



MAÍRA FASCIOTTI PINTO LIMA

**APLICAÇÕES DA MOBILIDADE IÔNICA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE
MASSAS COMO UMA TÉCNICA ANALÍTICA PARA O ESTUDO DE MISTURAS
COMPLEXAS E SEPARAÇÃO DE ISÔMEROS.**

**CAMPINAS
2012**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

MAÍRA FASCIOTTI PINTO LIMA

**APLICAÇÕES DA MOBILIDADE IÔNICA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE
MASSAS COMO UMA TÉCNICA ANALÍTICA PARA O ESTUDO DE MISTURAS
COMPLEXAS E SEPARAÇÃO DE ISÔMEROS.**

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCOS NOGUEIRA EBERLIN

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA AO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRA EM QUÍMICA NA
ÁREA DE QUÍMICA ANALÍTICA.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR
MAÍRA FASCIOTTI PINTO LIMA, E ORIENTADA PELO PROF.DR. MARCOS NOGUEIRA EBERLIN.**

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

L628a Lima, Maíra Fasciotti Pinto (1987-).
Aplicações da mobilidade iônica acoplada à espectrometria de massas como uma técnica analítica para o estudo de misturas complexas e separação de isômeros / Maíra Fasciotti Pinto Lima. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Marcos Nogueira Eberlin.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Espectrometria de massas. 2. Mobilidade iônica. 3. Corróis. 4. Petróleo. 5. Açúcares. I. Eberlin, Marcos Nogueira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Applications of ion mobility mass spectrometry as an analytical technique for the study of complex mixtures and isomers separations

Palavras-chave em inglês:

Mass spectrometry
Ion mobility
Corroles
Crude oil
Sugars

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestra em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora:

Marcos Nogueira Eberlin [Orientador]
Fernando Antonio Santos Coelho
Luiz Alberto Beraldo de Moraes

Data de defesa: 30/07/2012

Programa de pós-graduação: Química

Dedico este trabalho à minha mãe, **Ednéa Fasciotti** por todo amor, dedicação, amizade e suporte oferecidos à mim, durante não só os anos do meu mestrado, mas como em todos da minha vida. Dedico também ao meu pai, **Marco Antonio Lima**, que embora não mais presente fisicamente entre nós, certamente ainda está comigo, na minha mente e no meu coração, olhando por mim e me ajudando em todos os momentos da minha vida. Obrigado por me fazerem experimentar a plenitude do verdadeiro **amor**.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a **Deus** por, de alguma forma, colocar oportunidades maravilhosas em meu **destino** e por ter me dado força e sabedoria nos momentos mais difíceis, embora muitas vezes eu não percebesse isso.

Agradeço ao meu orientador, o professor **Marcos Eberlin**, por todo suporte e conhecimento compartilhado ao longo desses dois anos de mestrado, assim como ao **CNPq** pela bolsa concedida à mim durante o período.

Agradeço à **Lilica** e a **Jolie** por toda a alegria que me deram, e que ainda me dão, em todos os dias que eu pude estar com vocês.

Agradeço aos meus **amigos** do **Laboratório ThoMSon de Espectrometria de Massas** pela contribuição científica, treinamento, apoio, amizade e companheirismo.

Agradeço ao **CENPES/PETROBRAS** pelo fornecimento das amostras de petróleo analisadas neste trabalho.

Agradeço ao Professor **Hiroiuki Furuta** pela síntese dos Corróis analisados neste trabalho, assim como ao Professor **Koiti Araki** pela proposta do projeto. Agradeço também ao **Alexandre F. Gomes** pela colaboração na parte dos cálculos teóricos e da modelagem molecular realizados neste trabalho.

Agradeço ao time de Manchester (UK) da **Waters Corporation**, em especial ao **pesquisador Michael McCullagh**, pela ajuda com as análises dos dissacarídeos e pelo suporte durante os dias de trabalho realizados na empresa.

Agradeço ao meu padrasto **Francisco** pela enorme ajuda e apoio dedicadas à mim e à minha mãe.

Por fim, agradeço à **Banca Examinadora**, pela disposição em contribuir para a qualidade deste trabalho.

Curriculum vitae

Maíra Fasciotti Pinto Lima

Formação Acadêmica

- 2010 –2012** Mestrado em Química Analítica.
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil.
Título: “Aplicações da mobilidade iônica acoplada a espectrometria de massas como uma técnica analítica para o estudo de misturas complexas e separação de isômeros.”
Orientador: Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin
Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).
- 2005 - 2009** Graduação: Química Industrial
Universidade Federal Fluminense, UFF
Niterói, Rio de Janeiro, Brasil.

Atuação Profissional

- 2009 - 2010** Vínculo: Livre, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 30 h.
Centro de Pesquisa e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguêz de Mello. CENPES/PETROBRAS.

Iniciação Científica

- 2008 –2009** Área: Química Analítica
Título: “Desenvolvimentos em Química Analítica do Petróleo.”
Orientador: Prof. Dr. Annibal Duarte Pereira Netto.
Bolsista da: Fundação Euclides da Cunha (CENPES/PETROBRAS).
- 2006 –2008** Área: Química Analítica
Título: “Desenvolvimento de Estratégias para a Caracterização da Composição de Triacilgliceróis em Óleos de Oliva para a Avaliação de Adulteração por HPLC-MS/MS.”
Orientador: Prof. Dr. Annibal Duarte Pereira Netto.
Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Produção Científica

Publicações em Revistas Indexadas:

- **Fasciotti, Maíra**; F. Gomes, Alexandre; Gozzo, Fabio C.; Iglesias, Bernardo A.; de Sá, Gilberto F.; Daroda, Romeu J.; Toganoh, Motoki; Furuta, Hiroyuki; Araki, Koiti; Eberlin, Marcos N.; Corrole Isomers: Gas-phase Shapes via Travelling Wave Ion Mobility Mass Spectrometry and Dissociation Chemistries via Tandem Mass Spectrometry. *Organic and Biomolecular Chemistry*. Aceito para publicação.
- **Fasciotti, Maíra**; Sanvido, Gustavo B.; Santos, Vanessa G.; Lalli, Priscila M.; McCullagh, Michael; de Sá, Gilberto F.; Daroda, Romeu J.; Peter. Martin G. Eberlin, Marcos N.; Separation of Isomeric Disaccharides by Traveling Wave Ion Mobility Mass Spectrometry: Increasing Resolution with Polarizable Drift Gases. *Journal of Mass Spectrometry*. **2012**. Aceito para publicação.
- Brenno A. D. Neto; José R. Corrêa; Pedro H. P. R. Carvalho; Diego C. B. D. Santos; Bruna C. Guido ; Claudia C. Gatto ; Heibbe C. B. de Oliveira ; **Fasciotti, Maíra** ; Eberlin, M. N. ; Eufrânio N. da Silva Jr . Selective and Efficient Mitochondrial Staining with Designed 2,1,3-Benzothiadiazole. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23, 70-781, **2012**.
- **Fasciotti, Maíra**; Pereira Netto, Annibal D. Optimization and application of methods of triacylglycerol evaluation for characterization of olive oil adulteration by soybean oil with HPLC APCI-MS MS. *Talanta (Oxford)*, 81, 1116-1125, **2010**.
- de M. Ochs, Soraya; **Fasciotti, Maíra** ; Barreto, Renata P. ; de Figueiredo, Natália G. ; Albuquerque, Flávio C.; Pontes Massa, M. Cecília G. ; Gabardo, Irene ; Pereira Netto, Annibal D. . Optimization and comparison of HPLC and RRLC conditions for the analysis of carbonyl-DNPH derivatives. *Talanta (Oxford)*, 81, p. 521-529, **2010**.

Prêmios e títulos

2010 Prêmio Láurea Acadêmica, Universidade Federal Fluminense. Melhor aluna do curso de Química Industrial.

RESUMO

Esta dissertação apresenta uma breve introdução sobre a técnica de mobilidade iônica acoplada a espectrometria de massas (Capítulo 1) e a discussão de resultados aplicados a três subprojetos distintos. A técnica de TWIM-MS é uma técnica de separação na qual a separação em dos íons ocorre em uma cela de mobilidade iônica e é baseada em parâmetros como a seção de choque, carga, polarizabilidade, que é a capacidade de um íon ter sua densidade eletrônica distorcida pela interação com o gás de mobilidade, além de, obviamente, da estrutura tridimensional dos íons em fase gasosa. Sobre o Capítulo 2, objetivo do trabalho em petroleômica foi desenvolver e otimizar um método para a identificação de compostos polares presentes em amostras de petróleo e seus derivados como diesel e gasolina, que fosse capaz de diferenciar amostras distintas com relação essas composições, verificando quais respostas esta técnica pode fornecer nos estudos petroleômicos. Puderam ser identificadas as classes N, O₂ e NO, com excelente resolução com a técnica de TWIM-MS. Entretanto, acredita-se que algumas outras classes ainda podem ser elucidadas. O CO₂ se mostrou ser o melhor gás de mobilidade a ser utilizado para a resolução destas classes. A técnica de TWIM-MS também se mostrou adequada para a caracterização de gasolina e seus aditivos, entretanto mais amostras de diesel aditivado devem ser investigadas, para se descobrir porque os aditivos não puderam ser detectados através da técnica de ESI-TWIM-MS. Com relação ao estudo das estruturas em fase gasosa dos isômeros do Corrol (Capítulo 3), pode-se observar que o corrolin tem a estrutura tridimensional mais compacta entre todos os isômeros, enquanto NCC4 e corrol são os isômeros com maiores seções de choque e maiores *drift times*. Mesmo que o norrole tenha os maiores valores previstos de CCS, seu menor momento de dipolo resulta em interações mais fracas com o gás de mobilidade, e um *drift time* menor do que o esperado é obtido. Uma melhor resolução entre os isômeros de corrol foi alcançada usando CO₂ como gás de mobilidade. Além disso, estes isômeros podem ser diferenciados monitorando íons característicos resultantes de suas fragmentações. Em conclusão, mostrou-se que a diferenciação por TWIM-MS destas estruturas pode ser conseguida através do monitoramento das diferenças entre as suas mobilidades relativas e também pelos espectros distintos de MS/MS obtidos para cada isômero. Já o Capítulo 4, visou avaliar a separação de 4 dissacarídeos isoméricos, em que se observou que a utilização de mais gases polarizáveis, tais como o CO₂ na análise realizada com o Synapt G2 permite uma resolução quase na linha de base, o que não foi possível utilizando N₂ como gás de mobilidade e nem na primeira geração do equipamento comercial Synapt, mesmo usando CO₂ como gás de mobilidade.

ABSTRACT

This dissertation presents a brief introduction of the technique of Ion Mobility Mass Spectrometry (Chapter 1) and also the discussion of results applied to three distinct subprojects. The technique of Traveling Wave Ion Mobility Mass Spectrometry, is a separation technique in which the separation of the ions occurs in a mobility cell and is based on parameters such as collision cross-section, charge, polarizability (the capacity of an ion to have its electronic density distorted by interaction with the drift gas) and the three dimensional structure (shape) of ions in the gaseous phase. The main goal of the work performed in petroleomics (Chapter 2), was to develop and optimize a method for the identification of polar compounds present in oil samples and its derivatives, such as diesel and gasoline. The applied method was able to differentiate oil samples based on some polar components. Classes N, O₂ and NO could be identified with proper resolution with TWIM-MS technique. However, it is believed that some other classes may be elucidated. CO₂ was shown to be the best drift gas to be used for the separation of these classes. The technique of TWIM-MS also proved to be suitable for the characterization of gasoline and its additives, however, more samples of additive diesel must be investigated to find out why the additives could not be detected by the technique of ESI-TWIM-MS. During the study of tridimensional structures in the gaseous phase of five Corrole isomers (Chapter 3), it was observed that significant differences in shape and charge distributions for the protonated molecules lead to contrasting gas phase mobilities, most particularly for corroin, the most “confused” isomer. Accordingly, corroin was predicted by DFT and collisional cross section calculations to display the most compact tridimensional structure. NCC4 and corrole, on the other hand were found to be the most planar isomers. Better resolution between the corrole isomers was achieved using the more polarizable and massive CO₂ as the drift gas and contrasting labilities towards CID, allowed the prompt differentiation of some isomers. Chapter 4 aimed to evaluate the separation of four isomeric disaccharides, where it was observed that the use of more polarizable gases, such as CO₂, in the analysis performed with a Synapt G2 allows almost a baseline resolution for some isomeric pairs. This was not possible using N₂ as drift gas with the Synapt G2, and not with the Synapt G1 using either N₂ or CO₂.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | XIII |
| LISTA DE FIGURAS | XVI |
| LISTA DE TABELAS..... | XXI |
| CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO GERAL SOBRE A TÉCNICA DE ION MOBILITY MASS SPECTROMETRY..... | 1 |
| 1.1. HISTÓRICO DA TÉCNICA | 1 |
| 1.2. FUNDAMENTOS BÁSICOS DA TÉCNICA DE IM-MS..... | 2 |
| 1.3. FUNDAMENTOS E INSTRUMENTAÇÃO DA TÉCNICA DE <i>TRAVELING WAVE ION MOBILITY MASS SPECTROMETRY</i> | 6 |
| CAPÍTULO 2. PETROLEÔMICA VIA TWIM-MS: DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE UMA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A CARACTERIZAÇÃO DE PETRÓLEOS E SEUS DERIVADOS | 10 |
| 2.1. INTRODUÇÃO..... | 10 |
| 2.1.1. CARACTERIZAÇÃO DE PETRÓLEO..... | 10 |
| 2.1.2. IM-MS APLICADA A ESTUDOS EM PETROLEÔMICA | 11 |
| 2.2. OBJETIVOS..... | 12 |
| 2.3. PARTE EXPERIMENTAL..... | 12 |
| 2.3.1. AMOSTRAS E REAGENTES..... | 12 |
| 2.3.2. CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS | 13 |
| 2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 14 |
| 2.5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS..... | 31 |
| CAPÍTULO 3. ISÔMEROS DO CORROL: ESTUDO DAS ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS EM FASE GASOSA POR TRAVELING WAVE ION MOBILITY MASS SPECTROMETRY E ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL..... | 32 |

| | |
|---|-----------|
| 3. INTRODUÇÃO..... | 32 |
| 3.1. A QUÍMICA DOS CORRÓIS | 32 |
| 3.1.2. A ESPECTROMETRIA DE MASSAS NA CARACTERIZAÇÃO DE ISÔMEROS | 33 |
| 3.2. OBJETIVOS..... | 34 |
| 3.3. PARTE EXPERIMENTAL..... | 34 |
| 3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 37 |
| 3.4.1. ANÁLISE POR TWIM-MS | 37 |
| 3.4.2. CÁLCULOS TEÓRICOS | 43 |
| 3.4.3. ANÁLISE POR MS/MS DE VARREDURA DE ÍONS PRODUTO..... | 48 |
| 3.5. CONCLUSÕES..... | 51 |
| CAPÍTULO 4. SEPARAÇÃO DE DISSACARÍDEOS ISOMÉRICOS POR TWIM-MS: AUMENTANDO O PODER DE RESOLUÇÃO COM O SYNAPT G2 E GASES MAIS POLARIZÁVEIS. | 52 |
| 4.1. INTRODUÇÃO..... | 52 |
| 4.1.1. A ESPECTROMETRIA DE MASSAS NA CARACTERIZAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS | 52 |
| 4.1.2. OS AVANÇOS DA TÉCNICA DE TWIM-MS | 53 |
| 4.2. OBJETIVOS..... | 54 |
| 4.3. PARTE EXPERIMENTAL..... | 55 |
| 4.3.1. AMOSTRAS E REAGENTES..... | 55 |
| 4.3.2. CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS..... | 55 |
| 4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 56 |
| 4.5. CONCLUSÕES..... | 64 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 72 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------|--|
| [M+H] ⁺ - | Molécula protonada |
| [M+Na] ⁺ - | Molécula sodiada |
| Å ² - | Ângstrom ao quadrado |
| AIMS - | <i>Aspiration Ion Mobility Spectrometry</i> |
| APCI - | <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> |
| APPI - | <i>Atmospheric Pressure Photo Ionization</i> |
| ASAP - | <i>Atmospheric Pressure Solids Analysis Probe</i> |
| ° C / min - | Graus Celsius por minuto |
| CCS - | <i>Collision Cross Section</i> |
| CID - | <i>Collision Induced Dissociation</i> |
| Da - | Dalton |
| DBE - | <i>Double Bond Equivalent</i> |
| DFT - | <i>Density Functional Theory</i> |
| dt - | <i>Drift time</i> |
| DTIMS - | <i>Drift Time Ion Mobility Spectrometry</i> |
| E - | Campo elétrico |
| EF IM-MS | <i>Extractive Fragment Ion Mobility Spectrometry</i> |
| EHSS - | <i>Exact-Hard Spheres Scattering</i> |
| ESI - | <i>Ionização por Electrospray</i> |
| ESI(-) - | <i>Electrospray no modo de íons negativos</i> |
| ESI(+)- | <i>Electrospray no modo de íons positivos</i> |
| ESI-MS | <i>Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i> |
| eV - | Eletronvolts |
| FAIMS - | <i>Field-Asymmetric Wave Form Ion Mobility Spectrometry</i> |
| Fru - | Frutose |
| FT ICR - | <i>Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance</i> |
| FT ICR-MS - | <i>Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry</i> |
| G1 - | Synapt G1 |

| | |
|-------------------|---|
| G2 - | Synapt G2 |
| Gal - | Galactose |
| GC-MS - | <i>Gas Chromatography Mass Spectrometry</i> |
| Glc - | Glicose |
| HDMS - | High Definition Mass Spectrometry |
| HF - | Ácido fluorídrico |
| HPLC - | <i>High Performance Liquid Chromatography</i> |
| IM - | <i>Ion Mobility</i> |
| IM-MS - | <i>Ion Mobility Mass Spectrometry</i> |
| IMS - | <i>Ion Mobility Spectrometry</i> |
| K - | Mobilidade Iônica |
| kV | kilo Volts |
| L / h | Litro por hora |
| LDI - | Laser Dessorption Ionization |
| m - | Massa |
| m/s - | Metros por segundo |
| m/z - | Razão massa sobre carga |
| MALDI - | <i>Matrix Assisted Laser Dessorption Ionization</i> |
| mbar - | milibar |
| MCR - | Modelo de Cargas Residuais |
| MDI - | Modelo da Dissociação de Íons |
| mg - | miligramas |
| min - | minuto |
| mL - | mililitros |
| mL/min - | mililitros por minuto |
| MMCC - | <i>Mobility Mass Correlation Curve</i> |
| MS - | <i>Mass Spectrometry</i> |
| ms - | milisegundos |
| MS/MS - | <i>Tandem Mass Spectrometry</i> |
| N - | Classe N |
| NH ₃ - | Amônia |

| | |
|--------------------|--|
| NO - | Classe NO |
| O2 - | Classe O2 |
| ° C - | Graus Celsius |
| PETROBRAS - | Petróleo Brasileiro S/A |
| PM - | <i>Projection Method</i> |
| q - | Carga |
| RF - | Radio frequência |
| R _p - | Poder de Resolução |
| R _{p-p} - | Resolução pico-a-pico |
| T - | Temperatura |
| TM - | <i>Trajectory Method</i> |
| TOF - | <i>Time of Flight</i> |
| T-wave - | <i>Traveling Wave</i> |
| TWIM - | <i>Traveling Wave Ion Mobility</i> |
| TWIM-MS - | <i>Traveling Wave Ion Mobility Mass Spectrometry</i> |
| V - | Volts |
| v/v - | Volume por volume |
| w _{1/2} - | largura do pico a meia altura |
| α - | Fator de separação |
| μ - | Mass reduzida do íon e do gás |
| μL - | Microlitro |
| v - | Velocidade de Fluxo |
| Ω - | Seção de choque |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema demonstrando o princípio básico da separação por mobilidade iônica, em que íons com diferentes estruturas tridimensionais irão atravessar a cela de mobilidade com diferentes tempos (*drift times*). 5
- Figura 2.** Representação esquemática de uma cela de mobilidade utilizada em TWIM. 7
- Figura 3.** Esquema do equipamento de TWIM-MS Synapt HDMS (Waters)..... 9
- Figura 4.** a) Espectro de massas para a amostra S1 obtido por TWIM-MS e b) obtido por FT-ICR MS. 17
- Figura 5.** Espectro bidimensional de *drift time* versus m/z para a amostra S1, em CO₂. 19
- Figura 6.** a) Distribuição de classes para a amostra S1 e b) gráfico de DBE por número de carbonos para a classe O2, obtidos com o software PetroMS, a partir dos dados de FT-ICR MS. 20
- Figura 7.** a) *Mobility Mass Correlation Curves* para a classe de compostos N e O2 obtidas com N₂ como gás de mobilidade (pressão = 2,00 mbar, velocidade de onda = 300 m/s e altura de onda = 30 V) e b) com CO₂ como gás de mobilidade (pressão = 0,85 mbar, velocidade de onda = 450 m/s e altura de onda = 30 V). 21
- Figura 8.** Espectro Bidimensional de *drift time* versus m/z para a amostra S2.. 22

| | |
|---|----|
| Figura 9. a) Distribuição de classes para a amostra S1 e b) gráfico de DBE por número de carbonos para a classe NO obtidos com o software PetroMS, a partir dos dados de FT-ICR MS..... | 23 |
| Figura 10. Espectro bidimensional de <i>drift time</i> versus <i>m/z</i> obtidos com ESI(+) para a) amostra de diesel comum, b) amostra de diesel aditivado, c) amostra de gasolina comum (bandeira I) e d) amostra de gasolina aditivada (bandeira I). (condições de a) e b): CO ₂ , 0,70 mbar, 550 m/s, 25 V e condições de c) e d): CO ₂ , 0,70 mbar, 430 m/s, 25 V)..... | 24 |
| Figura 11. Espectro bidimensional de drift time versus <i>m/z</i> obtidos com ESI(-) para a) amostra de diesel comum, b) amostra de diesel aditivado, c) amostra de gasolina comum (bandeira I) e d) amostra de gasolina aditivada (bandeira I). (condições: CO ₂ , 0,70 mbar, 600 m/s, 30 V). | 25 |
| Figura 12. a) Cromatogramas obtidos através da análise por CG-MS para as amostras do diesel comum e b) aditivado. (No cromatograma, a = 9,15-octadecadienoato de metila, b = C21, c = 8-octadecenoato de metila)..... | 27 |
| Figura 13. Espectro bidimensional de <i>drift time</i> versus <i>m/z</i> , obtidos em ESI(+), para a gasolina aditivada, destacando-se o espectro da região dos aditivos, circulos em branco a) para a bandeira I e b) para a bandeira II..... | 29 |
| Figura 14. a) ESI(+) de gasolina comum e b) gasolina aditivada da mesma bandeira. | 30 |
| Figura 15. a) Espectro bidimensional de <i>drift time</i> x <i>m/z</i> de gasolina comum e b) Espectro bidimensional de <i>drift time</i> x <i>m/z</i> de gasolina aditivada. | 30 |

Figura 16. Gráficos de *drift time* sobrepostos obtidos para cada isômero separadamente. **a)** N₂, pressão = 2,00 mbar, velocidade de onda = 250 m s⁻¹ e altura de onda de 30,0 V; **b)** pressão de CO₂ = 1,00 mbar, velocidade de onda = 280 m s⁻¹ e altura de onda de 30,0 V; **c)** gráficos de *drift time* sobrepostos para o corrorin e NCC4 utilizando as condições de **b)**; em destaque o gráfico de mobilidade de uma mistura corrorin e NCC4 analisadas em uma mesma solução na mesma condição experimental de **b)**..... 39

Figura 17. Geometrias representativas, otimizadas no nível B3LYP/6-31g(d,p), de todos os cinco isômeros do corrol. Figuras foram geradas usando o programa PyMOL v1.4..... 47

