



**PRISCILA MICARONI LALLI**

**APLICAÇÕES DE MOBILIDADE IÔNICA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS  
PARA SEPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISÔMEROS**

**CAMPINAS**

**2012**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**PRISCILA MICARONI LALLI**

**APLICAÇÕES DE MOBILIDADE IÔNICA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS  
PARA SEPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISÔMEROS**

**ORIENTADOR: PROF. DR. MARCOS NOGUEIRA EBERLIN**

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO  
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA EM CIÊNCIAS.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA  
POR PRISCILA MICARONI LALLI, 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

L155a Lalli, Priscila Micaroni (1985-).  
Aplicações de mobilidade iônica acoplada a espectrometria de massas para separação e caracterização de isômeros / Priscila Micaroni Lalli. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Marcos Nogueira Eberlin.

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

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

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Ion mobility mass spectrometry applications to isomer separation and characterization

**Palavras-chave em inglês:**

Mass spectrometry  
Ion mobility  
Porphyrins  
Protomers  
Crude oil

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Doutora em Ciências

**Banca examinadora:**

Marcos Nogueira Eberlin [Orientador]  
Luiz Alberto Beraldo de Moraes  
Norberto Peporine Lopes  
Dosil Pereira de Jesus  
Ana Valéria Colnaghi Simionato Cantú

**Data de defesa:** 11/09/2012

**Programa de pós-graduação:** Química



## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Marcos Eberlin pela confiança e incentivo que foram essenciais para o meu crescimento durante todos esses anos; pelo seu entusiasmo contagiante e seu grande exemplo como pesquisador;

Ao Professor Alan Marshall por ter me concedido a oportunidade de realizar um estágio em seu grupo; ao Dr. Ryan Rodgers pela confiança e acolhimento durante o estágio em Tallahassee;

Ao Dr. David Podgorski pela ajuda na aquisição dos dados de FT-ICR MS;

À equipe da Waters em Beverly, MA, em especial, ao Dr. Douglas Stevens e Steven Lai, pela ajuda na aquisição dos dados de TWIM-MS de petróleo;

Ao Professor Koiti Araki e ao Bernardo Iglesias pela síntese das porfirinas e pela valiosa colaboração científica durante esses anos;

À CAPES e à CNPq pelas bolsas concedidas;

Ao INMETRO pela concessão do equipamento Synapt presente no Laboratório ThoMSON;

A todos os colegas do Laboratório ThoMSON pela amizade e disposição em ajudar nos momentos em que precisei, em especial às queridas amigas Heliara, Dena, Vanessa, Thaís, Raquel, Mirela, Maíra, Marla e Elisabeth;

À minha querida amiga Livia Eberlin por ter me introduzido ao Laboratório ThoMSON, pelo incentivo e ajuda durante o meu início no laboratório;

Aos funcionários do IQ-UNICAMP que indiretamente auxiliaram na realização deste trabalho, em especial à Dona Cida por manter o Laboratório ThoMSON sempre em condições de trabalho impecáveis, à Núbia e ao Pimpim;

A todos da família Micaroni e da família Lalli pelo carinho e incentivo, em especial aos queridos tios Liliana, Kiko, Cristina, Marcos e Stefânia, meu irmão Felipe, meu pai Saulo, minha afilhada Laura, vó Rachel e demais tios e primos. À nonna Carolina e ao nonno Giacinto pelo enorme carinho e conforto que sempre me deram;

À minha mãe Silvana e ao meu padrasto Márcio pelo suporte que me sustentou em toda minha caminhada até aqui, pelo amor e incentivo de sempre;

Ao meu marido e melhor amigo Yuri pelo amor e companheirismo em todos os momentos, por tornar meus dias mais felizes, por tudo que me ensinou e me ajudou tanto na minha vida pessoal quanto profissional;

A Deus pelas inúmeras bênçãos que me concedeu em minha vida.

# CURRÍCULO

---

## Formação Acadêmica

---

- 03/2008 - 02/2010** Mestrado em Química Analítica, UNICAMP  
“Mobilidade iônica acoplada a espectrometria de massas: Interferência de parâmetros do *drift gas* na resolução de anilinas substituídas e mobilidade intrínseca de agregados de líquidos iônicos”.  
Orientador: Prof. Dr. Marcos N. Eberlin
- 03/2004 - 12/2008** Licenciatura em Química, UNICAMP
- 03/2004 - 12/2007** Bacharelado em Química, UNICAMP

---

## Outras Experiências Acadêmicas

---

- 08/2011 -01/ 2012** Estágio de Doutorado Sanduíche no Exterior.  
National High Magnetic Field Laboratory, Florida State University, Tallahassee  
“Crude oil characterization by IM-MS and FT-ICR MS”  
Supervisor: Prof. Dr. Alan G. Marshall; Co-supervisor: Dr. Ryan P. Rodgers
- 03/2012 –07/2012** Programa de Estágio Docente (PED -C), IQ-UNICAMP.  
Disciplina: “Química Geral I”  
Professor responsável: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Ferreira
- 03/2009 –07/2009** Programa de Estágio Docente (PED -C), IQ-UNICAMP.  
Disciplina: “Laboratório de Química Orgânica II”  
Professor responsável: Prof. Dr. Francisco Reis e Prof. Dr. Lauro Barata
- 07/2007 -12/ 2007** Programa de Auxílio ao Docente (PAD),IQ- UNICAMP.  
Disciplina: “Laboratório de Química Geral I”  
Professor responsável: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Buffon
- 11/2005 -07/ 2007** Iniciação Científica, IQ-UNICAMP.  
“Desenvolvimento e Validação de Métodos Analíticos para Determinação de Pesticidas em Amostras de Água e Solo”  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

---

## Artigos Publicados

---

- Lalli, P.M.; Iglesias, B.A.; Toma, H.E.; Sa, G.F.; Daroda, R.J.; Silva Filho, J.C.; Szulejko, J.E.; Araki, K.; Eberlin, M.N. “Protomers: formation, separation and characterization via travelling wave ion mobility mass spectrometry” *J. Mass Spectrom.* **2012**, *47*, 712 - 719.
- Lalli, P.M.; Iglesias, B.A.; Deda, D.K.; Toma, H.E.; Sa, G.F.; Daroda, R.J.; Araki, K.; Eberlin, M.N. “Resolution of isomeric multi-ruthenated porphyrins by travelling wave ion mobility mass

spectrometry” *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2012**, *26*, 263 – 268.

3. Santos, J.J.; Toma, S.H.; Lalli, P.M.; Riccio, M.F.; Eberlin, M.N.; Toma, H.E.; Araki, K. “Exploring the coordination chemistry of isomerizable terpyridine derivatives for successful analyses of *cis* and *trans* isomers by travelling wave ion mobility mass spectrometry” *Analyst* **2012**, *137*, 4045 - 4051.

4. Romão, W.; Vaz, B.G.; Lalli, P.M.; Bueno, M.I.M.S.; Correa, D.N.; Telles, V.L.C.N.; Castro, E.V.R.; Eberlin, M.N. “Analyzing Brazilian vehicle documents for authenticity by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry”. *J. Forensic Sci.* **2012**, *57*, 539 – 543.

5. Lalli, P.M.; Rodrigues, T.S.; Arouca, A.M.; Eberlin, M.N.; Neto, B.A.D. “N-heterocyclic carbenes with negative-charge tags: direct sampling from ionic liquid solutions” *RSC Adv.* **2012**, *2*, 3201 – 3203.

6. Oliveira, F.F.D.; Santos, M.R.; Lalli, P.M.; Schmidt, E.M.; Bakuzis, P.; Lapis, A.A.M.; Monteiro, A.L.; Eberlin, M.N.; Neto, B.A.D. “Charge-tagged acetate ligands as mass spectrometry probes for metal complexes investigations: applications in Suzuki and Heck phosphine-free reactions” *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 10140 – 10147.

7. Romão, W.; Lalli, P.M.; Franco, M.F.; Sanvido, G.; Schwab, N.V.; Lanaro, R.; Costa, J.L.; Sabino, B.D.; Bueno, M.I.M.S.; Sa, G.F.; Daroda, R.J.; Souza, V.; Eberlin, M.N. “Chemical profile of meta-chlorophenylpiperazine (m-CPP) in ecstasy tablets by easy ambient sonic-spray ionization, X-ray fluorescence, ion mobility mass spectrometry and NMR” *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400*, 3053 – 3064.

8. Lalli, P.M.; Corilo, Y. E.; Sa, G.F.; Daroda, R.J.; Souza, V.; Souza, G.H.M.F.; Campuzano, I.; Ebeling, G.; Dupont, J.; Eberlin, M.N. “Intrinsic mobility of gaseous cationic and anionic aggregates of ionic liquids”. *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 1444 – 1447.

9. Alberici, R.M.; Simas, R.C.; Sanvido, G.B.; Romão, W.; Lalli, P.M.; Benassi, M.; Cunha, I.B.S.; Eberlin, M.N. “Ambient mass spectrometry: bringing MS into the ‘real world’”. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, 265 - 294.

10. Lalli, P.M.; Sanvido, G.B.; Garcia, J.S.; Haddad, R.; Cosso, R.G.; Maia, D.R.J.; Zacca, J.J.; Maldaner, A.O.; Eberlin, M.N. “Fingerprinting and aging of ink by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry”. *Analyst* **2010**, *135*, 745 - 750.

11. Lalli, P.M.; Corilo, Y.E.; Abdelnur, P.V.; Eberlin, M.N.; Laali, K.K. “Intrinsic acidity and electrophilicity of gaseous propargyl/allenyl carbocations”. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2580 - 2585.

---

## **Total de Trabalhos Publicados em Anais de congresso**

---

11 Internacionais e 7 Nacionais.

---

## **Participação em Congressos**

---

5 Internacionais e 3 Nacionais.

## RESUMO

### ***APLICAÇÕES DE MOBILIDADE IÔNICA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA SEPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISÔMEROS***

A espectrometria de mobilidade iônica separa íons de diferentes tamanhos ou formatos (seção de choque) em fase gasosa de acordo com o tempo que levam para atravessar uma câmara preenchida com gás sob a influência de um campo elétrico fraco. O acoplamento dessa técnica à espectrometria de massas (IM-MS) resulta em uma ferramenta extremamente versátil, pois adiciona uma nova dimensão aos dados de MS com informação sobre a estrutura tridimensional das espécies. Assim, a IM-MS tem sido muito utilizada para o estudo conformacional de proteínas, separação de isômeros e análise de misturas complexas. Neste trabalho, investigamos novas aplicações da IM-MS, focando na separação de isômeros. Na primeira parte, mostramos que a IM-MS é capaz de separar isômeros posicionais de piridil porfirina mono ou multi substituída com  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}]^+$ . Os isômeros substituídos em *meta* mostraram ser mais compactos do que os substituídos em *para*. Entretanto, os isômeros di-substituídos em *cis* e *trans* possuem seção de choque muito parecida e não puderam ser separados. Na segunda parte, mostramos a separação e caracterização de protômeros (espécies protonadas ou desprotonadas em sítios distintos). Apesar da protonação (ou desprotonação) em sítios diferentes não alterar significativamente a seção de choque da espécie, ela pode resultar em íons com distribuição de cargas contrastantes, o que leva a formação de heterodímeros entre os íons e as moléculas do gás ( $\text{CO}_2$ ) com forças e tempo de vidas contrastantes, assim assegurando a resolução desses protômeros por IM-MS. Na terceira parte do trabalho, investigamos o potencial da técnica para o detalhamento composicional e estrutural de compostos presentes em petróleo através da análise de cortes de destilação de alto ponto de ebulição.



