíclico, aromático e portanto altamente estável (íon 1,3,5-oxadiazínio) formado por uma segunda adição de nitrila seguida de uma ciclização espontânea.

4.3.3.3 Síntese conjunta de íons isoméricos 1,3,5-oxadiazínios 4,6-disubstituídos

A ciclização em duas etapas dos íons acílios gasosos através da dupla adição de nitrilas fornece um caminho para síntese de íon 1,3,5-oxadiazínios 4,6-dissubstituídos via reações "one-pot" com misturas de nitrilas (Esquema 20).



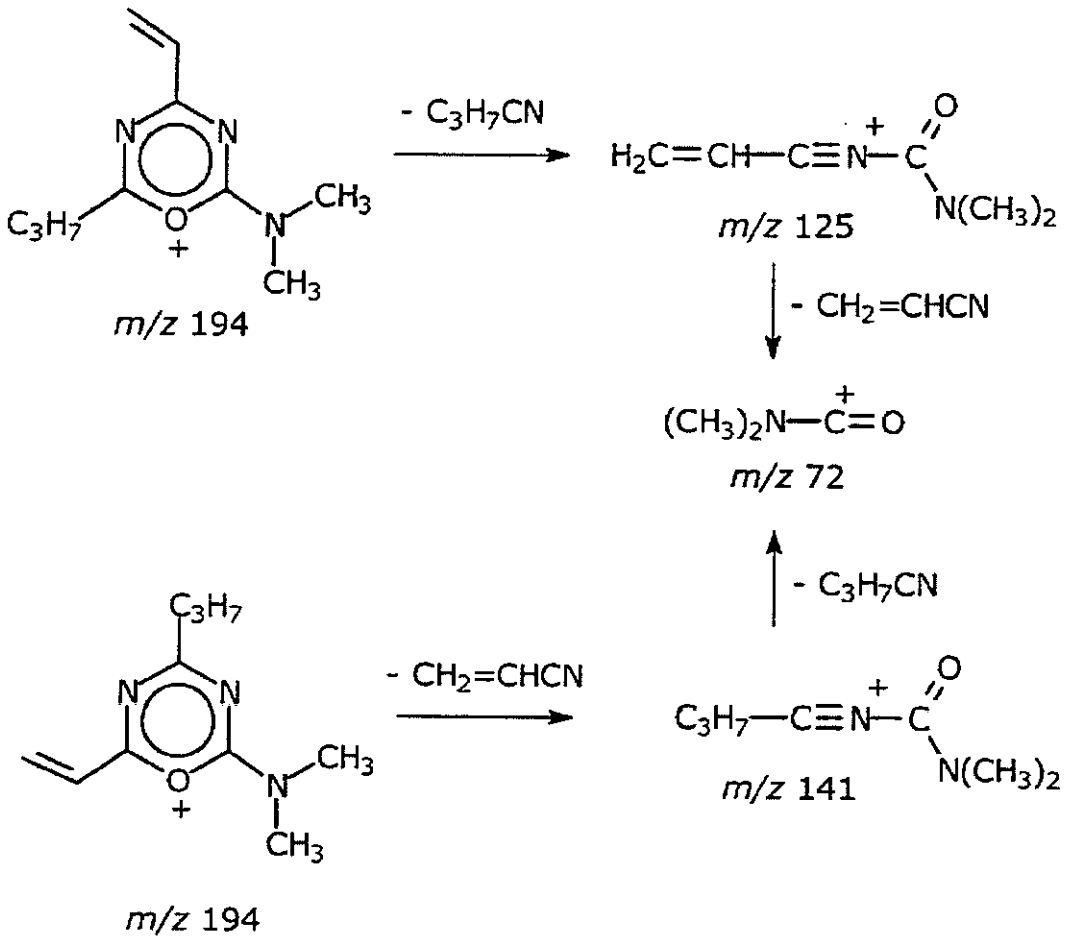
Esquema 20 Mecanismo proposto para mono- e dupla-adição de duas nitrilas diferentes no íon acílio reagente

Estas reações "one-pot" foram realizadas para o íon **4** com uma mistura de dois componentes das quatro nitrilas mostradas na Tabela 3 e butironitrila, todos íons 1,3,5-oxadiazínios esperados foram formados. A Figura 24a ilustra uma porção relevante dos produtos no espectro de massas para a reação "one-pot" de **4** com uma mistura de

acrilonitrila e butirontrila. Os produtos cíclicos esperados são 4,6-divinila (*m/z* 178), 4,6-dipropila (*m/z* 210) e dois íons isoméricos 4-propila-6-vinila e 4-vinila-6-propila (*m/z* 194) 2-*N,N*-dimetilamino-1,3,5-oxodiazínios, os quais são os produtos majoritários.

4.3.3.4 Dissociação induzida por colisão (CID) dos íons 1,3,5-oxadiazínios

A Figura 24b e 24d mostram o espectro de massas de triplo estágio CID dos dois íons cíclicos 1,3,5-oxadiazínios. Aqueles de *m/z* 178 formados por dupla adição de acrilonitrila em **4** dissocia-se exclusivamente para re-formar, primeiro o monômero (*m/z* 125) pela perda neutra de acrilonitrila e subseqüentemente, o íon acílio reagente (*m/z* 72) através de uma segunda perda neutra de acrilonitrila (Figura 24d). Similarmente, aqueles de *m/z* 210 (Figura 24d) formados por dupla adição de butironitrila em **4** dissociam-se exclusivamente para re-formar primeiro o monômero (*m/z* 141) e subseqüentemente o íon acílio reagente (*m/z* 72). Os dois íons isoméricos substituídos 4-propila-6-vinila e 4-vinila-6-propila de *m/z* 194 são esperados a dissociarem-se diferentemente, pois a nitrila adicionada por último é perdida primeiro (Esquema 21).



Esquema 21 Mecanismos de dissociação por CID dos íons isômeros 1,2,3-oxadiazínios

Desta forma, os dois monômeros esperados são de *m/z* 141 e 125 como detectados nos seus espectros de massas de CID (Figura 24c).

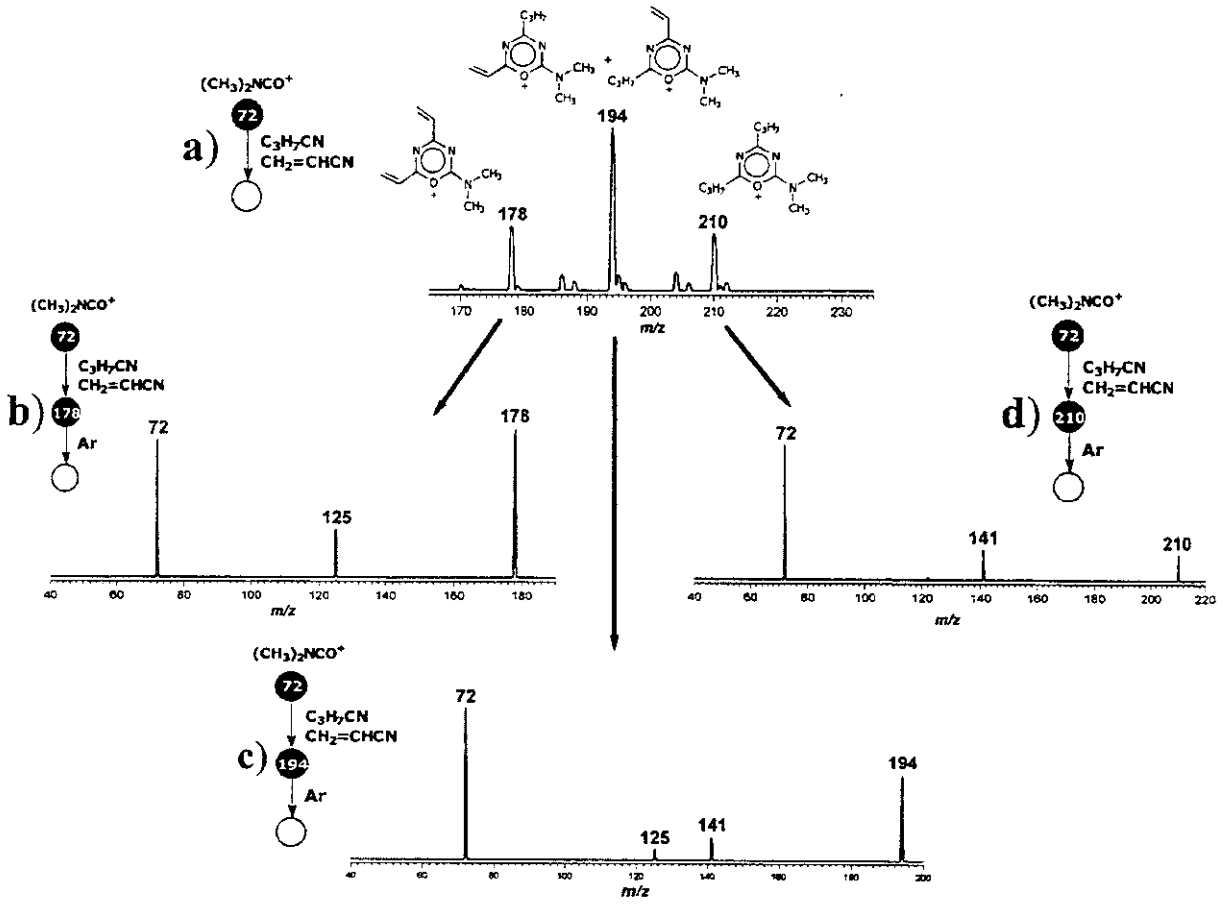


Figura 24 (a) Um segmento representativo do espectro de massas de duplo estágio MS^2 dos produtos da reação do íon acílio **4** com uma mistura de acrilonitrila e benzonitrila. Espectro de massas de triplo estágio MS^3 (CID) dos produtos da cíclicos 1,3,5-oxadiazínios de (b) *m/z* 178 (c) *m/z* 194, e (d) *m/z* 210.

O espectro da Figura 25 é também estruturalmente elucidativo. Embora todos os íons 1,3,5-oxadiazínios formados a partir de **4** se dissociem exclusivamente por dupla retro-adição para reformar o íon reagente **4**, como exemplificado na Figura 24b e 24d, o íon 1,3,5-oxadiazínio de *m/z* 261 formado por dupla adição de benzonitrila em **2** (Figura 22a) dissocia-se para formar ambos os íons reagentes **2** de *m/z* 55 e o cátion benzoila **3** de *m/z* 105. Os dois íons acílios são formados devido à simetria do anel do íon 1,3,5-oxadiazínio e a presença de diferentes substituintes nas posições 2 e 4 do anel permitem dois caminhos competitivos de dissociação (Esquema 22).

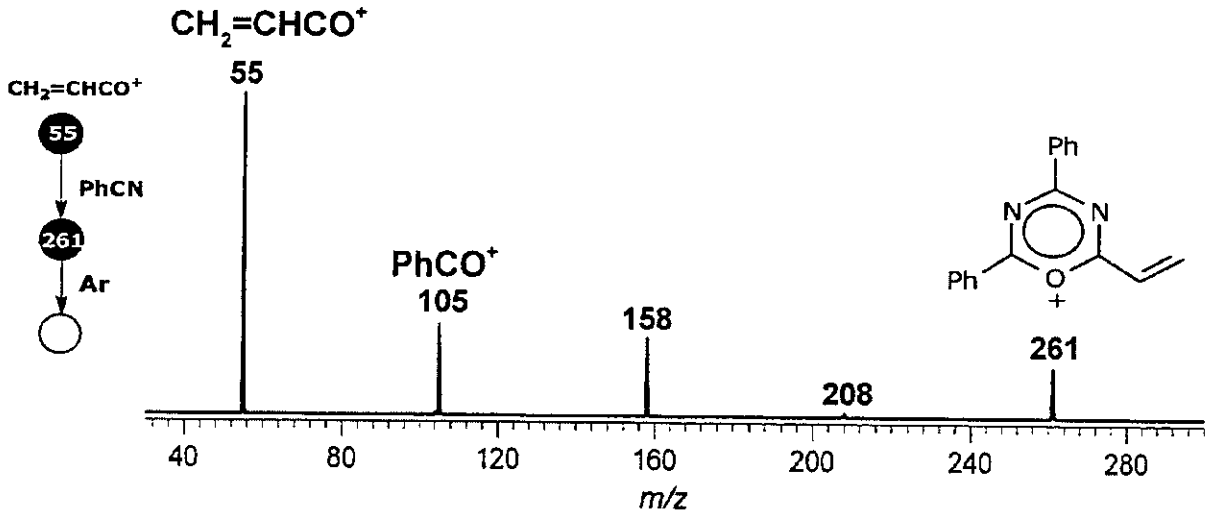
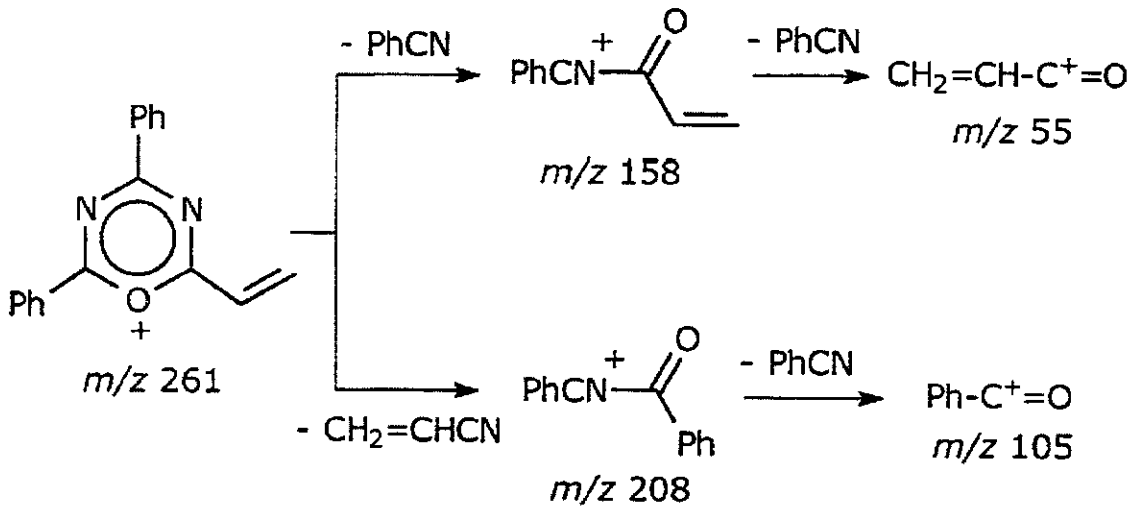


Figura 25 Espectro de massas de triplo estágio MS^3 (CID) do produto cíclico 2-vinil-4,6-difenil-1,3,5-oxadiazínio de *m/z* 261, formado na reação de **2** com benzonitrila.



Esquema 22 Dissociação competitiva do íon 1,3,5-oxadiazínio comprovando a estrutura cíclica do íon

A dupla retro-adição que reforma o íon acílio **2** de *m/z* 55 promove combinada com a cicloadição uma troca de grupos formal entre a benzonitrila e o íon acílio **2**, formando acrilonitrila e $PhCO^+$ (**3**). Dissociações competitivas similares que formam ambos **1** e **3** são também observadas para íons 2-metil-4,6-difenil-1,3,5-oxadiazínios de *m/z* 249 formado pela ciclização de **1** com benzonitrila (Tabela 3). Note que a

dissociação com troca de grupos, somente pode ser racionalizada com o intermédio dos íons 1,3,5-oxadiazínios, o que nos mostra evidência para ciclização.

4.3.3.5 Adição nucleofílica nos íons 1,3,5-oxadiazínios

Em solução, os íons trifenil-1,3,5-oxadiazínios formados por ciclização de **3** com benzonitrila é conhecido por reagir com nucleófilos, e nucleófilos nitrogenados em particular, formando uma variedade de compostos heterocíclicos após uma série de adições, transferências de prótons intramoleculares e reações de eliminação.[45] O íon gasoso 1,3,5-ozadiazínios de *m/z* 178 formados por ciclização de **4** com duas moléculas de acrilonitrila foi portanto selecionado e reagido utilizando experimentos MS^3 com quatro nucleófilos nitrogenados: *N,N*-dimetilhidrazina, dietilamina (Figura 26), piridina e pirrolidina.

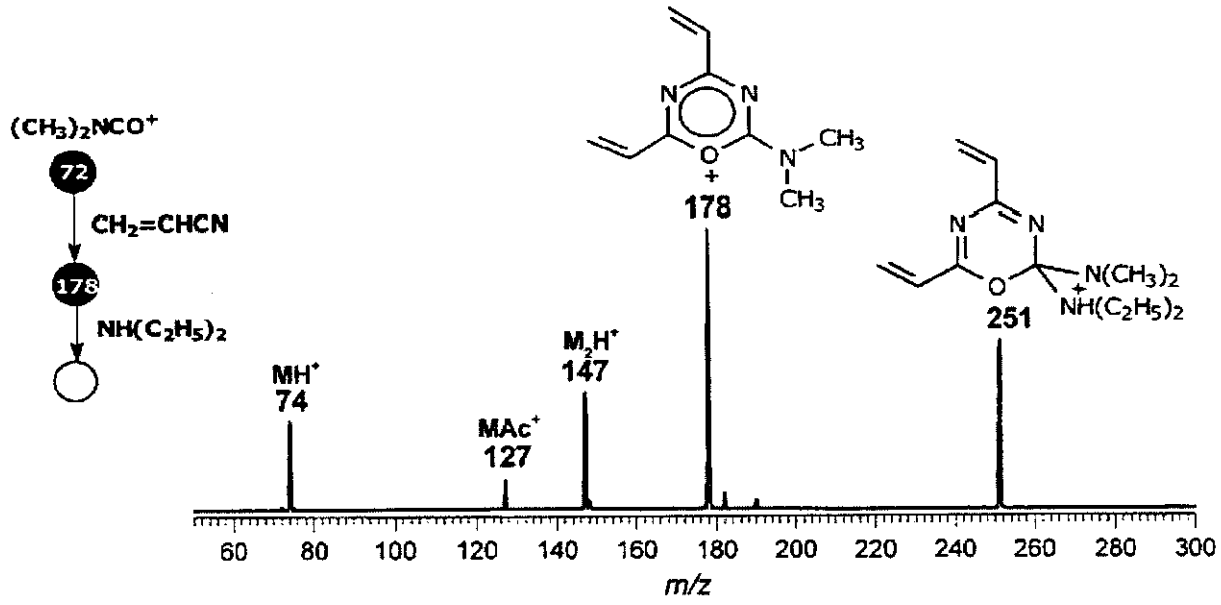


Figura 26 Espectro de massas de triplo estágio MS^3 da reação em q_4 com dietilamina do íon cíclico 1,3,5-ozadiazínio de *m/z* 178 formado em q_2 do íon **4** com acrilonitrila.