Figura 18. Espectro de MS/MS de varredura de íons produto para **a)** corrol, **b)** corrorin, **c)** NCC2, **d)** NCC4 e **e)** norrol, utilizando 40,0 eV de energia de colisão. 49

Figura 19. Deconvolução dos picos de mobilidade obtida para uma mistura de corrorin e NCC4, conseguida através da extração de cromatogramas de mobilidade individuais para os íons de fragmentos específicos observados no espectro de íon produto de cada isômero, *m/z* 525 para corrorin e *m/z* 780 para NCC4..... 50

Figura 20. **a)** Espectros de *drift times* obtidos para a sacarose, lactose, celobiose e maltose no Synapt (CO₂, 2.00 mbar, velocidade de onda = 100 m s⁻¹, altura de onda = 30V) e **b)** análise realizada no Synapt G2 (CO₂, 2.00 mbar, velocidade de onda = 550 m s⁻¹, altura de onda = 40V)..... 57

Figura 21. a) Gráficos de *drift time* obtidos para uma mistura de maltose e lactose no Synapt G1 com CO₂, b) no G2 com N₂, c) no synapt G1 com CO₂ e d) nas mesmas condições de b), porém usando CO₂ como gás de mobilidade..... 61

Figura 22. Espectros de MS/MS dos íons [M+Na]⁺ obtidos para amostras puras de a) maltose, b) sacarose, c) lactose e d) cellobiose, utilizando 100 eV de energia de colisão..... 64

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Poder resolução (R_p) determinado para os gráficos de *drift time* adquiridos a partir de soluções individuais de cada isômero utilizando N_2 e CO_2 como gases de mobilidade e **Equação 2**..... 41
- Tabela 2.** Fator de separação α e resolução pico-a-pico (R_{p-p}) calculadas para cada par de isômeros usando N_2 e CO_2 como gases de mobilidade. 42
- Tabela 3.** Energias, seções de choque e momentos de dipolo para os isômeros do Corrol. (^a Para as espécies protonadas, ^b $E_{NORMALIZADA} = E - E_{corrole}$)..... 45
- Tabela 4.** Poder de resolução do pico de mobilidade (R_p) para cada isômero analisado separadamente com o Synapt e o Synapt G2..... 58
- Tabela 5.** Fator de separação α e resolução pico-a-pico (R_{p-p}) calculados para cada par de isômeros usando o Synapt G1 e o G2..... 59

CAPÍTULO 1. Introdução geral sobre a técnica de Ion Mobility Mass Spectrometry

1.1. Histórico da técnica

As primeiras medidas da mobilidade iônica de íons foram realizadas por Tyndall e Powell em 1931, em um experimento que verificava a mobilidade de íons positivos em gás hélio¹. Logo em seguida, em 1932, Bradbury e colaboradores realizaram um experimento que media a mobilidade absoluta de elétrons em gás hidrogênio, descrevendo então, um novo método para medir a mobilidade de elétrons em diferentes gases². Todos estes experimentos usavam um instrumental simplificado (se comparado à tecnologia atual) montado em laboratório e serviram de base para o desenvolvimento da técnica e o entendimento de seus princípios básicos. Até a década de 70 muitos outros trabalhos descrevendo a mobilidade de íons já haviam sido reportados na literatura, fornecendo material para que em 1975 Revercon e Mason publicassem um artigo de revisão na *Analytical Chemistry*³, descrevendo os princípios e aplicações da técnica que foi neste momento denominada de “Cromatografia de plasma” e “Eletroforese gasosa”, visto que a técnica, até então, sempre considerava íons em fase gasosa, sendo principalmente utilizada para a análise de compostos orgânicos voláteis e para comprovar o estado de carga de espécies iônicas⁴.

A Espectrometria de Mobilidade Iônica (*Ion Mobility Spectrometry – IMS*) se tornou uma técnica analítica de grande destaque nas últimas décadas principalmente após seu acoplamento com a técnica de Espectrometria de Massas (MS - *Mass Spectrometry*). Em 1997, o grupo de Clemmer e colaboradores desenvolveu um equipamento de IM acoplado a MS que utilizava um analisador

híbrido (*Ion Trap e Time-of-flight*), sendo este desenvolvimento um marco de extrema importância no desenvolvimento da técnica. Atualmente, cerca de 50000 espectrômetros de mobilidade iônica são utilizados ao redor do mundo, sendo aplicados para os mais diversos tipos de análises, tais como de explosivos, drogas, fármacos, dentre outros, e em diversas matrizes.

O desenvolvimento de fontes como o *Electrospray* (ESI) e a *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* (MALDI) como fonte de íons para IMS aumentou drasticamente as possibilidades de aplicações da IMS, que pôde ser aplicada na determinação de íons em fase aquosa ou até mesmo em fase sólida contendo analitos não voláteis. Além disso, o desenvolvimento de instrumentos de IMS de alta resolução e a implementação de metodologias que utilizam gases de mobilidade seletivos permitiram que fossem realizadas separações em fase gasosa de isômeros estruturais, conformeros poliméricos e compostos quirais, com uma velocidade jamais conseguida anteriormente, visto que a separação por mobilidade iônica ocorre na faixa de milisegundos, enquanto que separações por cromatografia ou eletroforese ocorrem na ordem de minutos.

1.2. Fundamentos básicos da técnica de IM-MS

Quando acoplada à Espectrometria de Massas (*Mass Spectrometry – MS*), a IMS, que separa os íons de acordo com seu tamanho, carga e suas interações com o gás de mobilidade, se torna uma ferramenta analítica extremamente poderosa para a investigação estrutural de compostos orgânicos e na separação de amostras complexas, como são os estudos de proteômica, glicômica e metabolômica⁵. O acoplamento da IMS com a MS é geralmente referido como IM-MS, pois as duas técnicas são complementares e encaixam-se instrumentalmente tão bem que podem

ser fundidas numa única medida analítica em um plano. Enquanto que a MS mede primariamente a razão massa carga (m/z) dos íons, a IMS adiciona uma nova dimensão aos dados conferindo para cada valor de m/z um espectro de *drift time*, que é tempo que o íon demora para atravessar a cela de mobilidade e alcança o analisador de massas.

A técnica, fundamentalmente, baseia-se no princípio de que a velocidade com que diferentes íons atravessam um gás neutro sob a influência de um campo elétrico fraco varia de acordo com a sua mobilidade iônica⁶. Se a pressão do gás é suficientemente alta para uma nuvem de íons desenvolver velocidade ao atravessá-lo sob influência de um campo elétrico, a velocidade de fluxo, v , será diretamente proporcional à mobilidade iônica, K , e ao campo elétrico, E :

$$v = K \cdot E$$

A mobilidade iônica é característica para cada íon e depende de diversos fatores como a carga do íon (q), a densidade molar do gás de mobilidade (N), a massa reduzida do íon e do gás (μ), da temperatura absoluta (T) e da seção de choque do íon (Ω) e são relacionados matematicamente através da seguinte equação, denominada equação de Mason-Schamp⁷:

$$K = \frac{3}{16} \times \frac{q}{N} \times \left(\frac{1}{\mu} \times \frac{2\pi}{kT} \right)^{\frac{1}{2}} \times \frac{1}{\Omega}$$

Esta equação mostra que a mobilidade de um íon é inversamente proporcional à raiz quadrada da massa reduzida e também inversamente proporcional a seção de choque do íon. Entretanto, esta equação não leva em

consideração as interações entre o íon e o gás de mobilidade do tipo íon-dipolo/dipolo induzido, sendo basicamente válida apenas quando Hélio (gás “clássico” de mobilidade) é utilizado como gás de mobilidade, quando estas interações podem ser desconsideradas, já que o Hélio é um gás que pode ser considerado pouco ou não polarizável. Entretanto, estudos mostram que a utilização de gases mais polarizáveis podem melhorar a separação por mobilidade⁸. Em um conjunto de experimentos em que todos os parâmetros do gás permaneçam constantes (temperatura, pressão e a natureza do gás), pode-se considerar que a mobilidade iônica (K) fica então dependente somente da seção de choque e da m/z dos íons, de acordo com a relação:

$$K^{-1} \propto \left(\frac{m}{q} \right) \Omega$$

Da relação acima, obtém-se o aspecto mais interessante da técnica de IM-MS: a capacidade de separação de íons de mesma m/z , porém distintas conformações espaciais em fase gasosa. Os íons com menor Ω , e portanto com maior mobilidade, irão atravessar a cela de mobilidade com maior rapidez e alcançarão o detector mais rapidamente. Cada conjunto de íons que foram separados ao longo da travessia da cela de mobilidade, chega ao analisador de massas em tempos diferentes resultando em um pico no espectro de mobilidade (**Figura 1**). O tempo que um íon demora para atravessar a cela de mobilidade é chamado de *drift time* (dt) e geralmente é medido em milisegundos.

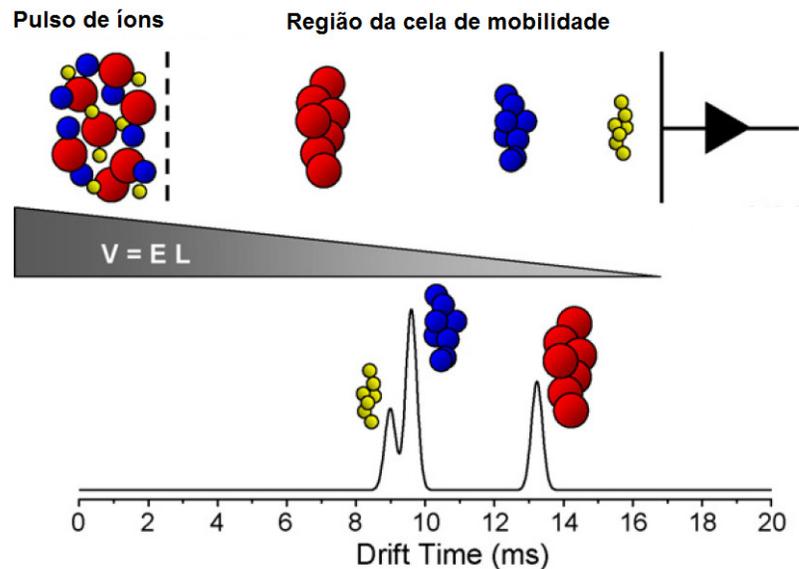


Figura 1. Esquema demonstrando o princípio básico da separação por mobilidade iônica, em que íons com diferentes estruturas tridimensionais irão atravessar a cela de mobilidade com diferentes tempos (*drift times*).

Basicamente, um equipamento de IM-MS deve conter 5 principais componentes: um sistema de introdução de amostra, a fonte de íons, a cela de mobilidade, o analisador de massas e o detector de íons. A amostra pode ser introduzida em um instrumento de IM-MS praticamente em todos os estados: sólido, líquido e vapor. Todas as fontes utilizadas em MS são compatíveis com equipamentos de IM-MS, sendo que as mais utilizadas são a ESI, MALDI e as por Dessorção a Laser (LDI).

Atualmente, existem basicamente 4 modalidades de IM-MS, que variam, entre outros aspectos, na forma e na intensidade em que um campo elétrico é aplicado à cela de mobilidade e na pressão com a qual o gás de mobilidade é utilizado no equipamento. São eles: *Drift Time Ion Mobility Spectrometry* (DTIMS), *Aspiration Mobility Mass Spectrometry* (AIMS), *Differential–Mobility Spectrometry* (DMS) também conhecida como *Field-Asymmetric Wave Form Ion*

Mobility Spectrometry (FAIMS) e a mais recente é a *Traveling Wave Ion Mobility* (TWIM), que será a modalidade utilizada e amplamente discutida neste trabalho e descrita detalhadamente a seguir.

1.3. Fundamentos e instrumentação da técnica de *Traveling Wave Ion Mobility Mass Spectrometry*

Os equipamentos clássicos de mobilidade iônica utilizam um campo elétrico uniforme e estático para conduzir os íons através do gás na cela de mobilidade iônica. Esses equipamentos apresentam baixa sensibilidade devido ao longo tempo que os íons levam para atravessar o equipamento e a difusão da nuvem iônica durante a separação. Recentemente, um dos grandes avanços sofridos pela técnica de IM-MS foi alcançada através da utilização de um gradiente de voltagem ao invés de uma voltagem fixa na espectrometria de mobilidade iônica^{9,10}. Em 2004, desenvolveu-se a técnica denominada de *Traveling Wave Ion Mobility Mass Spectrometry* (TWIM-MS), instrumentalmente comercializada pela Waters Corporation (Manchester, UK). Nesta modalidade, os íons são acumulados e periodicamente liberados na cela de mobilidade, onde serão separados de acordo com suas mobilidades sobre a ação de pulsos periódicos transientes de voltagens que são aplicados nos eletrodos que constituem a cela de mobilidade, controlados através de RF (rádio frequência).

A cela de mobilidade deste equipamento é formada por um total de 122 eletrodos anelares posicionados sequencialmente, constituindo uma cela de mobilidade bastante compacta de 18,5 cm. Este aspecto, foi o que possibilitou a comercialização de equipamentos de IM-MS, já que em equipamentos que utilizam um campo elétrico constante a cela de mobilidade chega a medir alguns metros, o

que inviabilizava a comercialização e a montagem em larga escala destes tipos de equipamento. Além disso, por apresentar uma cela de mobilidade mais compacta, equipamentos com TWIM apresentam maior poder de transmissão de íons, visto que quanto menor for o comprimento da cela, menor irá ser a dispersão natural da nuvem de íons. Isto resultou em uma maior sensibilidade para a técnica. O esquema de uma cela de mobilidade de TWIM é apresentado na **Figura 2**.

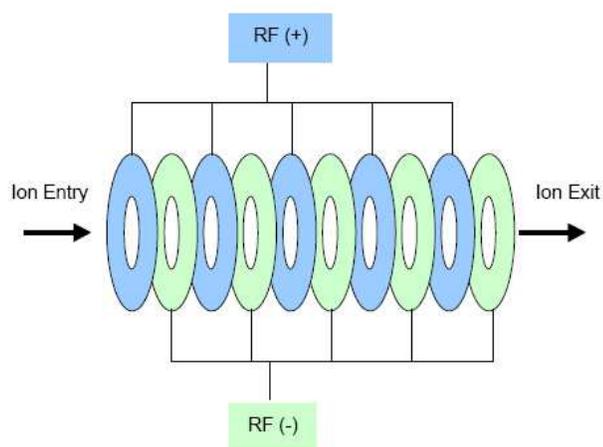


Figura 2. Representação esquemática de uma cela de mobilidade utilizada em TWIM.

O esquema do equipamento de TWIM-MS é apresentado na **Figura 3**. Como em todos os espectrometros de massas ele apresenta uma fonte de íons, que irá promover a ionização dos analitos presentes na amostra, que será inserida ou por uma bomba de seringa, ou por um sistema de separação, como um cromatógrafo a líquido.

Comercialmente existem praticamente todos os tipos mais frequentes de fonte de íons disponíveis para este equipamento (APCI, APPI, ESI, MALDI, etc). Entretanto, o equipamento utilizado neste trabalho possui fonte de ionização por *Electrospray* (ESI), adequada para a ionização de moléculas de baixo ou alto peso molecular, alta polaridade e complexidade estrutural, portanto oferecendo uma ionização seletiva de compostos polares presentes nas amostras. Esta técnica de

ionização se baseia nos fundamentos em que a liberação dos íons a partir das gotículas carregadas pode se dar através de dois mecanismos: o Modelo de Cargas Residuais (MCR) e o Modelo da Dessorção dos Íons (MDI). O MCR sugere que as gotículas carregadas saem da ponta do capilar num spray de formato cônico (chamado de cone de Taylor) e com o auxílio de um fluxo de gás aquecido (N_2), as gotículas carregadas com várias unidades de carga sofrem um processo de evaporação do seu solvente. A redução no tamanho e o conseqüente aumento da densidade de carga torna a repulsão entre as cargas maior que a tensão superficial da microgotícula resultante. Isto faz com que as gotículas se desintegram em gotículas ainda menores e o mesmo processo pode ser repetido até que o solvente seja evaporado por completo, restando apenas os íons da amostra. Já o MDI, propõe que o aumento da densidade superficial de carga devido à evaporação do solvente cria um campo superficial que supera as forças de solvatação dos íons antes de exceder a tensão superficial do solvente, causando a ejeção do íon antes da explosão coulômbica. Estes mecanismos favorecem a formação de íons multiplamente carregados, característica que pode ser utilizada na determinação de macromolécula.

Após serem formados na fonte, os íons entram na região de alto vácuo do espectrômetro de massas, onde são guiados por lentes iônicas até o quadrupolo, onde poderá haver a transmissão de uma faixa selecionada de m/z ou apenas uma m/z , no caso da realização de múltiplos estágios de MS ou MS/MS.

Um dos aspectos fundamentais deste equipamento é a região de mobilidade iônica, que compreende três “guias de íons” (*Ion Guides*), que juntos são denominados de *TriWave*. O *Trap* acumula os íons e os libera em “pacotes” para a cela de mobilidade, onde irá ocorrer a separação de íons com diferentes mobilidade iônicas, através da interação dos íons com o gás de mobilidade que preenche a cela,

sob a influência de um campo elétrico oscilante. O *Transfer* tem a função de conduzir os íons separados na cela de mobilidade para o analisador de massa¹¹.

O analisador de massa desse equipamento é o *Time of Flight* (TOF) que realiza a separação dos íons através da medida do tempo que um íon leva para atravessar uma determinada distância até o detector de íons.

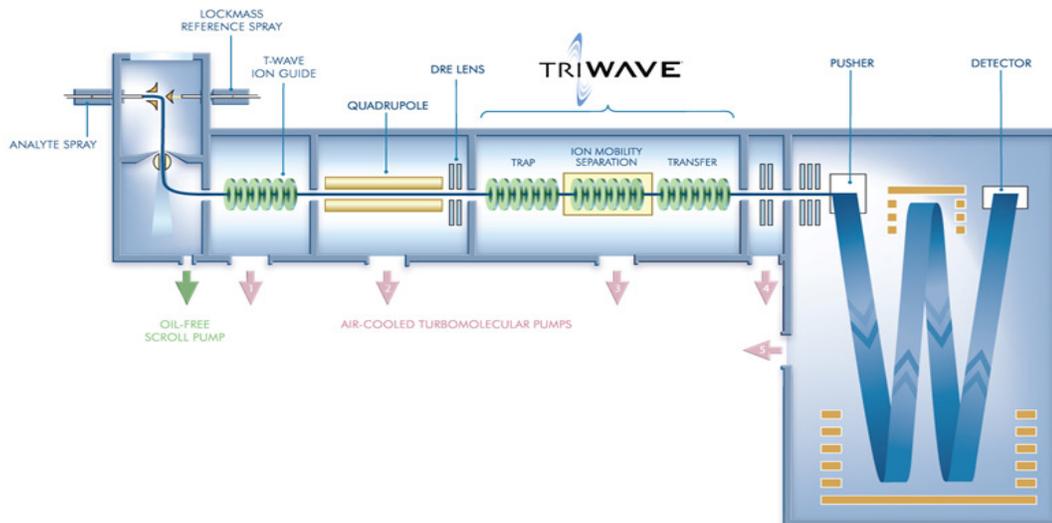


Figura 3. Esquema do equipamento de TWIM-MS Synapt HDMS (Waters)

CAPÍTULO 2. Petroleômica via TWIM-MS: desenvolvimento, otimização e aplicação de uma metodologia analítica para a caracterização de petróleos e seus derivados

2.1. Introdução

2.1.1. Caracterização de petróleo

O petróleo é certamente uma das misturas presentes na natureza que apresenta uma das maiores complexidades químicas, sendo constituída de milhares de compostos. Sua caracterização é fundamental em diversos processos da cadeia petrolífera, que vão desde a exploração até a obtenção de derivados. Neste contexto, a petroleômica surge como um termo que descreve o estudo de todos os componentes presentes e de como esses componentes podem afetar a reatividade e as propriedades físicas e químicas de determinado petróleo. A identificação e a caracterização de todos os componentes presentes no petróleo é um dos maiores desafios da análise química, devido à altíssima complexidade e ampla variabilidade de compostos orgânicos presentes nas amostras.

As metodologias analíticas para a determinação da composição de hidrocarbonetos em petróleo já são muito bem estabelecidas, através de técnicas como a Cromatografia Gasosa com detector de ionização por chama (*Gas Chromatography – Flame Ionization Detector - GC-FID*) ou com detecção por Espectrometria de Massas (*Gas Chromatography – Mass Spectrometry - CG-MS*). Entretanto, atualmente o termo petroleômica remete diretamente à utilização de espectrômetros de massas de altíssima resolução, como é o caso dos espectrômetros

de ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR MS)^{12,13}. A utilização de fontes de ionização a pressão atmosférica, tais como ESI, APPI e APCI acopladas ao analisador de FT-ICR, possibilita a determinação de compostos polares devido à altíssima resolução e precisão que este analisador de massas apresenta, permitindo a interpretação e classificação dos constituintes orgânicos por classes de heteroátomo, *Double Bond Equivalent* (DBE) e número de carbonos. Um estudo amplo de revisão sobre as metodologias analíticas para a caracterização de petróleo foi publicado por Rodgers e McKeena¹⁴ e pode ser utilizado como material de suporte para o maior conhecimento sobre a análise de petróleo.

2.1.2. IM-MS aplicada a estudos em petroleômica

A primeira aplicação do IM-MS para a caracterização de petróleo foi relatada por Fernandez-Lima, *et al.*¹⁵. Nesse trabalho, *Laser Desorption Ionization* (LDI) foi usada como uma fonte de ionização, acoplada a uma célula de mobilidade convencional preenchida com hélio como gás de mobilidade e um TOF como analisador de massa. Recentemente, Ahmed *et al.*¹⁶ aplicou a técnica TWIM-MS com o dispositivo ASAP (*Atmospheric-Pressure Solids Analysis Probe*), que permitiu a análise direta do petróleo sem nenhum pré-tratamento ou diluição. No modo ASAP, a amostra é depositada sobre um tubo de vidro (*probe*), inserida na fonte de ionização, aquecida e volatilizada, com temperatura controlada, por um fluxo de nitrogênio (proveniente do sistema de aquecimento do gás de dessolvatação) e ionizada através da descarga elétrica gerada pela corona da fonte APCI. Neste trabalho, o N₂ foi utilizado como gás de mobilidade.

Apesar da alta capacidade de transmissão de íons em celas do tipo *Traveling Wave* (T-wave), estas celas apresentam um poder de resolução relativamente baixo. Uma estratégia para melhorar o poder de resolução seria o uso de gases de

mobilidade mais polarizáveis. As considerações teóricas para a melhoria das separações por mobilidade iônica usando gases de mobilidade com diferentes polarizabilidades e massa molecular foram discutidas por Asbury *et al.*¹⁷.

2.2. Objetivos

O objetivo deste trabalho, foi desenvolver e otimizar um método para a identificação de compostos polares presentes em amostras de petróleo e seus derivados (diesel e gasolina), que fosse capaz de diferenciar amostras distintas com relação as suas composições, verificando quais respostas esta técnica pode fornecer nos estudos petroleômicos. Para isso, foram testados os gases CO₂ e N₂ como gases de mobilidade.

2.3. Parte Experimental

2.3.1. Amostras e reagentes

Aproximadamente 2 mg de petróleo de diferentes reservatórios do Brasil, fornecidas pelo CENPES/PETROBRAS, foram diluídos (sem tratamento prévio) em 1 mL de metanol/tolueno 1:1 (v/v) (grau HPLC, Honeywell Burdick & Jackson, MI, EUA) adicionando-se hidróxido de amônio com concentrações otimizadas para cada amostra em função da eficiência de ionização, que variaram de 1-5% (v/v). Em seguida, as amostras foram diretamente injetadas na fonte de ESI com aquisição de íons negativos. Para os derivados, cerca de 2 µL de cada amostra foram diluídas em 5 mL de MeOH com 0,1% de hidróxido de amônio para a detecção de íons negativos e ácido fórmico 0,1% para a detecção de íons positivos.