## ABSTRACT

### ***ION MOBILITY MASS SPECTROMETRY APPLICATIONS TO ISOMER SEPARATION AND CHARACTERIZATION***

Ion mobility mass spectrometry separates ions with different size or shape (collision cross section) in the gas phase according to the time they take to travel through a cell filled with gas under the influence of a low electric field. The coupling of this technique to mass spectrometry (IM-MS) results in an extremely versatile tool, since it adds a new dimension to MS data with information about the species' three-dimensional structure. Therefore, IM-MS has been extensively used for protein conformation studies, isomer separations and analysis of complex mixtures. In this work, we investigate new applications of IM-MS, focusing on isomer separation. In the first part, we show that IM-MS is able to separate positional isomers of pyridil-porphyrins mono or multi-substituted with  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}]^+$ . The *meta* substituted isomers were shown to be more compact than the *para* substituted isomers. On the other hand, *cis* and *trans* di-substituted isomers display very similar collision cross sections and could not be separated. In the second part of this work, we show the separation and characterization of protomers (species protonated or deprotonated in different sites). Although protonation (or deprotonation) in different sites does not change significantly the species collision cross section, it may result in ions with contrasting charge distribution, which leads to the formation of heterodimers between ions and gas molecules ( $\text{CO}_2$ ) with contrasting strengths and life times, therefore allowing the resolution of these protomers by IM-MS. In the third part of this work, we investigate the potential of this technique for the compositional and structural detailing of compounds present in crude oil by the analysis of high boiling point distillation cuts.



# ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>xvii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>xxi</b>
<b>INTRODUÇÃO: Mobilidade iônica acoplada a espectrometria de massas .....</b>	<b>1</b>
1. Um breve histórico.....	3
2. A espectrometria de mobilidade iônica .....	5
3. A espectrometria de massas .....	8
3.1. Ionização por eletrospray (ESI) .....	9
3.2 Fotoionização à pressão atmosférica (APPI) .....	10
4. O acoplamento: IM-MS .....	12
5. Travelling wave ion mobility mass spectrometry.....	16
5.1 Funcionamento de uma cela de TWIM.....	17
5.2 Synapt HDMS .....	19
6. Análise de isômeros por IM-MS e TWIM-MS.....	21
7. Objetivos gerais.....	22
<b>CAPÍTULO 1- Separação de isômeros de porfirina substituída.....</b>	<b>23</b>
1.1 Introdução.....	25
1.2 Objetivo .....	27
1.3 Parte experimental .....	28
1.4 Resultados e discussão .....	29
1.5 Conclusão .....	35
<b>CAPÍTULO 2- Protômeros: separação e caracterização.....</b>	<b>37</b>
2.2 Objetivo .....	41
2.3 Parte experimental .....	41
2.3.1 TWIM-MS(/MS).....	41
2.3.2 Cálculos de seção de choque teórica.....	42

2.4	Resultados e discussão .....	43
2.5	Conclusão .....	52
<b>CAPÍTULO 3- Caracterização de petróleo .....</b>		<b>55</b>
3.1	Introdução .....	57
3.1.1	Compostos polares em petróleo .....	57
3.1.2	O modelo de Boduszynski .....	59
3.1.3	Análise composicional do petróleo .....	61
3.1.4	FT-ICR MS .....	63
3.1.5	Mobilidade iônica para análise de petróleo.....	66
3.1.6	Fontes de ionização .....	68
3.1.7	Algumas classificações comumente utilizadas na análise de petróleo .....	69
3.2	Objetivo .....	71
3.3	Parte experimental .....	71
3.3.1	Amostras.....	71
3.3.2	Fracionamento por HPLC-2.....	72
3.3.3	Soluções para as análises por espectrometria de massas .....	73
3.3.4	TWIM-MS.....	74
3.3.5	FT-ICR MS .....	74
3.3.6	Cálculos teóricos de seção transversal de choque.....	75
3.4	Resultados e discussão .....	75
3.4.1	Análises por eletrospray no modo positivo de íons .....	76
3.4.2	Análises por eletrospray no modo negativo de íons .....	87
3.4.3	Análises por fotoionização a pressão atmosférica .....	101
3.5	Conclusão .....	107
<b>CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS.....</b>		<b>111</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>		<b>115</b>
<b>ANEXOS.....</b>		<b>125</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

APPI	Fotoionização a pressão atmosférica
ASAP	<i>Atmospheric solids analysis probe</i>
CID	Dissociação induzida por colisão
DBE	<i>Double bonds equivalent</i>
ESI	Ionização por eletrospray
FT-ICR	Ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier
GC	Cromatografia a gás
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IM-MS	Mobilidade iônica acoplada a espectrometria de massas
IMS	Espectrometria de mobilidade iônica
$K$	Coefficiente de mobilidade iônica
LC	Cromatografia líquida
MALDI	Ionização/dessorção a laser assistida por matriz
MS	Espectrometria de massas
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial
$m/z$	Razão massa/carga
$R_p$	Poder de resolução
$R_{p-p}$	Resolução pico-a-pico
TMAH	Hidróxido de tetrametil amônio
TOF	Tempo de voo
TWIM	<i>Travelling wave ion mobility</i>
$\alpha$	Fator de separação
$\Omega$	Seção de choque



## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Resolução pico-a-pico ( $R_{p-p}$ ), fator de separação ( $\alpha$ ) e poder de resolução ( $R_p$ )<sup>a</sup> para cada par isomérico..... 33

**Tabela 1:** Parâmetros da onda de potencial (velocidade e altura) otimizados para as separações por TWIM, e valores de energia de colisão ajustados para os experimentos de MS/MS..... 42

**Tabela 3:** Gradiente da fase móvel otimizado para o fracionamento por HPLC-2..... 73



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Esquema de uma cela de mobilidade. ....5
- Figura 2: Esquema da separação de íons por IMS. ....7
- Figura 3: Esquema de um equipamento de IMS. ....7
- Figura 4: Esquema da fonte de ESI. ....10
- Figura 5: Esquema da fonte de APPI.....12
- Figura 6: Esquema de um equipamento de IM-MS.....14
- Figura 7: Exemplo de um gráfico 3D de mobilidade:  $m/z$  vs *drift time*. ....15
- Figura 8: Ilustração comparando a voltagem aplicada na cela de mobilidade de um equipamento convencional (drift tube) e de um equipamento de TWIM (TWIG).<sup>31</sup> .....17
- Figura 9: Ilustração dos eletrodos anelares em uma cela de TWIM.<sup>31</sup> .....18
- Figura 10: Esquema do impulsionamento dos íons em uma cela de TWIM.<sup>31</sup> .....18
- Figura 11: Esquema ilustrativo da configuração do equipamento de TWIM-MS, Synapt (Waters Corp.).<sup>31</sup> .....19
- Figura 12: Funcionamento das celas *trap*, TWIM e *transfer*.<sup>31</sup> .....20
- Figura 13: Mobiligramas sobrepostos para as porfirinas multi-rutenadas: *m*-TetraRu, *p*-TetraRu, *m*-TriRu, *p*-TriRu, *cis-m*-DiRu, *cis-p*-DiRu, *trans-m*-DiRu e *trans-p*-DiRu usando (a) N<sub>2</sub> e (b) CO<sub>2</sub> como *drift gas*. ....30
- Figura 14: Mobiligramas sobrepostos para as porfirinas mono-rutenadas livres: *m*-MonoRu e *p*-MonoRu; e mono-rutenadas complexadas com zinco: *m*-ZnMonoRu e *p*-ZnMonoRu, usando (a-b) N<sub>2</sub> e (c-d) CO<sub>2</sub> como *drift gas*.....31
- Figura 15: Estruturas otimizadas para as espécies monocarregadas *m*-MonoRu e *p*-MonoRu (A, B) usando o método MM-Plus e parâmetro de convergência de  $1 \times 10^{-4}$  kcal /Å,.....32

- Figura 16: Mobiligramas para misturas dos isômeros a) *m*-TetraRu e *p*-TetraRu, b) *m*-TriRu e *p*-TriRu, c) *cis-m*-DiRu e *cis-p*-DiRu, d) *trans-m*-DiRu e *trans-p*-DiRu, e) *m*-MonoRu e *p*-MonoRu, f) *m*-ZnMonoRu e *p*-ZnMonoRu usando CO<sub>2</sub> a 1 mbar como *drift gas*. .....34
- Figura 17: ESI(+)-TWIM-MS para os protômeros de *m/z* 94 amostrados de uma solução metanólica ácida (pH 4) de anilina. ....43
- Figura 18: ESI(+)-TWIM-MS/MS dos dois protômeros de anilina de *m/z* 94,07.44
- Figura 19: ESI(+)-TWIM-MS dos protômeros monocarregados de *m/z* 619,24 a partir de soluções metanólicas ácidas de a) tetra(4-piridil)porfirina e b) tetra(3-piridil)porfirina, e c) do protômero duplamente carregado de *m/z* 310,11 a partir de tetra(4-piridil)porfirina. ....47
- Figura 20: ESI(+)-TWIM-MS/MS dos dois protômeros de *m/z* 619,24 a partir de soluções metanólicas ácidas de tetra(4-piridil)porfirina. ....48
- Figura 21: ESI(-)-TWIM-MS para os íons de *m/z* 789,28 a partir de solução metanólica básica de tetra(4-carboxifenil)porfirina. ....50
- Figura 22: ESI(-)-TWIM-MS/MS para os dois protômetos de tetra(4-carboxifenil)porfirina. ....51
- Figura 23: a) ESI(-)-TWIM-MS e b) ESI(-)-TWIM-MS/MS para a tetra(4-carboxifenil)porfirina duplamente desprotonada de *m/z* 394,14 indicando a formação de um único protômero duplamente carregado. ....52
- Figura 24: Modelo de Boduszynski ilustrando o efeito da massa molar e da estrutura em função ponto de ebulição.<sup>99</sup> .....60
- Figura 25: Força de Lorentz aplicada a um íon sob a influência de um campo magnético. ....63
- Figura 26: Esquema de uma cela de FT-ICR MS. ....65
- Figura 27: Esquema da detecção dos íons na cela de ICR. ....65