A adição ocorre abundantemente para os quatro nucleófilos, mas não foram observados produtos iônicos equivalentes aos formados em solução. Uma explicação para a não observação destas reações envolvendo transferência de próton

intermolecular e equilíbrio entre reações, pode estar relacionada a barreiras energéticas para transferências intramoleculares muito altas e/ou impedimentos cinéticos.

4.3.3.6 Cálculos teóricos: entalpias das reações

A Figura 27 mostra um diagrama de superfície de energia potencial para a reação modelo de **4** com duas moléculas de acrilonitrila. A adição simples ocorre favoravelmente com uma exotermicidade de –19,1 kcal/mol para a reação de *N*-acilação. A segunda adição de acrilonitrila e ainda mais favorável termodinamicamente, sendo a exotermicidade total de –62,2 kcal/mol; o que leva a um dímero acíclico instável (veja Esquema 19) que durante a otimização da estrutura termina sem barreiras de energia para o íon 1,3,5-oxadiazínio. Então o íon acíclico dimérico corresponde meramente a um ponto na superfície de energia que conecta o monômero ao íon cíclico 1,3,5-oxadiazínio. A alta exotermicidade da adição de uma segunda nitrila que forma um composto iônico aromático altamente estável se deve a alta reatividade do íon MAc^+ como discutido previamente.

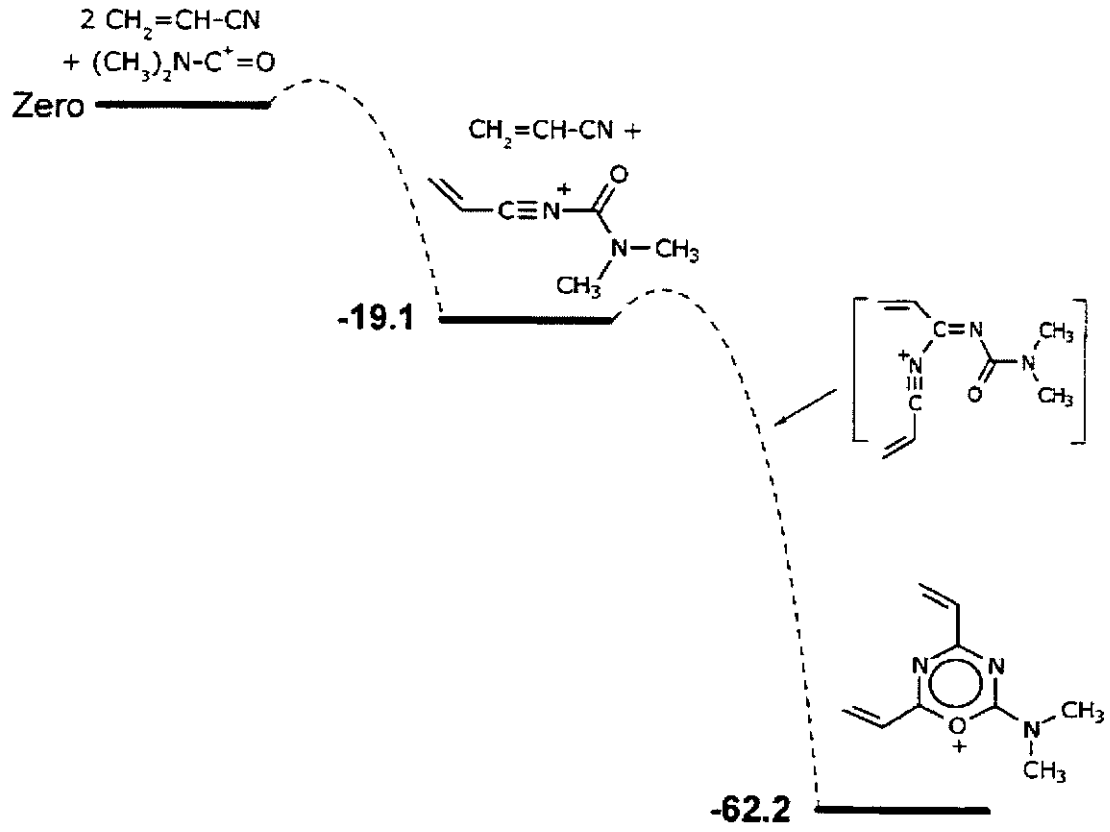


Figura 27 Diagrama de energia Becke3LYP/6-311+G(d,p) para reação de **4** com acrilonitrila. As barreiras da reação não foram estimadas. As energias das espécies são em hartrees: 4 (-247,68463), acrilonitrila (-170,88288), acrilonitrila N-acetilada (-418,59800) e o íon 1,3,5-oxadiazínio (-589,54960).

4.3.4 Conclusão

Íons acílios gasosos **1-4**, similarmente ao comportamento em solução e como demostrado neste trabalho, reagem abundantemente com aril nitrilas por ciclização via dupla adição para formar íons cíclicos aromáticos, altamente estáveis. Aril nitrilas são mais reativos provavelmente devido ambos intermediário *N*-acetilados e produtos iônicos cíclicos 1,3,5-oxadiazínios serem estabilizados por deslocamento de carga no anel aromático. Ciclização de íons acílios com nitrilas alifáticas, como demostrado para acetonitrila, propionitrila e acrilonitrila, é menos geral e ocorre somente para **4**, de longe o menos ácido e mais reativo íon acílio testado. Devido a ciclização ocorrer através dupla de adição seqüencial de nitrila, podem ser formados íons isoméricos 4,6-dissubstituídos-1,3,5-oxadiazínios através de reações "one-pot" dos íons acílios e de misturas de duas nitrilas.

A simetria do anel 1,3,5-oxadiazínio permite dois caminhos de dissociação alternativos: dupla retro-adição que reforma os íons acílios reagentes ou uma dissociação análoga que formalmente é combinada com a ciclização promovendo uma troca de grupos entre uma nitrila e o íon acílio, um processo que pode ser sumarizado como $RCO^+ + 2R^1CN$ -> íon cíclico 1,3,5-oxadiazínio -> $R^1CO^+ + R^1CN + RCN$. Dependendo dos substituintes nas posições 2- e 6- do anel, estas dissociações podem competir ou dominar uma sobre as outras, onde a troca de grupos prova que os íons cíclicos 1,3,5-oxadiazínios são formados. Os íons isoméricos 1,3,5-oxadiazínios com diferentes substituintes na posição 4,6 são facilmente distinguidos por CID devido à dissociação por dupla retro-adição, onde a nitrila adicionada por último é perdida primeiro.

4.4 Reações de Transacetalização entre íons acílios e acetais por APCI/ESI

4.4.1 Introdução:

Técnicas de ionização, utilizando pressão atmosférica: ionização química à pressão atmosférica (APCI, "atmosferic pressure chemical ionization"),[62] fotoionização química à pressão atmosférica,[63] ionização por "spray" eletrolítico à pressão atmosférica (ESI, "electrospray ionization")[64] junto com ionização por "laser" assistida por matriz[65] têm revolucionado o modo que as moléculas são ionizadas e transferidas para o ambiente gasoso dos espectrômetros de massas para análise por massas, caracterização estrutural e medidas de propriedades Físico-Químicas.[66]

Técnica à pressão atmosférica (API, "atmosferic pressure ionization") tem expandido grandemente a faixa de moléculas que podem ser analisadas por "MS" incluindo aquelas moléculas de alta polaridade,[67] complexidade molecular e alta massa, até agora na casa de milhões de unidades de massa,[68] tanto que são raras as exceções de constituintes da fase condensada que não podem ser trazidas para fase gasosa na forma ionizada para investigação por massa.

Técnicas de API são chamadas brandas, pois elas produzem à "temperatura ambiente" moléculas relativamente frias. As moléculas iônicas podem ser formadas no estado protonado (MH^+), cationizado ($MMetal^{n+}$) ou desprotonado ($[M - H]^-$). A formação exclusiva destas moléculas "intactas" é de grande vantagem para medidas de massas moleculares de misturas. Mas a falta de dissociação elimina a informação estrutural fornecida pelos fragmentos iônicos mais leves. Tal limitação pode ser convenientemente resolvida através da dissociação induzida por colisão (CID, "collision induced dissociation") realizada através de experimentos de massas seqüenciais.

Interessantemente, o ambiente de pressão atmosférica nas técnicas de API também abre uma oportunidade única para proceder dissociação das moléculas intactas MH^+, $MMetal^{n+}$ ou $[M - H]^-$ na própria fonte de ionização ("in-source CID"). A técnica de "in-source CID"[69] é uma técnica menos refinada que o CID seqüencial devido a não haver seleção de massas do íon pai, mas a técnica de dissociação na fonte tem a vantagem de ser facilmente implementada em espectrômetros de massas com somente

um analisador de massas através do aumento da energia cinética dos íons pais durante suas trajetórias na fonte.

Embora CID e EI sejam ferramentas poderosas de análise estrutural (conectividades entre átomos) de íons gasosos e vastamente utilizados como método padrão de analise estrutural,[70] reações íon-molécula são muito mais seletivas que simples processos de quebras de ligações pois são altamente seletivas pelas classes químicas e servem como diagnóstico estrutural feito sob condições de ionização química ou através de experimentos seqüenciais com seleção de íons.[71] Estas reações podem ser projetadas para revelar detalhes estruturais muito sutis devido à sensibilidade a efeitos eletrônicos e estéricos provocados pela posição de grupos funcionais, configurações moleculares e conformação.[36]

Adicionalmente, o ambiente gasoso dos espectrômetros de massas com as diversificadas técnicas de ionização, abre um vasto campo de uma variedade muito grande de íons dos mais diversos tipos, como os íons acílios ($R\text{-}C^{+}{=}O$) que são altamente estáveis e de uma reatividade muito rica na fase gasosa.[36f,72] Entre as muitas reações na fase gasosa com íons acílios está incluída a transacetalização iônica com acetais cíclicos (a reação de Eberlin)[73] que é muito geral e foi observada uma variedade de aplicações para reconhecimento e caracterização estrutural de íons e compostos neutros.[16,74] Para realizar tais reações em condições bem controladas de espectrometria de massas seqüencial, selecionando o íon acílio, os reagentes neutros têm de ser suficientemente voláteis de tal maneira que se preencha propriamente a região da cela de colisão.[73,74] O problema mostrado pelos acetais em apresentar uma volatilidade baixa (para MM altas) é a principal limitação para aplicações mais gerais destas reações íon-moléculas para diagnóstico estrutural.

Neste capítulo nós descrevemos a utilização da técnica de reação íon-molécula na fonte ("in-source IMR") em condições de ESI e APCI utilizando tetrametiluréia (TMU) como um dopante eficiente para as reações seletivas por classe química e diagnóstica estrutural através de transacetalização com íons acílios gasosos, $(CH_3)_2NCO^{+}$, com uma variedade de acetais cíclicos polares, pesados e estruturalmente complexos.

4.4.2 Parte Experimental

Os íons acílios gasosos $(CH_3)_2NCO^+$ foram produzidos através da auto-dissociação do TMU protonado que é de alta labilidade sob as condições de ESI e APCI utilizadas. Os íons reagem com um acetal neutro (sintetizados através reações em solução de aldeídos ou cetonas com dióis) na fonte de API e os produtos da reação são analisados com experimentos espectrométricos de simples (MS) e duplo (MS^2) estágios com um equipamento seqüencial híbrido (quadrupolo, cela de colisão hexapolar, e o analisador por tempo de vôo) Qtof (Manchester, U.K.). As soluções de acetais dopadas com TMU (1 mg de acetal e 1 μL de TMU dissolvido em 1,5 mL de solvente) foram preparadas em diferentes solventes: benzeno, tolueno, água e soluções 1:1 metanol/água. Devem ser tomados cuidados quanto à escolha do solvente pois ele deve ser inerte através da reação com o íon acílio.[72,73,74] Assim, acetonitrila (um solvente comum para ESI e APCI) deve ser evitado devido à acetonitrila (e outras nitrilas) reagir eficientemente com $(CH_3)_2NCO^+$ por ciclização via dupla adição formando íons 1,3,5-oxadiazínios.[72] As voltagens do cone e extrator foram ajustadas para 1 e 40 V, respectivamente com o intuito de formar o íon acílio com altos rendimentos, aumentar o tempo de residência na região da fonte de íons e favorecer as colisões de baixa energia com o acetal neutro. Os outros parâmetros como da voltagem do capilar (ESI) ou da agulha (APCI) foram ambas ajustadas para 4000 V. Os experimentos MS^2 foram realizados selecionando os íons de interesse formados por reação íon/molécula na fonte e dissociados por CID com nitrogênio a 15 eV de energia na cela de colisão hexapolar, e a análise de massas foi obtida com resolução de 5000 em um analisador por tempo de vôo ortogonal Tof.

4.4.3 Resultados e discussão

4.4.3.1 Reações preliminares.

Para proceder-se reações íon-molécula na fonte de forma eficiente sob condições de APCI e ESI, se faz necessário que um dopante neutro tenha função de precursor do íon acílio reagente e deve preencher dois critérios cruciais: (i) simplificar a composição iônica na região da fonte onde se dá a ionização e a reação para maximizar o rendimento dos produtos desejado provenientes das reações íon-molécula na fonte, o dopante protonado deve ser suficientemente lábil para se dissociar facilmente (preferencialmente por uma rota única) para o íon acílio, ambas por decomposição metaestável ou colisões na fonte próximas de zero em energia que usualmente promovem simultaneamente e eficientemente CID na fonte do dopante protonado; (ii) o íon acílio formado deve ser de baixa acidez e de reatividade considerável através da reação de transacetalização desejada para minimizar a reação de transferência de prótons competitiva e indesejada (a qual poderia promover a protonação não específica do acetal cíclico). Felizmente o TMU se encaixa perfeitamente em ambos critérios como a Figura 28 mostra para uma solução de TMU em benzeno (espectros de massas similares são obtidos para soluções de TMU em tolueno, água, e 1:1 agua/metanol).

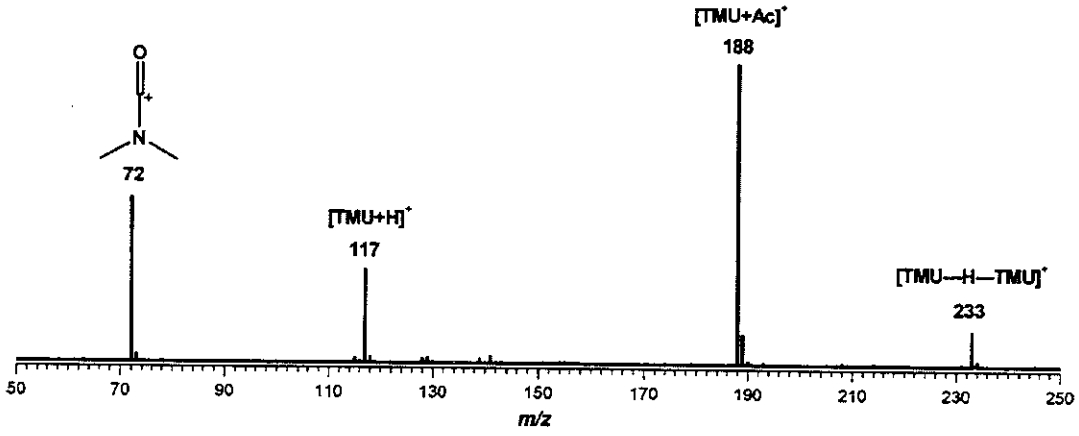
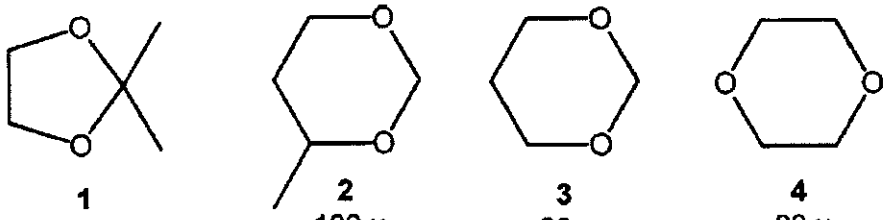


Figura 28 Espectro de massas utilizando APCI do branco para uma solução de TMU em benzeno.

Tanto as técnicas de APCI como ESI para se obter os espectros da solução de TMU resulta no mesmo padrão de abundâncias dos íons: a molécula de TMU protonada de *m/z* 117 e o íon acílio de longe o mais abundante de *m/z* 72 resultante da dissociação do TMU protonado. O íon $(CH_3)_2NCO^+$ é o íon acílio menos ácido e o mais reativo até agora encontrado através de transacetalização na fase gasosa.[73,74] No ambiente do ESI e em condições objetivando maximizar as reações íon-molécula, o produto iônico de *m/z* 188 (o aduto TMU-$(CH_3)_2NCO^+$) e o dímero ligado por próton de TMU [TMU---H^+---TMU] de *m/z* 233 são ambos formados em grande extensão.