2.3.2. Condições Instrumentais

As análises por ESI-TWIM-MS foram realizadas em um espectrômetro de massas de alta resolução Synapt HDMS (Waters Corporation, Manchester, UK). Para petróleo, o espectro de massas foi adquirido de 50 – 800 m/z , em modo de íons negativos. CO_2 e N_2 foram utilizados como gás de mobilidade. Os parâmetros da fonte de ionização e da cela de mobilidade foram otimizados de modo a obter uma maior sensibilidade e maior poder de resolução. A análise de derivados do petróleo foi realizada tanto em modo negativo quanto em modo positivo de íons, utilizando CO_2 como gás de mobilidade a uma pressão de 1.00 mbar, com aquisição de m/z de 50-2000.

O equipamento foi diariamente calibrado utilizando uma solução de ácido fosfórico. Os espectros de massas foram obtidos através do software MassLynx e os dados de mobilidade foram obtidos e interpretados através do software DriftScope (v2.1), utilizando a ferramenta de detecção automática de picos, com detecção de íons com intensidade mínima de 80 contagens e 1000 de resolução de massa.

Os resultados das análises de TWIM-MS foram comparados com dados obtidos a partir da análise de altíssima resolução realizada em um espectrômetro de massas FT-ICR MS (LTQ FT 7.2T Ultra Mass Spectrometer, Thermo Scientific, Alemanha) com fonte ESI(-). Os espectros obtidos foram convertidos em um arquivo no formato *.txt* utilizando o software Xcalibur 2.0 (Thermo Scientific – Bremen – Alemanha). Esses espectros em formato *.txt* são os arquivos de entrada do software *PetroMS*^{18,19}, que foi especialmente desenvolvido para análise de dados em petroleômica. Gráficos de distribuição de classes e de DBE por número de carbono foram construídos através deste software e comparados com os espectros de massas tridimensionais obtidos por TWIM-MS.

Para a análise das amostras através da técnica de GC-MS, utilizou-se um cromatógrafo a gás 7890A com detector seletivo de massas 5975C da Agilent, com um analisador monoquadrupolar. O injetor foi aquecido a 280 °C e a injeção foi realizada em modo de divisão de fluxo (*split*), na proporção de 50:1. A coluna utilizada foi da Agilent modelo HP-5 (30m x 250mm x 0,25mm), com fluxo de 1.0 mL/min do gás de arraste (hélio) e rampa de temperatura sendo iniciada a 40 °C por 10 minutos, elevada a 150 °C a 10 °C/min e elevada novamente a 300 °C a 6 °C/min permanecendo por 14 min. O modo de aquisição do espectrômetro de massas foi de varredura de massas na faixa de 20 a 600 Da. Para o preparo das amostras, lavou-se a seringa com aproximadamente 5 enxágues das amostras a serem analisadas, ao final esvaziou-se a seringa, preencheu-se a mesma com 10 µL de ar ambiente e injetou-se no equipamento.

2.4. Resultados e Discussão

Como já mencionado anteriormente, a separação de ions em uma cela de mobilidade iônica é baseada em parâmetros como a seção de choque, carga, polarizabilidade, que é a capacidade de um íon ter sua densidade eletrônica distorcida pela interação com o gás de mobilidade, além de, obviamente, sua estrutura tridimensional (forma) em fase gasosa. Além disso, parâmetros da cela de mobilidade e do gás de mobilidade podem aumentar o poder de resolução da técnica. Melhores performances em termos de resolução são, geralmente, obtidos com a utilização de gases de mobilidade mais polarizáveis e de maior massa molecular. Neste sentido, N₂ e CO₂ podem ser gases bastante adequados, pois apresentam essas características mais pronunciadas, se comparados com outros gases mais frequentemente usados, como He. Em adição, um gás de mobilidade deve ser capaz de prover sensibilidade suficiente para detectar compostos presentes

em concentrações relativamente baixas e um maior poder de resolução, mesmo em celas de mobilidade menores, como é o caso das T-wave.

A primeira etapa deste trabalho, consistiu na otimização dos parâmetros da fonte de ESI e de mobilidade iônica. O poder de resolução de íons em celas de mobilidade são diretamente proporcionais à pressão do gás. Entretanto, pressões muito elevadas podem causar perda de sensibilidade, fragmentação ou distorção da distribuição dos íons no espectro de massa, que para os compostos polares em petróleo é aproximadamente uma forma gaussiana. Devido a este fato, a maior pressão de CO₂ que pôde ser utilizada, sem que houvesse o comprometimento dessas características foi 0,85 mbar. Para o N₂, a maior pressão que pôde ser utilizada sem que houvesse o comprometimento da sensibilidade foi de 2,00 mbar, sendo isto é possível devido a sua menor massa molecular se comparado ao CO₂, permitindo assim que maiores pressões sejam alcançadas sem que haja o comprometimento da sensibilidade do espectro.

Os parâmetros da fonte ESI também foram otimizados para que também fornecessem a maior sensibilidade, sem que ocorresse fragmentação e distorção do espectro. A distribuição de íons no espectro de massas obtido por TWIM-MS (**Figura 4a**) foi comparada com o espectro obtido por FT-ICR MS (**Figura 4b**), e ambos foram semelhantes com relação ao máximo de intensidade. A única diferença observada entre eles é a diferença de intensidade de íons de baixa m/z (<200), devido a menor sensibilidade do analisador de FT-ICR para a região de massa baixa, entretanto os máximos de intensidade foram os mesmos, em torno de m/z 500 para esta amostra. As faixas de massas adquiridas também foram diferentes para cada equipamento, pois acima de m/z 800, tanto o TOF quanto a mobilidade, não possuem resolução suficiente a ponto de fornecer alguma informação relevante sobre a amostra.

Dez amostras de petróleo foram analisadas por TWIM-MS nas condições otimizadas, porém neste trabalho apenas duas amostras (S1 e S2) representativas dos resultados obtidos serão apresentadas. A primeira observação obtida a partir da interpretação dos resultados foi de que classes de compostos com heteroátomos distintos em suas estruturas apresentam *drift times* bastante diferentes, mesmo tendo apenas uma pequena diferença de massa, tais como espécies isobáricas (mesma massa nominal e diferentes defeitos de massa). A consequência deste fato é que diferentes classes de compostos puderam ser diretamente identificadas no espectro de mobilidade bidimensional (*drift time* versus m/z) gerado pelo software DrifScope (Waters), através de seus espectros de massas por apresentarem diferentes tendências de *drift time*.

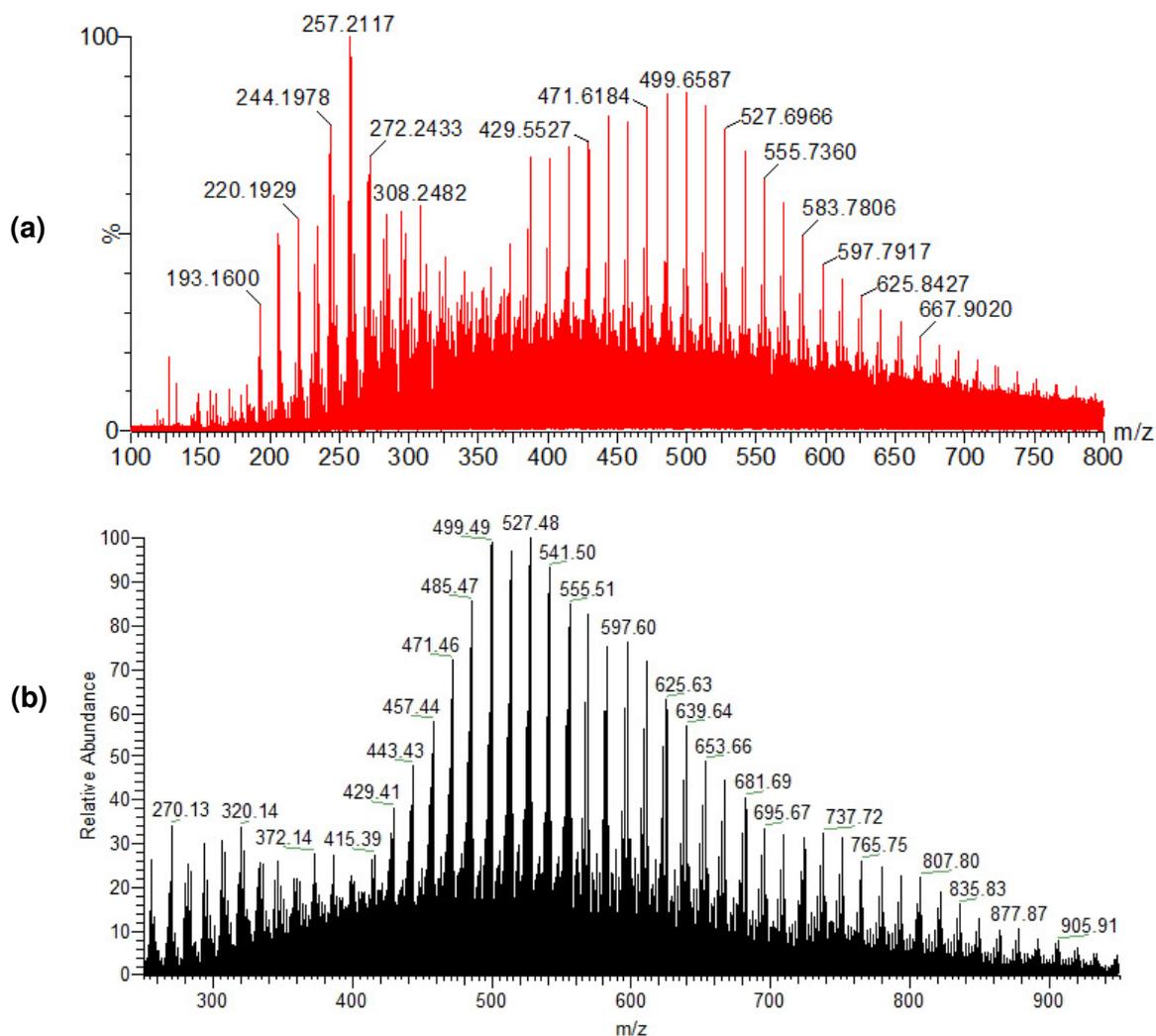


Figura 4. a) Espectro de massas para a amostra S1 obtido por TWIM-MS e b) obtido por FT-ICR MS.

A **Figura 5** apresenta o espectro de mobilidade bidimensional de *drift time* versus m/z para a amostra S1 obtido com CO_2 como gás de mobilidade, em que a escala de cores representa a intensidade relativa dos sinais. É possível identificar duas tendências distintas até aproximadamente m/z 350, que a partir dos espectros de massa de cada região foram identificadas como classes O2 e classe N, através da comparação do espectro de TOF com os resultados de massa exata e fórmula molecular inequívoca obtidos através do tratamento de dados dos espectros obtidos

por FT-ICR MS pelo software *PetroMS*^{14,15}. Este software, desenvolvido em uma tese de doutorado realizada em nosso grupo de pesquisa, permite atribuição da composição elementar para todos os sinais adquiridos através das seguintes etapas: 1) a atribuição da m/z para cada sinal do espectro; 2) atribuição do limiar ótimo de intensidade para o ruído de cada espectro individualmente; 3) construção de um banco de dados teórico de correlação massa e fórmula molecular para os possíveis constituintes polares do petróleo; 4) atribuição da composição elementar para cada sinal através da comparação com este banco teórico; 5) eliminação de duplicidade de atribuições através da confirmação do padrão isotópico e comparação com séries homólogas. Os resultados destes tratamentos permitem a organização dos dados por classes (heteroátomos) e tipo (DBE), construção de bibliotecas gráficas para a visualização e interpretação das atribuições na forma de Diagramas de Kendrick e van Krevelen. A combinação destes algoritmos e a execução automática deles formam o software de grande eficiência e alta tecnologia para tratamento e visualização de dados de petroleômica por FT- ICR MS.

O processamento de dados de FT-ICR MS usando o software *PetroMS* também corrobora a idéia de que as classes de O2 e N estão presentes nesta amostra, entre outras classes, que podem estar não resolvidas ou não detectadas no espectro de mobilidade.

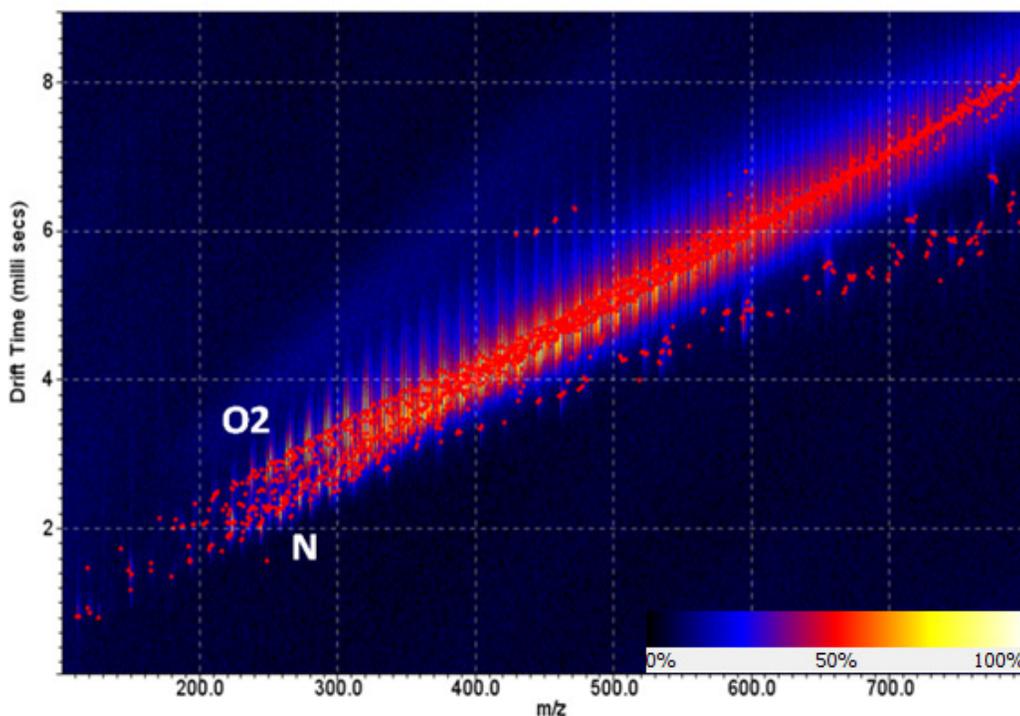


Figura 5. Espectro bidimensional de *drift time* versus m/z para a amostra S1, em CO_2 .

As abundâncias relativas para as classes de diferentes heteroátomos para a amostra S1 são mostradas na **Figura 6a**. Na **Figura 6b** é apresentado um gráfico de DBE por número de carbono para a classe O2, que é a mais abundante. A partir deste gráfico, pode-se observar que esta classe se apresenta em uma ampla faixa ao longo do espectro de massas, mas que apenas em regiões de massa mais baixa esta classe pode ser resolvida da classe N no espectro de mobilidade.

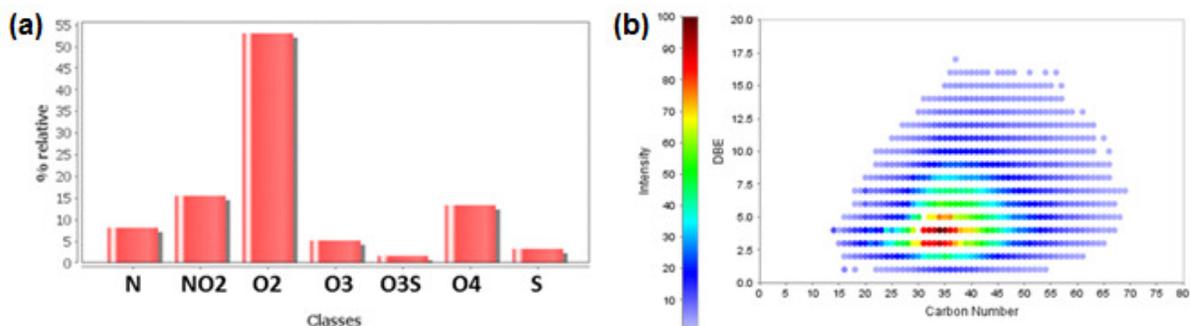


Figura 6. a) Distribuição de classes para a amostra S1 e **b)** gráfico de DBE por número de carbonos para a classe O2, obtidos com o software PetroMS, a partir dos dados de FT-ICR MS.

A mesma amostra também foi analisada utilizando N_2 como gás de mobilidade. A **Figura 7** apresenta um gráfico que mostra as tendências distintas das classes O2 e N obtidas com N_2 e CO_2 . Este gráfico pode ser chamado de *Mobility Mass Correlation Curve* (MMCC)²⁰, pois relaciona a m/z com o *drift time* de diferentes classes de substâncias em uma mesma análise. A **Figura 7a** mostra a distinção das classes N e O2 usando N_2 , e é possível observar que a partir da m/z 300 começa a ocorrer uma sobreposição de ambas as classes. A **Figura 7b** mostra a análise realizada com CO_2 , sendo observado que até a m/z 400 a separação das classes N e O2 ainda ocorre. A partir deste resultados, é possível afirmar que a utilização do CO_2 como gás de mobilidade para a análise de petróleo permite uma separação mais evidente dessas classes mesmo em pressões mais baixas (0,85 mbar de CO_2 contra 2.00 mbar de N_2) muito provavelmente porque o CO_2 é um gás mais polarizável que o N_2 . Isto facilita a visualização de classes distintas no espectro bidimensional de *drift time* versus m/z . Portanto, todas as análises subsequentes deste trabalho foram realizadas utilizando CO_2 como gás de mobilidade.

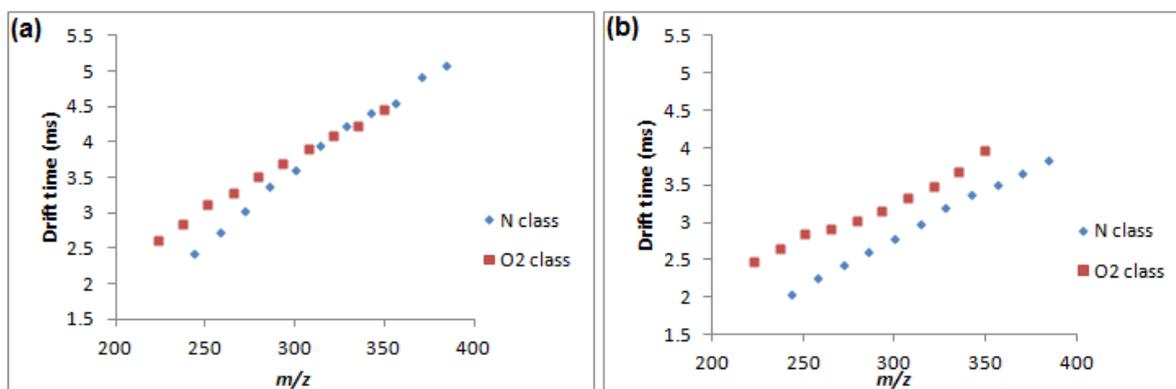


Figura 7. a) *Mobility Mass Correlation Curves* para a classe de compostos N e O2 obtidas com N₂ como gás de mobilidade (pressão = 2,00 mbar, velocidade de onda = 300 m/s e altura de onda = 30 V) e **b)** com CO₂ como gás de mobilidade (pressão = 0,85 mbar, velocidade de onda = 450 m/s e altura de onda = 30 V).

Outras amostras apresentaram tendências distintas no espectro bidimensional de *drift time* versus *m/z*, como um reflexo da presença de outras classes de compostos polares na composição do petróleo analisado. Como exemplo, podemos observar uma tendência bastante proeminente no espectro de mobilidade para S2, representada na **Figura 8**. A identificação das classes também foi feita por comparação com os dados FT- ICR MS de massa exata e fórmula molecular, que proporciona a caracterização da classe NO na amostra S2. É interessante observar que a amostra S1 não apresenta a classe NO (como pode ser visto na **Figura 6a**) e, portanto, não apresenta esta tendência em seu espectro de mobilidade. Isso mostra que a técnica de TWIM-MS pode ser capaz de prover um perfil tridimensional dos compostos polares em petróleo, visto que as diferentes classes sempre apresentarão tendências características de *drift time* quando resolvidas no espectro, podendo assim, ser diretamente identificadas.

Os resultados de abundância relativa de classes de compostos polares (**Figura 9a**) obtidos pela a análise de FT-ICR MS também concordam com as

tendências encontradas nos espectros de mobilidade. Os compostos nitrogenados são a classe mais abundante, seguida pela classe NO e apenas uma pequena quantidade da classe NO₂ (inferior a 5%). Na **Figura 9b**, está representado o gráfico de DBE por número de carbono para a classe NO, onde é possível observar que esta classe está presente em abundância considerável a partir de 30 carbonos na estrutura, e o espectro de mobilidade (**Figura 8**) mostra a resolução desta classe a partir de m/z 450, aproximadamente, resultados estes que são concordantes entre si. Isso indica que as técnicas de FT-ICR MS e TWIM-MS usando CO₂ como um gás de mobilidade são técnicas complementares, gerando resultados concordantes. Além disso, TWIM-MS pode oferecer informações estruturais de compostos específicos, o que a técnica de FT-ICR MS não é capaz de fornecer.

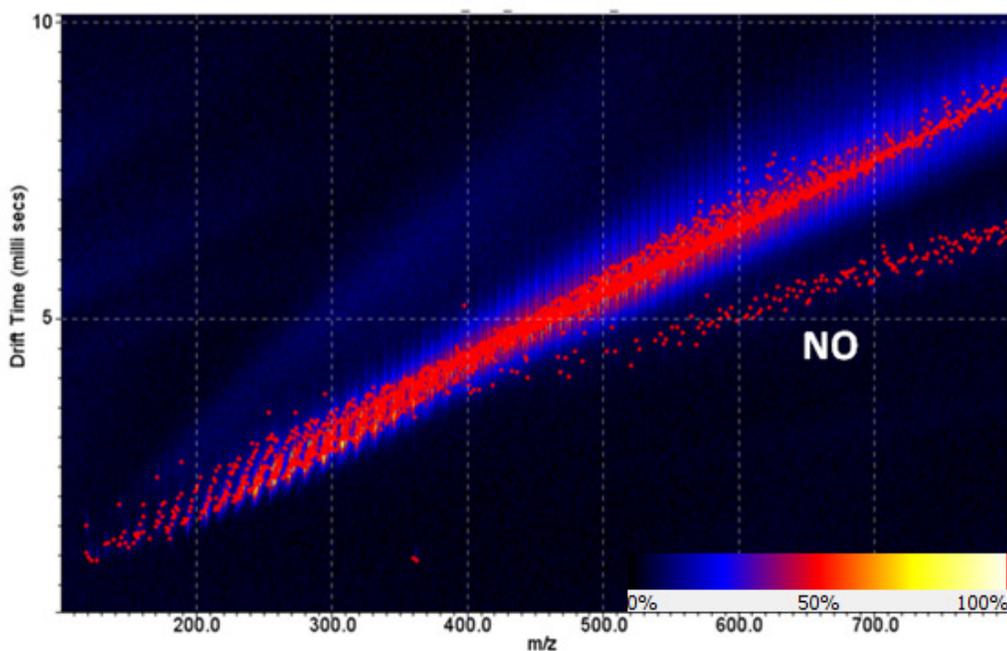


Figura 8. Espectro Bidimensional de *drift time* versus m/z para a amostra S2.