- Figura 28: Imagem da corrente induzida no domínio de tempo (esquerda); espectro de frequência após a transformada de Fourier (centro); e espectro de massas depois da transformada de frequência para  $m/z$  (direita). .....66
- Figura 29: Estrutura ilustrativa geral de compostos presentes em petróleo. ....70
- Figura 30: Exemplos de possíveis “*cores*” (esqueletos moleculares base) presentes em petróleo.....70
- Figura 31: Ilustração comparativa entre as faixas de polaridade e massa molar dos compostos ionizados por ESI e APPI. ....76
- Figura 32: ESI(+)-TWIM-MS para os três cortes de destilação. Esquerda: espectro 2D de mobilidade ( $m/z$  x drift time); direita: espectro de massas. ....78
- Figura 33: Aproximação de uma região do gráfico 2D de mobilidade mostrando a tendência dos compostos de petróleo. ....79
- Figura 34: Mobiligramas extraídos para íons mais intensos do espectro de massas, atribuídos a compostos das séries homólogas com DBE 9, 10 e 11 da classe N, a partir de análises por ESI(+) do corte de destilação 475-500 °C.....80
- Figura 35: a) Espectros de massas e b) diagrama DBE vs Número de Carbonos para a classe N para as análises das frações F2, F3, F4 e F5 por ESI(+). ....82
- Figura 36: Aproximação do espectro de massas na região de  $m/z$  454 - 472 para as análises do corte de destilação e das frações F2 e F3.....83
- Figura 37: ESI(+)-TWIM-MS para o corte de destilação 475-500 °C e suas cinco frações de HPLC-2. Esquerda: espectro 2D de mobilidade ( $m/z$  x drift time); direita: espectro de massas.....85
- Figura 38: (+)ESI-TWIM-MS para a fração F3 do corte de destilação 475-500 °C. Acima: plot 2D de mobilidade ( $m/z$  x drift time); e abaixo: espectros de massas exportados de cada região.....87
- Figura 39: Comparação da mobilidade da série homóloga da classe N, DBE 11, usando TMAH e NH<sub>4</sub>OH como dopante. ....89

- Figura 40: Mobiligramas extraídos para íons das séries homólogas com DBE 3 da classe O<sub>2</sub>, a partir de análise por ESI(-) do corte de 500 – 525 °C.....90
- Figura 41: Mobiligramas extraídos para íons da série homóloga com DBE 5 da classe O<sub>2</sub>, a partir de análise por ESI(-) do corte de 500 – 525 °C.....92
- Figura 42: Aproximação do espectro de massas da F5 no corte de 500 – 525 °C na região de *m/z* 443,000-443, 600 obtido pelos analisadores de massa do tipo FT-ICR (acima) e TOF (abaixo).....93
- Figura 43: Possíveis estruturas dos ácidos carboxílicos presentes majoritariamente em petróleo.<sup>124</sup> .....94
- Figura 44: Fórmulas estruturais (acima) e estruturas otimizadas (abaixo) para dois isômeros hipotéticos de ácidos carboxílicos (desprotonados) com DBE 5.....95
- Figura 45: Mobiligrama para os compostos mais abundantes da classe O<sub>2</sub> com DBE 5 nos três cortes de destilação.....96
- Figura 46: ESI(-)-TWIM-MS (usando TMAH como dopante) para o corte de destilação 475-500 °C e suas cinco frações de HPLC-2. Esquerda: espectro 2D de mobilidade (*m/z* x *drift time*); direita: espectro de massas. ....97
- Figura 47: ESI(-)-MS (usando TMAH como dopante) para a F3 do corte de destilação 475-500 °C. a) ampliação do espectro 2D de mobilidade (*m/z* x *drift time*), b) espectro de massas pelo analisador TOF e c) espectro de massas pelo analisador de altíssima resolução FT-ICR MS.....98
- Figura 48: Mobiligramas extraídos para compostos da classe N de DBE 11 por ESI(-), usando TMAH como dopante.....99
- Figura 49: Estruturas hipotéticas para os compostos isoméricos da classe N detectados por ESI(-). ....100
- Figura 50: Comparação da mobilidade dos compostos das classes N e O por ESI(-) usando TMAH. Acima: compostos de *m/z* ímpar (vermelho) versus compostos

- de  $m/z$  par (azul) extraídos da análise da F2. Abaixo: mobilidade extraída para compostos da classe O com DBE 10-12 e da classe N DBE 11.....101
- Figura 51: (+)APPI-TWIM-MS para as cinco frações de HLPC2 do corte de destilação 500-525 °C. Esquerda: espectro 2D de mobilidade ( $m/z$  x *drift time*); direita: diagrama de DBE vs número de carbonos para a classe S por FT-ICR MS. Os círculos vermelhos mostram a posição da distribuição da fração anterior. ...103
  - Figura 52: Identificação de isômeros da classe  $S_2$ . a) Espectro de massas obtido pelo analisador TOF (instrumento de TWIM-MS); b) mobilograma para o íon em  $m/z$  420.21; c) espectro de massas de altíssima resolução obtido pelo analisador FT-ICR; d) diagrama de DBE vs número de carbonos para a classe  $S_2$ .....106
  - Figura 53: *Drift time* vs. número de carbono para os compostos da classe N com DBE 6, 7 e 9.....107



---

***INTRODUÇÃO:***  
***MOBILIDADE IÔNICA ACOPLADA A***  
***ESPECTROMETRIA DE MASSAS***

---



## 1. UM BREVE HISTÓRICO

A espectrometria de mobilidade iônica (IMS)<sup>i</sup> consiste em uma técnica de separação de íons em fase gasosa, baseada na diferença de mobilidade dos íons ao atravessarem uma cela preenchida por um gás e conduzidos por um campo elétrico fraco.

Os primeiros registros de mobilidade iônica deram-se na década de 30, através de experimentos que estudavam a mobilidade de cátions em gases não reativos.<sup>1,2</sup> Os primeiros trabalhos publicados nessa área focavam o estudo da teoria por trás da mobilidade de diferentes íons em diferentes condições. A partir da década de 70, a mobilidade iônica passou a ser considerada uma técnica analítica sendo referida como “Cromatografia de Plasma” ou “Eletrofose Gasosa”,<sup>3</sup> por se tratar de uma separação de íons em fase gasosa. A possibilidade de ser usada como uma ferramenta de detecção e caracterização despertou então um certo interesse na comunidade científica, devido a rapidez na qual as separações ocorrem (na ordem de milissegundos), o seu baixo limite de detecção, baixo custo e uma possível adequação para monitoramento em tempo real.<sup>4</sup> Assim, a IMS encontrou grande aplicação nos campos militar e de segurança para análise de traços de vapores orgânicos, especialmente compostos como explosivos, drogas e agentes de guerra química.<sup>5,6</sup>

O acoplamento da mobilidade iônica a espectrometria de massas foi realizado pela primeira vez entre as décadas de 50 e 60 por McDaniel, que é hoje considerado o pai da mobilidade iônica acoplada a espectrometria de massas (IM-MS)<sup>ii</sup>. Ele acoplou uma cela de mobilidade que operava em pressões reduzidas (0,1 a 10 torr) a um analisador de massas do tipo setor magnético com o intuito de estudar a mobilidade de íons e reações íon-molécula.<sup>7</sup> Em seguida, os analisadores de massas do tipo quadrupolo<sup>8,9</sup> e TOF<sup>10-12</sup> rapidamente substituíram os de tipo setor magnético para as

---

<sup>i</sup> Do inglês: *ion mobility spectrometry*.

<sup>ii</sup> Do inglês: *ion mobility mass spectrometry*.

análises de íons separados por mobilidade. Em 1971 o primeiro equipamento comercial de IM-MS tornou-se disponível pela empresa Franklin GNO Corporation e foi batizado de “Alpha II PC/MS”.<sup>13</sup> A maioria dos trabalhos nessa época incluíam a identificação e caracterização de drogas ilícitas e de prescrição.<sup>14,15</sup> O equipamento também era usado para identificar íons estruturalmente diferentes que apresentam os mesmos valores de  $m/z$ .<sup>16</sup> Entretanto, o interesse pela técnica foi logo perdido devido principalmente ao baixo poder de resolução das celas de mobilidade e às fontes de ionização existentes na época, fatores estes que limitavam as aplicações a compostos puros e voláteis. Entre 1980 e o começo de 1990, uma variedade de modificações no arranjo dos instrumentos renovou o interesse em IMS e IM-MS, resultando em equipamentos de melhor resolução<sup>17,18</sup> e na sua adequação para o uso em uma vasta gama de aplicações. Este último foi conquistado principalmente pelo desenvolvimento de novas fontes de ionização, que possibilitaram a análise de compostos polares não-voláteis e de alto peso molecular. Entre as fontes de ionização desenvolvidas nessa época, destaca-se a *ionização por eletrospray* (ESI)<sup>i,19</sup> e a *ionização por dessorção a laser assistida por matriz* (MALDI).<sup>ii20</sup>

Assim, apesar da IM-MS não ser uma técnica recente, foi apenas em meados da década de 90, especialmente após a demonstração da aplicação na separação de confôrmeros de proteína por Clemmer *et al.*,<sup>21</sup> que ela despertou um grande interesse na comunidade científica. Desde então, o desenvolvimento de novos arranjos instrumentais e a busca por novas aplicações para a técnica de IM-MS tornaram-se uma das áreas de crescimento mais promissoras em espectrometria de massas. Atualmente, já existe uma certa variedade de equipamentos de IM-MS com celas de mobilidade envolvendo diferentes tecnologias e a utilização de diferentes fontes de ionização e analisadores de massas. Com relação às aplicações da IM-MS, elas têm se diversificado recentemente,

---

<sup>i</sup> Do inglês: *electrospray ionization*

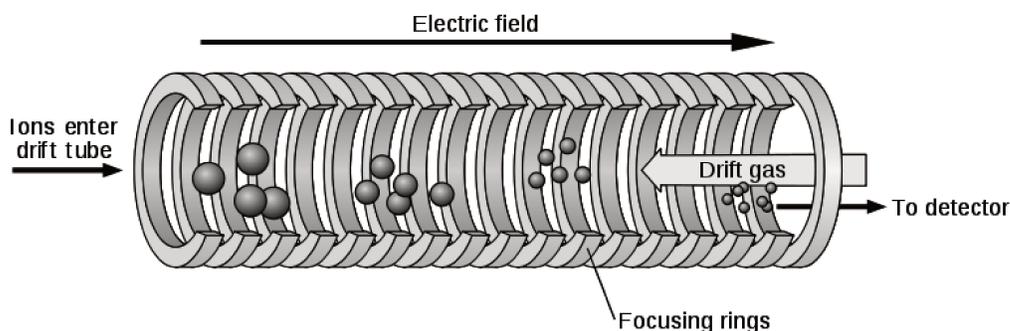
<sup>ii</sup> Do inglês: *matrix assisted laser desorption ionization*

porém os estudos de biomoléculas ainda constituem boa parte dos trabalhos publicados nessa área, devido a grande adequação da técnica para estudos estruturais de confôrmeros dessas moléculas tão relevantes.