Tendo estabelecido um ambiente apropriado para as reações utilizando ESI e APCI, nós utilizamos as mesmas condições para realizar as reações teste para o método com acetais cíclicos de referência (**1-3**),[74] que são estruturalmente simples, de baixa massa moleculares e voláteis. Como mostrado na Figura 29a, adicionando 2,2-dimetil-1,3-dioxolano (**1**) em uma solução dopada de TMU em tolueno, é formado um produto adicional (compare com a Figura 28), único e intenso é observado de *m/z* 116. Este íon é um acetal cíclico iônico formado pela transacetalização iônica de um acetal neutro com o íon acílio (Esquema 23).[74a]



1 102 u

2 102 u

3 88 u

4 88 u

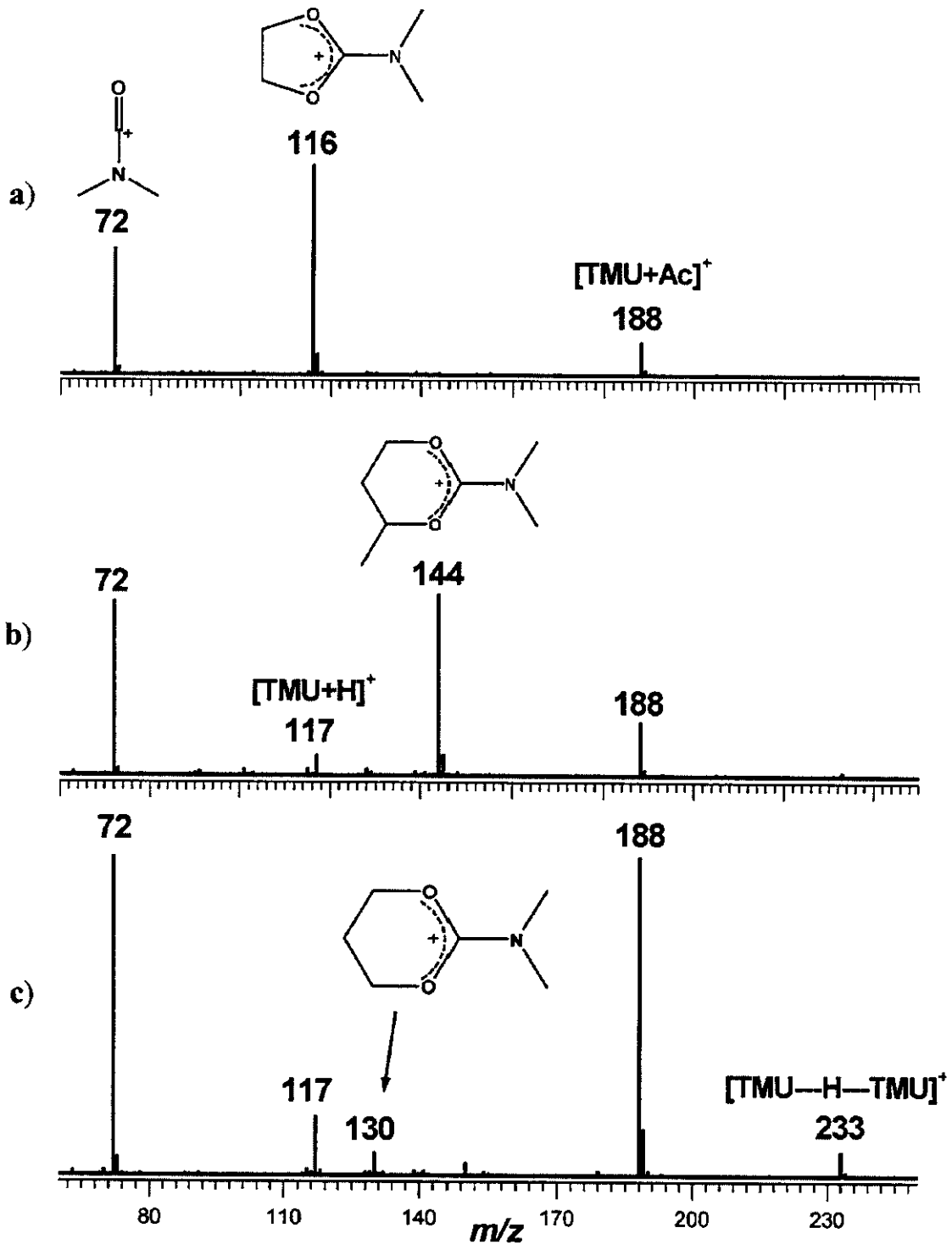
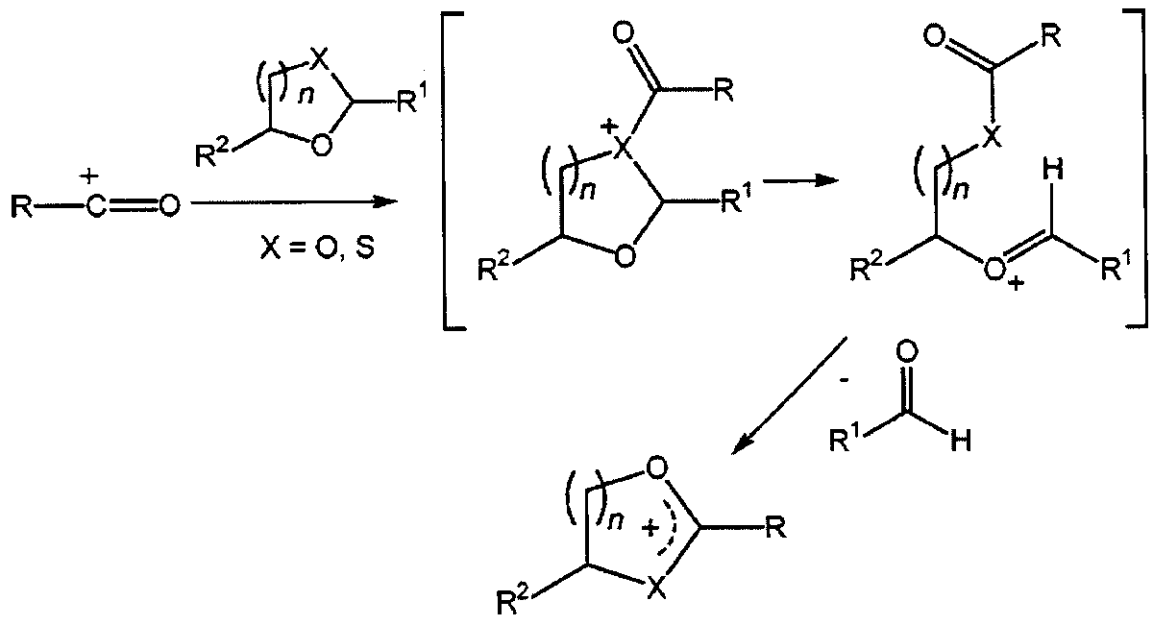


Figura 29 Espectro de massas das reações íon-molécula na fonte por APCI de soluções em água/metanol dos acetais (a) **1**, (b) **2** e (c) **3** com TMU como dopante para a formação do íon acílio $(CH_3)_2NCO^+$ (Ac^+). Note que o branco para uma solução de TMU em água/metanol não foi subtraído.



Esquema 23 Mecanismo da reação de Eberlin

Note o rendimento relativamente alto, de aproximadamente 100% com o acetal **1** de 102u detectado exclusivamente pelo produto de transacetalização de *m/z* 116. O produto de *m/z* 116 é formado por troca de acetona (58u) pelo íon acílio (*m/z* 72) onde não é observado o acetal protonado $\mathbf{1}H^+$ de *m/z* 103 que seria observado competitivamente (e aqui não observado) por reação de transferência de próton (o TMU altamente básico é protonado preferencialmente).

Sob condições mais bem controladas de espectrometria de massas seqüencial ajustada para reações íon-molécula, os acetais protonados (e produtos de abstração de hidreto) são observados freqüentemente como produtos.[73,74] Provavelmente sob as condições de reações íon-moléculas diretamente na fonte de ionização mostrada aqui, o TMU por ser muito mais básico, compete favoravelmente pelos prótons; então acetais protonados não são formados ou pelo menos não sobrevivem à alta pressão (atmosférica). Pelo contrário, o TMU acetilado de *m/z* 188 é consideravelmente lábil sendo revertido sob colisões para o íon acílio, o qual reage irreversivelmente (permitindo a saída de um produto carbonílico neutro: acetona no Esquema 23) com o acetal por transacetalização iônica, com **1** formando o acetal iônico cíclico de *m/z* 116 majoritário no espectro.[74]

A Figura 29a e 29b exemplificam casos nos quais a transacetalização funciona, não só como seletiva pela classe química, mas também como diagnóstico estrutural (para acetais em geral) adicionalmente com distinção isomérica. O acetal **1** ser caracterizado sob as condições de ESI e APCI com reações íon-molécula na fonte por troca de acetona pelo íon acílio formando um produto iônico de *m/z* 116 (Figura 29a), o acetal isomérico **2** é caracterizado pela troca por formaldeído pelo íon-sonda $(CH_3)_2NCO^+$ por transacetalização formando o produto de *m/z* 144 (Figura 29b).

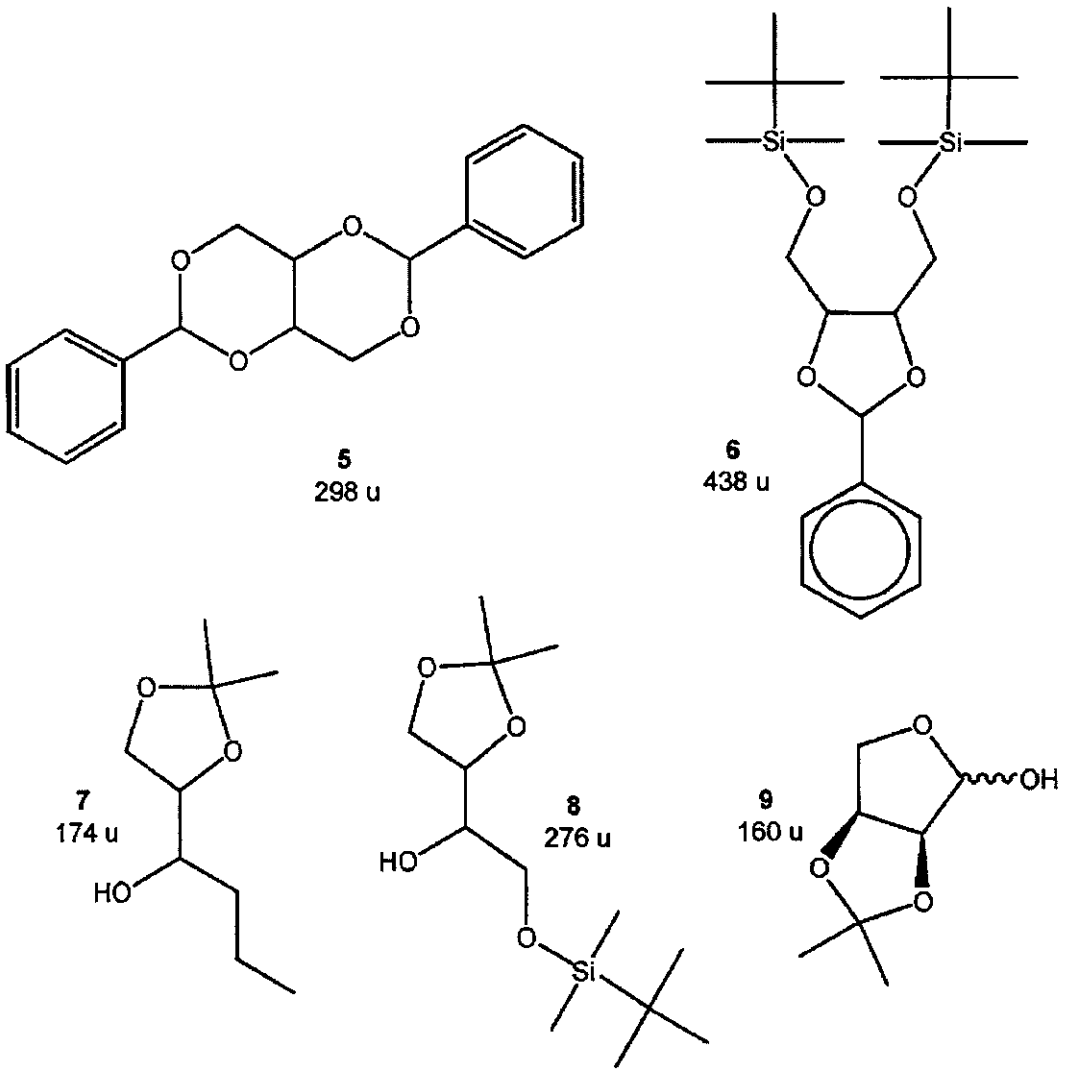
Foi observada uma relação estrutural direta entre o acetal e os produtos iônicos, devido aos substituintes na posição C2 serem perdidos no curso da transacetalização iônica como parte do produto carbonílico neutro, enquanto os substituintes não ligados no C2 permanecem causando então um deslocamento de massa no acetal iônico produzido (Esquema 23). A Figura 29c mostra outro caso de prova do funcionamento do método o qual um 1,3-acetal o 1,3-dioxano (**3**), é distinguido de um isômero não acetal, seu análogo 1,4-dioxano (**4**). Enquanto **3** é caracterizado pelo produto de transacetalização iônica de *m/z* 130 (Figura 29c) (note que estes são espectros com a subtração do branco), seu isômero **4** (espectro não mostrado) resulta em produtos característicos do espectro de massas do branco. Isto ocorre devido ao **4** não ser básico suficiente para competir por um próton com TMU nem um 1,3-acetal cíclico e por isso inerte para a transacetalização.

4.4.3.2 Subtração do branco com TMU.

Devido à abundância relativa dos acetais cíclicos iônicos dependerem das concentrações relativas do dopante TMU e do acetal cíclico, nas fontes de ESI ou APCI sob condições de reações íon-molécula (Figura 28), a subtração de espectros é altamente recomendada pois elimina os produtos iônicos provenientes das reações de TMU com ele mesmo (Figura 28).

4.4.3.3 Acetais Cíclicos mais complexos, menos voláteis e mais pesados.

Depois de confirmados que a transacetalização iônica ocorre com os acetais cíclicos de referência, era importante testar o método para acetais mais complexos, menos voláteis e estruturas multifuncional. Foram selecionados cinco acetais (**5-9**) de importância sintética (Esquema 24).[75]



Esquema 24 Acetais de massas altas e polares utilizados nas análises estruturais por reação de Eberlin

A Figura 30a exemplifica o espectro de massas do TMU subtraído do acetal **6**, com a formação respectiva e praticamente exclusiva do acetal cíclico iônico de *m/z* 404,

todos estes acetais reagem utilizando ESI e APCI sob as condições de reações íon-molécula utilizada nas fontes com TMU como dopante.

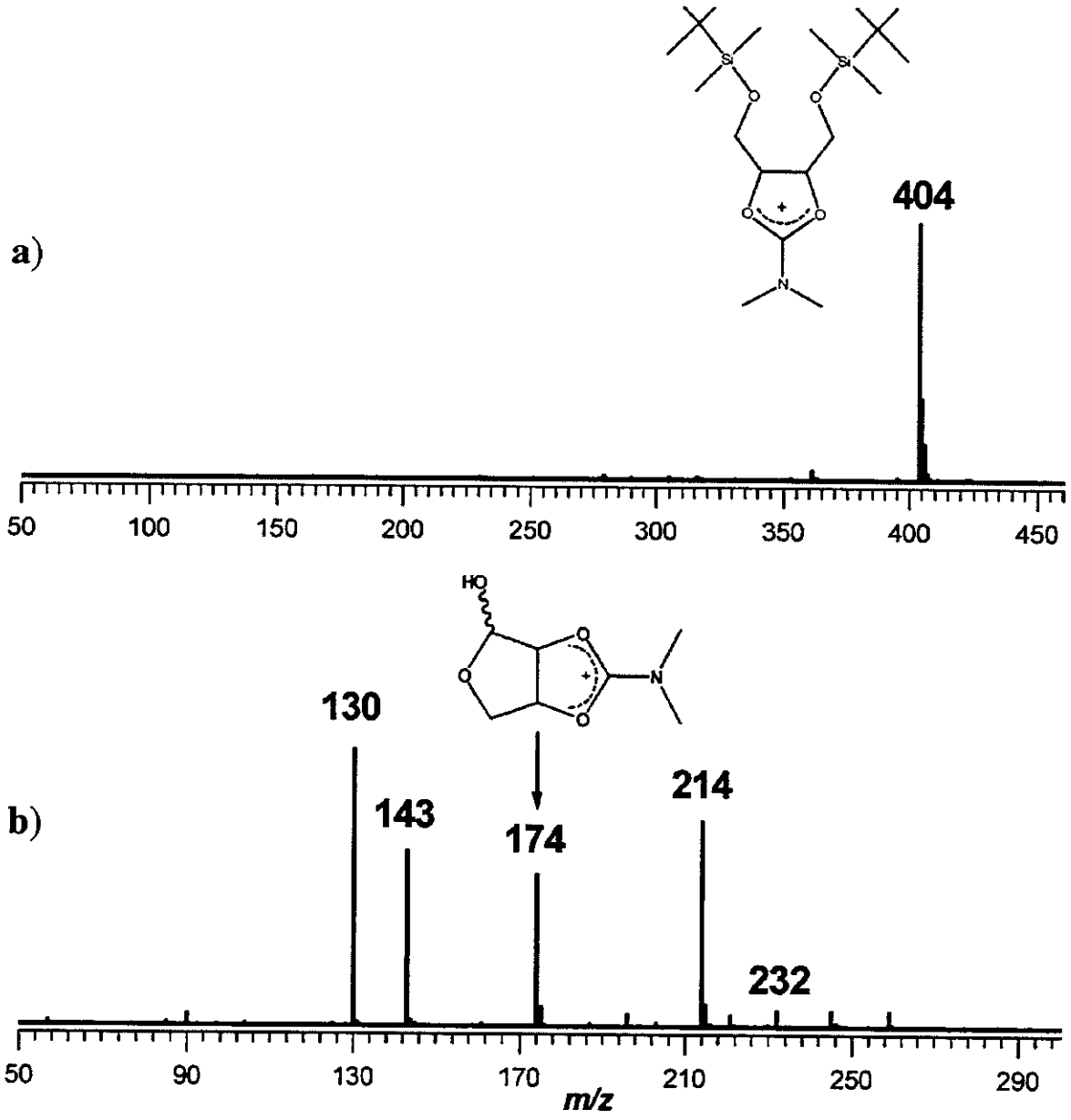
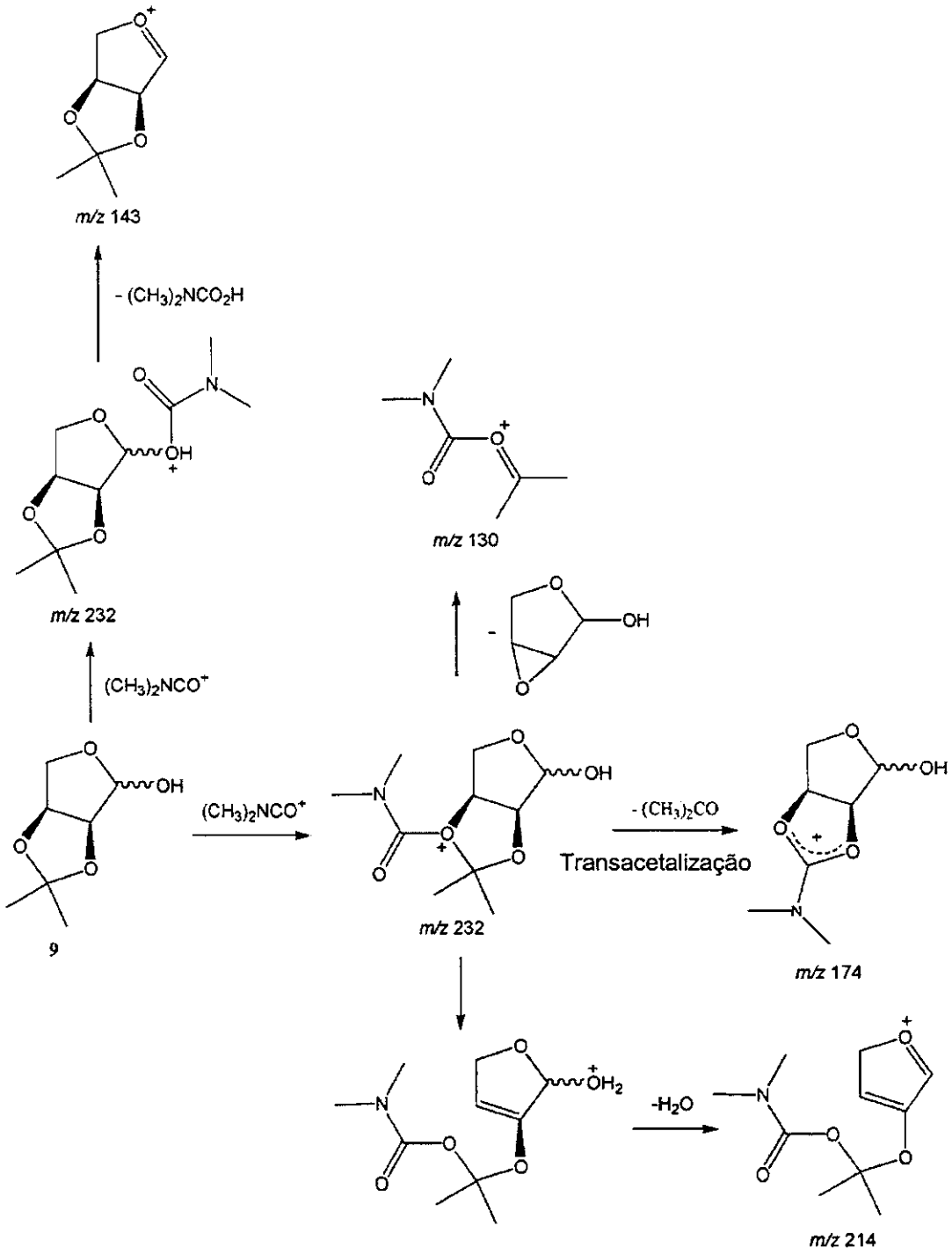