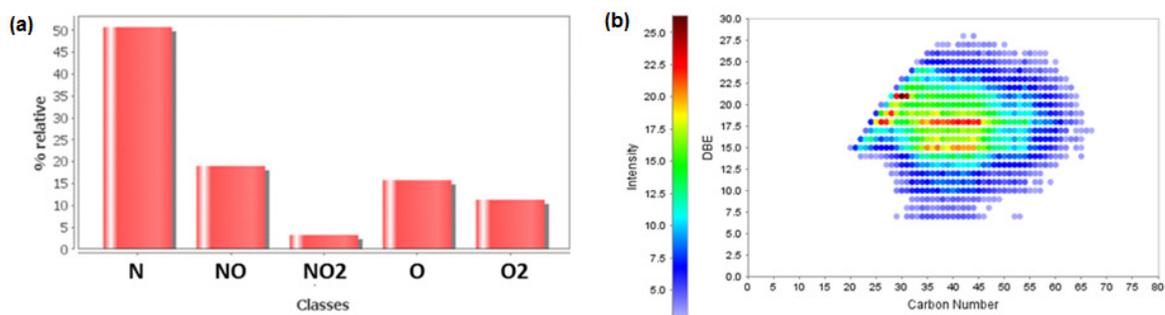


Figura 9. a) Distribuição de classes para a amostra S2 e b) gráfico de DBE por número de carbonos para a classe NO obtidos com o software PetroMS, a partir dos dados de FT-ICR MS.

A metodologia desenvolvida para as amostras de petróleo também foi aplicada para a caracterização de derivados de petróleo, tais como a gasolina comum, gasolina aditivada, diesel comum e diesel aditivado provenientes de diferentes bandeiras que comercializam combustíveis no Brasil. O principal aditivo de combustíveis é, geralmente, um surfactante e tem como objetivo principal a limpeza de todo o sistema de queima de combustível de um veículo, além de diminuir a emissão de poluentes e de aumentar a vida útil do sistema de combustão. Em contrapartida, a aditivação pode e deve aumentar a complexidade da composição do combustível. Desta forma, a técnica de TWIM-MS pode facilitar bastante a visualização das mudanças nas composições do combustível. Como já mencionado, a fonte ESI promove a ionização de compostos com grupamentos polares, sendo assim, ideal para a análise dos aditivos presentes em combustíveis, já que provavelmente se tratam de surfactantes catiônicos ou aniônicos. Ao todo foram analisadas gasolinas comuns e aditivadas de duas bandeiras distintas, assim como diesel comum e aditivado de uma mesma bandeira, o que totaliza 6 amostras. As análises foram realizadas tanto em modo positivo quanto em modo negativo de íons e os resultados são apresentados nas **Figura 10** e **Figura 11**, respectivamente.

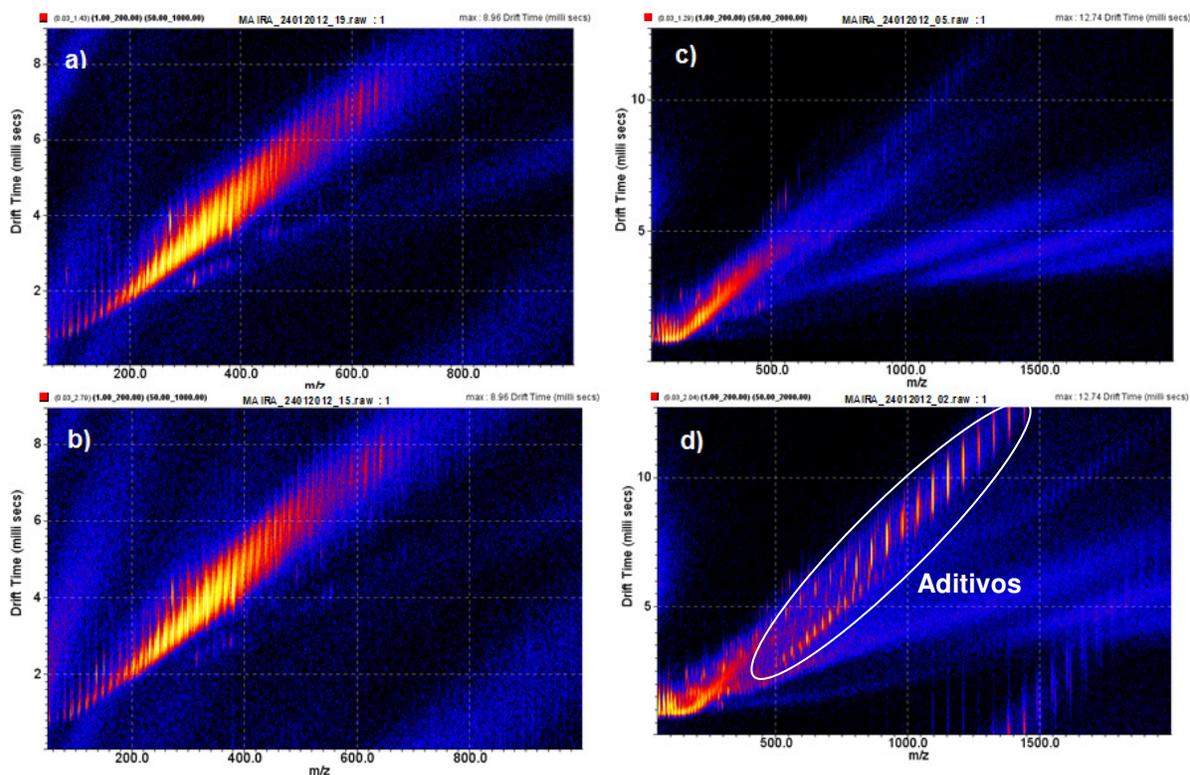


Figura 10. Espectro bidimensional de *drift time* versus m/z obtidos com ESI(+) para a) amostra de diesel comum, b) amostra de diesel aditivado, c) amostra de gasolina comum (bandeira I) e d) amostra de gasolina aditivada (bandeira I). (condições de a) e b): CO₂, 0,70 mbar, 550 m/s, 25 V e condições de c) e d): CO₂, 0,70 mbar, 430 m/s, 25 V).

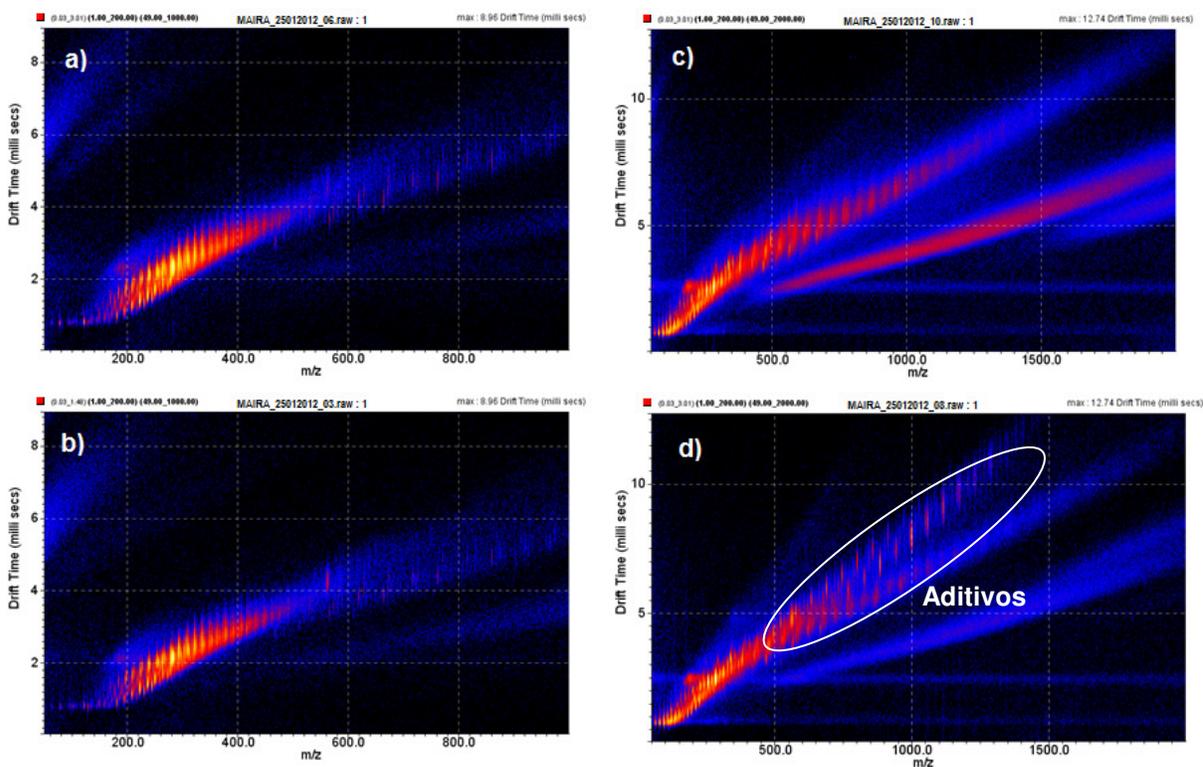


Figura 11. Espectro bidimensional de drift time versus m/z obtidos com ESI(-) para **a)** amostra de diesel comum, **b)** amostra de diesel aditivado, **c)** amostra de gasolina comum (bandeira I) e **d)** amostra de gasolina aditivada (bandeira I). (condições: CO₂, 0,70 mbar, 600 m/s, 30 V).

A partir da interpretação dos resultados obtidos, foi possível realizar algumas afirmações sobre a composição dos combustíveis analisados. A primeira delas é que a detecção dos aditivos da gasolina pode ser realizada tanto em modo positivo quanto em modo negativo, como pode ser observada nas **Figura 10d** e **Figura 11d**. Por outro lado, a aditivação do diesel não foi detectada nas amostras estudadas visto que tanto o diesel comum, quanto o diesel aditivado, apresentaram o mesmo espectro de massas, com exatamente a mesma distribuição de íons. Este fato pode ser devido a ausência efetiva de aditivos, o que poderia configurar uma adulteração do diesel que está sendo vendido como aditivado, ou talvez devido o aditivo empregado em diesel não estar sendo ionizado pela fonte ESI, tendo, portanto, uma

natureza diferente dos aditivos empregados em gasolinas. Outro aspecto interessante é que as amostras de diesel também apresentaram a separação de classes N e O2 (**Figura 11a e 11b**) encontrada nos petróleos que apresentam estas classes, porém em uma faixa mais estreita de m/z , já que o diesel é um “corte” da destilação do petróleo bruto.

Com o objetivo de esclarecer a composição dos aditivos do diesel, as mesmas amostras foram analisadas pela técnica de GC-MS, visto que esta técnica privilegia a detecção de componentes mais apolares e mais voláteis do que a técnica de ESI-MS. A escolha desta técnica complementar, deu-se devido ao fato de que se os aditivos do diesel não puderam ser detectados por ESI, talvez eles apresentassem características mais apolares ou com ausência de grupo polar ionizável, e portanto não seriam passíveis de serem analisados por ESI. Entretanto, através da análise por GC-MS também não foi possível observar diferenças nas composições do diesel comum e do diesel aditivado, visto que ao menos, qualitativamente, os mesmos compostos com intensidades relativamente próximas foram encontrados. Os cromatogramas obtidos por GC-MS para as amostras de diesel comum e aditivado são apresentados na **Figura 12**.

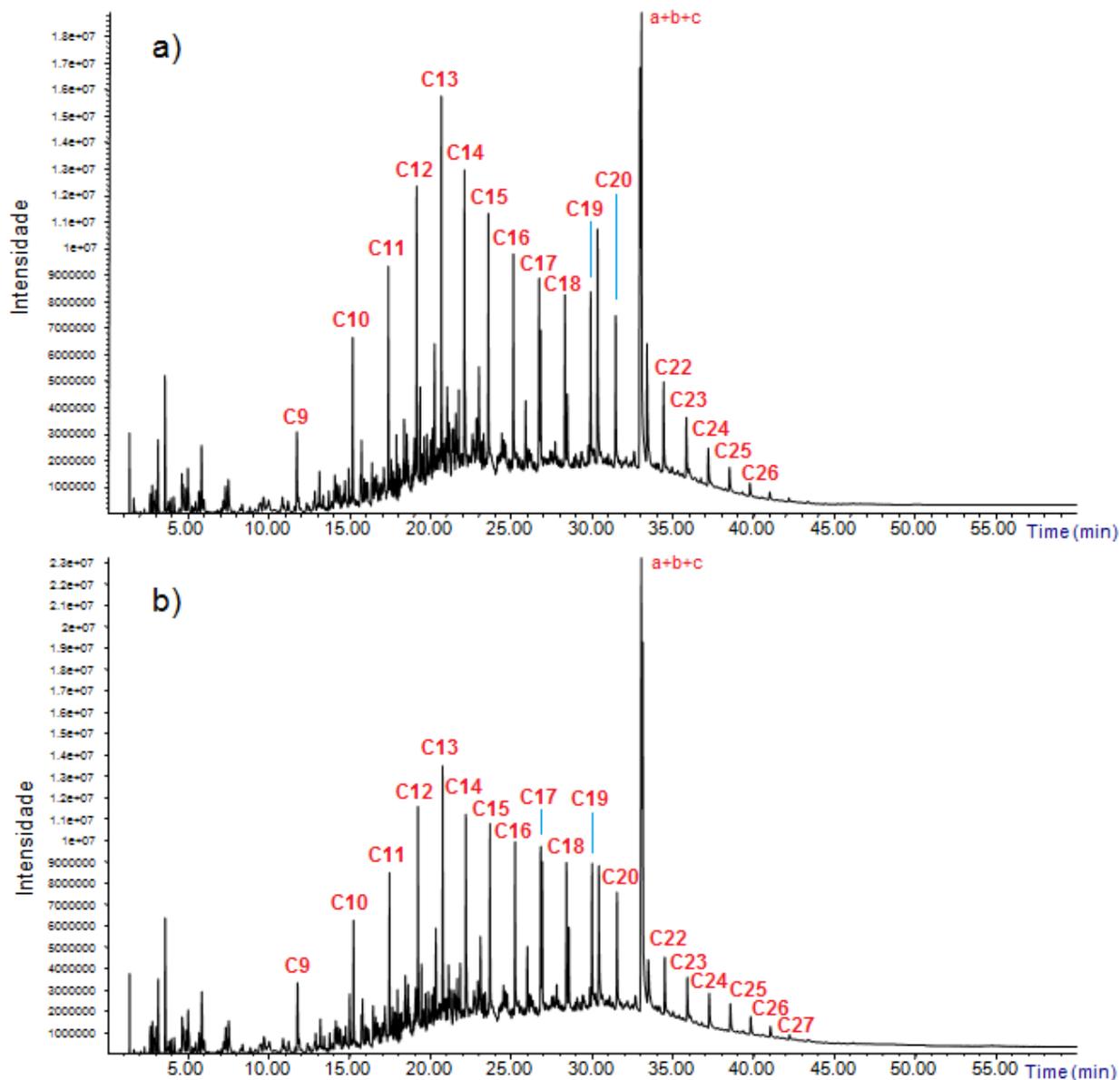


Figura 12. a) Cromatogramas obtidos através da análise por CG-MS para as amostras do diesel comum e b) aditivado. (No cromatograma, a = 9,15-octadecadienoato de metila, b = C21, c = 8-octadecenoato de metila)

A análise por GC-MS identificou principalmente os hidrocarbonetos lineares (identificados nos cromatogramas como C9 à C27) presentes nas amostras, como

era esperado e já amplamente descrito na literatura²¹. Porém, não foi detectado nenhum componente que diferenciasse ambas as amostras. A partir deste fato, pode-se esperar que, ou a técnica de GC-MS também não é capaz de detectar os aditivos do diesel, ou que a amostra do diesel aditivado pode não estar dentro das conformidades. Este aspecto é interessante, pois ao se comparar os resultados obtidos pela técnica de TWIM-MS e uma técnica mais clássica e amplamente utilizada como GC-MS, foram obtidos resultados semelhantes. Isto aponta que a técnica de TWIM-MS pode ser empregada para a avaliação da composição dos combustíveis, principalmente em análises do tipo “*screening*”, tendo como principal vantagem a velocidade de análise, tendo em vista que uma análise cromatográfica demora cerca de uma hora e a análise por TWIM-MS pode ser realizada em frações de minuto.

Outro aspecto que pode ser observado a partir dos resultados para as gasolinas comum e aditivadas é que diferentes bandeiras, ou seja, diferentes empresas, empregam diferentes aditivos em suas gasolinas aditivadas, fato que poderia já ser esperado. Os espectros extraídos somente para a região de *drift times* dos aditivos são apresentados nas **Figura 13a e 13b**, onde é possível observar claramente a diferença dos espectros de massa dos aditivos para ambas as marcas, como um reflexo de suas distintas composições.

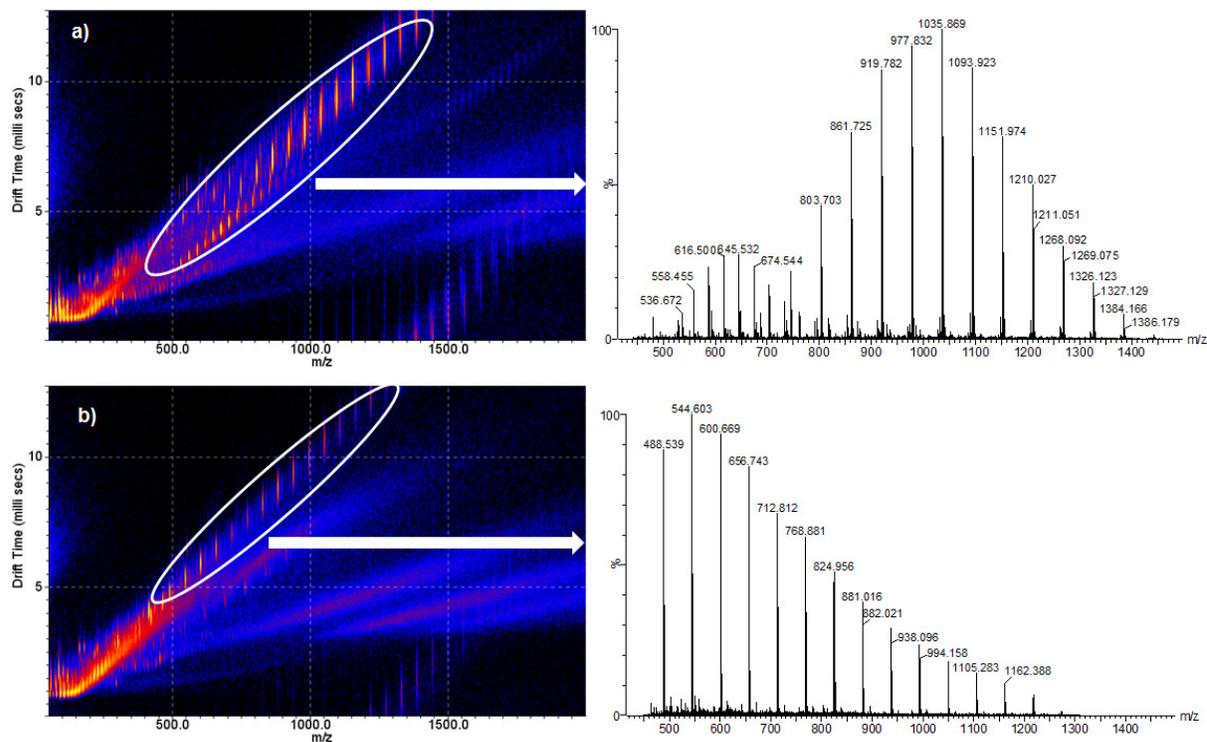


Figura 13. Espectro bidimensional de *drift time* versus m/z , obtidos em ESI(+), para a gasolina aditivada, destacando-se o espectro da região dos aditivos, circulado em branco **a)** para a bandeira I e **b)** para a bandeira II.

Ainda através da análise das gasolinas aditivadas, observou-se também que a presença dos aditivos suprime o sinal dos íons da gasolina, fato que torna o uso da mobilidade iônica importante para a visualização destes sinais, visto que apenas a região do espectro bidimensional de *drift time* x m/z referentes aos íons da gasolina pode ser extraído do conjunto total de íons. A **Figura 14a** mostra um espectro em modo positivo para uma gasolina comum, e a **Figura 14b** mostra a gasolina aditivada da mesma bandeira analisadas nas mesmas condições. Na **Figura 14b** é possível observar que os íons que aparecem no espectro da **Figura 14a** não estão sendo observados diretamente devido a maior eficiência de ionização dos aditivos frente aos compostos polares presentes na gasolina. Já a **Figura 15** mostra a mesmas amostras de gasolina comum e aditivada analisadas por TWIM-MS. Na

Figura 15b, é possível observar que a tendência dos íons da gasolina continua sendo identificada no espectro bidimensional de *drift time* x *m/z*, o que aponta a técnica de TWIM-MS como uma alternativa interessante para a caracterização de gasolinas e seus aditivos.

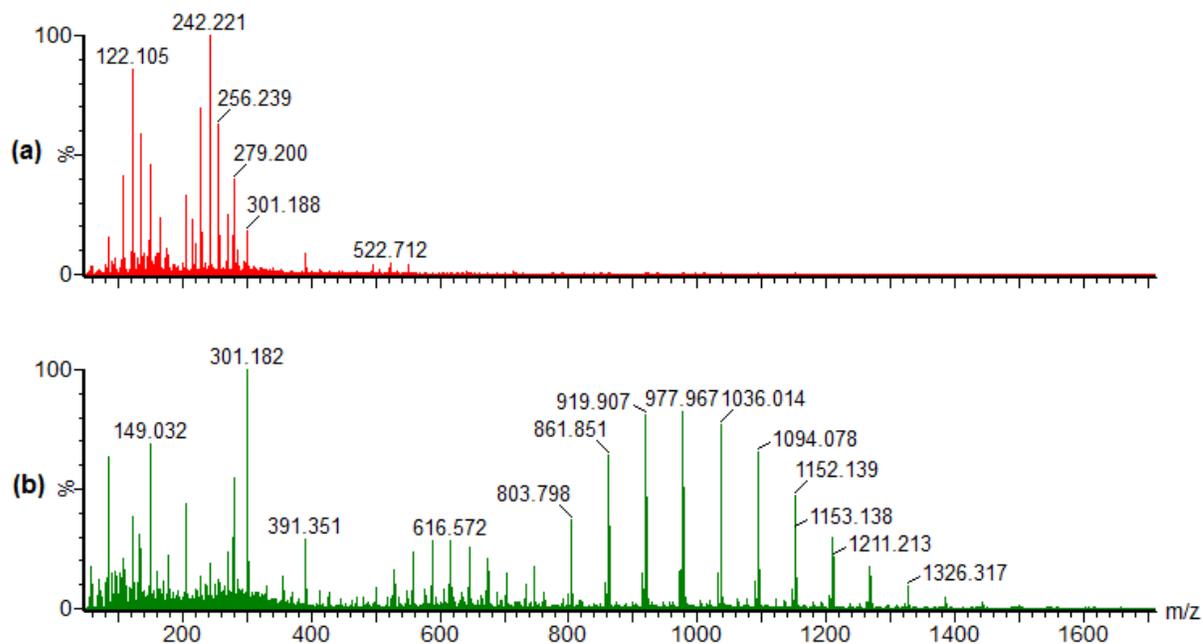


Figura 14. a) ESI(+) de gasolina comum e b) gasolina aditivada da mesma bandeira.