## 2. A ESPECTROMETRIA DE MOBILIDADE IÔNICA

Na espectrometria de mobilidade iônica (IMS) os íons viajam através da cela de mobilidade preenchida por um gás em contra fluxo, e sob a influência de um campo elétrico fraco (**Figura 1**). Durante o percurso, os íons experimentam um número de colisões com as moléculas do gás, que impedem o seu progresso através da cela. Os íons maiores (maior seção de choque,  $\Omega$ ) experenciam um número maior de colisões do que os íons menores e assim levam mais tempo para atravessar a cela de mobilidade. Dessa forma ocorre a separação dos íons pela diferença de tamanho ou formato ( $\Omega$ ). A velocidade com a qual um íon atravessa a cela de mobilidade é proporcional a sua mobilidade iônica,  $K$ , e à resultante de força do campo elétrico,  $E$ :

$$v = K \cdot E \quad \text{(Equação 1)}$$



**Figura 1: Esquema de uma cela de mobilidade.**<sup>22</sup>

A mobilidade de um íon é afetada por fatores como a densidade numérica dos átomos/moléculas do gás de fluxo ( $N$ ), a massa reduzida do íon e do átomo/molécula do

gás ( $\mu$ ), a temperatura do gás ( $T$ ), a seção transversal de choque do íon ( $\Omega$ ) e a carga do íon ( $q$ ), todos estes expressos pela equação de Mason-Schamp:<sup>23</sup>

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

Mantendo constante os fatores da equação de Mason-Schamp referentes ao gás ( $N$ ,  $T$  e massa da molécula do gás), a variável  $K$  torna-se característica para um dado íon e é inversamente proporcional à razão  $m/q$  (massa/carga) e à seção de choque ( $\Omega$ ) do íon:

$$K^{-1} \propto \left( \frac{m}{q} \right) \Omega \quad \text{(Equação 3)}$$

Assim, nas mesmas condições de operação, os íons são separados conforme suas massas, cargas e seção de choque ao atravessarem a cela de mobilidade. A dependência da mobilidade iônica em função da seção de choque do íon resulta na capacidade de separação de íons de mesma  $m/z$  que apresentam tamanho e formato diferentes. A **Equação 3** também mostra que íons com mesma  $m/q$  (como exemplo isômeros com mesmo estado de carga) podem ser separados por IMS se tiverem tamanhos ou formatos diferentes ( $\Omega$ ). Ou seja, pares de isômeros em que um deles apresenta uma estrutura mais compacta do que o outro podem ser diferenciados pela técnica por possuírem diferentes valores de  $\Omega$ .

Portanto, os íons com maior mobilidade iônica (menor  $\Omega$ , menor massa e/ou maior carga) possuem uma velocidade de fluxo maior e chegam mais rapidamente ao detector. Cada grupo de íons separados eluem em tempos diferentes gerando um sinal no mobiligrama (**Figura 2**). O tempo que um íon (ou grupo de íons) leva para atravessar a cela de mobilidade é chamado de *drift time*, e ocorre na ordem de milissegundos (ms).

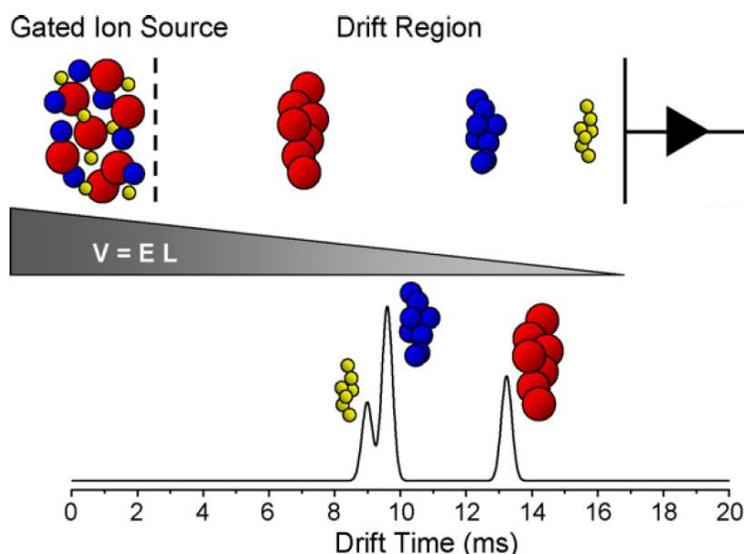


Figura 2: Esquema da separação de íons por IMS.<sup>24</sup>

Um equipamento de IMS apresenta basicamente quatro partes: sistema de introdução da amostra, fonte de ionização, cela de mobilidade e detector (**Figura 3**). A amostra é introduzida no equipamento, os analitos são ionizados pela fonte de ionização, e então os íons formados são conduzidos através do equipamento pela aplicação de um campo elétrico. Os íons passam pela cela de mobilidade, onde ocorre a separação conforme discutido acima, e então os grupos de íons separados são detectados, o sinal é processado gerando o mobiligrama.

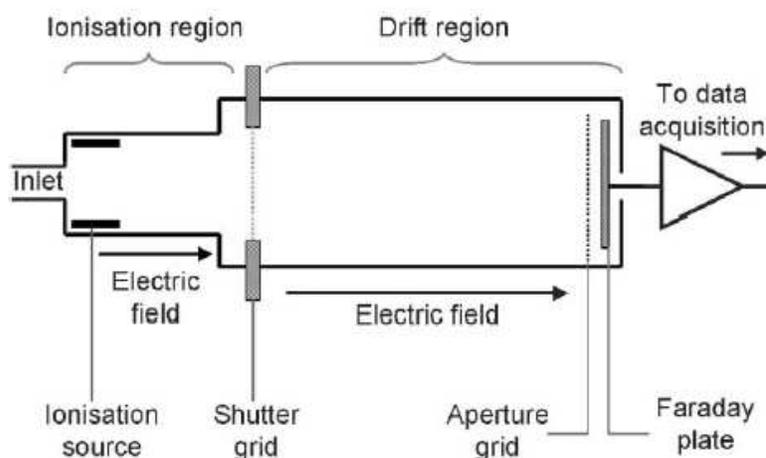


Figura 3: Esquema de um equipamento de IMS.<sup>25</sup>

### 3. A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica analítica que permite discriminar íons em fase gasosa de acordo com a razão massa/carga ( $m/z$ ) de cada espécie. Atualmente compreende uma das técnicas analíticas mais versáteis, abrangendo diversos campos da química, biologia, ciências médicas e tecnológicas, desde pesquisas aplicadas até as mais fundamentais.

Para a análise por MS, as amostras podem ser inseridas diretamente no espectrômetro de massas, ou através do acoplamento com uma técnica de separação, como a cromatografia a gás (GC), cromatografia líquida (LC) ou eletroforese capilar. Após a inserção do analito no espectrômetro de massas o primeiro passo é a ionização/transferência para a fase gasosa dos compostos por meio de uma fonte de ionização adequada. Em seguida os íons são separados com base na sua razão massa/carga ( $m/z$ ) em um analisador de massas e por fim um detector recebe os íons, transformando a corrente iônica em sinais elétricos. A magnitude do sinal elétrico em função da razão  $m/z$  é convertida por um processador de dados, o qual gera o espectro de massas.

Os diferentes tipos de analisadores de massas funcionam baseados em diferentes princípios pela aplicação de campos elétricos e/ou magnéticos, mas em geral dependem da aceleração dos íons, e por isso separam de acordo com a  $m/z$ .<sup>26</sup> Algumas características de análise determinadas pelo tipo de analisador escolhido são: o limite de massa, poder de resolução, exatidão de massa, sensibilidade, velocidade de análise, faixa dinâmica, potencial para experimentos de MS/MS e facilidade de operação.

A versatilidade das análises por MS é ditada pela fonte de ionização escolhida, pois ela determina o tipo de analito que será analisado (de acordo principalmente com sua massa molar e polaridade) e o tipo de matriz para qual a técnica será adequada. Inúmeras fontes de ionização foram desenvolvidas ao longo da história da MS, tornando a técnica hoje aplicável a praticamente todos os tipos de analitos e matrizes. Entretanto,

nenhuma fonte de ionização é universal, devendo ser escolhida de acordo com a análise desejada. Nos dois primeiros capítulos, utilizamos a fonte de ionização por eletrospray (ESI), e no terceiro capítulo, além de ESI também foi utilizada a fotoionização a pressão atmosférica (APPI)<sup>i</sup>.

### 3.1. Ionização por eletrospray (ESI)

A ionização por eletrospray (ESI) transfere espécies em solução para a fase gasosa na forma de íons livres ou agregados de forma branda e contínua.<sup>27</sup> Sua capacidade de ionizar e transferir para a fase gasosa espécies polares e de alto peso molecular, não ionizadas por outras técnicas de ionização existentes até então, conferiu a John Fenn o prêmio Nobel em 2001. A introdução de ESI expandiu enormemente o leque de aplicações da espectrometria de massas, e assim, tornou-se rapidamente a técnica de ionização primária operada a pressão atmosférica e a técnica de escolha para o acoplamento da cromatografia líquida a espectrometria de massas.

A **Figura 4** mostra um esquema da fonte de ESI. Soluções diluídas da amostra são injetadas por uma bomba de seringa através de um capilar de pequeno diâmetro no qual é aplicado um potencial elétrico de 2-5 kV. A diferença de potencial induz o acúmulo de carga na superfície do líquido no final do capilar, o que causa o seu alongamento para além da forma causada pela tensão superficial. Quando a tensão superficial é quebrada, a superfície do líquido no final do capilar adquire a forma de cone (cone de Taylor) e pequenas gotas carregadas são ejetadas formando o *spray*. Essas gotas atravessam, então, uma corrente de gás quente (gás de dessolvatação), fazendo com que o solvente contido nas gotículas evapore aumentando a densidade de cargas na gota até o ponto em que as forças Coulômbicas de repulsão superam as forças de coesão, causando assim a divisão da gota. Essas gotas passam por uma cascata de

---

<sup>i</sup> Do inglês: *atmospheric pressure photo-ionization*

rupturas, gerando gotas cada vez menores. Quando o campo elétrico na superfície das gotas torna-se grande o suficiente para romper a tensão superficial da gota, ocorre a ejeção de íons da superfície.<sup>28</sup>