Figura 30 Espectro de massas (branco de TMU subtraído) das reações íon-molécula na fonte por APCI do íon acílio de *m/z* 72 com os acetais (a) **6** e (b) **9**. TMU foi utilizado como dopante das soluções benzênicas dos acetais. O espectro de massas com os acetais de **5** a **8** mostram (não mostrado) (a) que os acetais iônicos cíclicos correspondentes a transacetalização estão praticamente sozinhos no espectro. O Esquema 2 mostra as atribuições para (b).



Esquema 25 Mecanismo de dissociação proposto para os produtos do acetal 9 com $(CH_3)_2NCO^+$.

O espectro de massas com os acetais de **5** a **8** mostram (não mostrado) como (a) que os acetais iônicos cíclicos correspondentes a transacetalização estão praticamente sozinhos no espectro. Note a característica de diagnóstico estrutural da variação de massas ocorrida durante a transacetalização iônica: por exemplo, o acetal **6** de massa molecular 438u sob condições de reação com íons acílio de *m/z* 72 forma um acetal iônico de *m/z* 404 devido à substituição de uma molécula neutra de benzaldeido de massa molecular 106u (438 – 106 + 72 = 404) em C2 pelo íon acílio de *m/z* 72: daí podemos inferir que o acetal cíclico neutro tem um grupo fenila ligado ao C2.

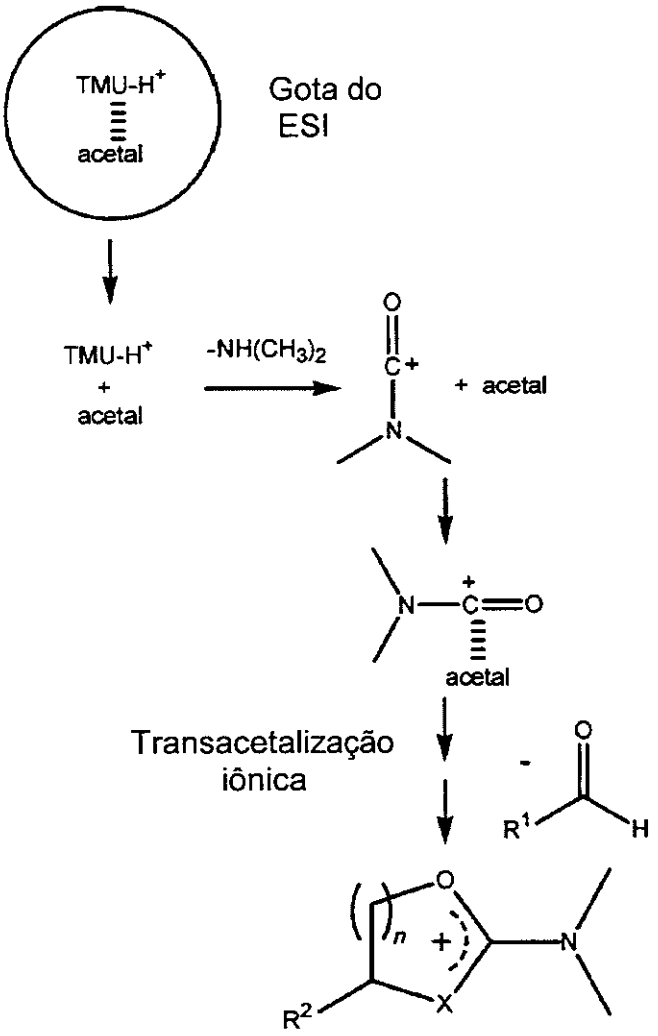
O acetal **9** é ilustrativo devido a este ser multifuncional contendo um grupamento α-hidroxi-éter favorecendo não somente a transacetalização iônica, formando o acetal iônico de *m/z* 174 (Figura 30b), mas também um número de reações também diagnósticas da estrutura, sendo os produtos iônicos principais competitivos com a reação principal de *m/z* 130, 143 e 214 (Esquema 25). Provavelmente, o produto iônico de *m/z* 214 é formado a partir do aduto nascente por perda de água (resfriando o produto iônico), o produto de *m/z* 143 é formado por abstração de hidroxila enquanto que o íon de *m/z* 130 também parece ser formado pelo aduto nascente de *m/z* 232 pela reação de abstração de acetona. Note que a abstração de hidroxila é uma reação comum e diagnóstica estrutural na fase gasosa para reação entre íons acílios com álcoois, ou mais particularmente α-hidroxi-éteres.[76]

4.4.3.4 Fundamentos de reações íon-molécula na fonte de APCI e ESI.

Reações íon-molécula na fonte sob condições de APCI e ESI é um novo meio de expandir o intervalo de massa, polaridade e complexidade estrutural de moléculas que podem ser trazidas para fase gasosa para reagir de maneira seletiva por uma classe química e diagnóstica estrutural. Antes, reações íon-molécula, e em particular transacetalização iônica,[73,74] eram limitadas para compostos neutros mais voláteis e leves devido a estes serem trazidos para fase gasosa volatilizando-os à temperatura ambiente ou por aquecimento rápido. Agora, com as técnicas de API, moléculas consideravelmente mais polares e mais pesadas podem ser transferidas para fase

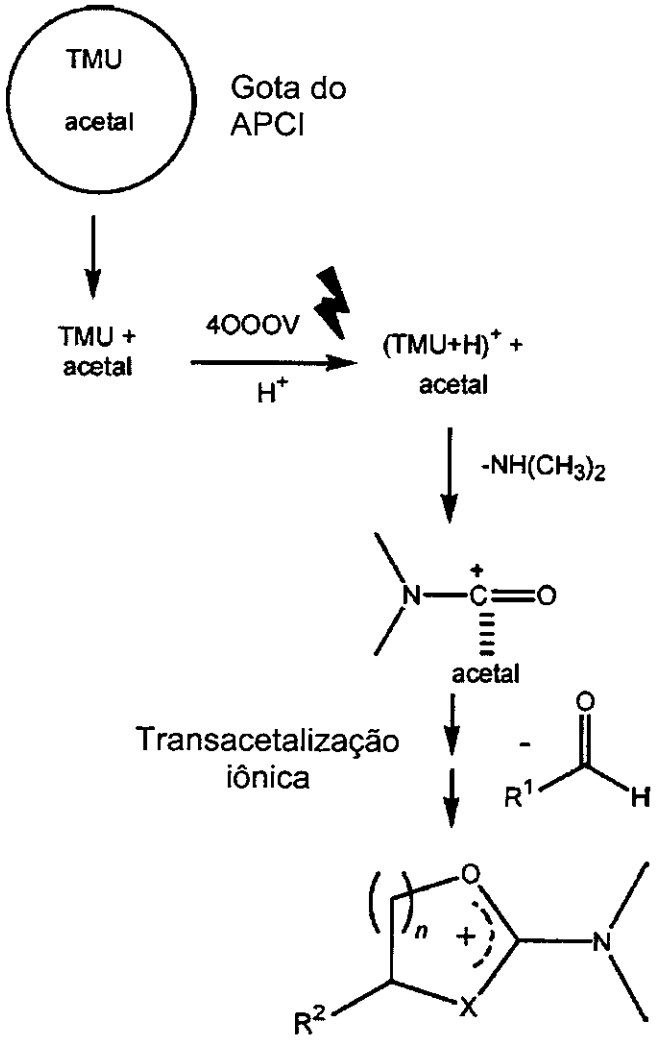
gasosa do ambiente da fonte do espectrômetro de massas onde as reações íon-molécula ocorrem.

(a) ESI. O mecanismo para reação de transacetalização iônica na fonte de ESI pode ser racionalizado utilizando o modelo de ESI para a evaporação e íons (IEM, "ion evaporation mechanism").[64a] O TMU protonado e o acetal neutro evaporam-se simultaneamente da solução da gota formada por ESI para a fase gasosa, então o TMU protonado gasoso se dissocia por perda de dimetil-amina para formar o íon acílio reagente, o complexo íon acílio-acetal e de forma irreversível a transacetalização ocorre dentro deste complexo íon-molécula gasoso, formando o produto iônico observado, o acetal cíclico iônico (Esquema 26).



Esquema 26 Mecanismo para reação proposto para transacetalização iônica na fonte de ESI.

(b) APCI. Durante o APCI, ambos TMU e o acetal cíclico são transferidos como neutros da solução para a fase gasosa. Provavelmente a descarga corona com ionização por reações de transferência de prótons forma principalmente o TMU protonado, o composto neutro mais básico da solução utilizada. A dissociação do TMU protonado por perda de dimetilamina é induzida principalmente pelo excesso de energia interna adquirido durante o processo exotérmico da reação de transferência de próton, o que forma o íon acílio desejado. O complexo gasoso formado entre o íon acílio e o acetal são portanto formados, e posteriormente ocorrendo a transacetalização iônica, formando o produto que é o acetal iônico cíclico (Esquema 27).



Esquema 27 Mecanismo para reação proposto para transacetalização iônica na fonte de APCI.

4.4.3.5 Experimentos de CID: Determinação das estruturas e mecanismos de reação.

A maioria dos acetais iônicos cíclicos formados por transacetalização iônica, quando selecionados por massa e sujeitos a colisões à baixa energia (10-20 eV) com argônio na câmara de colisão do espectrômetro de massas seqüencial Qtof, se dissociam para re-formar o íon acílio precursor de *m/z* 72, como exemplificado pelo íon de *m/z* 130 da reação com 1,3-dioxano (Figura 31a).

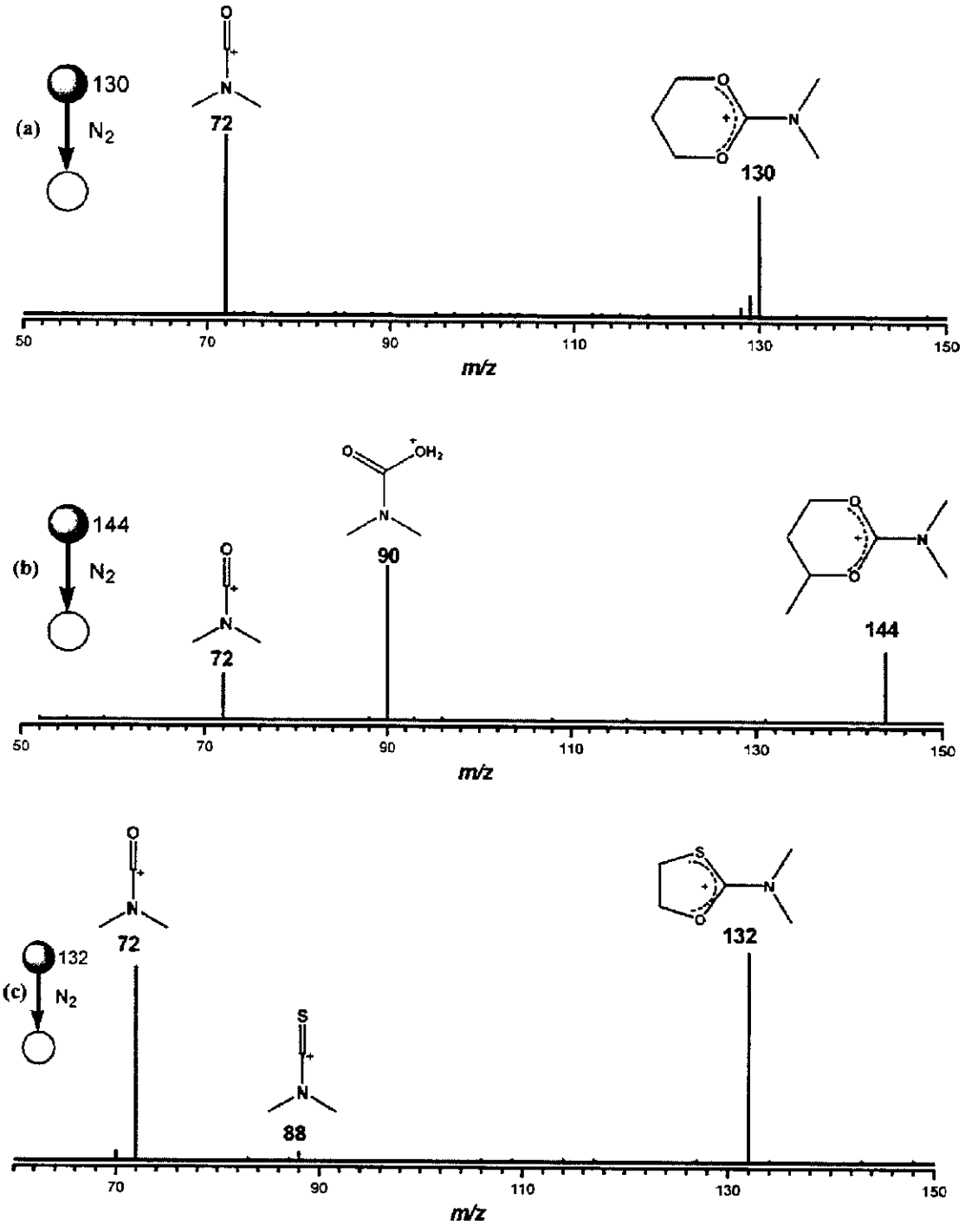
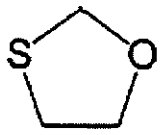


Figura 31 Espectro de massas (MS^2) dos produtos iônicos formados por CID à baixa energia dos acetais iônicos cíclicos formados por transacetalização na fonte de APCI do íon acílio com (a) 1,3-dioxano, (b) 4-metil-1,3-dioxano e (c) 1,3-thioxolano.

Quando a complexidade do íon aumenta com a presença de outros grupos funcionais ou substituintes (quando estão em posições que favorecem quebras de ligações), estes íons tendem a favorecer outras dissociações competitivas, como exemplificado para o acetal iônico cíclico de *m/z* 144 formado de **2** (Figura 31b). Este íon se dissocia competitivamente para formar um fragmento iônico de *m/z* 90 (ácido dimetilcarbâmico protonado), um processo que corresponde formalmente à reação de abstração de água induzida por colisão.

A Figura 31c mostra o espectro de massas seqüencial de CID do acetal iônico cíclico formado pela transacetalização iônica do íon acílio com o tioacetal,1,3-tioxolano (**10**) (Esquema 28).

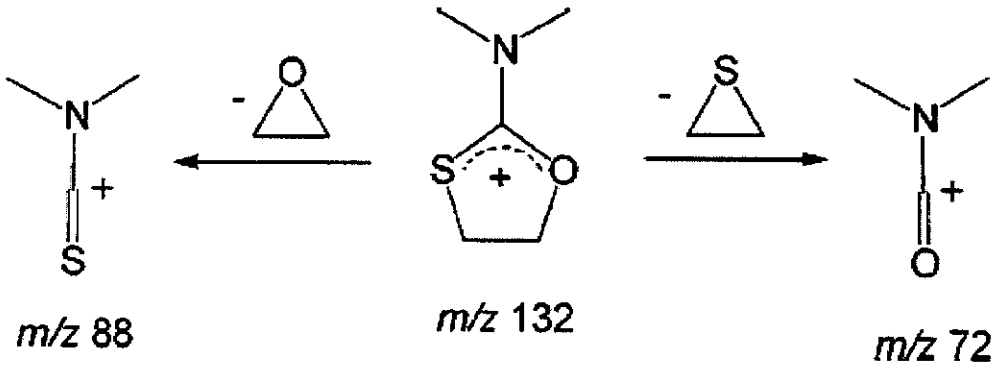


10

90 u

Esquema 28 Tioacetal utilizado para comprovar a ciclização do produto de transacetalização com o íon acílio $(CH_3)_2NCO^+$.