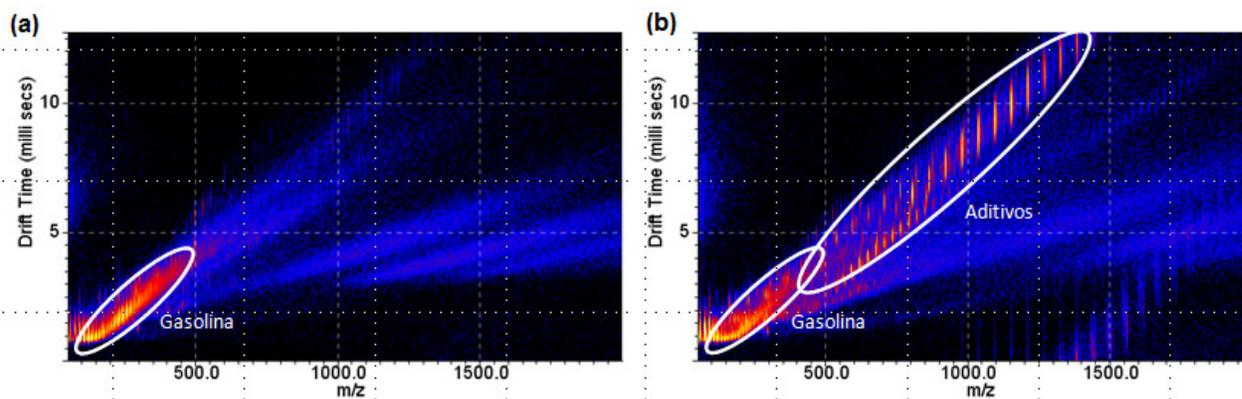


Figura 15. a) Espectro bidimensional de *drift time* x *m/z* de gasolina comum e b) Espectro bidimensional de *drift time* x *m/z* de gasolina aditivada.

2.5. Conclusões e perspectivas futuras

Até o momento, já puderam ser identificadas as classes N, O₂ e NO, com excelente resolução com a técnica de TWIM-MS. Entretanto, acredita-se que algumas outras ainda podem ser elucidadas. O CO₂ mostrou ser o melhor gás de mobilidade a ser utilizado para a resolução desta classe.

Juntamente com a classe de compostos nitrogenados, a classe de compostos sulfurados é de grande importância, devido a sua toxicidade ao meio ambiente, já que a queima de combustíveis contendo enxofre libera compostos do tipo SO_x, que sabidamente causam vários problemas ambientais. Entretanto, relativamente a outros constituintes, a eficiência de ionização de compostos contendo enxofre é muito baixa, normalmente não podendo ser detectados. Para melhorar a ionização e poder detectá-los em amostras de petróleo e derivados, uma reação de metilação pode ser realizada. Desta forma, este será um experimento a ser realizado dentro deste projeto, que se destaca devido ao interesse ambiental e econômico, em que uma nova tendência pode ser observada: a dos compostos sulfurados.

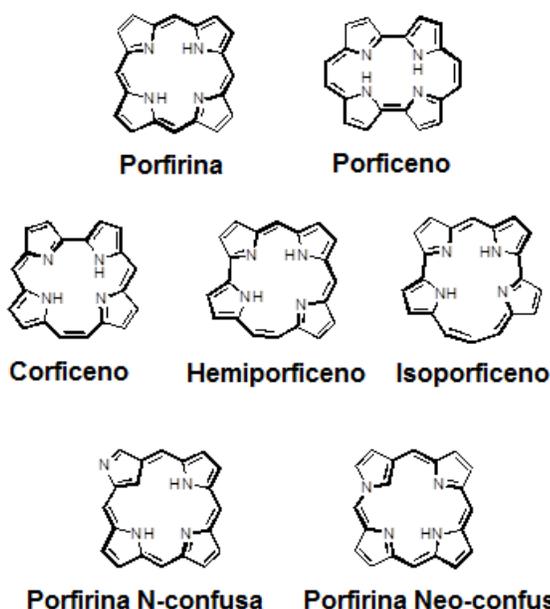
A técnica de TWIM-MS também se mostrou adequada para a caracterização de gasolina e seus aditivos, entretanto mais amostras de diesel aditivado devem ser investigadas, utilizando inclusive outras técnicas, para se descobrir porque os aditivos não puderam ser detectados através da técnica de ESI-TWIM-MS.

CAPÍTULO 3. Isômeros do Corrol: Estudo das estruturas tridimensionais em fase gasosa por Traveling Wave Ion Mobility Mass Spectrometry e Espectrometria de massas sequencial.

3. Introdução

3.1. A química dos corróis

A caracterização e a identificação de compostos isoméricos é um objeto de estudo de extrema importância, principalmente dentro da sub-área da química orgânica. No caso dos análogos da porfirina, alguns isômeros são normalmente formados através da mudança do número de carbonos presentes entre os anéis pirrólicos, como é o caso do porfíceno²², corfíceno^{23,24}, hemiporfíceno²⁵ e do isoporfíceno²⁶ (**Esquema 1**). Outros exemplos de isômeros de porfirinas são obtidos através da mudança na forma em que os átomos de nitrogênio estão ligados na estrutura, gerando espécies chamadas “N-confusas” e “neo-confusas”^{27,28,29}.



Esquema 1. Estruturas de porfirinas e porfirinóides isômeros.

Corróis confusos e não-confusos (**Esquema 2**) pertencem a uma nova classe de porfirinas contraídas que recebeu nos últimos anos bastante atenção especialmente devido à sua química de coordenação de metais e às suas propriedades espectroquímicas, no qual seu comportamento mostrou-se ser completamente diferente do análogo de porfirina.³⁰ A química dos corróis já é bem desenvolvida e o crescente número de novos compostos dessa classe sendo sintetizados está abrindo um grande potencial para novas aplicações, em analogia aos derivados da porfirina³¹.

3.1.2. A espectrometria de massas na caracterização de isômeros

A técnica de ionização por eletrospray (ESI-MS) se tornou uma técnica bastante poderosa para análise de substâncias termicamente instáveis, polares ou espécies organometálicas iônicas, e também de vários tipos de porfirinas e seus

derivados³². Apenas um estágio de MS é incapaz de distinguir isômeros, já que eles possuem a mesma composição elementar e conseqüentemente a mesma m/z , porém estratégias como MS/MS podem ser capazes de distinguí-los a partir da geração de íons diferentes a partir de suas fragmentações. Outra forma de se analisar isômeros seria a utilização da técnica de IMS, onde a separação dos íons de isômeros ocorre através de suas seções de choque.

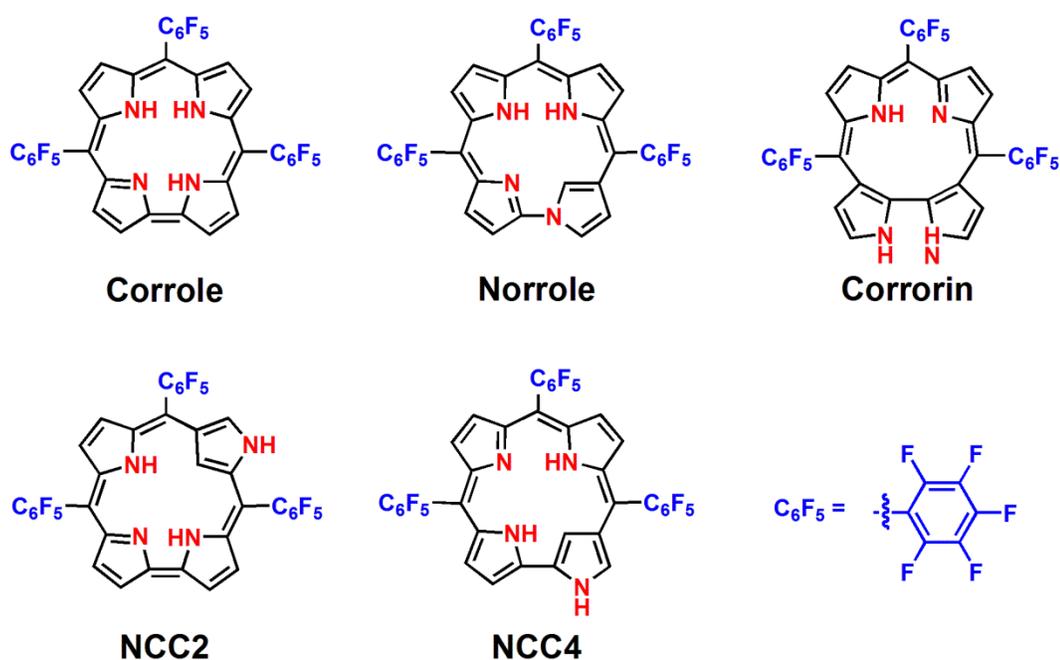
3.2. Objetivos

Novos isômeros do corrol N-confusos contendo o grupo pentafluorofenil nas posições *meso* (NCC2, NCC4, norrol e corrorin³³, **Esquema 2**) foram sintetizados por Furuta *et al*³⁴. O objetivo deste trabalho foi realizar a investigação do comportamento destes isômeros em fase gasosa por TWIM-MS. Estas moléculas são relativamente pequenas ($m/z \sim 800$) e estruturalmente bastante similares, sendo portanto, desafiador distinguí-los. Além disso, a análise por TWIM-MS desses isômeros do corrol poderá esclarecer seu comportamento em fase gasosa, além de suas interações com gases constituídos de moléculas pequenas, tais como CO₂ e N₂. Esta informação pode ser relevante no entendimento da química dos corróis confusos.³⁵

3.3. Parte experimental

O corrol e seus análogos N-confusos foram sintetizados e caracterizados espectroquimicamente pelo grupo de pesquisa de Furuta *et al.*³². As amostras foram dissolvidas em metanol (grau HPLC, Honeywell Burdick & Jackson, MI, USA) com 0,1% (v/v) de ácido fórmico e diretamente injetadas na fonte ESI

através de uma bomba de seringa. As análises por TWIM-MS foram analisadas em um espectrômetro de massas Synapt HDMS (*high definition mass spectrometer*, Waters, Manchester, Reino Unido). Este instrumento já foi descrito no Capítulo 1 deste trabalho. As análises foram realizadas com aquisição de íons positivos sendo as condições da fonte ESI otimizadas para os seguintes valores: capilar, 3 kV; cone de amostragem, 30 V; cone de extração, 3,0 V; temperatura da fonte, 100 °C; temperatura de dessolvatação, 100 °C e vazão do gás de dessolvatação (N₂) de 400 L h⁻¹.



Esquema 2. Esquema representando as estruturas dos isômeros *meso*-pentafluorofenil N-confusos do corrol.

Para os experimentos de TWIM-MS foram utilizados N₂ e CO₂ como gases de mobilidade a 2,00 mbar e 1,00 mbar, respectivamente. As condições de onda otimizadas foram 250 e 280 m.s⁻¹ para N₂ e CO₂ respectivamente, e a altura de onda foi mantida em 30 V. Os experimentos de MS/MS de varredura de íons-produtos

foram realizados no transfer do equipamento (depois da cela de mobilidade) utilizando-se Ar como gás de colisão a uma pressão de $1,0 \times 10^{-2}$ mbar e uma energia de colisão de 40,0 eV.

As estruturas do corrol, corrorin, NCC2, NCC4 e norrol foram modeladas (otimizadas) tanto para suas formas neutra, quanto para suas formas protonadas em cada sítio de pronação provável, sendo as respectivas energias e momentos de dipolo calculadas por DFT (*Density Functional Theory*) no nível B3LYP/6-31G(d,p) usando-se o programa Gaussian03³⁶. O programa MOLDEN³⁷ foi utilizado para visualização dos resultados dos cálculos das geometrias otimizadas. A seção de choque teórica dos íons foi estimada utilizando o método da trajetória implementado no programa MOBCAL³⁸ na temperatura de 298 K. O código do MOBCAL foi modificado através da adição de parâmetros para o flúor e compilado depois de introduzir os valores apropriados de massa e polarizabilidade para os gases de mobilidade (He, N₂ e CO₂)³⁹. As coordenadas atômicas e as cargas de Mulliken foram extraídas da otimização realizada no Gaussian03 e inseridas no MOBCAL utilizando um script em PERL.

3.4. Resultados e Discussão

3.4.1. Análise por TWIM-MS

A mobilidade relativa em fase gasosa para os cinco isômeros do corrol (**Esquema 2**) foi avaliada por TWIM-MS. Fundamentalmente, a mobilidade de um íon em um experimento de TWIM está relacionada com o tempo em que um “pacote” de íons demora para atravessar uma cela preenchida com um gás sob a influência de um campo elétrico oscilante. O *drift time* é dependente de vários parâmetros tais como a temperatura, pressão, massa molecular e polarizabilidade do gás de mobilidade como também da carga do íon e de sua seção de choque da interação do íon com moléculas neutras do gás de mobilidade¹².

Figuras de mérito, comumente usadas em cromatografia, também podem ser calculadas em experimentos de mobilidade iônica para avaliar a resolução entre dois picos adjacentes. O primeiro parâmetro é o fator de separação (α), que é a razão entre os *drift times* de dois picos adjacentes (**Equação 1**).

$$\alpha = \frac{dt_b}{dt_a} \quad (1)$$

O poder de resolução (R_p) da técnica é dependente de parâmetros de resolução de um único pico, que é a razão entre o *drift time* (dt) e a largura do pico à meia altura ($w_{1/2}$), de acordo com a **Equação 2**.

$$R_p = \frac{dt}{w_{1/2}} \quad (2)$$

R_p pode ser relacionada com a resolução pico-a-pico (R_{p-p}) através da **Equação 3**, que indica uma correlação linear entre a separação de dois picos adjacentes com o produto de $\alpha-1$ e R_p .⁴⁰

$$R_{p-p} = 0.589 R_p \frac{\alpha-1}{\alpha} \quad (3)$$

Todos esses parâmetros são fortemente afetados pela natureza do gás de mobilidade e sua pressão. Geralmente, o aumento da pressão do gás de mobilidade resulta num aumento da resolução em mobilidade iônica. Apesar de o nitrogênio ser o gás padrão utilizado em equipamentos comerciais de TWIM, gases mais polarizáveis como o CO_2 , em que as polarizabilidades são $1,7403 \times 10^{-24} \text{ cm}^3$ e $2.9110 \times 10^{-24} \text{ cm}^3$, respectivamente, podem aumentar o R_{p-p} . Entretanto, usando CO_2 , uma menor pressão é requerida para evitar perda de sensibilidade. Antes que as misturas entre os isômeros fossem avaliadas, os experimentos de TWIM-MS foram realizados utilizando cada substância separadamente, avaliando a mobilidade dos íons $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 797. Os resultados das mobilidades de cada isômero são apresentados na **Figura 16**.

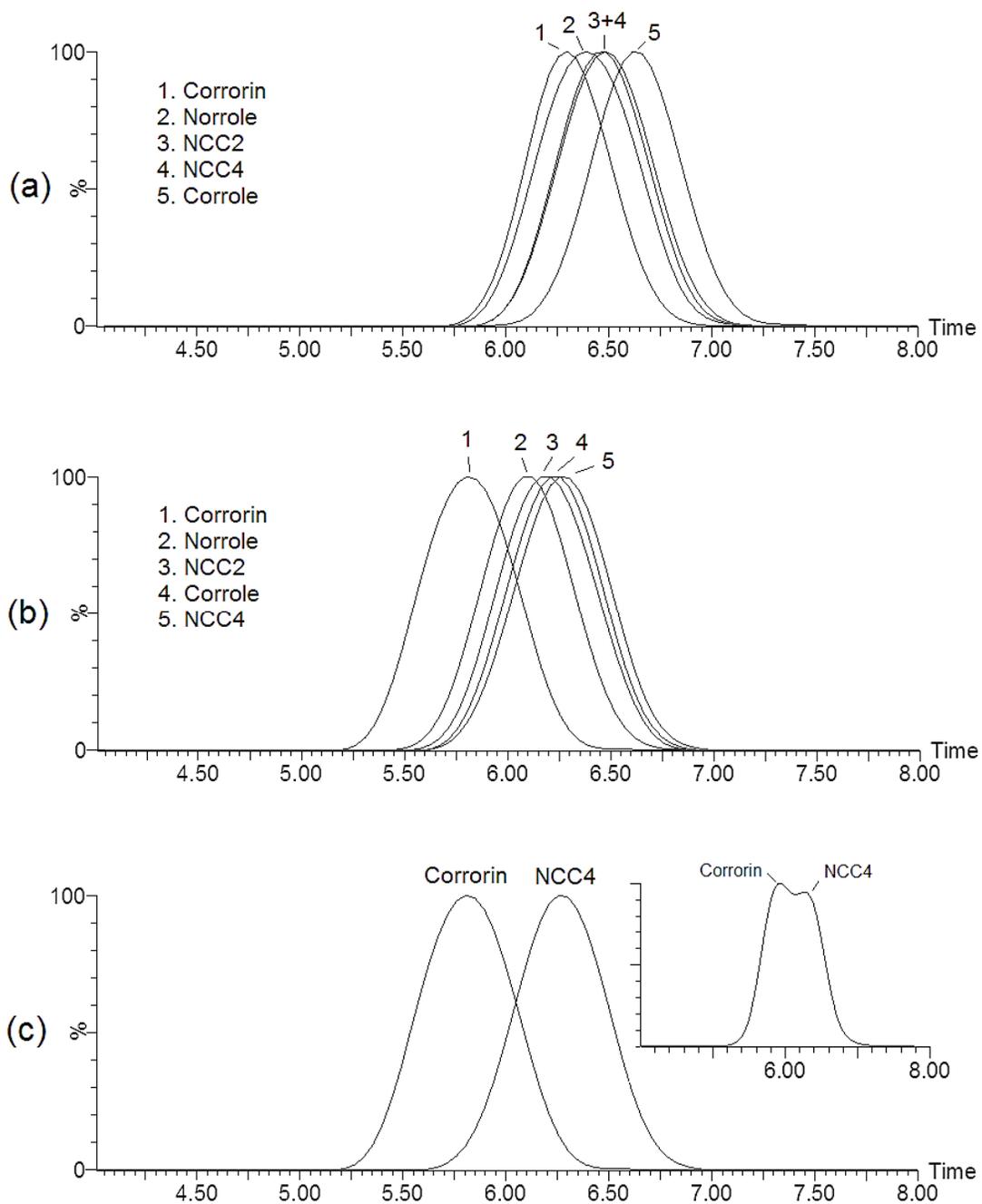


Figura 16. Gráficos de *drift time* sobrepostos obtidos para cada isômero separadamente. **(a)** N_2 , pressão = 2,00 mbar, velocidade de onda = 250 m s^{-1} e altura de onda de 30,0 V; **(b)** pressão de CO_2 = 1,00 mbar, velocidade de onda = 280 m s^{-1} e altura de onda de 30,0 V; **(c)** gráficos de *drift time* “sobrepostos” para o corrorin e NCC4 utilizando as condições de **(b)**; em destaque o gráfico de

mobilidade de uma mistura corrorin e NCC4 analisadas em uma mesma solução na mesma condição experimental de **(b)**.

Os valores de R_p foram calculados a partir dos *drift time plots* apresentados na **Figura 16**, usando-se a **Equação 2**. Este parâmetro deve ser constante para uma dada condição experimental de TWIM, porém variou sutilmente devido a flutuações no *drift time* e na medição da largura do pico à meia altura. Desta forma, médias mais significativas foram listadas na **Tabela 1**. é possível observar que os valores de R_p determinados para todas as cinco moléculas, exceto para o norrol, foram menores em CO_2 do que em N_2 . Este fato pode ser um reflexo da maior pressão de N_2 e uma menor velocidade de onda utilizada, que pode resultar em picos mais estreitos.

O fator de separação α e a resolução pico-a-pico (R_{p-p}) em N_2 e em CO_2 são listadas na **Tabela 2** para cada isômero. Apesar de os maiores valores de poder de resolução (R_p) terem sido obtidos com N_2 , melhores valores de R_{p-p} foram obtidos com CO_2 , mesmo utilizando uma pressão de gás inferior (1,00 mbar). Esse resultado aponta que a polarizabilidade do gás tem uma influência pronunciada na mobilidade dos isômeros do corrol, sugerindo que a distribuição de cargas nesses íons tem um papel fundamental na separação porque provavelmente faz com que as interações íon-dipolo induzido entre o gás e o íon são diferentes para os cinco isômeros estudados. De fato, os pares isoméricos: corrol/corrorin, NCC4/corrorin, norrol/corrorin e NCC2/corrorin apresentaram os maiores valores de R_{p-p} em CO_2 (valores em negrito na **Tabela 2**).

Tabela 1. Poder resolução (R_p) determinado para os gráficos de *drift time* adquiridos a partir de soluções individuais de cada isômero utilizando N_2 e CO_2 como gases de mobilidade e **Equação 2**.

| Isômero | Poder de Resolução (R_p) | |
|-------------------------------|------------------------------|--------|
| | N_2 | CO_2 |
| Corrol | 13.50 | 11.39 |
| Corrorin | 13.76 | 10.10 |
| Norrol | 11.26 | 12.62 |
| NCC2 | 12.73 | 11.90 |
| NCC4 | 12.50 | 11.92 |
| R_p médio | 12.73 | 11.90 |

Os resultados dos experimentos de TWIM obtidos para as soluções puras de cada composto usando N_2 como gás de mobilidade são apresentados na **Figura 16a**. É observado que todos os isômeros apresentaram *drift times* (dt) bastante similares, o que era esperado baseado em suas estruturas, em que as mudanças estruturais não são extremamente drásticas, sendo assim, apenas pequenas variações em suas seções de choque são esperadas. O corrorin foi o isômero de maior mobilidade (dt = 6,30 ms), seguido pelo norrol (6,34 ms), NCC2 e NCC4 com o mesmo drift time (6,48 ms) e finalmente o corrol (6,61 ms). Apesar das pequenas diferenças no *drift time*, é possível observar que existem sim algumas diferenças na mobilidade iônica quando as posições dos átomos de nitrogênio e carbono estão arrançadas de forma distinta do que a forma do esqueleto do corrol.

De modo a simplificar a interpretação dos resultados, pode-se considerar que a seção de choque é o fator principal que se correlaciona com o *drift time* da respectiva espécie isomérica. A partir dos resultados obtidos por TWIM-MS, o

corrorin deve ter a estrutura mais compacta e o corrol a estrutura menos compacta, enquanto que o NCC2, NCC4 e o norrol (isômeros do tipo “NCC”) devem exibir seções de choque intermediárias entre os valores do corrol e do corrorin. Um comportamento e uma tendência similares são esperadas utilizando CO₂ como gás de mobilidade (**Figura 16b**), porém o resultado mostrou que corrorin apresentou uma melhor diferenciação entre todos os isômeros e o NCC4 foi o isômero mais lento, ao invés do corrol. Esta grande diferença nos *drift times* permitiu uma boa diferenciação do NCC4 e do corrorin (**Figura 16c**) quando o CO₂ foi usado como gás de mobilidade, o que não foi obtido usando N₂.