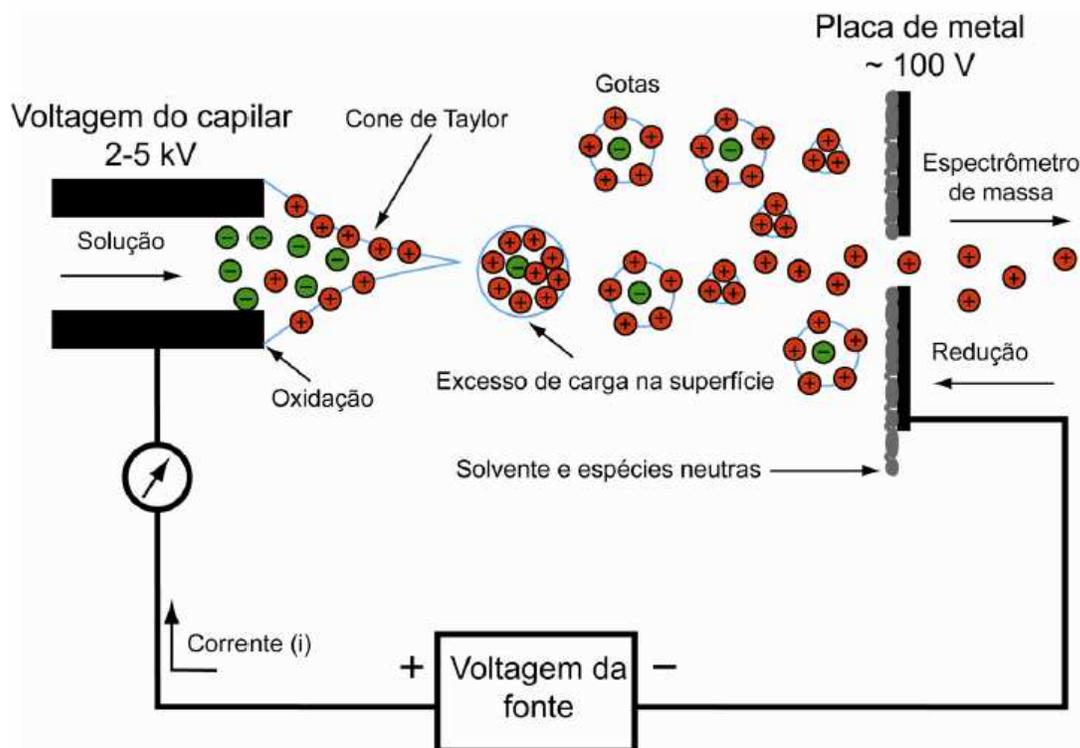


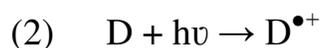
Figura 4: Esquema da fonte de ESI.<sup>29</sup>

### 3.2 Fotoionização à pressão atmosférica (APPI)

A fotoionização à pressão atmosférica (APPI) foi introduzida por Bruins e colaboradores em 2000<sup>30</sup> e, ao contrário da ESI, é capaz de ionizar espécies apolares aromáticas.

Em APPI a amostra é dissolvida em um solvente, geralmente tolueno, e injetada na fonte por uma bomba de seringa. Ao entrar na fonte de APPI, a amostra é vaporizada com auxílio de um gás nebulizador dentro de uma câmara aquecida, e então deixa a câmara na forma de um jato confinado e passa perpendicularmente a uma lâmpada de UV, que promove a ionização das espécies a pressão atmosférica (**Figura 5**).

O mecanismo de formação de íons em APPI é mostrado nas equações abaixo. O princípio fundamental em APPI no modo positivo de íons é a absorção de um fóton por uma molécula causando a ejeção de um elétron e a formação de um cátion radicalar (1). Esse é o mecanismo de ionização direta e ocorre se a energia do fóton for maior do que o potencial de ionização da molécula. A probabilidade disso ocorrer é muito baixa, já que os fótons colidem com o gás e outras moléculas na fonte antes de atingirem o analito. Nesse caso, a ionização de um dopante (escolhido por ter baixa energia de ionização) (2) seguida pela ionização do analito (3) pode aumentar a eficiência de ionização do analito. Se a afinidade de próton da molécula do dopante desprotonado for menor do que a afinidade de próton do analito, moléculas do solvente podem agir como um intermediário entre os íons do dopante e o analito através de transferência de prótons (4) ou reações de troca de carga (5). Porém, se o tolueno for usado como solvente, ele pode agir também como dopante e sozinho então aumenta a eficiência de ionização.



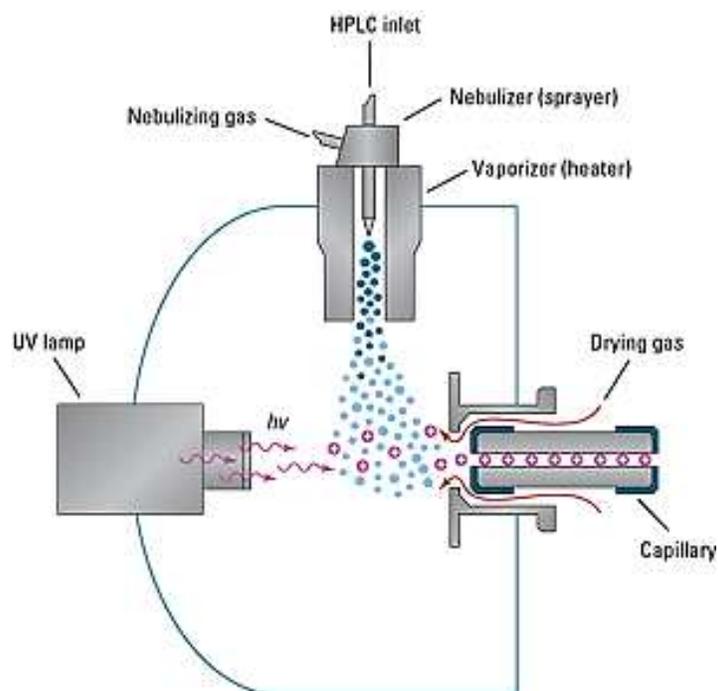


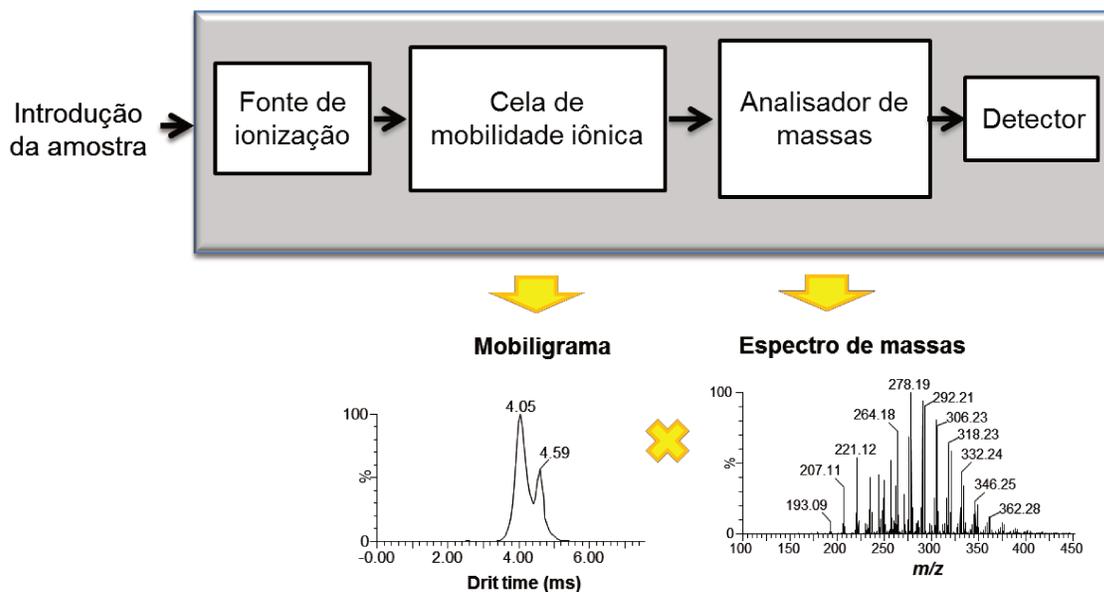
Figura 5: Esquema da fonte de APPI.<sup>31</sup>

#### 4. O ACOPLAMENTO: IM-MS

O acoplamento da IMS com a MS é geralmente referido como IM-MS e as duas técnicas são complementares e encaixam-se instrumentalmente tão bem que podem ser fundidas em uma única medida analítica. 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 mobilograma com informação estrutural ( $\Omega$ ) dos íons. Assim, o acoplamento IM-MS gera uma técnica extremamente versátil e torna-se uma ferramenta analítica poderosa para a investigação de estrutura molecular, separação de isômeros e análise de amostras complexas.<sup>32</sup>

Ambas as técnicas (IMS e MS) necessitam que os analitos sejam primeiramente ionizados e transferidos para a fase gasosa por uma fonte de ionização para que possam ser conduzidos através do equipamento por campos elétricos, e por final um detector de

íons para a geração do sinal analítico. Assim, a compatibilidade instrumental entre a IMS e a MS permite que ambas as técnicas sejam acopladas dentro de um mesmo equipamento. Basicamente, um equipamento de IM-MS deve conter 5 principais componentes: um sistema de introdução de amostra, a fonte de ionização, a cela de mobilidade, o analisador de massas e o detector de íons (**Figura 6**). As amostras podem ser introduzidas em um instrumento de IM-MS por infusão direta ou por cromatógrafos a gás ou líquido. Existe uma grande variedade de técnicas de ionização que podem ser utilizadas, sendo que todas as fontes usualmente disponíveis para MS são compatíveis com equipamentos de IM-MS. Quando fontes de ionização contínua são usadas, como ESI, há a necessidade de armazenar os íons antes de eles entrarem na cela de mobilidade, e estes são então periodicamente lançados por um portão de íons (alta voltagem repelindo os íons) gerando pacotes estreitos de íons. Enquanto um pacote percorre a cela, o portão permanece fechado e parte dos íons que são gerados continuamente na fonte acaba sendo perdida, prejudicando a sensibilidade. Já em fontes pulsadas, como o MALDI, os íons produzidos em um pulso percorrem a cela e o pulso seguinte ocorre apenas quando o primeiro pacote deixa a cela. Dessa forma, todos os íons da amostra produzidos na fonte são analisados, não havendo perda de sensibilidade.

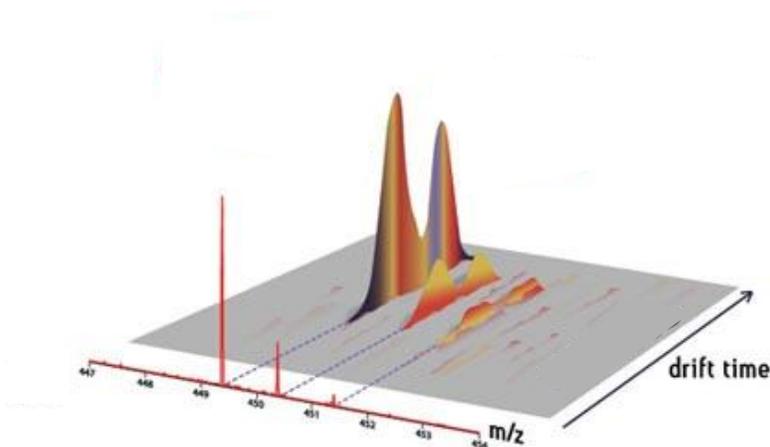


**Figura 6: Esquema de um equipamento de IM-MS.**

Com relação às celas de mobilidade, existe hoje uma certa variedade de arranjos diferentes, sendo a grande maioria desenvolvida por grupos de pesquisa e construídas em laboratório (*lab built*). Os diferentes tipos de cela de mobilidade variam principalmente na forma e intensidade em que o campo elétrico é aplicado. As celas de mobilidade convencionais apresentam um campo elétrico constante e tem sido construídas por diversos grupos de pesquisa. Outro tipo bastante conhecido, é a FAIMS (*high-field asymmetric ion mobility spectrometry*) introduzida em 1993.<sup>33</sup> Nessa tecnologia os íons são separados enquanto são carregados por um fluxo de gás entre dois eletrodos planares, expostos a campos elétricos fraco e forte alternativamente na direção perpendicular ao fluxo do gás.<sup>34</sup> Por fim, a tecnologia TWIM (*travelling wave ion mobility*) também é uma das mais utilizadas hoje e será discutida em detalhe adiante na seção 5 uma vez que é o tipo de cela utilizada nos experimentos deste trabalho.