Esta reação produz ambos os produtos esperados, o acetal iônico cíclico de *m/z* 116 e o tioacetal iônico cíclico de *m/z* 132. Os produtos de CID do íon de m/z 132 confirmam a estrutura cíclica dos acetais iônicos (Esquema 29) devido na dissociação ser formado o íon acílio de *m/z* 72 e o análogo tioacílio de *m/z* 88 o que só pode ser racionalizado pelo intermédio do íon cíclico (Esquema 29).



Esquema 29 Dois caminhos de dissociação do íon de *m/z* 132 comprovando que o produto de transacetalização é cíclico.

A presença de outros grupos funcionais contribui com o aumento na complexidade estrutural tendendo a favorecer outros caminhos dissociativos competitivos seletivos para os acetais iônicos cíclicos. Assim, o acetal iônico cíclico de *m/z* 404 formado de **6** (Figura 32a) se dissocia principalmente para o íon de *m/z* 315 por perda de *N,N*-dimetilcarbamato (Esquema 30), enquanto que o íon de *m/z* 174 formado de **9** se dissocia principalmente para os íons de *m/z* 90 e 85 (Figura 32b) por caminhos de dissociação racionalizados no Esquema 31 e também para o íon acílio de *m/z* 72.

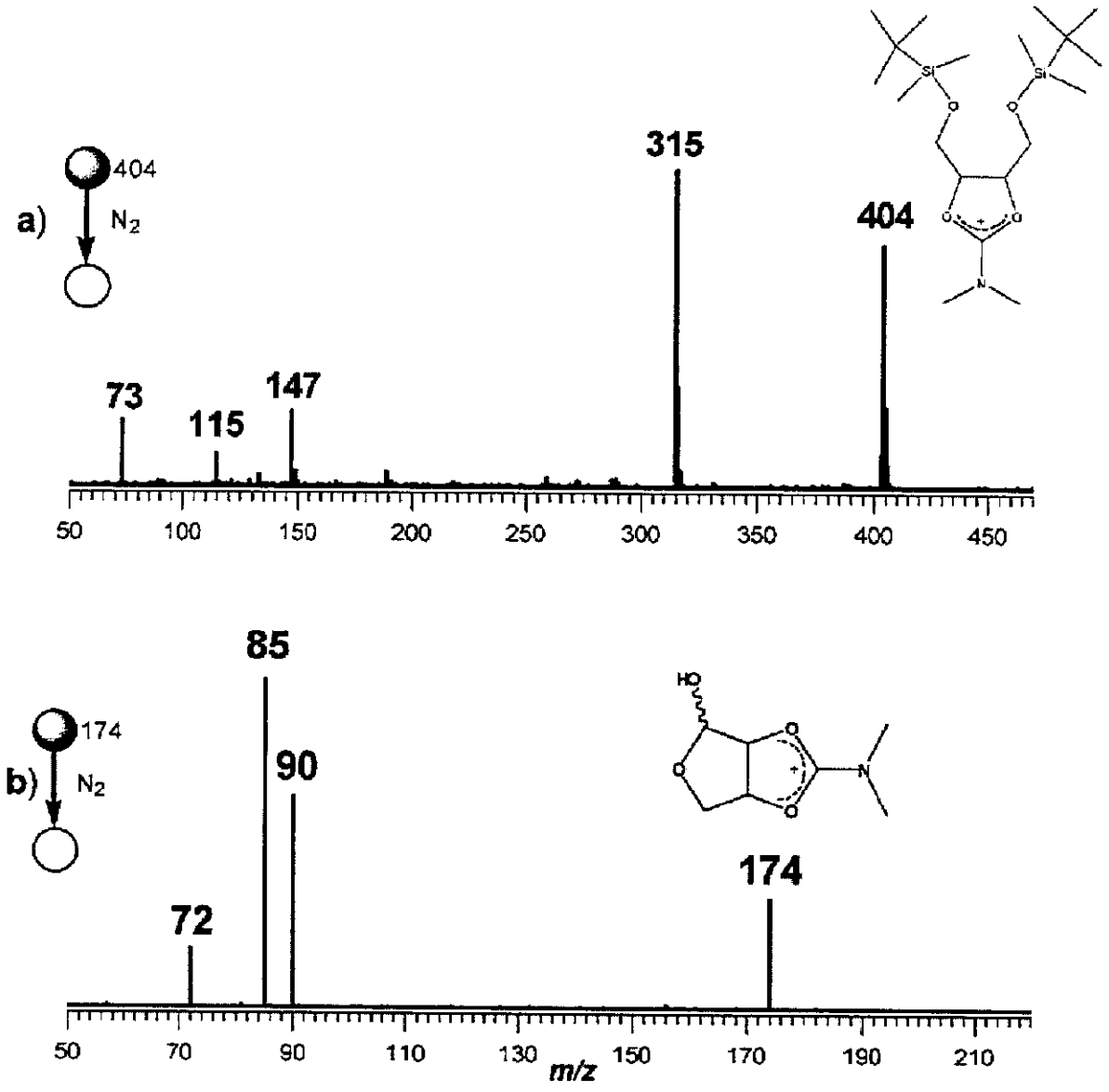
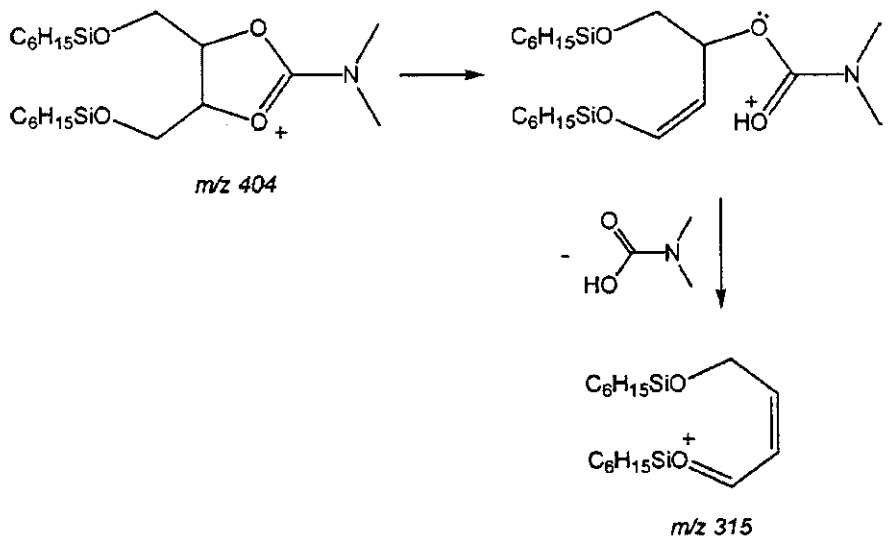
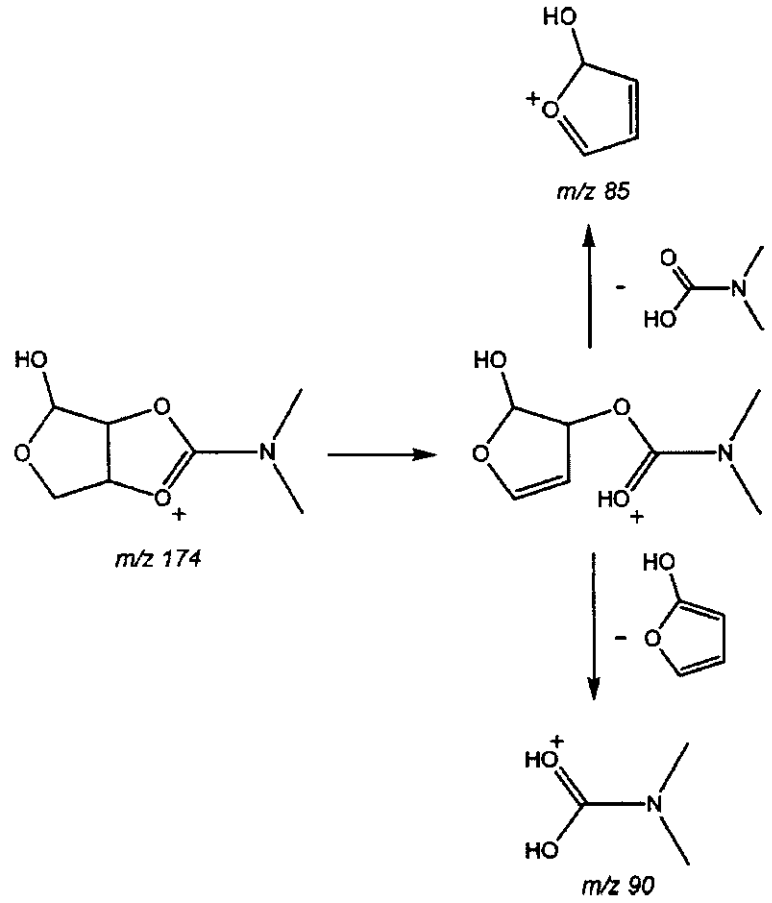


Figura 32 Espectro de massas (MS^2) dos produtos iônicos formados por CID à baixa energia dos acetais iônicos cíclicos formados por transacetalização do íon acílio com o acetal cíclico (a) **6** de *m/z* 404 e (b) **9** de *m/z* 174.



Esquema 30 Mecanismo de dissociação proposto para o produto de transacetalização formado a partir do acetal 6.



Esquema 31 Mecanismo de dissociação proposto para o produto de transacetalização formado a partir do acetal 9.

4.4.4 Conclusão:

Fontes de ESI e APCI, sob baixa energia cinética, cria condições de reações íon-molécula, que neste trabalho foram utilizadas para transacetalização iônica de acetais cíclicos com o íon acílio gasoso $(CH_3)_2NCO^+$ com alta eficiência. ESI e APCI expandem grandemente a variedade de acetais cíclicos que podem ser trazidos para fase gasosa para reação por transacetalização iônica. Foi mostrado que acetais cíclicos muito mais pesados, mais polares e menos voláteis que os empregados em trabalhos anteriores em celas de colisão quadrupolares, reagem eficientemente por transacetalização iônica utilizando fontes de ESI e APCI em condições de reações íon-molécula na fonte.

A tetrametiluréia age como um dopante muito eficiente e pode ser facilmente co-injetada com o acetal em soluções de benzeno, tolueno, água ou água/metanol. Condições de pressão atmosférica e baixa energia de colisão, ajustadas em ESI e APCI para reações íon-molécula na fonte, favorece o íon $(CH_3)_2NCO^+$ reagir competitivamente com TMU para formar o TMU acetilado ou com o acetal neutro através da transacetalização iônica seletiva para formar o acetal iônico cíclico desejado que é uma reação estruturalmente diagnóstica estrutural para o acetal neutro. Subtração de espectros remove os produtos iônicos das auto-reações do dopante (TMU), produzindo um espectro de massas somente dos produtos de interesse.

A informação dos substituintes no anel do acetal pode ser obtida pelos deslocamentos de massas resultantes da troca de aldeído/cetona pelo íon acílio que ocorre sob transacetalização iônica como mostrado para que misturas de acetais O/S, O/NH e S/NH formam dois produtos iônicos cíclicos,[73,74d] o que se adiciona na capacidade diagnóstica estrutural da reação. Dissociação induzida por colisão utilizando experimentos espectrométricos de massas foram utilizados para a obtenção de uma seletividade mais apurada para caracterização estrutural ou reconhecimento químico. A maioria dos acetais iônica cíclicos se dissociou exclusivamente ou quase exclusivamente para re-formar o íon acílio reagente $(CH_3)_2NCO^+$ enquanto que a presença de grupamentos com funções adicionais aumentaram a complexidade estrutural tendendo a favorecer outros canais de dissociação seletivos.

4.5 Espectrometria de Massas por Introdução via Fibra de Micro-extração em Fase Sólida

4.5.1 Introdução:

Micro-extração em fase sólida (SPME, "solid phase micro extraction") é uma alternativa atrativa quando comparada com técnicas mais convencionais de extração tendo ganhado aceitação muito grande e é utilizada vantajosamente em vários procedimentos analíticos.[27,77] SPME se tornou popular em análises de cromatografia gasosa (GC, "gas cromatography") e HPLC (HPLC, "high performance liquid cromatography") cromatografia líquida de alta eficiência) pois integra procedimentos de amostragem, extração, pré-concentração e introdução de amostra em uma só etapa, de forma simples, rápida, sensível e sem utilização de solventes.

A técnica de SPME utiliza um pequeno pedaço de fibra óptica à qual é aplicado um recobrimento de fase estacionária líquida para absorver ou adsorver os analitos e concentrá-los no recobrimento. Entre a variedade de sorbentes disponíveis o recobrimento de PDMS (polidimetilsiloxano) vem sendo o mais utilizado para análise de materiais orgânicos voláteis (VOC, "volatile organic compound") e semivoláteis (SVOC,"semivolatile organic compound"). SPME é geralmente acoplado com GC (/MS); mais recentemente foi desenvolvido um acoplamento mais simples de SPME em um MS utilizando uma coluna capilar curta para obter o perfil de compostos voláteis de queijo.[78]

Membranas de PMDS são também largamente utilizadas para amostragem e introdução direta de analitos em um espectrômetro de massas, técnica esta denominada espectrometria de massas por introdução via membrana (MIMS).[79] De forma similar a SPME, MIMS também integra de forma simplificada a extração, pré-concentração de VOC e SVOC de uma forma rápida e sensível em uma etapa somente e tem sido também utilizada em vários procedimentos analíticos.[80] Em MIMS, os VOC e SVOC migram seletivamente da matriz (geralmente soluções aquosas) para membrana hidrofóbica, são pré-concentrados e se difundem através da membrana e se evaporam da superfície da membrana diretamente para o alto vácuo da região de ionização do espectrômetro de massas, no qual os analitos são ionizados e então detectados por

análise de massa. Na técnica derivada de MIMS conhecida como "trap-and-release" (T&R)-MIMS[29,81] e a técnica de "single-sided" MIMS (SS-MIMS),[82] compostos mais polares SVOC também podem ser analisados com alta sensibilidade permitindo a pré-concentração dentro da membrana seguida de uma rápida dessorção térmica dos SVOC armazenados na membrana para a fase gasosa.

Neste capitulo, nós mostramos o primeiro acoplamento direto de SPME à MS, através de uma nova técnica chamada espectrometria de massas por introdução via fibra (FIMS).[83,84] Neste trabalho a fibra de SPME com recobrimento de PDMS é utilizado para a extração do analito (VOC e SVOC), a introdução e dessorção térmica na região de ionização do espectrômetro de massas. Portanto, a técnica de FIMS combina a seletividade na adsorção do analito no PDMS, a sensibilidade na pré-concentração do analito na membrana e dessorção single-sided e a versatilidade da amostragem por SPME. A introdução da amostra ocorre diretamente na região de ionização do espectrômetro de massas para o máximo de rendimento na ionização.

Como ocorre para T&R-MIMS, a técnica de FIMS também se beneficia da radiação dos dois filamentos de ionização do espectrômetro de massas para promover o aquecimento uniforme do recobrimento da fibra para dessorção dos analitos do PDMS diretamente na região de ionização para o máximo de sensibilidade.

4.5.2 Parte Experimental

4.5.2.1 Equipamento.

Os experimentos foram realizados utilizando um espectrômetro de massas Extrel (Pittsburg, PA) equipado com um quadrupolo de alta transmissão de ¾ de polegada. Como mostrado pela Figura 33, a fonte de íons Extrel padrão (D) foi utilizada com poucas modificações: O diâmetro interno de uma das entradas de gases (E e F) foi alargado para ¼ de polegada para permitir a introdução da agulha de SPME.

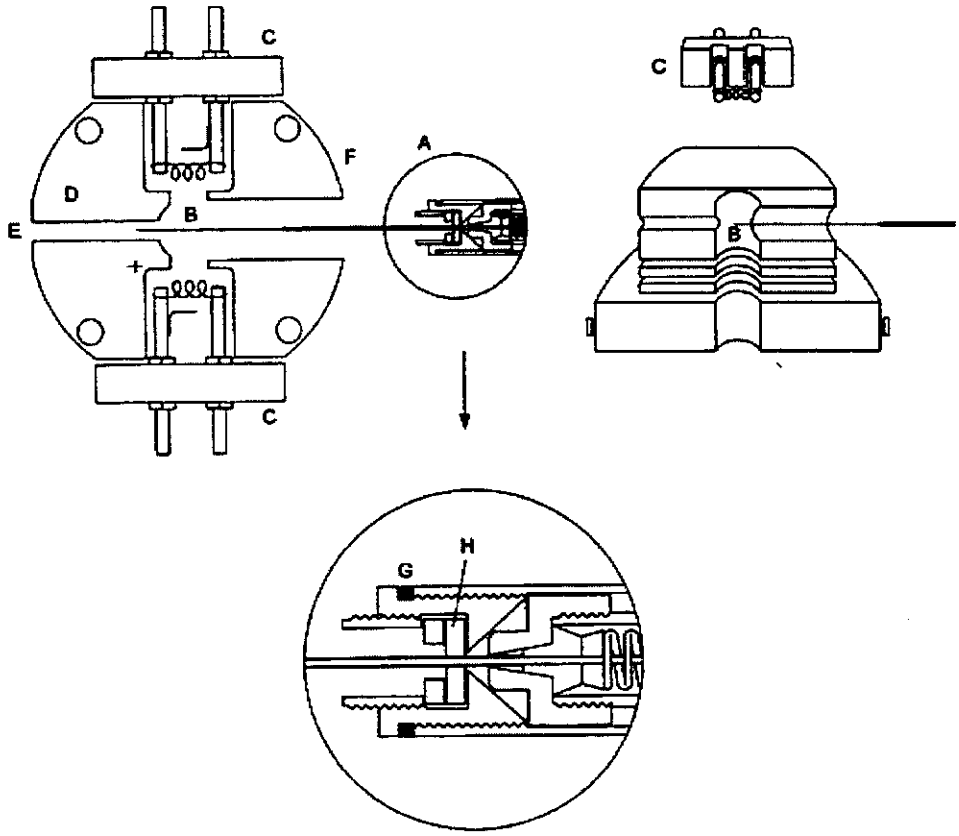


Figura 33 Diferentes ângulos de visão e secções transversais do sistema de FIMS: (A) secção transversal parcial da cabeça da sonda de FIMS; (B) recobrimento de PDMS da fibra de SPME na região de dessorção térmica e ionização; (C) dois filamentos padrão de ionização (e aquecimento) por EI; (D) bloco da fonte de íons padrão Extrel MS; (E) entrada de gás alternativa para a ionização química; (F) entrada de gases alargada para ¼ de polegada para permitir a introdução da fibra; (G) anel de borracha para selar a sonda de FIMS; (H) septo padrão de CG para selar o vácuo durante a introdução da fibra.