Tabela 2. Fator de separação α e resolução pico-a-pico (R_{p-p}) calculadas para cada par de isômeros usando N₂ e CO₂ como gases de mobilidade.

| Pares de isômeros | N ₂ | | CO ₂ | |
|-------------------|----------------|-----------|-----------------|-------------|
| | α | R_{p-p} | α | R_{p-p} |
| Corrol/Corrorin | 1.05 | 0.35 | 1.07 | 0.46 |
| NCC4/NCC2 | 1.00 | 0.00 | 1.01 | 0.06 |
| NCC2/Norrol | 1.02 | 0.16 | 1.01 | 0.10 |
| NCC4/Norrol | 1.02 | 0.16 | 1.02 | 0.16 |
| Corrol/Norrol | 1.04 | 0.31 | 1.01 | 0.10 |
| NCC4/Corrorin | 1.03 | 0.21 | 1.08 | 0.52 |
| Norrol/Corrorin | 1.01 | 0.05 | 1.06 | 0.37 |
| Corrole/NCC2 | 1.02 | 0.15 | 1.00 | 0.00 |
| Corrol/NCC4 | 1.02 | 0.15 | 1.01 | 0.06 |
| NCC2/Corrorin | 1.03 | 0.21 | 1.07 | 0.46 |

3.4.2. Cálculos teóricos

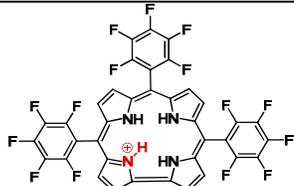
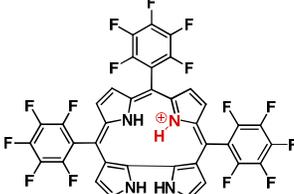
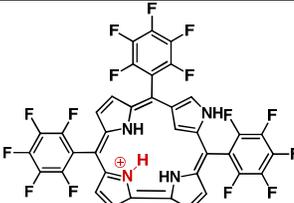
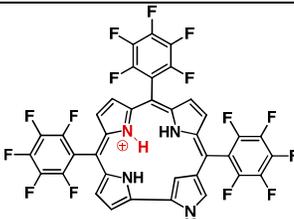
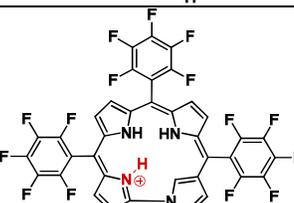
Alguns parâmetros relevantes e intimamente relacionados com a mobilidade iônica em fase gasosa foram estimados através de modelagem molecular e comparados com os valores experimentais de TWIM de modo a obter um melhor entendimento sobre as estruturas dos isômeros estudados. Esse estudo foi focado nas respectivas estruturas protonadas dos isômeros, uma vez que todos os experimentos foram realizados com a detecção de íons positivos. Desta forma, as espécies protonadas mais prováveis para cada isômero foram definidas através da comparação das energias eletrônicas totais das espécies protonadas em cada um dos quatro nitrogênios passíveis de protonação nas estruturas dos isômeros, calculada por DFT no nível B3LYP/6-31G(d,p) (**ANEXO 1**). Assim, é possível correlacionar o sítio doador que possui a mais alta afinidade por prótons com as espécies protonadas que possuem a mais baixa energia eletrônica. De acordo com as energias relativas calculadas, pode-se achar as espécies protonadas mais estáveis de cada um dos isômeros.

Foi demonstrado, de fato, que aqueles compostos nos quais o próton está ligado ao nitrogênio no anel *2H-pirrol* (iminas) tem a mais baixa energia quando comparados com os anéis *1H-pirrol* que originam energia mais alta e assim, espécies iônicas menos estáveis. Além disso, os valores de seção de choque (CCS) das espécies protonadas mais estáveis de cada isômero foram calculados usando o método da projeção (*Projection Method* – PM) e o método trajetória (*Trajectory Method* - TM) implementado no software MOBCAL (**ANEXO 2**), considerando He, N₂ e CO₂ como gases de mobilidade (para o método TM).

De forma simplificada, pode-se considerar que a mobilidade de um íon é exclusivamente dependente de seu CCS somente quando Hélio é usado como gás

de mobilidade, porque não há uma interação íon-dipolo relevante entre o íon e o átomo de He não polarizável. Entretanto, estudos mostraram¹⁶ que quando gases polarizáveis são utilizados, interações significativas íon-dipolo induzidas estão contribuindo para a mobilidade, criando assim potenciais de interações entre o íon e as moléculas neutras dos gases dirigidos pela natureza química do analito. Isto pode ser traduzido pela dispersão de cargas nos íons gasosos que resultará em diferentes magnitudes das interações íon-dipolo e dipolo-dipolo com o gás de mobilidade. Baseados nestas considerações, os momentos dipolo das espécies protonadas mais estáveis foram também calculados (no nível B3LYP/6-31g(d,p)) e comparados com os respectivos *drift times* de cada molécula protonada. Todos os principais parâmetros calculados envolvidos nas separações TWIM estão sumarizados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Energias, seções de choque e momentos de dipolo para os isômeros do Corrol. (^a Para as espécies protonadas, ^b $E_{\text{NORMALIZADA}} = E - E_{\text{corrole}}$)

| Isômero | Sítio mais estável de protonação | E (kcal mol ⁻¹) ^a | $\Delta_{\text{PROTONAÇÃO}}$ | $E_{\text{NORMALIZADA}}$ (kcal mol ⁻¹) ^b | Ω_{He} (Å ²) | Ω_{N_2} (Å ²) | Ω_{CO_2} (Å ²) | Momento de dipolo (D) |
|----------|---|--|------------------------------|---|--|---|--|-----------------------|
| Corrol |  | -1966232.486 | -243.33 | 0.000 | 210.77 | 235.20 | 253.54 | 5.15 |
| Corrorin |  | -1966176.474 | -264.86 | 56.012 | 200.81 | 220.59 | 239.17 | 5.25 |
| NCC2 |  | -1966193.370 | -260.17 | 39.116 | 203.65 | 223.86 | 242.24 | 6.38 |
| NCC4 |  | -1966192.334 | -252.89 | 40.153 | 205.85 | 227.66 | 245.63 | 8.32 |
| Norrol |  | -1966216.190 | -277.24 | 16.297 | 210.04 | 240.09 | 262.69 | 4.95 |

Tanto os dados de mobilidade quanto o resultado dos cálculos teóricos de CCS indicam que corrorin tem a estrutura tridimensional mais compacta na fase gasosa. Valores teóricos de CCS indicam que a segunda espécie mais compacta é o NCC2, seguido do NCC4, corrol e norrol. Em geral, há uma boa correlação entre os *drift times* e os valores previstos CCS (do menor para o maior) para a série de 5 isômeros. Estas tendências para ambos gases de mobilidade, N₂ e CO₂, são como se segue:

| | |
|----------------------------------|---|
| Drift time com N ₂ : | Corrorin < Norrol < NCC2 < NCC4 < Corrol |
| CCS (N ₂) teórico : | Corrorin < NCC2 < NCC4 < Corrol < Norrol |
| Drift time com CO ₂ : | Corrorin < Norrol < NCC2 = Corrol < NCC4 |
| CCS (CO ₂) teórico: | Corrorin < NCC2 < NCC4 < Corrol < Norrol |

Entretanto, os experimentos TWIM mostraram que o norrol é o segundo isômero mais rápido na cela de mobilidade quando se usa N₂ e CO₂ como gases de mobilidade, o que contrasta com resultados de cálculo de CCS, mesmo considerando parâmetros de massa molecular e polarizabilidade de cada gás. Por outro lado, o norrol é o menos polar entre todos os isômeros (traduzido pelo seu menor momento de dipolo), o que significa que ele tem a mais fraca interação íon-dipolo com o gás de mobilidade e viaja mais rapidamente através da cela de mobilidade quando gases polarizáveis são usados. Apesar do momento de dipolo do norrol não ser tão menor (se comparado aos outros compostos), esta diferença pode ser significativa, já que todos os 5 isômeros apresentaram *drift times* muito semelhantes, então uma pequena variação do momento de dipolo pode resultar em um desvio relativamente grande na tendência observada através da análise por TWIM-MS.

Em resumo, os *drift times* experimentais obtidos por TWIM e parâmetros relacionados com o tamanho e forma do íon, assim como a distribuição de cargas eletrônicas em cada isômero, determinadas no nível B3LYP/6-31g(d,p) depois de otimização da geometria, (**Figura 17**) mostraram tendências consistentes. Das geometrias otimizadas, pode-se observar facilmente que o corrol e norrol tem uma estrutura mais “esticada” ou planar, o que resulta em *drift times* maiores e valores teóricos de CCS mais altos, quando comparados com corrorin, NCC2 e NCC4. As torções nas estruturas de NCC2 e NCC4, devido a suas características estruturais “*N-confusas*”, tornam-se também evidentes. A estrutura mais “torcida” foi a do corrorin, o que significa que este isômero tem a conformação mais compacta na fase gasosa, fornecendo o menor *drift time* e o menor valor CCS teórico calculado dentre todos os cinco isômeros do corrol.

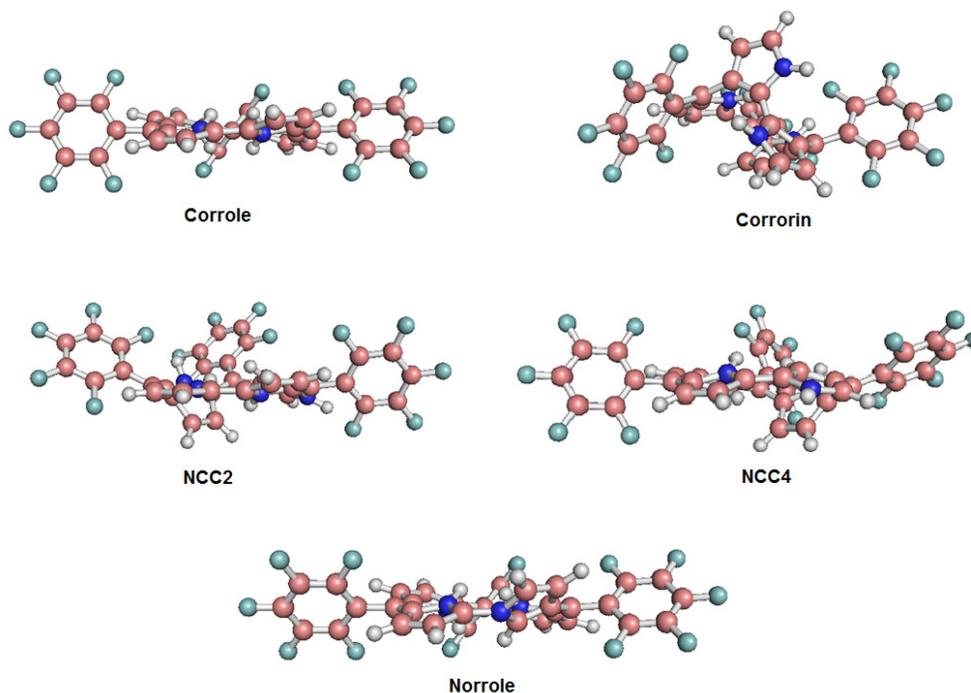


Figura 17. Geometrias representativas, otimizadas no nível B3LYP/6-31g(d,p), de todos os cinco isômeros do corrol. Figuras foram geradas usando o programa PyMOL v1.4.

3.4.3. Análise por MS/MS de varredura de íons produto

Experimentos MS/MS, realizados por dissociação induzida por colisão (*Collision Induced Dissociation- CID*) (**Figura 18**) mostram principalmente extensas perdas neutras de HF para todos os compostos, com diferenças acentuadas na labilidade entre o isômeros⁴¹. Com base na intensidade relativa dos íons que atingem o detector (expresso como intensidade relativa) gerada a partir do íon precursor em m/z 797 após a dissociação induzida por colisão, é possível dizer que corrol é o mais lábil entre todos os isômeros, seguido pelo NCC4, norrol, corrorin e NCC2.

Curiosamente, NCC4 foi o único isômero que exibiu uma extensa perda de NH_3 , gerando um fragmento em m/z 780, bem como as perdas subsequentes. Essa perda de NH_3 pode ser explicada considerando a sua estrutura (**Esquema 2**). Mesmo que a protonação do NCC4 no anel *1H-pirrol* (amina em que o átomo de nitrogênio aponta para fora da cadeia) seja menos favorável, gerando uma espécie com energia mais elevada, pode-se supor que esta espécie é formada, pelo menos, em pequenas quantidades no processo de ESI. Devido ao elevado nível de torção e a estrutura rígida do NCC4, este grupo protonado menos estável torna-se isolado e, assim, incapaz de transferir facilmente o próton para sítios com maior afinidade por prótons. Desta forma, a via mais acessível para liberar a energia obtida no processo CID é através de um rearranjo envolvendo a abertura do anel, a transferência de hidrogênio e, finalmente, eliminação, de uma molécula de NH_3 .

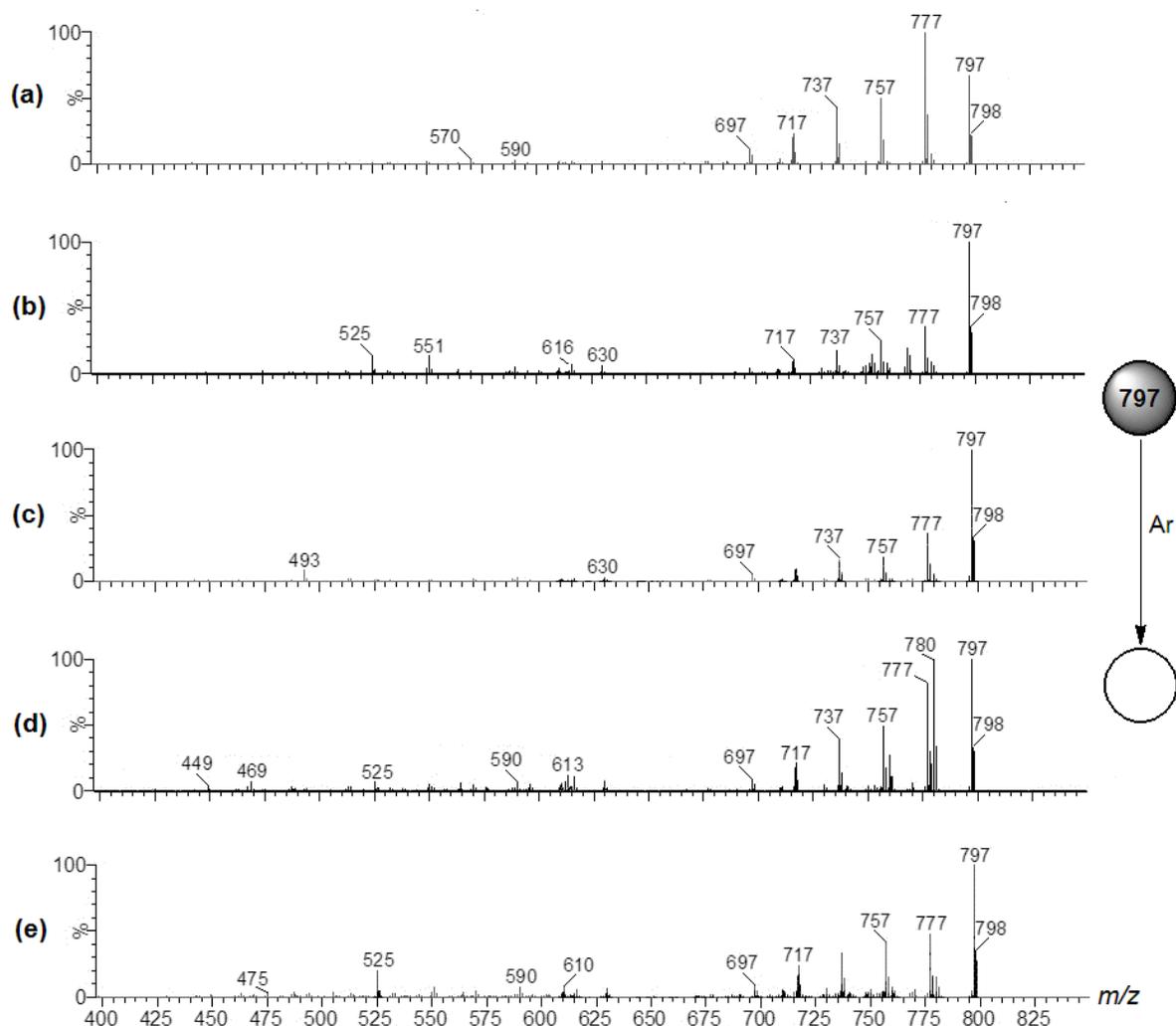


Figura 18. Espectro de MS/MS de varredura de ions produto para **a)** corrol, **b)** corrin, **c)** NCC2, **d)** NCC4 e **e)** norrol, utilizando 40,0 eV de energia de colisão.

Este comportamento não é observado para os outros isômeros provavelmente devido à ausência de sítios básicos nos quais o átomo de nitrogênio aponta para fora, sem impedimento estérico significativo. No NCC2, por exemplo, o átomo de nitrogênio do anel 1H-pirrol está apontando para fora da cadeia, porém está rodeado por dois grupos $-C_6F_5$, o que provavelmente gera um impedimento estérico considerável para o sítio de protonação. Em resumo, estes resultados indicam que os isômeros do corrol podem ser diferenciados com base em suas mobilidade

relativas e através de seus espectros de MS/MS, monitorando fragmentos específicos de íons característicos de cada isômero.

A **Figura 19** mostra a deconvolução dos picos de mobilidade obtida a partir de uma mistura de corrorin e NCC4 (par isomérico com a melhor resolução em CO₂, **Figura 16c**). Ao extrair cromatogramas de mobilidade para os íons de m/z 780 e m/z 525 para NCC4, que são fragmentos formados em quantidades muito mais elevadas para um isômero do que para outro, picos de mobilidade separados podem ser obtidos para cada cada espécie. Usando esta estratégia, podemos agregar outra ferramenta para a diferenciação dos isômeros do corrol, com base nos diferentes picos de mobilidade de íons de fragmentos formados exclusivamente para cada isômero na mistura. Porém, a assimetria dos picos sugere que existe, porém em menor intensidade, a presença destes fragmentos característicos também no outro isômero estudado simultâneamente.

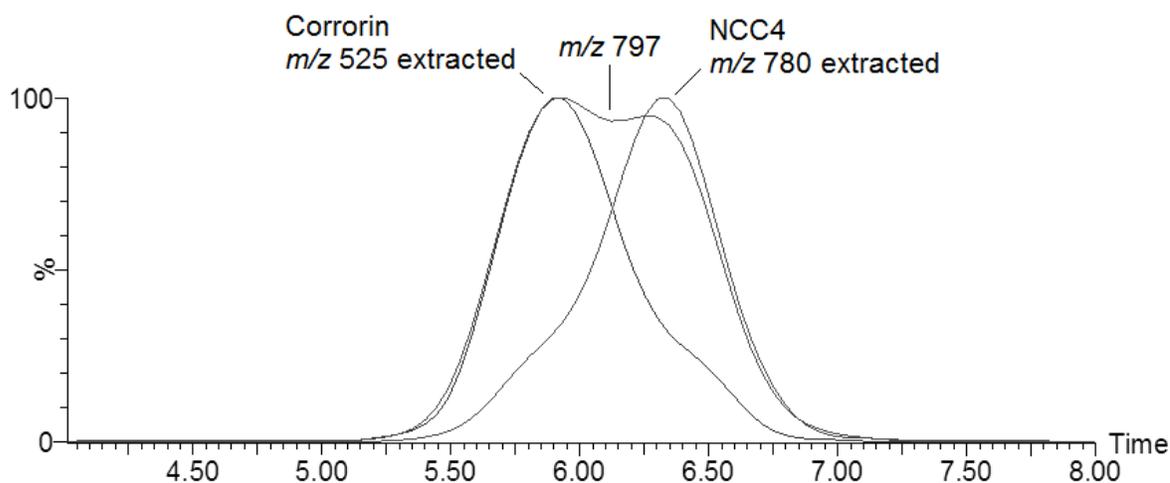


Figura 19. Deconvolução dos picos de mobilidade obtida para uma mistura de corrorin e NCC4, conseguida através da extração de cromatogramas de mobilidade individuais para os íons de fragmentos específicos observados no espectro de íon produto de cada isômero, m/z 525 para corrorin e m/z 780 para NCC4.

3.5. Conclusões

As mudanças estruturais sutis promovidas pela mudança de conectividade dos átomos de nitrogênio e carbono nos anéis do corrol resultam em diferenças consideráveis na mobilidade destes compostos na fase gasosa, como provável consequência das mudanças nas seções de choque e nos momentos de dipolo para cada estrutura. O corrolin tem a estrutura tridimensional mais compacta entre todos os isômeros, enquanto NCC4 e corrol são os isômeros com maiores seções de choque e maiores *drift times*. Mesmo que o norrole tenha os maiores valores previstos de CCS, seu menor momento de dipolo resulta em interações mais fracas com o gás de mobilidade, e um *drift time* menor do que o esperado é obtido.

Uma melhor resolução entre os isômeros de corrol foi alcançada usando CO₂ como gás de mobilidade. Além disso, estes isômeros podem ser diferenciados monitorando íons característicos resultantes de suas fragmentações. Em conclusão, mostrou-se que a diferenciação por TWIM-MS destas estruturas pode ser conseguida através do monitoramento das diferenças entre as suas mobilidades relativas e também pelos espectros distintos de MS/MS obtidos para cada isômero.

CAPÍTULO 4. Separação de Dissacarídeos Isoméricos por TWIM-MS: aumentando o poder de resolução com o Synapt G2 e gases mais polarizáveis.

4.1. Introdução

4.1.1. A espectrometria de massas na caracterização de oligossacarídeos

Oligossacarídeos são uma classe de substâncias que está presente na natureza com uma imensa diversidade estrutural, diferindo principalmente nas estruturas das unidades dos monossacarídeos dos quais são constituídos, na configuração do carbono anomérico, do tipo de ligação presente entre as unidades de monossacarídeos, assim como na configuração espacial dos mesmos. Em outras palavras, as unidades de monossacarídeos podem variar no número de carbonos da cadeia do anel (ex. sacarose e tealose), na configuração dos átomos de carbono (ex. lactose e celobiose) e nas posições das ligações glicosídicas (ex. maltose e isomaltose). Além disso, oligossacarídeos contendo mais de um tipo de unidade de monossacarídeo podem diferir na sequência na qual eles estão ligados (como por exemplo, GlcNAc-GlcN e GlcN-GlcNAc)⁴².

A espectrometria de massas é uma ferramenta poderosa para a análise estrutural e identificação de oligossacarídeos em misturas complexas, sendo que a análise de isômeros é geralmente feita através da análise por MS/MS⁴³ utilizando a Dissociação Induzida por Colisão (*Collision Induced Dissociation* – CID) como

método de fragmentação. Entretanto, muitos isômeros podem apresentar uma química de dissociação semelhante, gerando portanto espectros de MS/MS muito semelhantes e permanecendo, desta forma, não resolvidos. Nestes casos, um tratamento mais elaborado das amostras pode ser requerido, tais como a digestão enzimática, ou seja, a degradação controlada e específica realizada por enzimas seletivas para cada um dos oligossacarídeos avaliados⁴⁴. Desta forma, pode-se avaliar se determinado oligossacarídeo está presente na amostra investigada, já que a enzima geralmente é capaz de reagir somente com um tipo de oligossacarídeo por vez, gerando íons característicos dos produtos de degradação.

O acoplamento da mobilidade iônica com a espectrometria de massas (IM-MS) torna-se uma ferramenta poderosa para separar e caracterizar oligossacarídeos isoméricos⁴⁵, visto que as diferenças estruturais podem resultar em estruturas tridimensionais em fase gasosa distintas, permitindo assim a diferenciação de alguns destes compostos através desta técnica. Sendo assim, alguns trabalhos já utilizaram algumas das modalidades de IM-MS para separar e caracterizar oligômeros em diversos tipos de amostras, tais como FAIMS, DTMS e TWIM⁴⁶, utilizando um artifício geralmente denominado de *Extractive Fragment Ion Mobility Mass Spectrometry* (EF IM-MS), em que a mobilidade de fragmentos específicos para cada oligossacarídeo é avaliada⁴⁷, além de técnicas clássicas de separação como cromatografia e eletroforese⁴⁸, para a determinação de oligossacarídeos em vários tipos de amostras biológicas.

4.1.2. Os avanços da técnica de TWIM-MS

Recentemente, em 2010, a técnica de TWIM-MS sofreu uma grande melhora devido à comercialização da segunda geração do equipamento Synapt

HDMS, equipamento batizado de *Synapt G2*. Basicamente, este equipamento possui um cela de mobilidade 40% maior que o da primeira geração, além de permitir a utilização de maiores pressões de gás de mobilidade dentro da cela e de operar com maiores voltagens de campo elétrico, o que diminui a dispersão de íons dentro da cela, aumenta sensibilidade e o poder de resolução da técnica⁴⁹. Todas estas modificações juntas resultaram em um poder de resolução cerca de 4 vezes maior obtido para o *Synapt G2*, quando comparado à primeira geração deste equipamento. Tudo isto, aliado ao estudo de melhores gases de mobilidade para a separação em TWIM, podem resultar em uma técnica analítica bastante eficiente para a resolução de oligossacarídeos em fase gasosa. Entretanto, como já demonstrado anteriormente, a natureza do gás de mobilidade pode ter um papel fundamental na separação dos analitos estudados e deve ser avaliado para cada caso experimental.