Diversos analisadores de massas já foram acoplados a celas de mobilidade, como TOF, quadrupolo, *ion trap* e setor magnético. Entretanto, o analisador do tipo TOF é o que se adequa melhor para a análise dos compostos separados por IMS devido a sua rapidez de aquisição dos espectros de massas. Como os mobiligramas são adquiridos na ordem de milissegundos e os espectros de massas obtidos pelo TOF são adquiridos na

ordem de microssegundos, milhares de espectros de massas podem ser obtidos para cada grupo de íons separados que eluem da cela de mobilidade, produzindo um arranjo tridimensional no qual tanto a mobilidade quanto o espectro de massas são registrados para os íons (**Figura 6**). Assim, uma forma convencional de apresentar os dados gerados por IM-MS é plotar o *drift time* (ou a seção de choque) em função da  $m/z$ . Nesses gráficos tridimensionais a intensidade é plotada no terceiro eixo (**Figura 7**).



**Figura 7: Exemplo de um gráfico 3D de mobilidade:  $m/z$  vs *drift time*.**<sup>35</sup>

Os analisadores de massas de menor frequência de aquisição apresentam uma certa dificuldade de serem acoplados a celas de mobilidade. No caso do quadrupolo, por exemplo, até é possível gerar espectros 3D como os obtidos pelo TOF, entretanto, a taxa de escaneamento é bem mais lenta. Dessa forma, a IM-MS com esse analisador é mais apropriada para separações de íons específicos isoméricos ou isóbaros<sup>i</sup> nas quais o espectrômetro de massas é operado no modo de monitoramento de um único íon.<sup>32</sup> Outro exemplo são os analisadores do tipo *ion trap*, em que um segundo portão de íons pode ser posicionado na saída da cela de mobilidade e é aberto em um tempo específico após a abertura do primeiro portão, de forma a selecionar apenas uma faixa de mobilidade específica para ser injetada no *ion trap*. Esse processo é repetido até que

<sup>i</sup> Isóbaros são compostos com a mesma massa nominal porém fórmulas moleculares e massas exatas diferentes.

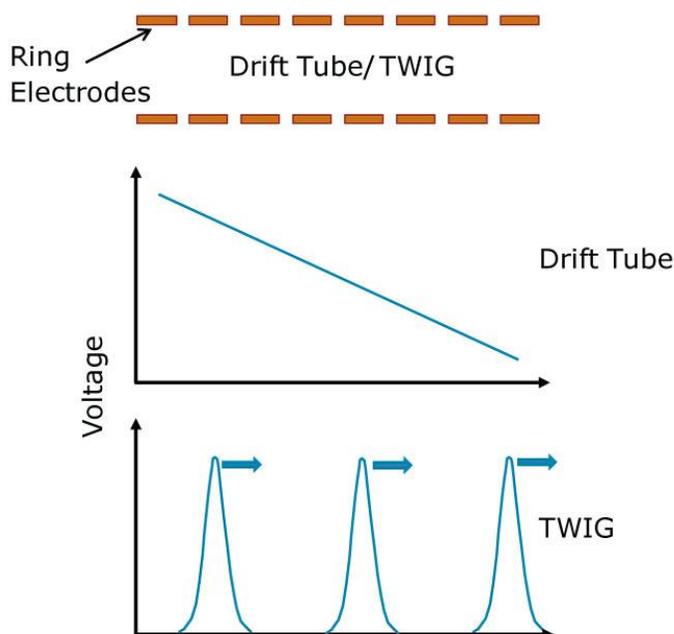
haja uma concentração de íons suficiente para realizar a análise na faixa de mobilidade selecionada.<sup>32</sup>

Quadrupolos e *ion traps* lineares também são em alguns casos posicionados antes da cela de mobilidade. Os quadrupolos com a função de selecionar uma faixa de  $m/z$ , como em experimentos de separação de isômeros, e os *ion traps* para acumular os íons enquanto o primeiro pacote percorre a cela de mobilidade, melhorando assim a sensibilidade.

## 5. TRAVELLING WAVE ION MOBILITY MASS SPECTROMETRY

Nos equipamentos clássicos de mobilidade iônica, os íons são conduzidos através da cela por um campo elétrico contínuo. Para que uma resolução adequada seja obtida, esses equipamentos necessitam de celas de mobilidade de grande comprimento, podendo chegar a 1 m ou até maiores.<sup>36</sup> Por isso, os equipamentos de mobilidade iônica clássicos sofrem de baixa sensibilidade uma vez que o longo percurso dos íons causa dispersão do pacote de íons e conseqüente perda significativa de íons.

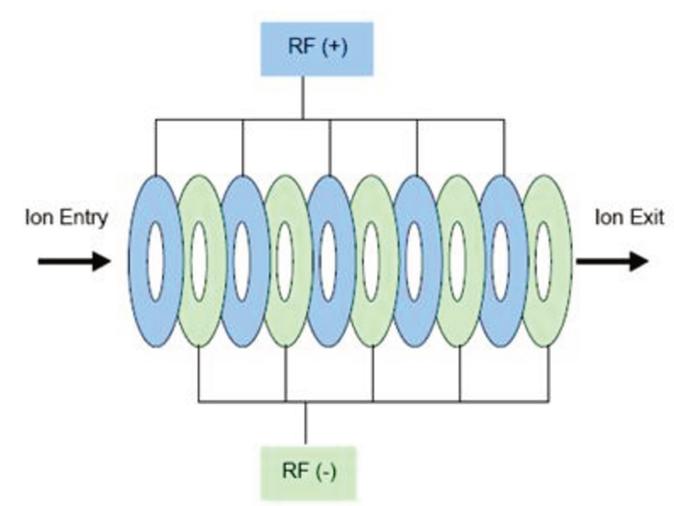
A partir da década de 90, o desenvolvimento de novos arranjos instrumentais para IM-MS tornou-se uma área de rápido crescimento, principalmente no sentido de aumentar a resolução e a sensibilidade, diminuir o tamanho dos equipamentos e aumentar a velocidade das aquisições para otimizar seu acoplamento ao espectrômetro de massas. Um dos principais avanços foi a utilização de sequências de pulsos de voltagem transiente (ondas), que impulsionam os íons através da cela, ao invés de se utilizar um campo elétrico uniforme (**Figura 8**). Essa tecnologia foi batizada de *travelling wave ion mobility* (TWIM).



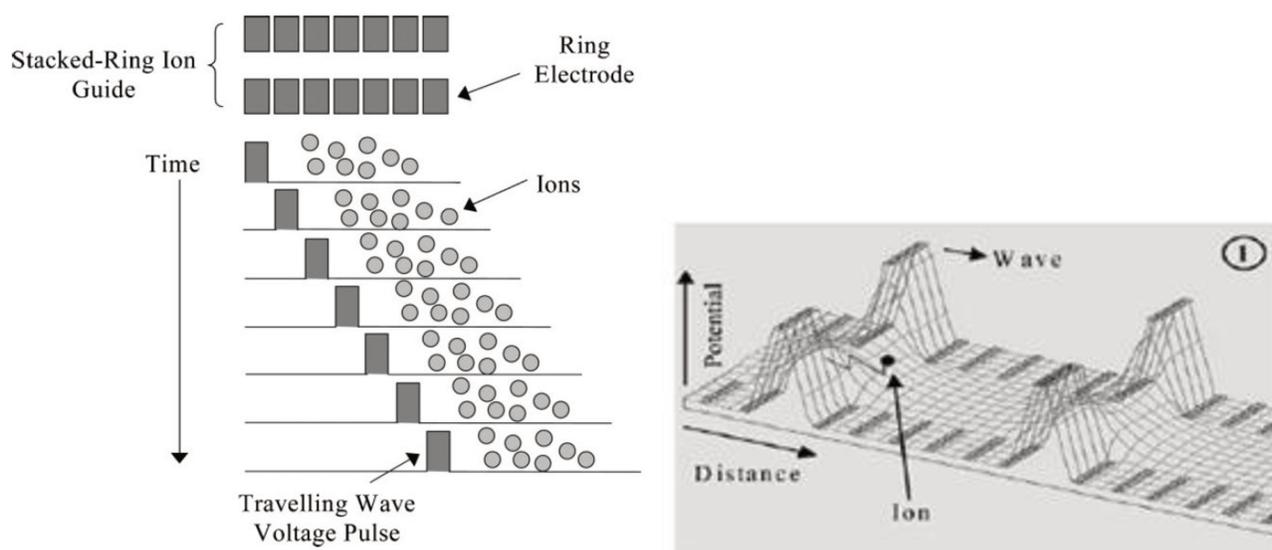
**Figura 8: Ilustração comparando a voltagem aplicada na cela de mobilidade de um equipamento convencional (drift tube) e de um equipamento de TWIM (TWIG).<sup>35</sup>**

### 5.1 Funcionamento de uma cela de TWIM

A fim de formar as ondas de potencial, a cela de mobilidade é composta por uma série de eletrodos anulares dispostos ortogonalmente ao eixo de transmissão dos íons (**Figura 9**). Em cada eletrodo é aplicada uma radiofrequência (RF) de fase oposta daquela aplicada aos seus eletrodos adjacentes. Para empurrar os íons através da cela, um potencial de corrente contínua (DC) é superimposto à RF de um par de eletrodos por um determinado tempo e em seguida é passado para o par de eletrodos adjacente e assim consecutivamente até o final da cela (**Figura 10**). Os íons saem da região onde o pulso foi aplicado para uma região a frente de menor campo, em seguida, o pulso se move para o próximo par de eletrodos e os íons são novamente conduzidos para frente. Dessa maneira, forma-se uma onda de campo elétrico (“*travelling wave*”) que carrega os íons através do equipamento, diminuindo o seu tempo de trânsito.