Um sistema de injeção direta da fibra foi construído (Figura 33): a sonda de FIMS constitui-se (A) de um tubo de ½ polegada em aço inoxidável com um septo propriamente fixado na cabeça da sonda (H). Uma vedação apropriada foi obtida utilizando um sistema parafuso tencionando o septo contra a cabeça da sonda. Um "holder" padrão Supelco com o comprimento modificado foi utilizado para inserir a fibra de 100μm de PDMS (Supelco, Bellefonte, PA) através do septo, para dentro e para fora do alto vácuo do espectrômetro de massas, para ajustar a fibra na fonte de ionização (D), e então expor seu recobrimento (B) para a radiação de aquecimento dos dois filamentos do MS (C). O recobrimento de PDMS foi inserido exatamente entre os dois filamentos paralelos do MS para o aquecimento uniforme, a dessorção eficiente e ionização dos analitos por elétrons a 70 eV.

4.5.2.2 Extração por SPME.

Foram preparadas soluções aquosas (utilizando água Milli-Q) por diluição em série de soluções estoque de 1mg/mL em metanol. As soluções dos analitos (5mL) foram introduzidas em frascos de "headspace" (10 mL) selados utilizando-se tampas com septo e as extrações por SPME foram realizadas a 23 ± 1 °C com agitação constante: 700 rpm para a extração em solução e 1200 rpm para o "headspace" estático. Em todos os casos, a quantificação foi realizada utilizando a área de resposta para o monitoramento seletivo de íons (SIM, "selective-ion monitoring").

4.5.3 Resultados e Discussão

4.5.3.1 Sistema de injeção por FIMS.

A dessorção térmica de analitos do recobrimento da fibra em análise por SPME-GC ocorre no injetor do cromatógrafo a gás.[77] Mesmo nos casos onde a separação cromatográfica a gás não é empregada e SPME é diretamente acoplado com MS,[78] a dessorção térmica de analitos se da no injetor do CG e o transporte de analitos é feito através de uma coluna e sílica fundida aquecida para o espectrômetro de massas.

Um sistema de FIMS simples, eficiente e direto foi desenhado para o acoplamento direto de SPME no MS. Um septo comum de GC (H) foi utilizado como a única interface entre o ambiente e o alto vácuo do espectrômetro de massas, então permitindo a introdução da agulha de SPME diretamente da fonte de íons do MS. Para garantir que não haja vazamento de ar para o espectrômetro de massas, o septo foi propriamente tencionado com um parafuso na cabeça da sonda.

A sonda de FIMS com o septo firmemente ajustado na sua ponta (A) foi então inserido dentro do MS de modo a ajustar o septo próximo suficiente à fonte de íons do MS (D) e inserir a fibra e seu recobrimento de PDMS (B) exatamente entre os filamentos de tungstênio do MS (C). Portanto os analitos são desorvidos termicamente de forma rápida e eficiente para a fase gasosa exatamente na região de ionização do MS, onde os dois filamentos fornecem radiação térmica uniforme para dessorção e elétrons a 70 eV para a ionização eficiente dos analitos.

4.5.3.2 Linha base da fibra.

A fibra normalmente é condicionada previamente antes das extrações por SPME. O condicionamento para fibras de PDMS ocorre a 250 °C por 4 h sob fluxo de hélio em um injetor de CG. Após este condicionamento, a fibra de SPME foi introduzida através de um sistema de FIMS e seu recobrimento de exposto aos filamentos até 3 minutos. Nenhum ruído químico foi observado, o que é uma ótima característica para a identificação e quantificação de analitos pela técnica de FIMS. Um condicionamento

similar ao regular foi realizado no sistema de FIMS procedendo-se exposições repetidas de 3 minutos do recobrimento à radiação do filamento.

4.5.3.3 Efeitos de Memória e a Utilização Repetitiva da Fibra de PDMS.

A dessorção térmica de fibras de SPME em injetores de GC é quantitativa e normalmente não são observados efeitos de memória substanciais ("carry over").[77] Fibras de PDMS são também aquecidas normalmente a 260 °C e utilizadas repetitivamente para extrações. Para testar os efeitos de memória em FIMS, foram realizadas extrações de todos analitos utilizados de soluções aquosas, após as extrações a fibra era exposta repetidamente à radiação do filamento e ionização por períodos de 3 minutos de aquecimento (medidas em T&R-MIMS[81] estimaram que o PDMS dentro da fonte de ionização é aquecido de 250 a 300 °C). O efeito de memória para esta técnica de FIMS é considerado negligenciável para os analitos testados (Tabela 4). Somente uma fibra de SPME foi utilizada repetidamente neste experimento, sem sinais de fadiga do recobrimento.

Tabela 4 Parâmetros e Performance de FIMS para análise de vários VOC e SVOC.

Analito	Tempo de exposição (min)	Íon característico (*m/z*)	Limite de detecção (ng/L, ppt)	R
Benzeno	5	78	100	0,997
Tolueno	5	92	100	0,998
Xileno	5	106	100	0,995
γ-terpineno	5	71	50	0,999
Éter diisoamílico	5	93	200	0,995
clorobenzeno	5	112	200	0,998
Tetracloreto de carbono	5	117	100	0,995
Silvex	30	282	200	0,996
HPAs	20-60	vários	50-200	0,994-0,996

4.5.3.4 Análises de BTX.

O primeiro teste do sistema de FIMS foi realizado com uma solução aquosa de benzeno, tolueno e xileno 100 ppb (BTX). A fibra de PDMS foi exposta ao "headspace" da solução aquosa de BTX por 5 minutos com uma agitação constante de 1200 rpm e então diretamente introduzida na fonte de ionização do espectrômetro de massas utilizando o sistema de introdução de FIMS. A Figura 34 mostra um espectro de massas simples a 70 eV por EI (sem acumulação de espectros) em um intervalo em *m/z* de 70 a 110 adquirido com velocidade de varredura de 10 u/s durante o período de dessorção térmica de ~ 1 minuto.

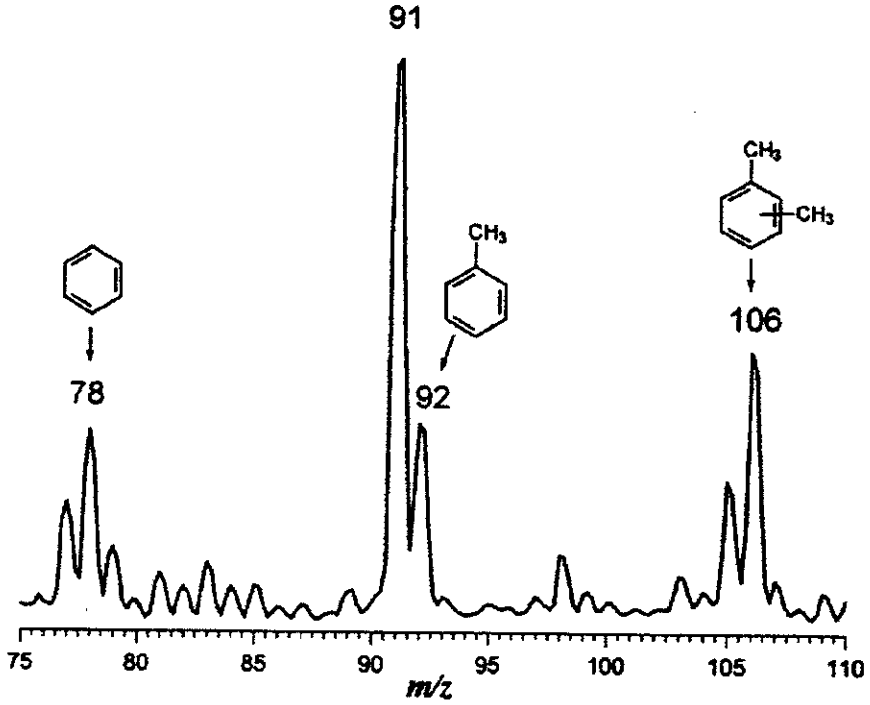


Figura 34 Espectro de massas parcial a 70 eV para uma solução aquosa de BTX 100 ppb adquirido durante um período de dessorção de 1 minuto na análise de "headspace" por FIMS. Note que os íons característicos de *m/z* 78 (benzeno), 92 (tolueno) e 106 (tolueno) com razões sinal/ruído consideravelmente altos.

No espectro de massas da Figura 34 está claro que todos 3 analitos, benzeno (*m/z* 78), tolueno (*m/z* 91) e xileno (*m/z* 106), são facilmente detectados com alta sensibilidade pelos íons característicos normalmente utilizados em quantificação de BTX por MS.[79]

4.5.3.5 Tempo de Exposição da Fibra.

Para o máximo de sensibilidade na análise por SPME, a exposição da fibra deve ser testada até que o equilíbrio de absorção seja alcançado, embora condições fora de equilíbrio possam ser também empregadas com reprodutibilidade e sensibilidade aceitáveis.[77] A Figura 35 compara a intensidade do sinal obtido por FIMS no modo SIM de uma solução aquosa de BTX a 200 ppb utilizando amostragem em "headspace" estático no intervalo de 1 a 15 minutos. O sinal aumenta de 1 a 10 minutos quando ele começa a diminuir a inclinação tendendo a absorção máxima no equilíbrio. O perfil observado é praticamente o mesmo observado para análise de SPME-GC(MS).[77]

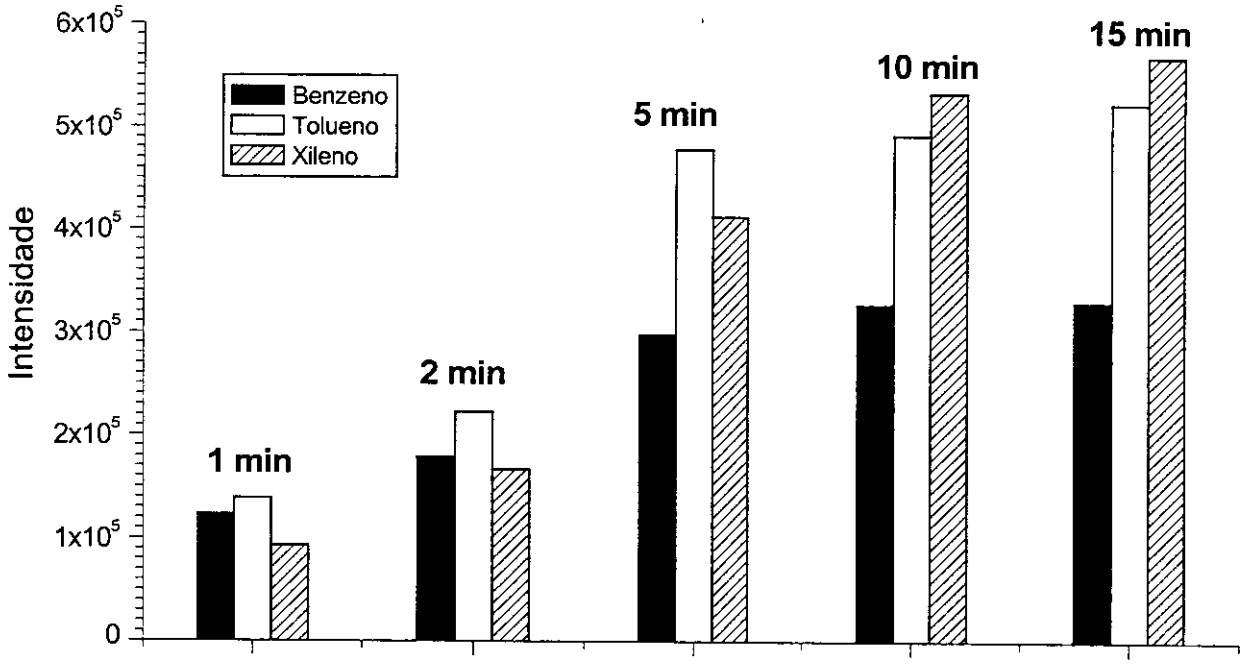


Figura 35 Intensidade do sinal de FIMS-SIM para os diferentes tempos de amostragem em "headspace" de uma solução aquosa de BTX a 200 ppb (m/z 78 para benzeno, m/z 92 para tolueno e m/z 106 para xileno). Note que em média o equilíbrio de absorção é alcançado com 10 min.

4.5.3.6 Perfil do sinal em FIMS-SIM.

A Figura 36 mostra o perfil do sinal para soluções aquosas de dois compostos aromáticos utilizando SIM, tolueno (50 ppb) e acenafeteno (1 ppb).

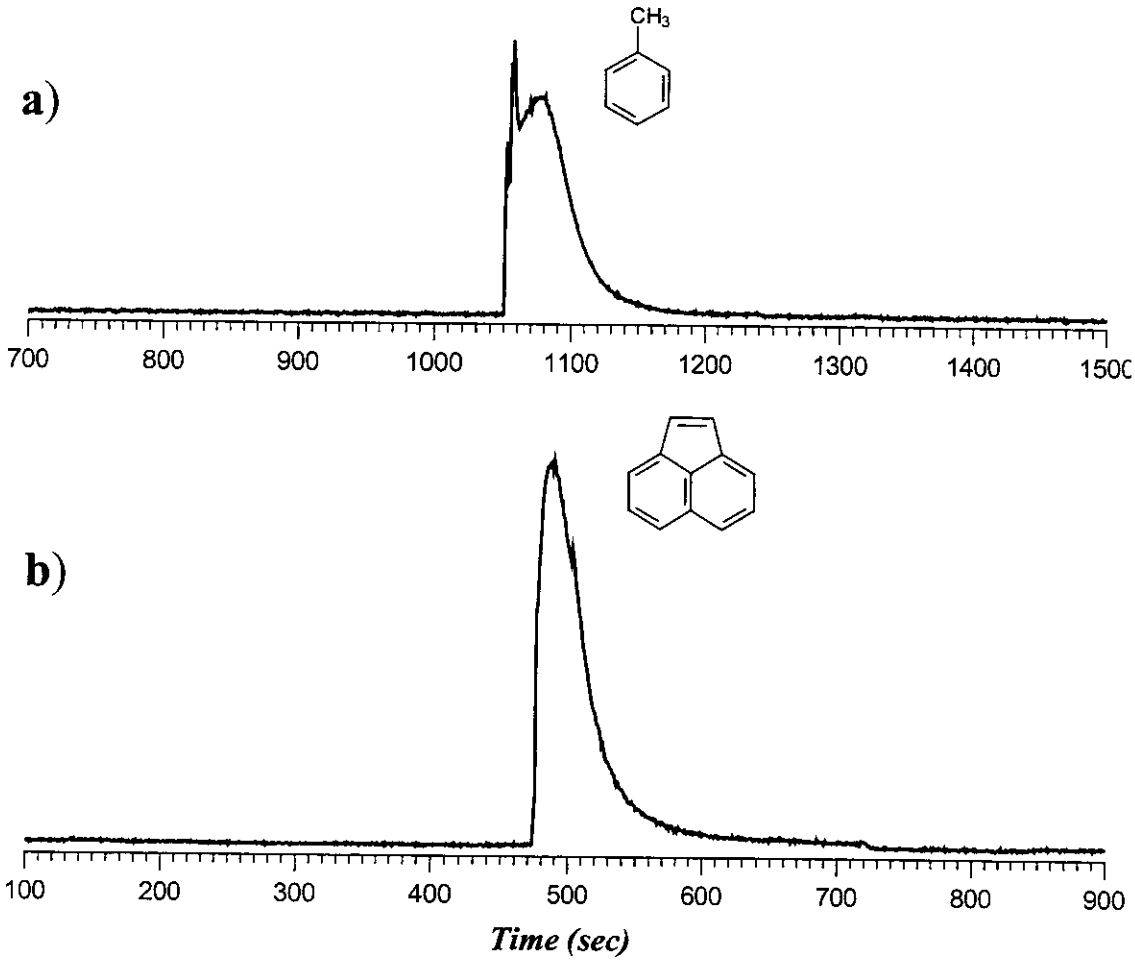


Figura 36 Perfil do sinal FIMS-SIM para soluções aquosas de (a) tolueno (50 ppb) e (b) acenafetileno (1 ppb) após 5 minutos e 30 minutos de exposição da fibra em "headspace" estático respectivamente. Note os picos de dessorção com uma largura relativamente pequena (aproximadamente 1 minuto) e a alta razão sinal/ruído.

O perfil do sinal de FIMS-SIM para tolueno foi construído utilizando "headspace" estático para a amostragem com a fibra que foi exposta por 5 minutos pois o tolueno é volátil e solúvel em PDMS. Para acenafeteno foram utilizados 30 minutos para amostragem que foi realizada inserindo a fibra dentro da solução. Foram observados perfis de dessorção relativamente estreitos (próximo a 1 min) e bem definidos enquanto que a alta razão sinal/ruído mostra a alta sensibilidade da técnica de FIMS para BTX e poli-aromáticos.

4.5.3.7 Reprodutibilidade.

A Figura 37 mostra uma análise em triplicata de uma solução aquosa de 200 ppb de tolueno (SIM do íon de *m/z* 92). A reprodutibilidade para técnica de FIMS (precisão) ficou na faixa de 10% (desvios próximos de 10% foram observadas para repetições múltiplas), um valor típico e aceito para análises por SPME.