4.2. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo geral a comparação da performance de análise do *Synapt* e do *Synapt G2* (referidos como G1 e G2, afim de simplificar) para a separação de 4 dissacarídeos isoméricos (**Esquema 3**): maltose (α -D-Glcp-1,4-D-Glcp), lactose (β -D-Galp-1,4-D-Glcp), sacarose (β -D-Fruf-2,1- α -D-Glcp) e celobiose (β -D-Glcp-1,4-D-Glcp), além de avaliar a influência do gás de mobilidade na performance da metodologia desenvolvida. Para isso, N₂ e CO₂ foram testados e avaliados como gases de mobilidade. Em adição foi investigada a possibilidade de diferenciação destes 4 isômeros através de seus espectros de MS/MS.

geração, Waters, Manchester, UK). As condições de ionização otimizadas para o Synapt foram: capilar, 2.5 kV, cone de amostragem, 20 V; cone de extração, 3,0 V; temperatura da fonte, 150 °C; temperatura de dessolvatação, 200 °C e vazão do gás de dessolvatação (N₂) de 400 L h⁻¹; e para o Synapt G2 foram: capilar, 0.6 kV, cone de amostragem, 14 V; cone de extração, 5,0 V; temperatura da fonte, 120 °C; temperatura de dessolvatação, 300 °C e vazão do gás de dessolvatação (N₂) de 400 L h⁻¹. Nitrogênio e CO₂ foram utilizados como gases de mobilidade, ambos a pressão de 2.00 mbar. Os espectros de massas foram obtidos através do software MassLynx 4.1. Os experimentos de MS/MS de varredura de íons-produto foram realizados no transfer do equipamento (depois da cela de mobilidade) utilizando-se Ar como gás de colisão a uma pressão de 1,0 x 10⁻² mbar a uma energia de colisão de 100,0 eV.

4.4. Resultados e discussão

A primeira etapa deste trabalho constituiu-se na avaliação das mobilidades relativas dos adutos de sódio de cada dissacarídeo ([M+Na]⁺) no Synapt G1 e no Synapt G2. A **Figura 20** mostra os resultados obtidos para as mobilidades do íon de *m/z* 365, utilizando CO₂ como gás de mobilidade. A primeira observação que pode ser feita é que os picos de mobilidade para todos os dissacarídeos são bem mais finos no Synapt G2 (**Figura 20b**) do que no G1 (**Figura 20a**), o que aumenta a probabilidade de resolução entre dois picos adjacentes.

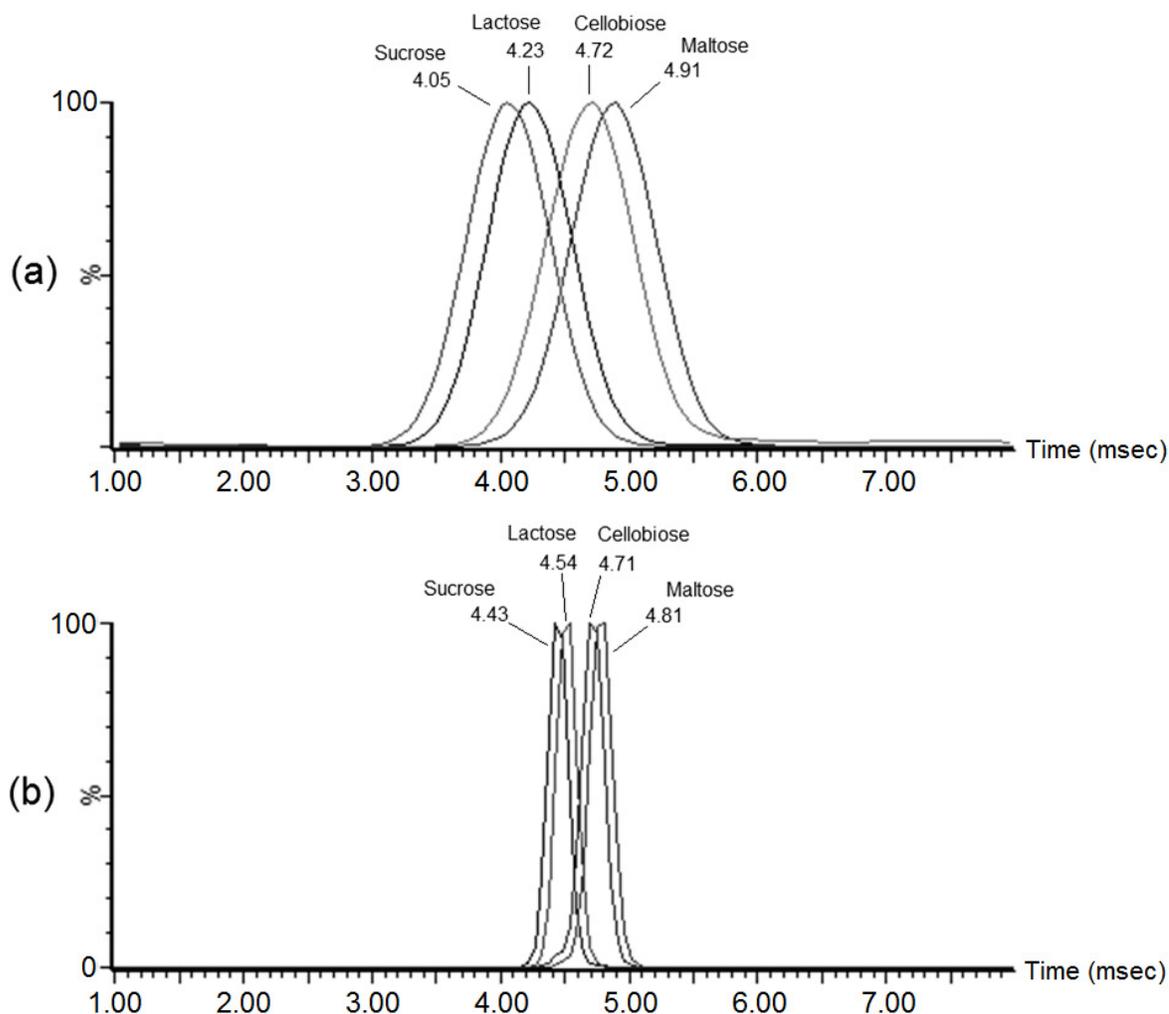


Figura 20. a) Espectros de *drift times* obtidos para a sacarose, lactose, celobiose e maltose no Synapt (CO_2 , 2.00 mbar, velocidade de onda = 100 m s^{-1} , altura de onda = 30V) e **b)** análise realizada no Synapt G2 (CO_2 , 2.00 mbar, velocidade de onda = 550 m s^{-1} , altura de onda = 40V).

Para avaliar em termos numéricos a resolução de cada equipamento, foram calculadas as resoluções dos picos de mobilidade (**Tabela 4**), obtidos através da mobilidade dos ions apresentadas na **Figura 20**. Os resultados mostraram que a resolução dos picos de mobilidade é aproximadamente 4 vezes maior no Synapt G2 do que no Synapt ($R_p=22.4$ and $R_p=5.6$, respectivamente), ou seja, bem próximo do aumento de resolução real na cela de mobilidade que a segunda geração do Synapt

recebeu em relação à primeira geração. É interessante observar também que o ganho em resolução do G1 para o G2 se dá através do afinamento dos picos de mobilidade, ao invés do maior “espaçamento” temporal destes picos, visto que a distância entre os máximos de cada pico é aproximadamente a mesma, o que indica realmente que há uma menor dispersão dos íons dentro da cela se mobilidade, que provavelmente se dá através da utilização de uma maior altura de onda (40 V) alcançada por este equipamento. Desta forma o campo elétrico é mais intenso, “interagindo” mais efetivamente com os íons dentro da cela de mobilidade evitando suas dispersões.

Tabela 4. Poder de resolução do pico de mobilidade (R_p) para cada isômero analisado separadamente com o Synapt e o Synapt G2.

| Poder de Resolução (R_p) | | |
|--|------------|-------------|
| Isômero | G1 | G2 |
| Lactose | 5.4 | 22.3 |
| Maltose | 6.4 | 21.9 |
| Celobiose | 5.8 | 22.5 |
| Sacarose | 5.0 | 23.7 |
| Média | 5.6 | 22.4 |

Também foram calculadas as resoluções pico-a-pico (R_{p-p}) para cada par de isômeros, conforme os resultados apresentados na **Tabela 5**. Uma resolução pico-a-pico quase na linha de base foi alcançada para os seguintes pares isoméricos, no Synapt G2: Celobiose/Sacarose ($R_{p-p} = 0.76$), Maltose/Sacarose ($R_{p-p} = 1.04$) e

Maltose/Lactose ($R_{p-p} = 0.74$). Por outro lado, os pares: maltose/celobiose, celobiose/Lactose e Lactose/Sacarose ainda não puderam ser resolvidos, ou seja, não seria possível distinguí-los caso estivessem presentes simultaneamente em uma mesma amostra. As resoluções obtidas no Synapt G1 não foram suficientes para obter a diferenciação dos isômeros, que pôde ser realizada no Synapt G2. Isto significa um enorme avanço na técnica de TWIM-MS, que pode abrir novas aplicações para esta técnica, visto que análises que antes não podiam ser feitas, agora talvez possam ser realizadas com resolução adequada. Além disso, as separações realizadas por TWIM-MS são extremamente rápidas, o que torna a técnica bastante adequada de ser implementada em laboratórios e indústrias para as análises de rotina.

Tabela 5. Fator de separação α e resolução pico-a-pico (R_{p-p}) calculados para cada par de isômeros usando o Synapt G1 e o G2.

| Par isomérico | G1 | | G2 | |
|--------------------|----------|-----------|----------|-------------|
| | α | R_{p-p} | α | R_{p-p} |
| Celobiose/Sacarose | 1.17 | 0.47 | 1.06 | 0.76 |
| Maltose/Celobiose | 1.04 | 0.13 | 1.02 | 0.30 |
| Celobiose/Lactose | 1.12 | 0.34 | 1.04 | 0.45 |
| Maltose/Sacarose | 1.21 | 0.58 | 1.09 | 1.04 |
| Lactose/Sacarose | 1.04 | 0.14 | 1.02 | 0.32 |
| Maltose/Lactose | 1.16 | 0.46 | 1.06 | 0.74 |

A segunda etapa deste trabalho foi avaliar a influência do gás de mobilidade na separação dos isômeros. Para ilustrar o aumento do R_{p-p} oferecido pela utilização de gases mais polarizáveis e mais “massivos” na separação de dissacarídeos isoméricos, uma solução contendo lactose e maltose foi analisada em ambos os equipamentos (G1 e G2), utilizando N_2 e CO_2 como gases de mobilidade (**Figura 21**). A partir destes resultados, pôde ser observado um efeito drástico, no qual, como esperado, os picos para ambos os dissacarídeos são muito mais finos na análise feita com o G2, porém utilizando N_2 nesta análise (**Figura 21b**), o R_{p-p} fica tão ruim quanto aquele obtido para este par de isômeros com o Synapt G1 (**Figura 21a**), em que os picos estão sobrepostos, sem nenhuma resolução aparente.

Utilizando CO_2 no G1 (**Figura 21c**), o R_{p-p} nitidamente aumenta, mas continua inaceitável para a resolução deste par em uma mesma solução, principalmente se eles estiverem presentes em proporções muito distintas (em que o máximo do pico do isômero menos abundante ficará ocultado devido a presença do isômero mais abundante). Porém, quando o CO_2 é utilizado na cela de mobilidade do G2 (**Figura 21d**), dois picos bem definidos podem ser observados, com uma resolução quase na linha de base do espectro. A partir deste resultado, fica nítido que não basta ter o aumento de resolução do equipamento e que a natureza do gás de mobilidade ainda assim tem um papel fundamental na resolução de espécies cujas seções de choque sejam muito semelhantes.

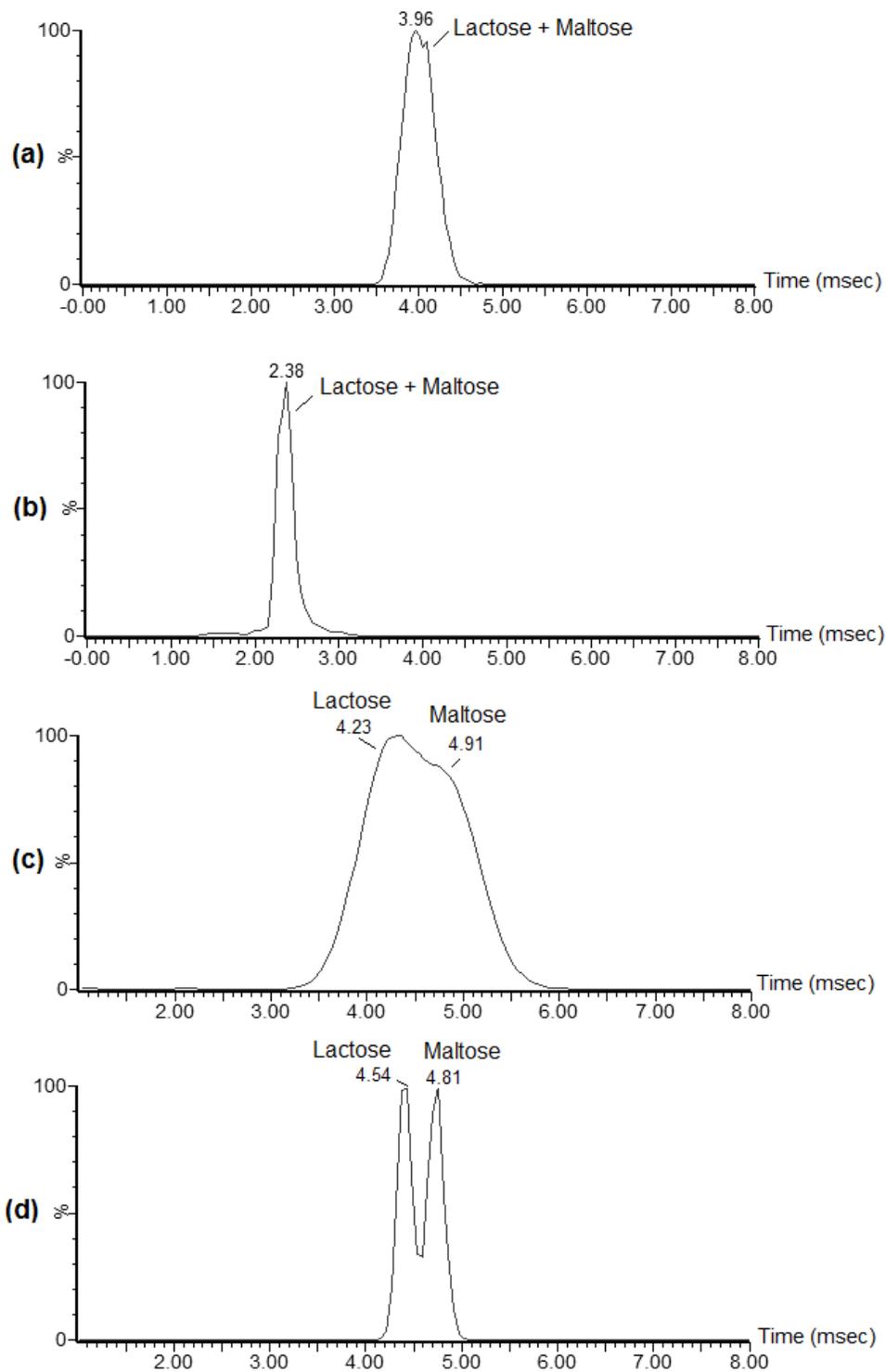


Figura 21. a) Gráficos de *drift time* obtidos para uma mistura de maltose e lactose no Synapt G1 com CO₂, b) no G2 com N₂, c) no synapt G1 com CO₂ e d) nas mesmas condições de b), porém usando CO₂ como gás de mobilidade.

No caso dos dissacarídeos avaliados, o CO₂ mostrou ser o melhor gás de mobilidade quando comparado ao N₂, que é o gás comercial dos equipamento de TWIM-MS. Mais uma vez, fica mostrado que uma etapa fundamental da otimização de um experimento de mobilidade iônica, é a avaliação da influência da natureza do gás de mobilidade na resolução dos picos de mobilidade. Para fins didáticos, porém como já mencionado anteriormente ao longo deste texto, gases polarizáveis como o CO₂ têm a habilidade de aumentar a resolução nos experimentos de mobilidade iônica porque interações mais fortes do tipo íon-dipolo induzida entre os íons da amostra e o gás de mobilidade são introduzidas no fenômeno de separação e são dependentes da “química” dos analitos. Desta forma, com a utilização de gases polarizáveis existe um outro parâmetro a ser considerado, o que significa que mesmo que dois analitos tenham valores de seções de choque muito próximas, se eles apresentarem diferentes magnitudes de interação com o gás de mobilidade, eles podem migrar com diferentes tempos pela cela de mobilidade, sendo, desta forma, espacialmente separados. Este fato foi nitidamente demonstrado experimentalmente neste caso dos dissacarídeos isoméricos.

A terceira e última etapa deste trabalho foi a obtenção dos espectros de MS/MS para os 4 dissacarídeos. Análise foi feita realizando a fragmentação do íon relativo ao aduto de sódio dos dissacarídeos ([M+Na]⁺ de *m/z* 365), através da dissociação induzida por colisão. Os espectros obtidos individualmente para cada dissacarídeo são apresentados na **Figura 22**. Pode-se observar uma grande diferença na labilidade (que avalia a facilidade em que os íons precursores de fragmentam) destes 4 isômeros, além de alguns fragmentos relativamente específicos para cada um deles, como por exemplo, o íon em *m/z* 281 para a lactose e celobiose, *m/z* 350 para sacarose e *m/z* 203 como fragmento principal do espectro da sacarose e da lactose. Como já mencionado no **Capítulo 3** desta dissertação, realizando-se a fragmentação no dispositivo *transfer* do equipamento, ou seja, após

a cela de mobilidade, os íons produto relativos a fragmentação do íon precursor apresentam o mesmo *drift time*, ou seja, diz-se que os fragmentos são alinhados no tempo (em relação ao íon precursor). Novamente, é possível monitorar a mobilidade de íons específicos de cada isômero e aumentar a resolução da técnica através de um processo de deconvolução dos picos de mobilidade. Desta forma, mesmo para os pares não totalmente resolvidos, monitorando a mobilidade de íons específicos, pode-se identificar um isômero mesmo na presença de um outro não resolvido. Por exemplo, para o par celobiose/maltose ($R_{p-p} = 0,30$), o fragmento de m/z 281 pode atuar como marcador da presença de celobiose. Já para o par lactose/celobiose ($R_{p-p} = 0,42$) o fragmento de m/z 185 pode indicar a presença de lactose, assim como o íon de m/z 203 pode ser um marcador da presença de sacarose no par não resolvido sacarose/lactose ($R_{p-p} = 0,32$), através no monitoramento da mobilidade destes íons nesta misturas mencionadas, mostrando a capacidade da técnica para o estudo de misturas dos dissacarídeos avaliados.

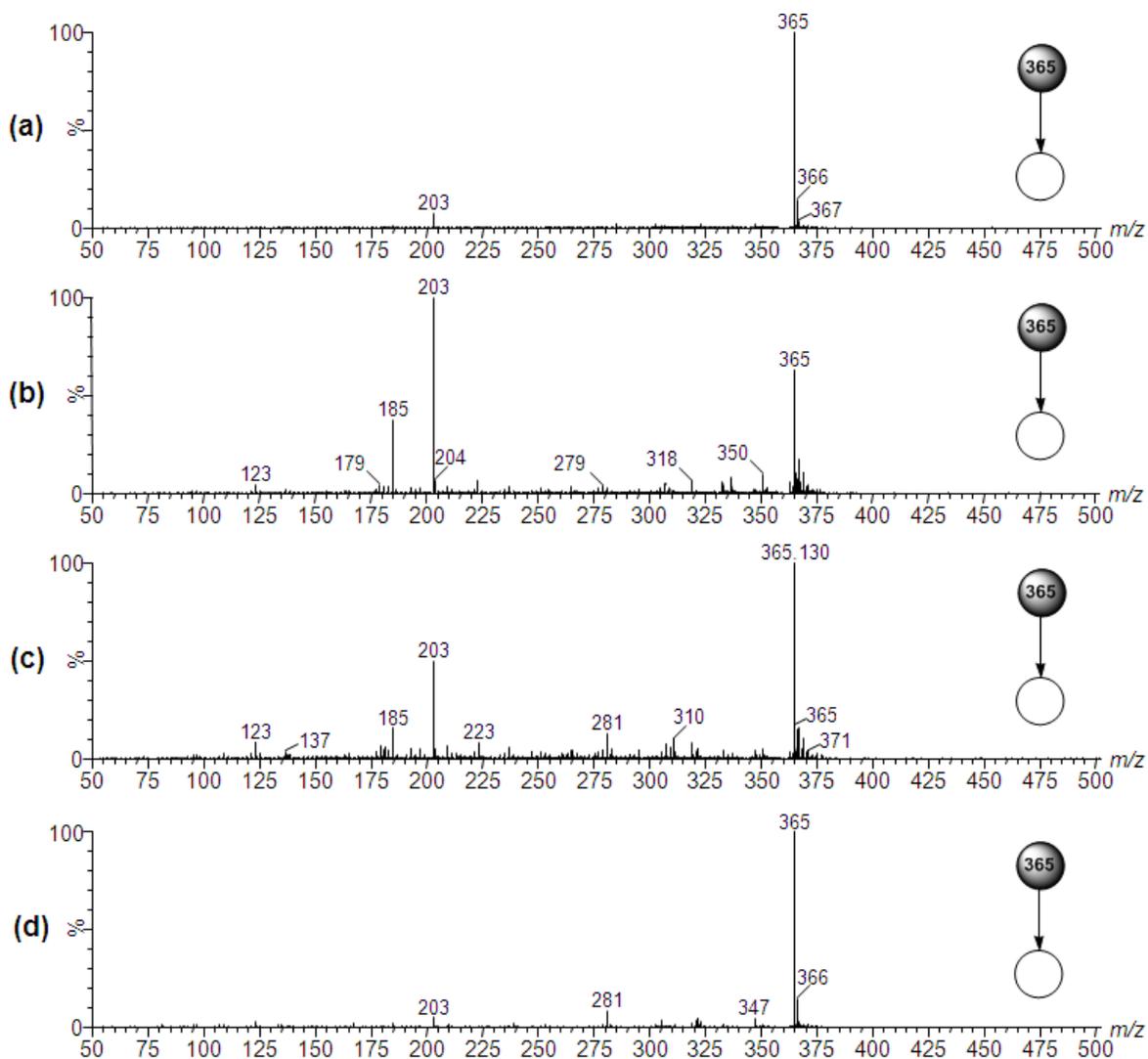


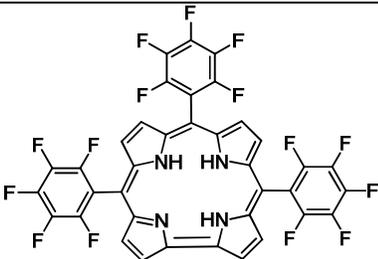
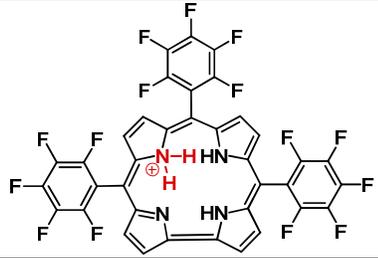
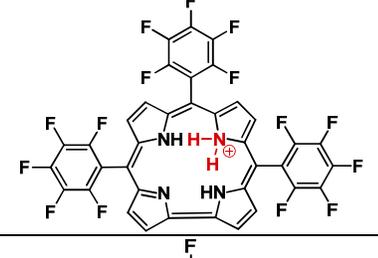
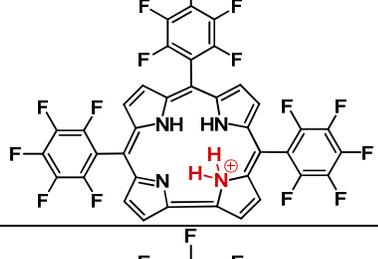
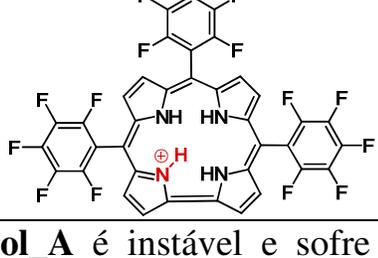
Figura 22. Espectros de MS/MS dos íons $[M+Na]^+$ obtidos para amostras puras de **a)** maltose, **b)** sacarose, **c)** lactose e **d)** cellobiose, utilizando 100 eV de energia de colisão.