**Figura 9: Ilustração dos eletrodos anulares em uma cela de TWIM.**<sup>35</sup>



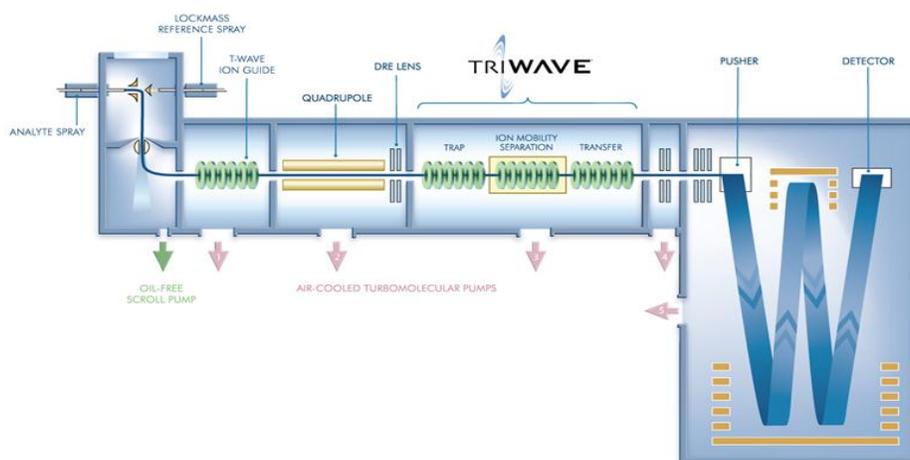
**Figura 10: Esquema do impulsionamento dos íons em uma cela de TWIM.**<sup>35</sup>

O desenvolvimento da técnica TWIM permitiu a construção de equipamentos com cela de mobilidade de menor comprimento (18,5 cm), aperfeiçoando então a transmissão dos íons, e conseqüentemente melhorando a sensibilidade. Além disso, a diminuição do comprimento da cela tornou viável a comercialização de espectrômetros de massas acoplados à mobilidade iônica, que anteriormente apenas eram construídos em laboratório (*lab built*) e ocupavam um espaço demasiado. Assim, o primeiro

equipamento de TWIM-MS, o Synapt (**Figura 11**), foi lançado e comercializado pela Waters Corporation em 2007 e continua sendo o único equipamento comercial desse tipo.<sup>37,38</sup>

## 5.2 Synapt HDMS

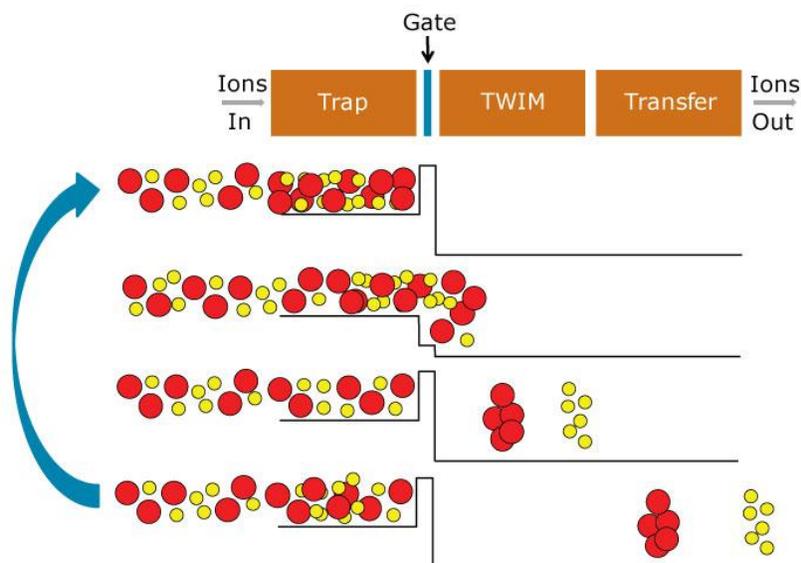
A **Figura 11** apresenta um esquema ilustrativo do equipamento Synapt com uma fonte de ESI. Além de ESI, diversas fontes de ionização são disponíveis para esse equipamento, como APCI,<sup>i</sup> APPI, MALDI e ASAP.<sup>ii</sup> Logo após a região de ionização, um guia de íons tem a função de focalizar o feixe proveniente da fonte e transferi-lo para o quadrupolo. O quadrupolo então pode funcionar como um filtro, selecionando uma faixa de  $m/z$  específica. A região de mobilidade nesse equipamento é dividida em três celas consecutivas, sendo que a primeira (*trap*) acumula os íons provenientes do quadrupolo e os lança por pacotes em intervalos de tempo regulares para a cela TWIM, onde ocorre de fato a separação por mobilidade iônica (**Figura 12**). A cela *transfer* tem como função focalizar e conduzir os íons separados de acordo com a sua mobilidade para o analisador de massas. Por fim, o analisador de massas presente no Synapt é do tipo TOF.



**Figura 11: Esquema ilustrativo da configuração do equipamento de TWIM-MS, Synapt (Waters Corp.).<sup>35</sup>**

<sup>i</sup> Ionização química a pressão atmosférica. Do inglês: *atmospheric pressure chemical ionization*.

<sup>ii</sup> *Atmospheric solids analysis probe*.



**Figura 12: Funcionamento das celas *trap*, TWIM e *transfer*.**<sup>35</sup>

Essa configuração adotada no Synapt provê uma grande versatilidade ao equipamento, uma vez que as celas *trap* e *transfer* operam a pressões semelhantes a celas de colisão típicas e dessa forma experimentos de fragmentação por CID (dissociação induzida por colisão) podem ser realizados em ambas as celas. Assim, é possível separar por mobilidade os íons produtos da fragmentação realizada na cela *trap*, ou fragmentar na cela *transfer* os íons separados por mobilidade, gerando assim um espectro de massas de íons produtos para cada *drift time*, ou mesmo realizar experimentos utilizando a fragmentação em ambas as celas *trap* e *transfer*.

A primeira geração do Synapt possui um poder de resolução um pouco inferior aos equipamentos clássicos, devido principalmente ao seu comprimento de cela de mobilidade muito reduzido. Recentemente, uma segunda geração desse equipamento foi lançada (Synapt G2) incorporando melhorias que tornaram o poder de resolução de mobilidade iônica 4 vezes maior do que a versão original.<sup>39</sup>

Os experimentos de TWIM-MS referentes aos Capítulos 1 e 2 deste trabalho foram realizados em um equipamento da primeira geração do Synapt, localizado no Laboratório ThoMSON, porém os experimentos do Capítulo 3 foram realizados durante

um doutorado sanduíche nos EUA utilizando a segunda geração do equipamento: Synapt G2.

## **6. ANÁLISE DE ISÔMEROS POR IM-MS E TWIM-MS**

As aplicações da IM-MS tem se diversificado recentemente além do seu uso para monitoramento de explosivos, drogas ilícitas e agentes de guerra química, que foram as primeiras aplicações de grande interesse que a técnica encontrou. Uma das aplicações que a IM-MS tem encontrado é a análise de misturas complexas, principalmente de polímeros sintéticos.<sup>40-42</sup> Também tem sido utilizada em estudos da estrutura em fase gasosa de agregados<sup>43,44</sup> e de biomoléculas.<sup>45,46</sup> A IM-MS encontrou aplicação para o estudo de espécies supramoleculares, nesse caso, separando os compostos com diferentes estados de carga.<sup>47</sup>

Com relação a separação de isômeros, a IM-MS já foi usada para separação de anilinas,<sup>48</sup> carboidratos,<sup>49,50</sup> lipídeos,<sup>51</sup> drogas quirais,<sup>52</sup> drogas ilícitas,<sup>53</sup> monitoramento de reação de isomerização<sup>54</sup> e na separação de isômeros e confôrmeros de peptídeos.<sup>55,56</sup>

A separação de isômeros é um campo muito interessante de aplicação da IM-MS, já que a MS é baseada primariamente na medida de razões massa/carga ( $m/z$ ) e por isso enfrenta um desafio, muitas vezes insuperável, na tarefa de separar isômeros, que apesar de possuírem estrutura e propriedades distintas, possuem exatamente a mesma massa. As tentativas de distinção entre esses compostos por MS geralmente envolvem o emprego de estratégias como as baseadas em dissociação induzida por colisão (CID)<sup>57</sup>, em reações íon/molécula<sup>57,58</sup> e no método cinético.<sup>59,60</sup> Entretanto, essas estratégias não são gerais sendo necessário tratar caso por caso e, além disso, algumas vezes os isômeros apresentam reatividades em fase gasosa muito parecidas permanecendo indistinguíveis.

Apesar de a IM-MS já ter sido aplicada em diversos casos de separação de isômeros, sua grande aplicação continua sendo a separação e estudo da estrutura em fase

gasosa de confômeros de peptídeos e proteínas, que é uma área bastante vasta. Assim, ainda há muito o que ser explorado em termos de separações de isômeros por essa técnica e esse trabalho pretende abrir novas diretrizes nesse aspecto e servir de referência para trabalhos futuros.

## **7. OBJETIVOS GERAIS**

O objetivo principal deste trabalho é sugerir e explorar aplicações inéditas da IM-MS focando na separação e caracterização de isômeros.

No Capítulo 1 pretende-se mostrar uma aplicação mais simples e direta, que é o estudo de isômeros de porfirina substituída. Temos como objetivo investigar as diferenças de geometria espacial das espécies pela sua separação por mobilidade, e assim guiar futuros trabalhos nessa área.

O objetivo do Capítulo 2 é introduzir uma aplicação bastante inusitada por não envolver os parâmetros que geralmente são considerados por afetar a mobilidade dos íons (carga, massa e seção de choque). Assim, pretende-se iniciar um novo campo de aplicações da IM-MS que é o estudo de espécies com múltiplos sítios de protonação ou desprotonação (protômeros).

O Capítulo 3 tem como objetivo investigar uma aplicação de inquestionável importância, que é o estudo dos compostos presentes em petróleo. Pretende-se explorar o potencial da técnica IM-MS, focando principalmente na separação de isômeros, e investigar que tipo de informação relevante pode ser obtida a partir das análises de petróleo por IM-MS.