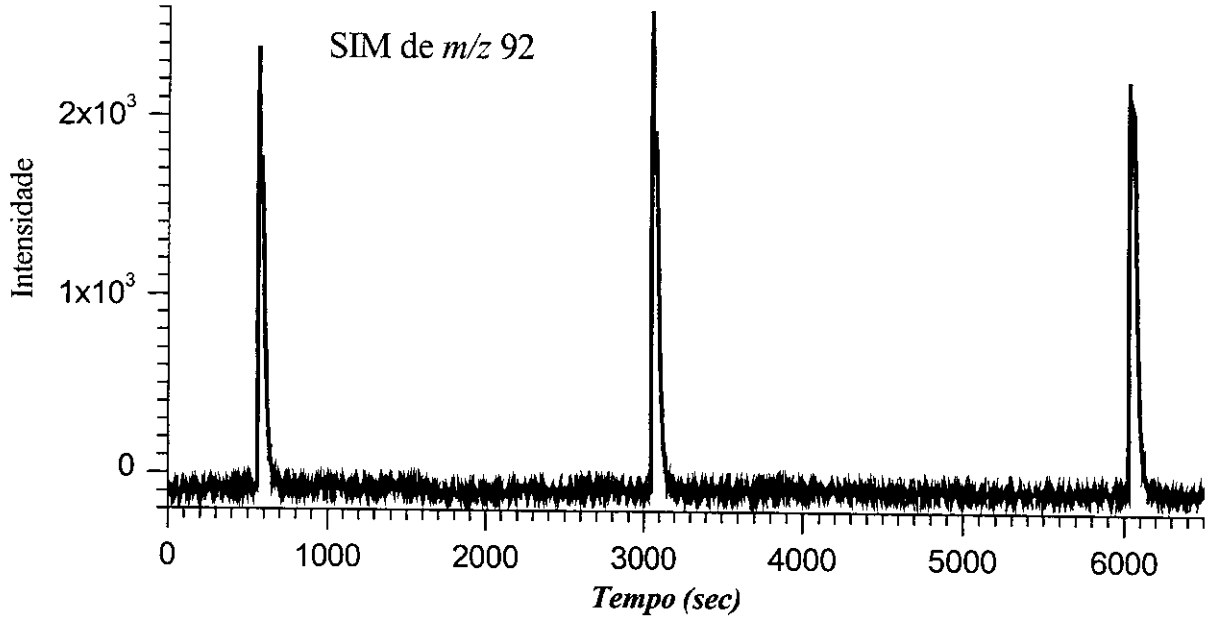


Figura 37 Perfil de FIMS exposto a "headspace" em uma análise em triplicata (SIM do íon de *m/z* 92) de uma solução de tolueno de 200 ppb em água.

4.5.3.8 Linearidade.

Como listado na Tabela 4, foram observados bons coeficientes de correlação para quantificação por FIMS para todos os analitos testados com concentrações variando desde o limite de detecção até tipicamente 100 µg/L (ppb). Estes resultados demonstram, portanto, uma boa linearidade de FIMS para quantificação de VOC e SVOC em soluções aquosas.

4.5.3.9 HPAs.

A Figura 38 mostra um conjunto de espectros de massas a 70 eV adquiridos em intervalos estreitos de massas após diferentes tempos de exposição em soluções aquosas de 1 ppb de uma mistura de 17 compostos poliaromáticos (diluído de uma mistura padrão 2,0 mg/mL AccuStandard em diclorometano/benzeno, Lot B0090027). A maioria dos componentes foi detectada por seus íons moleculares que se mostraram relativamente intensos embora eliminando a separação cromatográfica alguns poliaromáticos não foram distinguidos.

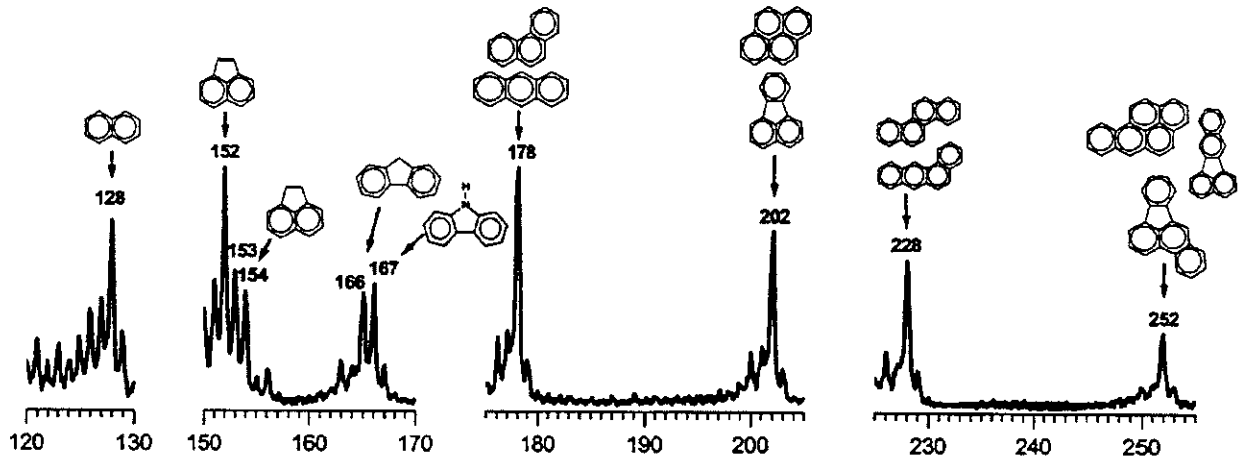


Figura 38 Conjunto dos espectros de massas de FIMS a 70 eV na região dos íons moleculares de uma solução aquosa de uma mistura de poliaromáticos após diferentes tempos de exposição da fibra (5-30 minutos). Note que alguns poliaromáticos não podem ser distiguindos pela análise por FIMS.

4.5.3.10 Herbicidas.

SPME é conhecido como sendo um método sensível e eficiente para análise de muitos compostos químicos de relevância ambiental, química, fotoquímica e clínica.[77] Por essas qualidades, a técnica de SPME tem sido aplicada com alta eficiência para análises de herbicidas e pesticidas em amostras aquosas utilizando PDMS e outros materiais como poliacrilatos.[77h] A Figura 39 mostra um exemplo onde FIMS mostrou uma detecção eficiente de Silvex, um importante herbicida, como também de seu éster metilado. A fibra foi exposta a uma solução aquosa de 100 ppb de ambos os compostos químicos por 30 minutos e diretamente analisada por FIMS.

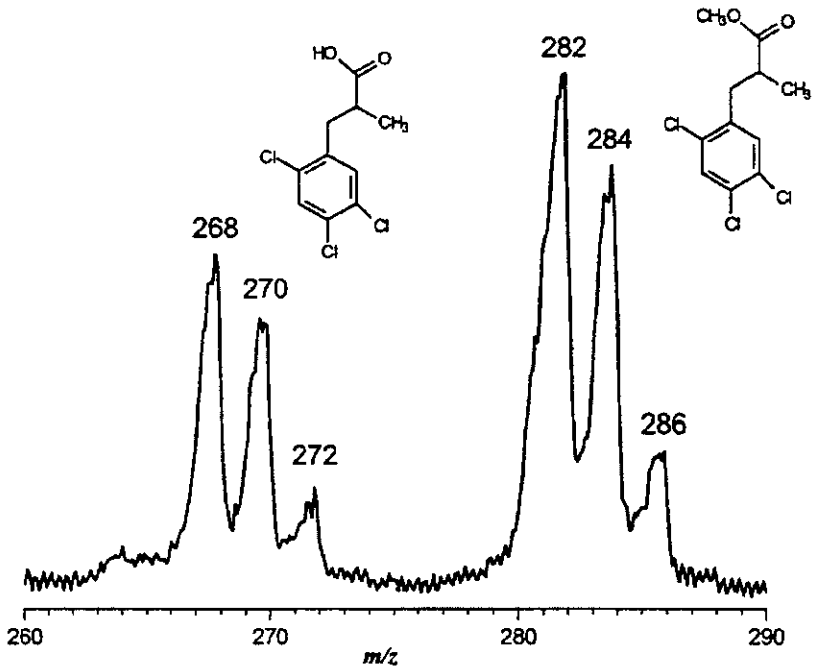


Figura 39 Espectro de massas parcial por FIMS de uma solução aquosa de 100 ppb do (a) herbicida Silvex e (b) seu éster metílico após 30 minutos de exposição da fibra em solução. Note a identificação segura que o padrão isotópico característico de Cl_3 mostra.

Na Figura 39 pode se observar facilmente a melhor sensibilidade para o derivado menos polar (como esperado para a fibra de PDMS) e que o espectro de massas na região dos íons moleculares podem ser facilmente adquiridos durante o pequeno período de dessorção de FIMS. Outro aspecto é a identificação segura que o padrão isotópico dos íons moleculares característicos de Cl_3 mostram. A quantificação e identificação inequívoca (em níveis traço, veja Tabela 4) destas (e outros herbicidas e pesticidas) classes de compostos pode ser realizada facilmente por FIMS pelos íons isotopoméricos característicos pela varredura total de íons ou por SIM.

4.5.3.11 Outros VOC e SVOC.

SPME também é conhecida por sua versatilidade e capacidade de extrair eficientemente uma grande variedade de compostos orgânicos de diferentes matrizes. Outros três VOC foram testados: clorobenzeno (um poluente comum), γ-terpineno (um produto natural) e éter diisoamílico (um solvente comum), sendo que a detecção foi alcançada com alta sensibilidade e linearidade (Tabela 4).

Limites de Detecção e Linearidade. A Tabela 4 mostra todos os analitos testados por FIMS, seus limites de detecção utilizando SIM dos íons característicos e a linearidade observada para quantificação no intervalo dinâmico testado (tipicamente de centenas de ppt até 100 ppb, a menos que os analitos tenham baixa solubilidade em água). Estes resultados demonstram a alta sensibilidade e repetitibilidade das análises por FIMS para uma variedade de VOC e SVOC.

4.5.4 Conclusão:

Foi realizado o primeiro acoplamento direto de SPME em MS. Esta nova técnica, denominada aqui espectrometria de massas por introdução via fibra (FIMS), permite a introdução de fibras de SPME diretamente na região de ionização de um espectrômetro de massas, então os filamentos são utilizados para dessorção térmica e o máximo de eficiência na ionização dos analitos. Comparado com outros acoplamentos menos diretos, FIMS é vantajoso, pois este elimina os efeitos de memória associados com as linhas de transferência e mostra um aumento na sensibilidade.

A dessorção de FIMS é muito rápida (aproximadamente 1 minuto); então, análises por FIMS são principalmente determinadas pelo tempo de extração. Como não há separação cromatográfica, FIMS permite análises em larga escala com limites de detecção próximos dos limites obtidos pelas análises com a técnica de SPME-CG(MS). Uma desvantagem em eliminar a etapa de separação é que conforme se aumenta à complexidade da mistura há um aumento na quantidade de íons (fragmentos e íons moleculares) nos espectros e portanto dificulta as análises devido o aumento na possibilidade de falso positivo. Estas limitações podem ser minimizadas aumentando a seletividade com a utilização de técnicas de ionização mais amenas com CI e técnicas de MS/MS.

5 Referências Bibliográficas.

[1] a) Chapman, J.R. *Pratical Organic Mass Spectrometry*, 2ª ed., **1993**. b) Hoffmann, E.; Charette, J.; Stroobant, V. *Mass Spectrometry Principles and Applications*. c) Watson, J. T. *Introduction to Mass Spectrometry*, 3ª ed., **1997**.

[2] De Later, J.R. *Mass Spectrom. Rev.*, 9, 453, **1990**.

[3] (a) Thomson, J.J. "Cathode Rays," The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and *Journal of Science*, Fifth Series, October. 296, **1897** (b)Thomson, J. J. *Rays of Positive Electricity and Their Application to Chemical Analysis,* Longmans Green, Londres, **1913**.

[4] Thomson, J.J. "On the Masses of the Ions in Gases at Low Pressures" *Philosophical Magazine*, **1899**, *48,* 295, 547.

[5] Dempster, A. J. *Phys. Rev.*, 11, 316, **1918**.

[6] Aston, F. W. *Phils. Mag.*, 38, 707, **1919**.

[7] Munson, M. S. B.; Field, F. H. *J. Am. Chem. Soc.*, 88, 2681, **1966**.

[8] Cooks, R. G.; Beynon, J. H.; Caprioli, R. M.; Lester, G. R. *Metastable ions*, Elsevier, Amsterdam, **1973**.

[9] Karas, M.; Buchman, D.; Hillenkamp, F. H. Anal. Chem., 57: 2935, **1985**.

[10] a) Tanaka, K.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y. and Yoshida, T. *Proc. Second Japan-China Joint Symposium on Mass Spectrometry. Editors*; Matsuda, H. and Xiao-tian, L. 185, **1987** b) Yoshida, T.; Tanaka, K.; Ido, Y.; Akita, S. and Yoshida, Y. *Mass Spectroscopy* (Japan). 59, **1988** c) Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 151, **1988**.

[11] Dole, M.; Mach, L.L.; Hines, R.L.; Mobley, R.C.; Ferguson, L.D. and Alice, M.B. J. *Chem. Phys.* 49: 2240, **1968**.

[12] Iribarne J. V.; Thomson B. A. J. *Chem. Phys.* 64, 2287, **1976**.

[13] Kebarle, P. *J. Mass Spectrom.* 35, 804, **2000**.

[14] Cole, R.B. *J. Mass Spectrom.* 35, 763, **2000**.

[15] Yamashita, M. and Fenn, J.B. *J. Phys. Chem.* 88, 4451, **1984**.

Nermag, S.N.; Rolando, C.;Joauen, D. *In Proc. 34th ASMS Conf. Mass Spectrom. And Allied Topics*, Cincinnati, OH, 220, **1986**, c) Cooks, R.G.; Hoke, I. I.; S.H.; Morand, K. L.; Lammert, S.A. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* ,1, **1992** e d) Juliano, V. F.; Gozzo, F.C.; Eberlin, M.N.; Kascheres, C.; Lago, C.L. *Anal. Chem.*, 68, 1328, **1996**.

[17] Yost, R. A.; Enke, C. G.; McLafferty, F.W. *In Tandem Quadrupole Mass Spectrometry*, Ed.; Wiley:Nova York, **1983**.

[18] Schwartz, J. C.; Wade, A. P.; Enke, C. G.; Cooks, R. G. *Anal. Chem.*, 62, 1809, **1990**.

[19] Eberlin, M.N. *Mass Spectrometry Reviews*, 16, 113, **1997**.

[20] Eberlin, M. N. e Cooks, R. G. *Organic Mass Spectrometry*, 28, 679, **1993**.

[21] Moraes, L.A.B.; Gozzo, F.C.; Eberlin, M.N.; *J. Org. Chem*, 62, 5096, **1997**.

[22] Stirk, M. S.; Orlowski, J. C.; Leeck, D.T.; Kenttamaa, H.I., *J. Am. Chem. Soc.*. 22, 8604, **1992**.

[23] Sparrapan, R.; Mendes, M. A.; Carvalho, M.; Eberlin, M. N. *Chem. Eur. J.*, 6, 321, **2000**.

[24] Gozzo, F.C.; Ifa, D. R.; Eberlin, M.N. *J. Org. Chem.* 65, 3920, **2000**.

[25] (a) Ohkura, K.; Seki, M.; Terashima; Y. Kanaoka; *Tetrahedron Lett.* 30, 3433, **1989**. b) Kauffmann, H. M.; *Chem. Ber.* 96, 2519, **1963**. c) Bunnett, J. F; Singh, P., *J. Org. Chem.* 46, 4567, **1981**.

[26] (a) Bier, M. E.; Cooks, R. G. *Anal. Chem. 59*, 597-601, **1987** (b) Mendes, M. A.; Pimpim, R. S.; Kotiaho, T.; Eberlin, M.N. *Anal. Chem.* 68, 3502, **1996** (c) Mendes, M. A.; Pimpim, R. S.; Kotiaho, T.; Eberlin, M. N. *Quim. Nova* 19, 480, **1996** (d) Haddad, R.; Mendes, M.A.; Höehr, N. F.; Eberlin, M. N. *Analyst* 126, 1212, **2001**.

[27] Pawliszyn, J. Solid Phase Microextraction: theory and practice, 1ª Ed. **1997**.

[28] Hoch, G. Kok, B., A Mass Spectrometer Inlet System for Sampling Gases Dissolved in Liquid Systems, *Archives of Biochemistry,* 101, 160-170, **1963**.

[29] (a) Lauritsen, F. R.; Ketola, R. A. *Anal. Chem.* 69, 4917, **1997** (b) Matz, G.; Lennemann, F. *J. Chromatogr. A* 750, 141, **1996** (c) Mendes, M. A.; Eberlin, M. N. *Analyst* 125, 21, **1999**.

[30] Riter, L. S.; Takats, Z.; Cooks, R. G. *Analyst* 126, 1980, **2001**.

[31] Valente, A. L. P. and Augusto, F. "Microextração por fase sólida" *Quím. Nova*, 23, 4, 523, **2000**.

[32] Yang, L.; Colombini, V.; Maxwell, P. et al. *J. Chromatogr A* 1011, 135, **2003**.

[33] Tiernan, T. O; Futrell, J. H. *J. Phys. Chem. 72*, 3080, **1968**.

[34] (a) Schoffstall, A. M,; Padwa, A. *In Advances in Cycloaddition*, vol. 2. Curran DP (ed). JAI Press: Greenwich, 1, **1990** (b) Boger, D. L.; Weinreb, S. N. *Hetero Diels-Alder Methodology in Organic Synthesis*, (ed). Academic Press: New York, **1987**.

[35] (a) Bowers, M. T.; Elleman, D. D.; O'Malley, R. M.; Jennings, K. R. *J. Phys. Chem.* 74, 2583, **1970** (b) Wilkins, C. L.; Gross, M. L. *J. Am. Chem. Soc.* 93, 895, **1971** (c) van Doorn, R.; Nibbering, N. M. M.; Ferrer-Correa, A. J. V.; Jennings, K. *Org. Mass Spectrom.* 13, 729, **1978** (d) Dass, C. *Mass Spectrom. Rev.* 9, 1, **1990** (e) Shay, B. J.; Eberlin, M. N.; Cooks, R. G.; Wesdemiotis, C. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 3, 518, **1992** (f) Bouchoux, G.; Salpin, J. Y. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 8, 325, **1994** (g) Mouregues, P.; Audier, H. E.; Hammerum, S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 8, 53, **1994** (h) Eberlin, M. N.; Morgon, N. H.; Yang, S. S.; Shay, B. J.; Cooks, R. G. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 6, 1, **1995** (i) Wiegel, K. N.; Holman, R. W.; Gross, M. L. *Int. J. Mass. Spectrom.* 146, 239, **1995** (j) Eberlin, M. N.; Sorrilha, A. E. P. M.; Gozzo, F. C.; Pimpim, R. S. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 3550, **1997** (k) Gevrey, S.; Taphanel, M. H.; Morizur, J. P.; *J. Mass. Spectrom.* 33, 399. **1998** (l) Bouchoux, G.; Nguyen, M. T.; Salpin, J. Y. *J. Phys. Chem. A* 104, 5778, **2000**.