4.5. Conclusões

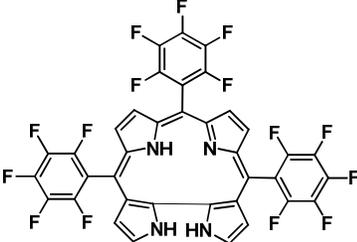
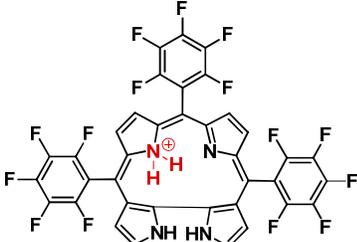
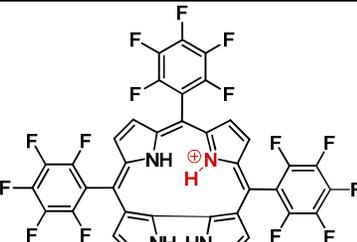
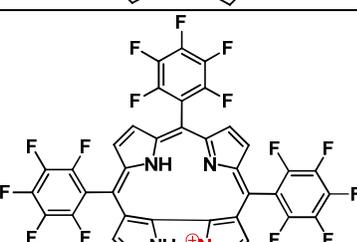
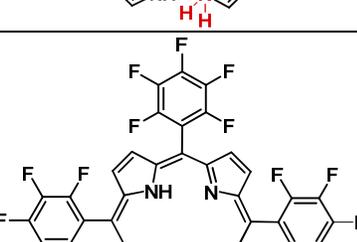
Este trabalho demonstrou a habilidade da técnica de TWIM-MS de separar alguns isômeros de dissacarídeos, comparando os resultados obtidos com as celas de mobilidade do G1 e do G2, avaliando-se também N_2 e CO_2 como gases de

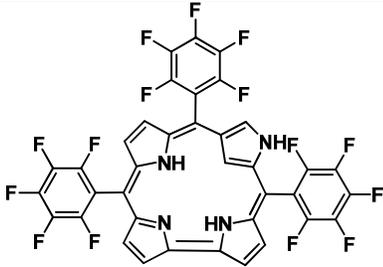
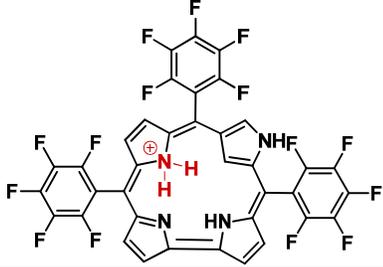
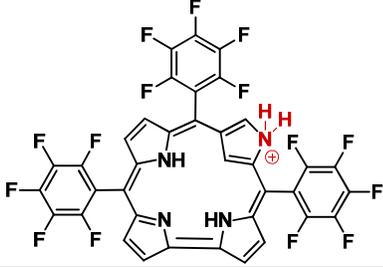
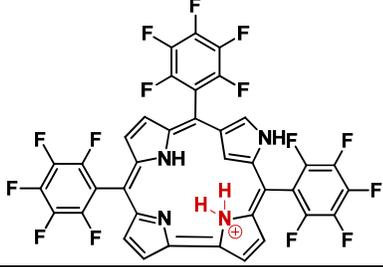
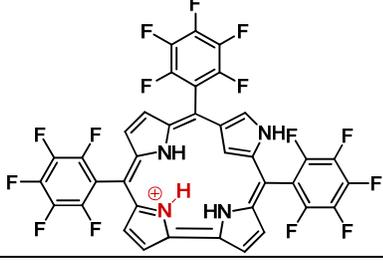
mobilidade. Apesar do grande aumento dos valores de R_p no G2, a resolução dos isômeros não foi obtida utilizando N_2 como gás de mobilidade. O uso de um gás mais polarizável, tal como o CO_2 , foi o artifício responsável por um grande aumento dos valores de R_{p-p} dos dissacarídeos avaliados, e uma resolução praticamente em linha base foi obtida, no G2, para três dos pares avaliados: celobiose e sacarose ($R_{p-p} = 0,76$), maltose e sacarose ($R_{p-p} = 1,04$) e maltose e lactose ($R_{p-p} = 0,74$). A técnica de TWIM-MS usando CO_2 como gás de mobilidade se mostrou, então, uma técnica rápida e eficiente para a separação de dissacarídeos, o que permite inclusive a realização de estudos quantitativos futuros, com um grande potencial analítico, devido à sua rapidez, para a aplicação em vários da análise química, dentre eles o controle de qualidade de alimentos⁴².

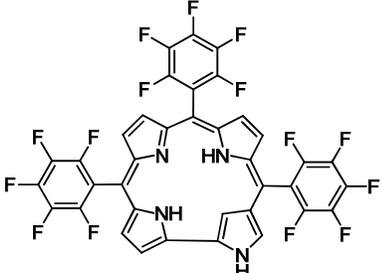
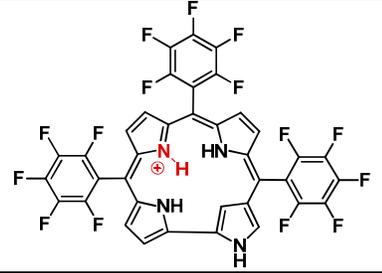
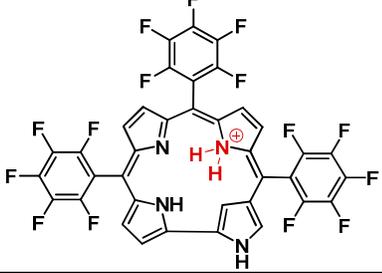
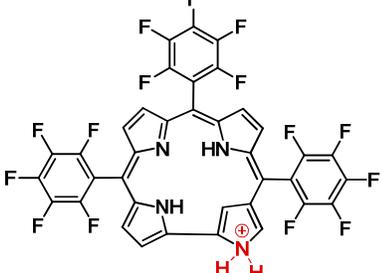
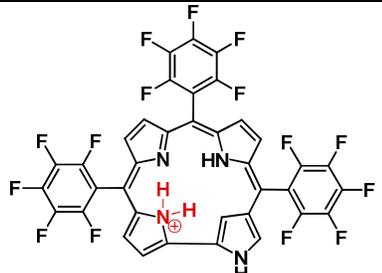
Anexo 1. Otimização da geometria de equilíbrio e sítios de protonação mais estáveis.

| Espécie | Estrutura | E (hartree) | $\Delta_{\text{PROTONAÇÃO}}$ (kcal mol ⁻¹) | E _{NORMALIZADA} (kcal mol ⁻¹) |
|------------------|---|----------------|---|---|
| Corrol neutro |  | -3133.00318 | — | — |
| Corrol_A* |  | — | — | — |
| Corrol_B |  | -3133.33534 | -208.43 | +37.82 |
| Corrol_C |  | -3133.34441 | -214.13 | +32.12 |
| Corrol_D |  | -3133.39561 | -246.25 | 0.00 |

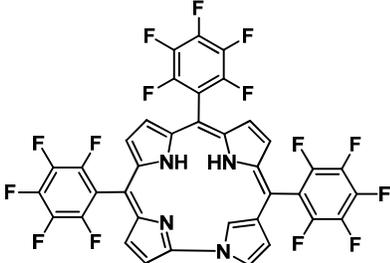
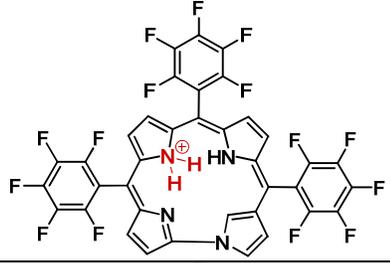
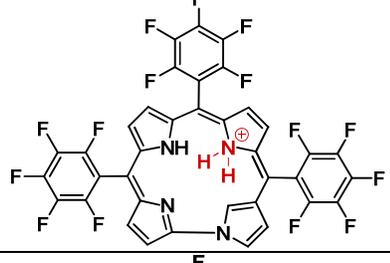
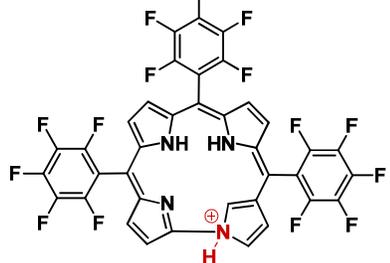
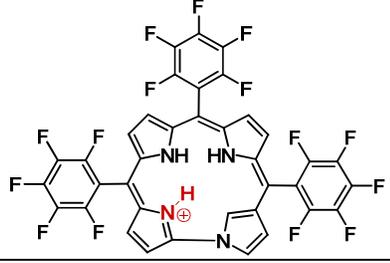
*A espécie **Corrol_A** é instável e sofre isomerização para a espécie **Corrol_D** durante a otimização da geometria.

| Espécie | Estrutura | E (hartree) | $\Delta_{\text{PROTONAÇÃO}}$ (kcal mol ⁻¹) | $E_{\text{NORMALIZADA}}$ (kcal mol ⁻¹) |
|--------------------|---|----------------|---|---|
| Corrorin neutro |  | -3132.87960 | — | — |
| Corrorin_A |  | -3133.24730 | -230.73 | +34.13 |
| Corrorin_B |  | -3133.30168 | -264.86 | 0.00 |
| Corrorin_C |  | -3133.22173 | -214.69 | +50.17 |
| Corrorin_D |  | -3133.21531 | -210.66 | +54.20 |

| Espécie | Estrutura | E (hartree) | $\Delta_{\text{PROTONAÇÃO}}$ (kcal mol ⁻¹) | E _{NORMALIZADA} (kcal mol ⁻¹) |
|----------------|---|----------------|---|---|
| NCC2 neutro |  | -3132.91400 | — | — |
| NCC2_A |  | -3133.28246 | -231.21 | +28.96 |
| NCC2_B |  | -3133.24991 | -210.79 | +49.38 |
| NCC2_C |  | -3133.27417 | -226.01 | +34.16 |
| NCC2_D |  | -3133.32861 | -260.17 | 0.00 |

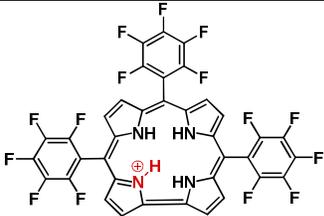
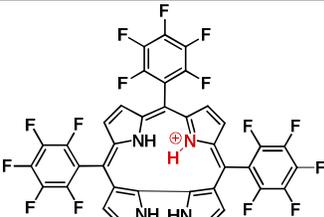
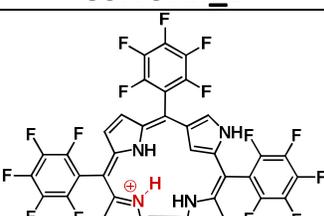
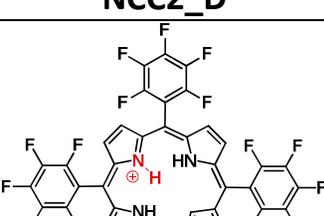
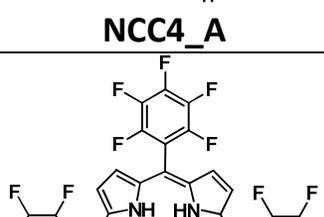
| Espécie | Estrutura | E (hartree) | $\Delta_{\text{PROTONAÇÃO}}$ (kcal mol ⁻¹) | $E_{\text{NORMALIZADA}}$ (kcal mol ⁻¹) |
|----------------|---|----------------|---|---|
| NCC4 neutro |  | -3132.92395 | – | – |
| NCC4_A |  | -3133.32695 | -252.89 | 0.00 |
| NCC4_B |  | -3133.28631 | -227.39 | +25.50 |
| NCC4_C |  | -3133.25609 | -208.42 | +44.47 |
| NCC4_D* |  | – | – | – |

*A espécie **NCC4_D** é instável e sofre isomerização para a espécie **NCC4_A** durante a otimização da geometria.

| Espécie | Estrutura | E (hartree) | $\Delta_{\text{PROTONAÇÃO}}$ (kcal mol ⁻¹) | E _{NORMALIZADA} (kcal mol ⁻¹) |
|------------------|---|----------------|---|---|
| Norrol neutro |  | -3132.92316 | – | – |
| Norrol_A* |  | – | – | – |
| Norrol_B |  | -3133.27978 | -223.78 | +53.46 |
| Norrol_C |  | -3133.25488 | -208.15 | +69.09 |
| Norrol_D |  | -3133.36497 | -277.24 | 0.00 |

*A espécie **Norrol_A** é instável e sofre isomerização para a espécie **Norrol_D** durante a otimização da geometria.

ANEXO 2. Seções de choque (CCS) em Å² estimadas pelo software MOBCAL

| Espécie | CCS (Å ²) | | | | |
|--|-----------------------|---------------------|-------------------|----------------|-----------------|
| | PA ^[1] | EHSS ^[2] | TM ^[3] | | |
| | | | He | N ₂ | CO ₂ |
|  <p>Corrol_D</p> | 195.81 | 217.90 | 210.77 | 235.20 | 253.54 |
|  <p>Corrorin_B</p> | 184.29 | 203.97 | 200.81 | 220.59 | 239.17 |
|  <p>NCC2_D</p> | 191.31 | 211.94 | 203.65 | 223.86 | 242.24 |
|  <p>NCC4_A</p> | 190.85 | 211.16 | 205.85 | 227.66 | 245.63 |
|  <p>Norrol_D</p> | 194.77 | 217.04 | 210.04 | 240.09 | 262.69 |

Referências Bibliográficas

-
- ¹ Tyndall, A. M., Powell, C. F., *Proc. R. Soc. Lond. A*, **1931**, 134, 125-136.
- ² Bradburry, N. E., Nielsen, R. A., *Phys. Rev.*, **1936**, 49, 388–393;
- ³ Revercomb, H. E., Mason, E. A., *Anal. Chem.*, **1975**, 47 (7), 970–983
- ⁴ Verbeck, G. F., Ruotolo, B. T., Sawyer, H. A., Gillig, K. J., Russel, D. H. *Journal of Biomolecular Techniques*, **2002**, 13, 56-61.
- ⁵ Kanu, A. B., Dwivedi, P., Tam, M., Matz, L., Jr Hill, H. H., *J. Mass Spectrom.* **2008**, 43, 1-22.
- ⁶ Verbeck, G. F.; Ruotolo, B. T.; Sawyer, H. A.; Gillig, K. J.; Russell, D. H. *J Biomol Tech.* **2002**, 13, 56-61.
- ⁷ Johnson, P. V.; Beegle, L. W.; Kim, H. I.; Eiceman, G. A.; Kanik, I. *Int. J. Mass Spectrom.* **2007**, 262, 1-15.
- ⁸ Asbury, G., R., Hill Jr., H. H., *Anal. Chem.* **2000**, 72, 580-584.
- ⁹ Thalassinos, K.; Slade, S. E.; Jennings, K. R.; Secrivens, J. H.; Giles, K.; Wildgoose, J.; Hoyes, J.; Bateman, R. H.; Bowers, M. T. *Int. J. Mass Spectrom.* **2004**, 236, 55-63.
- ¹⁰ Shvartsburg, A. A., Smith, R. D., *Anal. Chem.* **2008**, 80, 9689–9699.
- ¹¹ a) K. Giles, S. D. Pringle, K. R. Worthington, D. Little, J. L. Wildgoose, R. H. Bateman. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, 18, 2401. b) S. D. Pringle, K. Giles, J. L. Wildgoose, J. P. Williams, S. E. Slade, K. Thalassinos, R. H. Bateman, M. T. Bowers, J. J. Scrivens. *Int. J. Mass Spectrom.* **2007**, 261, 1.
- ¹² Rodgers, R. P.; Blumer, E. N.; Hendrickson, C. L.; Marsahall, A. G. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2000**, 11, 835-840.
- ¹³ Marshall, A. G.; Rodgers, R. P. *Accounts of Chemical Research.* **2004**, 37, 53-59.
- ¹⁴ Rodgers, R.; McKeena, A., *Anal. Chem.* **2011**, 83, 4665 - 4687.
- ¹⁵ Fernandez-Lima, F. A., Becker, C., McKenna, A. M., Rodgers, R. P., Marshall, A. G., Russell, D. H., *Anal. Chem.* **2009**, 81, 9941–9947.

-
- ¹⁶ Ahmed, A., Cho, Y. J., No, M., Koh, J., Tomczyk, N., Giles, K., Yoo, J. S., Kim, S. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 77–83.
- ¹⁷ Asbury, G. R., Hill, H. H., Jr. *Jr. Anal. Chem.* **2000**, *72*, 580-584.
- ¹⁸ Corilo, Y. E.; Vaz, B. G.; Simas, R. C.; Lopes Nascimento, H. D.; Klitzke, C. F.; Pereira, R. C. L.; Bastos, W. L.; Santos Neto, E. V.; Rodgers, R. P.; Eberlin, M. N. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 3990-399.6
- ¹⁹ Corilo, Y. E.; Vaz, B. G.; Simas, R. C.; Lopes Nascimento, H. D.; Klitzke, C. F.; Pereira, Rosana C. L.; Bastos, W. L.; Santos Neto, E. V.; Eberlin, M. N.,. *58th ASMS on Mass Spectrometry & Allied Topics*, **2010** Salt Lake City –USA.
- ²⁰ Dwivedia, P., Schultzb, A. J., Hill Jr, H. H. *International Journal of Mass Spectrometry*, **2010**, *298*, 78–90.
- ²¹ Blomberg, J., Schoenmakers, P. J., Brinkman, U. A. *Journal of Chromatography A*. **2002**, *972*(2), 137-173.
- ²² Vogel, E.; Köcher, M.; Schmickler, H.; Lex, J. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 257.
- ²³ Sessler, J. L.; Brucker, E. A.; Weghorn, S. J.; Kisters, M.; Schäfer, M.; Lex, J.; Vogel, E. *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.* **1994**, *33*, 2308.
- ²⁴ Aukauloo, M. A.; Guillard, R. *New. J. Chem.* **1994**, *18*, 1205
- ²⁵ Vogel, E.; Bröring, M.; Weghorn, S.; Scholz, P.; Deponte, R.; Lex, J.; Schmickler, H.; Schaffner, K.; Braslavsky, S. E.; Müller, M.; Pörting, S.; Fowler, C. J.; Sessler, J. L. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1651.
- ²⁶ Vogel, E.; Bröring, M.; Erben, C.; Demuth, R.; Lex, J.; Nendel, M.; Houk, K. N. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 353.
- ²⁷ Furuta, H.; Asano, T.; Ogawa, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 767.
- ²⁸ Chmielewski, P. J.; Latos-Grażyński, L.; Rachlewicz, K.; Głowiak, T. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 779.
- ²⁹ Lash, T. D.; Lammer, A. D.; Ferrence, G. M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 9718.

-
- ³⁰ Ding, T.; Alemán, E.A.; Modarelli, D.A.; Ziegler, C.J.; *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 7411.
- ³¹ Gryko, D.T.; *J. Porphyr. Phthalocyan.* **2008**, *12*, 906.
- ³² Swider, P.; Nowak-Król, A.; Voloshchuk, R.; Lewtak, J.P.; Gryko, D.T.; Danikiewicz, W.; *J. Mass Spectrom.* **2010**, *45*, 1443.
- ³³ Furuta, H.; Maeda, H.; Osuka, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6435.
- ³⁴ Fujino, K.; Hirata, Y.; Kawabe, Y.; Morimoto, T.; Srinivasan, A.; Toganoh, M.; Miseki, Y.; Kudo, A.; Furuta, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6855.
- ³⁵ Toganoh, M.; Furuta, H. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 937
- ³⁶ Gaussian 03, Revision C.02, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, J. A. Pople, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2004**.
- ³⁷ a) <http://www.indiana.edu/~nano/software.html>; b) M. F. Mesleh, J. M. Hunter, A. A. Shvartsburg, G. C. Schatz, and M. F. Jarrold. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 16082-16086. c) A. A. Shvartsburg, M. F. Jarrold, *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *261*, 86-91.
- ³⁸ G. Schaftenaar, J. H. Noordik. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2000**, *14*, 123-134.
- ³⁹ Lide, D. R. CRC Handbook of Chemistry and Physics, 88th Edition, 2007-2008.
- ⁴⁰ Tabrizchi, M., Rouholahnejad, F. *Talanta*, **2006**, *69*, 87-90.

-
- ⁴¹ K. S. F. Lau, M. Sadilek, M. Gouterman, G. E. Khalil, C. Brückner. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2006**, *17*, 1306.
- ⁴² C. A Bush, M. Martin-Pastor, A. Imberty. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **1999**, *28*, 269–93.
- ⁴³ **a)** M.R. Asam, G.L. Glish. Tandem mass spectrometry of alkali cationized polysaccharides in a quadrupole ion trap. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1997**, *8*, 987–995; **b)** J. Jiao, H. Zhang, V.N. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2011**, *303*, 109–117. **c)** B. Vijayakrishnan, A. Issaree, Y. E. Corilo, C. R. Ferreira, M. N. Eberlin, Martin G. Peter. *Carbohydrate Polymers* , **2011**, *84(2)*, 713–726.
- ⁴⁴ G. B. Sanvido, J. S. Garcia, Y.E. Corilo, B.G. Vaz, J. J. Zacca, R.G. Cosso, M. N. Eberlin, M.G. Peter. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 9407
- ⁴⁵ **a)** A. A. Shvartsburg, A. J. Creese, R. D., Smith, H. J. Cooper. *Anal. Chem.*, **2011**, *83(18)*, 6918-6923. **b)** T. Yamagaki, A. Sato. *J. Mass spectrom.*, **2009**, *44(10)*, 1509-1517.
- ⁴⁶ **a)** Williams, J. P. *et al.*, *International Journal of Mass Spectrometry*, 2010, 298, 119–127; **b)** Liu, Y. Clemmer, D. L, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2504-2509; **c)** Perdita, L. J., Barran, E., Jon A. Deakin, Malcolm Lyonb and Dus'án Uhrín*a *Phys . Chem. Chem. Phys .*, **2005**, *7*, 3464 – 3471
- ⁴⁷ S. Lee, S. J. Valentine, J. P. Reilly, D. E. Clemmer. *Int. J. Mass spectrom.* **2012**, *309*, 161–167.
- ⁴⁸ **a)** Jianjun Li, Randy W. Purves, and James C. Richards, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4676-4683, **b)** S. Lee et al. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1997**, *167/168*, 605-614.
- ⁴⁹ Giles, K., Williams, J. P., Campuzano, I., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25*, 1559–1566.