[36] (a) Eberlin, M. N.; Majumdar, T. K.; Cooks, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 2884, **1992** (b) Colorado, A.; Barket, D. J.; Hurst, J. M.; Shepson, P. B. *Anal. Chem.* 70, 5129, **1998** (b) Sharifi, M.; Einhorn, J. *Int. J. Mass Spectrom.* 191, 253, **1999** (c) Sparrapan, R.; Mendes, M. A.; Carvalho, M.; Eberlin, M. N. *Chem. Eur. J.* 6, 321, **2000** (d) Carvalho, M.; Gozzo, F. C.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Kascheres, C.; Eberlin, M. N. *Chem. Eur. J.* 4, 1161, **1998** (e) Augusti, R.; Gozzo, F. C.; Moraes, L. A. B.; Sparrapan, R.; Eberlin, M. N. *J. Org. Chem.* 63, 4889. **1998** (f) Meurer, E. C.; Eberlin, M. N. *Int. J. Mass Spectrom.* 210, 469, **2001**.

[37] (a) Schmidt, R. R. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 12, 212, **1973** (b) Gassman, P. G.; Singleton, D. A.; Wilwerding, J. J.; Chavan, S. P. *J. Am. Chem. Soc.* 109, 2182, **1987** (c) Barluenga, J.; Aznar, F.; Fustero, S.; Tomas, M. *Pure Appl. Chem.* 62, 1957, **1990** (d)

Knoelker, H. J.; Baum, G.; Gonser, P. *Tetrahedron Lett.* 36, 8194, **1995** (e) Beifuss, U.; Ledderhose, S.; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 2137, **1995**.

[38] Gaussian 98, Revision A. 6, Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Zakrzewski VG, Montgomery JJA, Stratmann RE, Burant JC, Dapprich S, Millam JM, Daniels AD, Kudin KN, Strain MC, Farkas O, Tomasi J, Barone V, Cossi M, Cammi R, Mennucci B, Pomelli C, Adamo C, Clifford S, Ochterski J, Petersson GA, Ayala PY, Cui Q, Morokuma K, Malick DK, Rabuck AD, Raghavachari KJB, Foresman J, Cioslowski JV, Ortiz B, Stefanov B, Liu G, Liashenko A, Piskorz P, Komaromi I, Gomperts R, Martin RL, Fox DJ, Keith T, Al-Laham MA, Peng CY, Nanayakkara A, Gonzalez C, Challacombe M, Gill PMW, John- sonB, ChenW, WongMW, AndresJL, GonzalezC, Head-Gordon M, Replogle ES, Pople JA. Gaussian, Inc, Pittsburgh. PA, **1998**.

[39] (a) Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* 98, 5648, **1993** (b) Stephens, P. J.; Devlin, F. J.; Chabalowski, C. F.; Frisch, M. J. *J. Phys. Chem.* 98, 11623, **1994** (c) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B* 37, 785, **1988**.

[40] (a) Pachuta, R. R,; Kenttamaa, H. I.; Cooks, R. G.; Zennie, T. M.; Ping, C.; Chang, C.J.; Cassady, J. M. *Org. Mass Spectrom.* 23, 10, **1988** (b) Kenttamaa, H. I.; Pachuta, R. R.; Rothwell, A. P.; Cooks, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 1654, **1989**.

[41] (a) Speckamp, W. N.; Moolenaar, M. J. *Tetrahedron* 56, 3817, **2000** (b) Hiemstra, H.; Speckamp, W. N. *In Comprehensive Organic Chemistry (Synthesis)*, vol.2. TrostBM, Fleming! (eds). Pergamon:Oxford, 1047, **1991** (c) Pilli, R. A.; Russowshy, D. *Trends Org. Chem.* 6, 101, **1997**.

[42] (a) Tomazela, D. M.; Moraes, L. A. B.; D'Oca, M. G. M.; Pilli, R. A.; Eberlin, M. N. *J. Org. Chem.* 67, 4652, **2002** (b) D'Oca, M. G. M.; Moraes, L. A. B.; Pilli, R. A.; Eberlin, M. N. *J. Org. Chem.* 66, 3854, **2001**.

[43] (a) Olah, G.A.; Gramain, A.; White, A. M. *In Carbonium Ions*, Vol. 5, Wiley–Interscience: New York, chapt. 35, 2084; **1976** (b) Olah, G. A.; Laali, K. K.; Wang, Q.; Prakash, G. K. S.; *Onium Ions*. Wiley: New York,**1998**.

[44] (a) Chatfield, D. A.; Bursey, M. M.; *J. Am. Chem. Soc.* 98, 6492, **1976** (b) Staley, R. H.; Wieting, R. D.; Beauchamp, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* 99, 5964, **1977** (c) Sparapani, C.; Speranza, M. *J. Am. Chem. Soc.* 102, 3120, **1980** (d) Attina, M.; Cacace, F. *J. Am.*

Chem. Soc. 105, 1122, **1983** (e) Caserio, M. C.; Kim, J. K. *J. Am. Chem. Soc.* 105, 6896, **1983** (f) Rahman, N. A.; Fisher, C. L.; Caserio, M. C. *Org. Mass Spectrom.* 23, 517, **1988** (g) Kotiaho, T.; Shay, B. J.; Cooks, R. G.; Eberlin, M. N. *J. Am. Chem. Soc.* 115, 1004, **1993**.

[45] Al-Talib, M.; Tashtoush, H. *Org. Prep. Proced. Int.* 22, 1, **1990**.

[46] (a) Moraes, L. A. B.; Pimpim, R. S.; Eberlin, M. N. *J. Org. Chem.* 61, 8726, **1996** (b) Moraes, L. A. B.; Eberlin, M. N. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12, 150, **2001**.

[47] (a) Moraes, L. A. B.; Eberlin, M. N. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 11136, **1998** (b) Sparrapan, R.; Mendes, M. A.; Eberlin, M. N. *J. Mass Spectrom.* 35, 189, **2000** (c) Moraes, L. A. B.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Eberlin, M. N. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12, 14, **2001**.

[48] Moraes, L. A. B.; Kotiaho, T.; Eberlin, M. N. *J. Mass Spectrom.* 34, 670, **1999**.

[49] Moraes, L. A. B.; Eberlin, M. N. *Chem. Eur. J.* 6, 897, **2000**.

[50] Grandinetti, F.; Pepi, F.; Ricci, A. *Chem. Eur. J.* 2, 495, **1996**.

[51] Reid, G. E.; Tichy, S. E.; Perez, J.; O'Hair, R. A. J.; Simpson, R. J.; Kenttamaa, H. I. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 1184, **2001**.

[52] (a) Bruins, A. P.; Nibbering, N. M. M. *Tetrahedron Lett.* 4491, **1975** (b) Williamson, B. L; Creaser, C. S. *Eur. Mass Spectrom.* 4, 103, **1998**.

[53] Schmidt, R. R.; Machat, R. *Angew. Chem., Int. Ed Engl.* 9, 311, **1970**.

[54] Eberlin, M. N.; Cooks, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* 115, 9226, **1993**.

[55] Lemos, A. B.; Eberlin, M. N. *J. Mass Spectrom.* 38, 305, **2003**.

[56] Lu, L.; Yang, S. S.; Wang, Z.; Cooks, R. G. *J. Mass Spectrom.* 30, 581, **1995**.

[57] Cheng, C. F.; Gross, M. L. *Mass Spectrom. Rev.* 19, 398, **2000**.

[58] Moraes, L. A. B.; Eberlin, M. N. *J Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 2, **1997**.

[59] Eitner, P.; Kraft, F. *Chem. Ber.* 25, 2267, **1892**.

[60] Meerwein, H.; Laasch, H.; Mersch, P.; Spille, J. *Chem. Ber.* 89, 209, **1956**.

[61] Schmidt, R.R.; *Chem. Ber.* 98, 334, **1965**.

[62] Carol, D. I.; Dzidic, I.; Stillwell, R. N.; Haegele, K. D.; Horning, M. G. *Anal. Chem.* 47, 2369, **1975**.

[63] (a) Robb, D. B.; Covey, T. R.; Bruins, A. P. *Anal. Chem.* 72, 3653, **2000** (b) Kauppila, T. J.; Kuuranne, T.; Meurer, E. C.; Eberlin, M. N.; Kotiaho, T.; Kostiainen, R. *Anal. Chem.* 74, 5470, **2002**.

[64] (a) Whitehouse, C. M.; Dreyer, R. N.; Yamashita, M.; Fenn, J. B. *Anal. Chem.* 57, 675 **1985** (b) Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M. *Science* 246, 64, **1989** (c) Cole, R. B. Electrospray Ionization Mass Spectroscopy; John Wiley & Sons Inc.: New York, **1997**.

[65] Karas, M.; Hillenkamp, F. *Anal. Chem.* 60, 2299, **1988**.

[66] (a) Aramendıa, M. A.; Borau, V.; Garcia, I.; Jimenez, C.; Lafont, F.; Marinas, J. M.; Porras, A.; Urbano, F. J. *J. Mass. Spectrom.* S153, **1995**. (b) Kerwin, J. L.; Wiens, A. M.; Ericsson, L. H. *J. Mass Spectrom.* 31, 184, **1996** (c) Kotiaho, T.; Eberlin, M. N.; Vainiotalo, P.; Kostiainen, R. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 11, 526, **2000**. (d) Potterat, O.; Wagner, K.; Haag, H. *J. Chromatogr., A* 872, 85, **2000** (e) Cooks, R. G.; Zhang, D.; Koch, K. J.; Gozzo, F. C.; Eberlin, M. N. *Anal. Chem.* 73, 3646, **2001** (f) 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.* 278, 8547, **2003** (g) Koch, K. J.; Gozzo, F. C ; Nanita, S.; Eberlin, M. N.; Cooks, R. G. *Angew. Chem., Int. Ed.* 41, 1721, **2002**.

[67] Colton, R.; D'Agostinho, A.; Traeger, J. C. *Mass Spectrom. Rev.* 14, 79, **1995**.

[68] Fuerstenau S. D.; Benner W. H.; Thomas J. J.; Brugidou C.; Bothner B.; Siuzdak G. *Angew. Chem.* 40, 542, **2001**.

[69] Bristow, A. W. T.; Nichols, W. F.; Webb, K. S.; Conway, B. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16, 2374, **2002**.

[70] (a) Holmes, J. L. Org. Mass Spectrom. 1985, 20, 169. (b) Levsen, K.; Schwarz, H. *Mass Spectrom. Rev.* 2, 77, **1983**.

[71] (a) Brodbelt, J. S. *Mass Spectrom. Rev.* 16, 91, **1997**. (b) Gerbaux, P.; Haverbeke, Y. V.; Flammang, R. *Int. J. Mass Spectrom.* 184, 39, **1998** (c) Wang, F.; Tao, W. A.; Gozzo, F. C.; Eberlin, M. N.; Cooks, R. G. *J. Org. Chem.* 64, 3213, **1999** (d) Cacace, F.; de Petris, G.; Pepi, F.; Rosi, M.; Sgamellotti, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* 38, 2408, **1999** (e) Frank, A. J.; Turecek, F. *J. Phys. Chem. A* 103, 5348, **1999** (f) Bronstrup, M.; Schroder, D.; Schwarz, H. *Organometallics* 18, 1939, **1999** (g) O'Hair, R. A. J.; Andrautsopoulos, N. K. *Org. Lett.* 2, 2567, **2000** (h) Moraes, L. A. B.; Gozzo, F. C.; Laali, K. K.; Eberlin, M.

N. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 7776, **2000** (i) Ramirez-Arizmendi, L. E.; Yu, Y. Q.; Kenttamaa, H. I. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 10, 379, **1999** (j) Steiner, V.; Daoust-Maleval, I.; Tabet, J. C. *Int. J. Mass Spectrom.* 196, 121, **2000**.

[72] (a) Kim, J. K.; Caseric, M. C. *J. Am. Chem. Soc.* 104, 4624, **1982** (b) Paradisi, C.; Kenttamaa, H. I.; Le, Q. T.; Caserio, M. C. *Org. Mass Spectrom.* 23, 521, **1988** (c) Creaser, C. S.; Williamson, B. L. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 427, **1996** (d) Meurer, E. C.; Eberlin, M. N. *J. Mass Spectrom.* 37, 146, **2002** (e) Moraes, L. A. B.; Eberlin, M. N. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 11136, **1998**.

[73] Riter, L. S.; Meurer, E. C.; Handberg, E. S.; Laughlin, B. C.; Chen, H.; Patterson, G. E.; Eberlin, M. N. and Cooks, R. G. *Analyst* 128, 1112, **2003**.

[74] (a) Moraes, L. A. B.; Eberlin, M. N. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 11, 697, **2000** (b) Sparrapan, R.; Mendes, M. A.; Eberlin, M. N. *J. Mass Spectrom.* 35, 189, **2000** (c) Moraes, L. A. B.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Eberlin, M. N. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12, 14, **2001** (d) Wang, F.; Tao, W. A.; Gozzo, F. C.; Eberlin, M. N.; Cooks, R. G. *J. Org. Chem.* 64, 3213, **1999**.

[75] Sabino, A. A.; Pilli, R. A. *Tetrahedron Lett.* 43, 2819, **2002**.

[76] Moraes, L. A. B.; Eberlin, M. N. *J. Mass Spectrom.* 37, 162, **2002**.

[77] Artur, C. L.; Pawliszyn, J. *Anal. Chem.* 62, 2145, **1990** (b) Yu, X.; Yuan, H.; Georechi, T.; Pawliszyn, J. *Anal. Chem.* 71, 2998, **1999** (c) Zygmunt, B.; Jastrzebska, A.; Namiesnik J. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 31, 1, **2001** (d) Ulrich, S. *J. Chromatogr.*, A 902, 167, **2000** (e) Snow, N. H. *J. Chromatogr.*, A 885, 445, **2000** (f) Eisert, R.; Pawliszyn, J. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 27, 103, **1997** (g) Beltran, J.; Lopez, F. J.; Hernandez, F. *J. Chromatogr.*, A 885, 389, **2000** (h) Augusto, F.; Koziel, J.; Pawliszyn, J. *Anal. Chem.* 73, 481, **2001** (i) Zini, C. A.; Augusto, F.; Christensen, E.; Smith, B. P.; Caramao, E. B.; Pawliszyn, J. *Anal. Chem.* 73, 4729, **2001** (j) Augusto, F.; Valente, A. L. P.; Tada, E. D.; Rivellino, S. R. *J. Chromatogr.*, A 873, 117, **2000**.

[78] Peres, C.; Viallon, C.; Berdage, J.-L. *Anal. Chem.* 73, 1030, **2001**.

[79] (a) Kotiaho, T.; Lauritsen, F. R.; Choudhury, T. K.; Cooks, R. G. *Anal. Chem.*, 63, 875A, **1991** (b) Lauritsen, F. R.; Kotiaho, T. *Rev. Anal. Chem.* 15, 237, **1996** (c) Mendes, M. A.; Pimpim, R. S.; Kotiaho, T.; Barone, J. S.; Eberlin, M. N. *Quim. Nova* 19, 480, **1996** (d) Srinivasan, N.; Johnson, R. C.; Kasthurikrishnan, N.; Wong, P.; Cooks, R. G.

Anal. Chim. Acta 350, 257, **1997** (e) Johnson, R. C.; Cooks, R. G.; Allen, T. M.; Cisper, M. E.; Hemberger, P. H. *Mass Spectrom. Rev.*, 19, 1, **2000** (f) Ketola, R. A.; Kotiaho, T.; Cisper, M. E.; Allen, T. M. *J. Mass Spectrom.* 37, 457, **2002**.

[80] (a) Cisper, M. E.; Garret, A. W.; Cameron, D.; Hemberger, P. H. *Anal. Chem.* 68, 2097, **1996** (b) Mendes, M. A.; Pimpim, R. S.; Kotiaho, T.; Eberlin, M. N. *Anal. Chem.* 68, 3502, **1996** (c) Creaser, C. S.; Stygall, J. W.; Weston, D. J. *Anal. Commun.* 35, 9H, **1998** (d) Kostiainen, R.; Kotiaho, T.; Mattila, I.; Mansikka, T.; Ojala, M.; Ketola, R. A. *Anal. Chem.* 70, 3028, **1998** (e) Moraes, L. A. B.; Eberlin, M. N.; Cagnon, J. R., Urbano, L. H. *Analyst* 125, 1529, **2000** (f) Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Eberlin, M. N. *Anal. Chem.* 9, 2166, **2000** (g) Alberici, R. M.; Zampronio, C. G.; Poppi, R. J.; Eberlin, M. N. *Analyst* 127, 230, **2002** (h) Nayar, A.; Liu, R.; Allen, R. J.; McCall, M. J.; Willis, R. R.; Smotkin, E. S. *Anal. Chem.* 74, 1933, **2002** (i) Short, R. T.; Fries, D. P.; Kerr, M. L.; Lembke, C. E.; Toler, S. K.; Wenner, P. G.; Byrne, R. H. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12, 676, **2001**.

[81] (a) Haddad, R.; Mendes, M. A.; Hoehr, N. F.; Eberlin, M. N. *Analyst* 126, 1212, **2001** (b) Vellasco, A. P.; Haddad, R.; Eberlin, M. N.; Hoehr, N. F. *Analyst* 127, 1050, **2002**.

[82] Riter, L. S.; Takats, Z.; Cooks, R. G. *Analyst* 126, 1980, **2001**.

[83] Eberlin, M. N.; Meurer,E. C.; Tomazela, D. M.; Silva, R. C.; Augusto, F. Presented at the 50th ASMS conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Orlando, FL, June **2002**.

[84] Riter, L. S., Meurer, E. C., Cotte-Rodriguez, I., Eberlin, M. N., Cooks, R. G. *Analyst 128*, 1119-1122, **2003**.