---

***CAPÍTULO 1***

***SEPARAÇÃO DE ISÔMEROS DE  
PORFIRINA SUBSTITUÍDA***

---

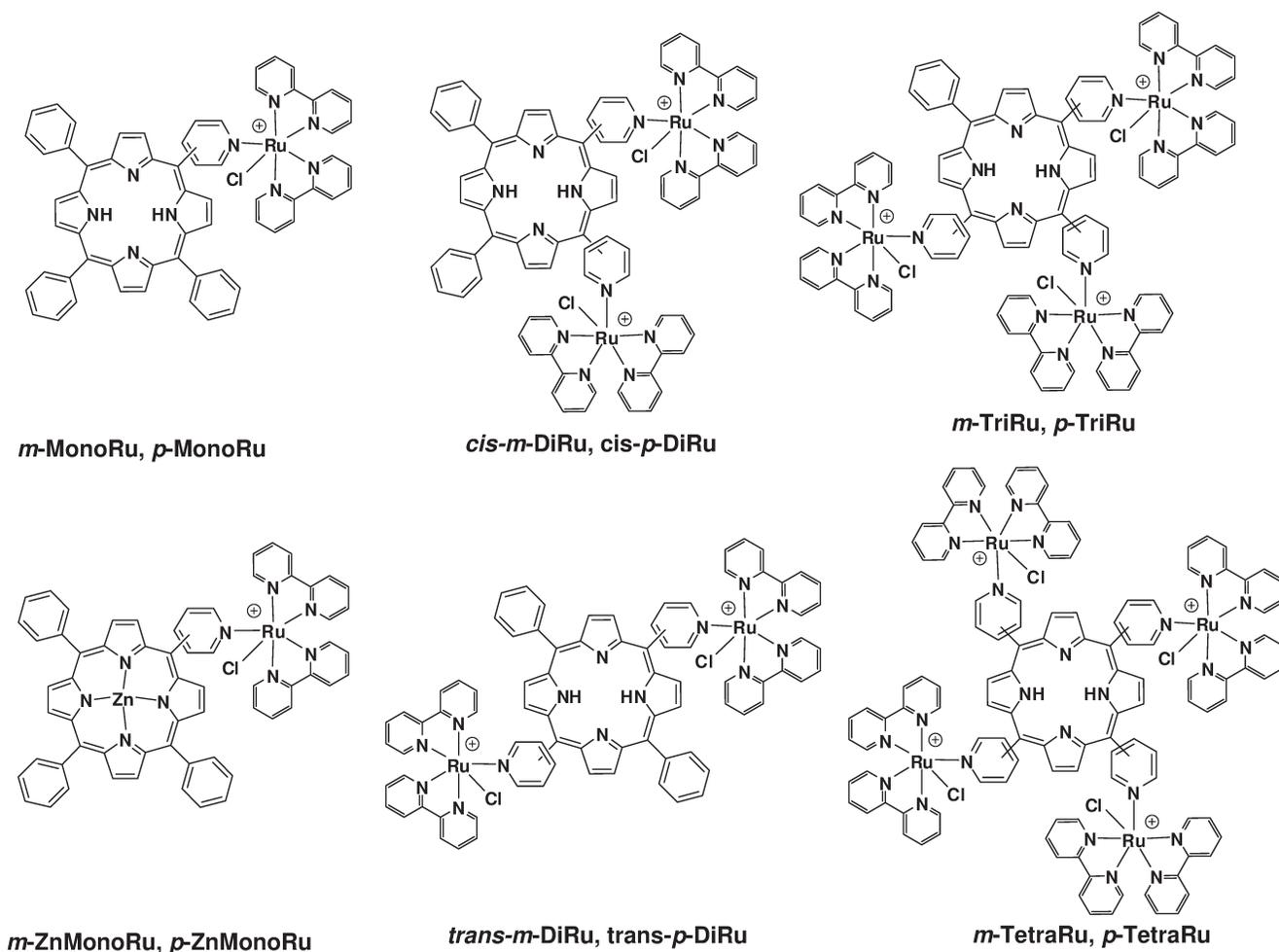


## 1.1 INTRODUÇÃO

A química supramolecular se baseia na associação de espécies moleculares, a fim de se obter determinada propriedade ou funcionalidade, tal como o reconhecimento molecular, automontagem, transporte e sinalização.<sup>61</sup> Porfirinas são formadas por quatro anéis pirrólicos ligados por ligações metilênicas e são moléculas de grande importância em vários campos da ciência, como biologia, medicina, química supramolecular, petroquímica, ciências dos materiais e nanomateriais.<sup>62-64</sup> Elas formam uma classe muito importante de macrocíclicos conjugados com 18 elétrons  $\pi$  e exibem propriedades catalíticas/eletrocatalíticas, fotoquímicas e fotofísicas únicas. Como o comportamento das espécies supramoleculares de porfirina é fortemente dependente do acoplamento eletrônico entre os grupos central e periférico, o uso de pontes moleculares que exibem propriedades fotoquímicas e fotofísicas pode aumentar o interesse de seu uso como foto sensibilizadores moleculares. Entre as várias espécies funcionais que podem ser utilizadas para este fim, os grupos contendo piridil são particularmente importantes devido às suas propriedades de coordenação bem conhecidas.<sup>65</sup> Assim, uma série de porfirinas foto-sensibilizadoras contendo complexos de metais de transição ou grupos metila ligados aos átomos N de piridinas periféricas tem sido investigada. Porfirinas catiônicas têm despertado um grande interesse há muito tempo pela sua capacidade de se ligar ao DNA<sup>66,67</sup> e danificá-lo devido a suas propriedades fotofísicas, por exemplo, agindo como foto-sensibilizadoras potenciais para a inativação fotodinâmica de vírus.<sup>68</sup> A interação das porfirinas com biomoléculas também pode ser finamente ajustada trabalhando-se com grupos isoméricos gerando topologias moleculares e estruturas 3D diferentes para a porfirina, como em porfirinas *para* e *meta meso*-substituídas. Engelmann e colaboradores sintetizaram uma série de porfirinas supramoleculares, obtidas pela coordenação de  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}]^+$  aos grupos periféricos de *meso*-fenil(piridil)porfirinas (**Esquema 1**), e verificaram que tais complexos apresentam excelentes propriedades catalíticas, eletrocatalíticas e fotoquímicas.<sup>69,70</sup>

Estas espécies apresentam massa relativamente baixa e alta densidade de carga e são estáveis em solução e/ou no estado sólido devido aos efeitos de solvatação. Entretanto, na fase gasosa os íons são isolados e, tais efeitos de estabilização não ocorrem, tornando os complexos instáveis devido a alta repulsão. Um trabalho realizado em nosso grupo de pesquisa mostrou que através da ionização por *electrospray* (ESI) é possível transferir brandamente da solução para a fase gasosa essa série de *meso*-tetra(4,3-piridil)porfirinas coordenadas a complexos bipyridínicos de rutênio (**Esquema 1**), possibilitando sua posterior caracterização por espectrometria de massas.<sup>71</sup> Uma vez que a espectrometria de massas inerentemente não distingue compostos de mesma *m/z*, a diferenciação de isômeros é feita em muitos casos através de estratégias baseadas na correlação entre a estrutura e a dissociação (ou reatividade) químicas através de experimentos de MS/MS<sup>72-74</sup> e de reações ion/molecula.<sup>75</sup> Tomazela *et al.*<sup>71</sup> mostraram que a dissociação dessa série de porfirinas rutenadas isoméricas ocorre pela liberação consecutiva dos complexos de  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}]^+$ , uma vez que a ligação mais lábil desses compostos é a Ru-N (entre o Ru e a piridina). Assim, o arranjo *meta-para* ou *cis-trans* (para as porfirinas di-substituídas) não afeta o espectro de ESI-MS/MS, não sendo possível diferenciar esses isômeros por esta estratégia e sua adequada separação e caracterização torna-se uma tarefa desafiadora.

Por este motivo, a IM-MS pode ser uma técnica interessante para a diferenciação entre esses isômeros posicionais *meta-para* e *cis-trans*. Além disso, a IM-MS pode fornecer informação sobre a geometria espacial dessas espécies, que juntamente com a distribuição de cargas, é uma das responsáveis pelas propriedades de interação intermolecular entre as espécies ou com outra espécie molecular.



Esquema 1: Estrutura das porfirinas estudadas.

## 1.2 OBJETIVO

Investigar, através da espectrometria de massas acoplada a mobilidade iônica, as estruturas tridimensionais e a possibilidade em resolver isômeros posicionais de piridil porfirinas rutenadas através da utilização dos *drift gases* N<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>.

### 1.3 PARTE EXPERIMENTAL

As espécies supramoleculares das porfirinas isoméricas foram sintetizadas pelo grupo do Prof. Koiti Araki (IQ-USP), por procedimentos conhecidos<sup>69,76</sup> que não serão descritos neste trabalho.

Os experimentos de TWIM-MS foram realizados usando o espectrômetro de massas Synapt (Waters Corp., Manchester, UK) equipado como uma fonte de ESI. Soluções metanólicas das amostras foram inseridas diretamente na fonte de ESI, no modo positivo de íons a uma velocidade de fluxo de 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  através de uma bomba de seringa. As condições instrumentais da fonte de ESI foram: voltagem do capilar 3,0 kV, cone de amostragem 30 V, cone de extração 3 V, temperatura da fonte 100 °C, temperatura de dessolvatação 100 °C, fluxo do gás de dessolvatação  $\text{N}_2$  400  $\text{mL min}^{-1}$ . Para a separação por mobilidade, a cela foi operada a pressão de 1,0 mbar de  $\text{N}_2$  ou de  $\text{CO}_2$ . Quanto maior a pressão do gás na cela de mobilidade, melhor é a resolução, entretanto, a sensibilidade diminui. Assim, o valor de 1,0 mbar foi utilizado por resultar em uma boa relação resolução/sensibilidade.

Diversos valores de velocidade e altura das ondas de potencial foram testados, entretanto observou-se que esses parâmetros não influenciaram significativamente na resolução dos compostos. Assim, procurou-se otimizar esses parâmetros de forma a permitir que o pico de mobilidade do maior número de compostos estivessem centrados na janela de 0 – 9 milissegundos. Porém, como não foi possível encontrar uma condição ideal para todos os compostos, otimizou-se uma condição para as porfirinas multi-substituídas e outra para as mono-substituídas. Então, quando  $\text{N}_2$  foi usado, a velocidade das ondas de potencial foi ajustada a 300 m/s; e altura das ondas foi 13,6 V para as porfirinas multi-substituídas ou 22,0 V para as porfirinas mono-substituídas. Para facilitar a comparação visual entre os resultados utilizando  $\text{N}_2$  e  $\text{CO}_2$ , para o segundo gás os parâmetros das ondas de potencial foram ajustados de forma que o primeiro pico a eluir apresentasse o mesmo *drift time* obtido quando  $\text{N}_2$  foi usado. Assim, quando  $\text{CO}_2$

foi utilizado, a velocidade e altura das ondas foram ajustadas a 300 m/s e 27,0 V para as porfirinas multi-substituídas e 182 m/s e 30 V para as porfirinas mono-substituídas.

A resolução pico-a-pico ( $R_{p-p}$ ) mede a habilidade de uma cela de mobilidade em resolver dois íons, e é definida como:<sup>77</sup>

$$R_{p-p} = \frac{2(t_{d2}-t_{d1})}{W_{b1}+W_{b2}} \quad \text{(Equação 1)}$$

onde  $t_d$  são os *drift times* dos dois picos e  $W_b$  é a largura do pico na linha de base.  $R_{p-p}$  é uma função da separação dos picos, medida pelo fator de separação ( $\alpha$ ), e também da largura dos picos, medida pelo poder de resolução ( $R_p$ ):<sup>77</sup>

$$\alpha = \frac{t_{d2}}{t_{d1}} \quad \text{(Equação 2)}$$

$$R_p = \frac{t_d}{W_{1/2}} \quad \text{(Equação 3)}$$

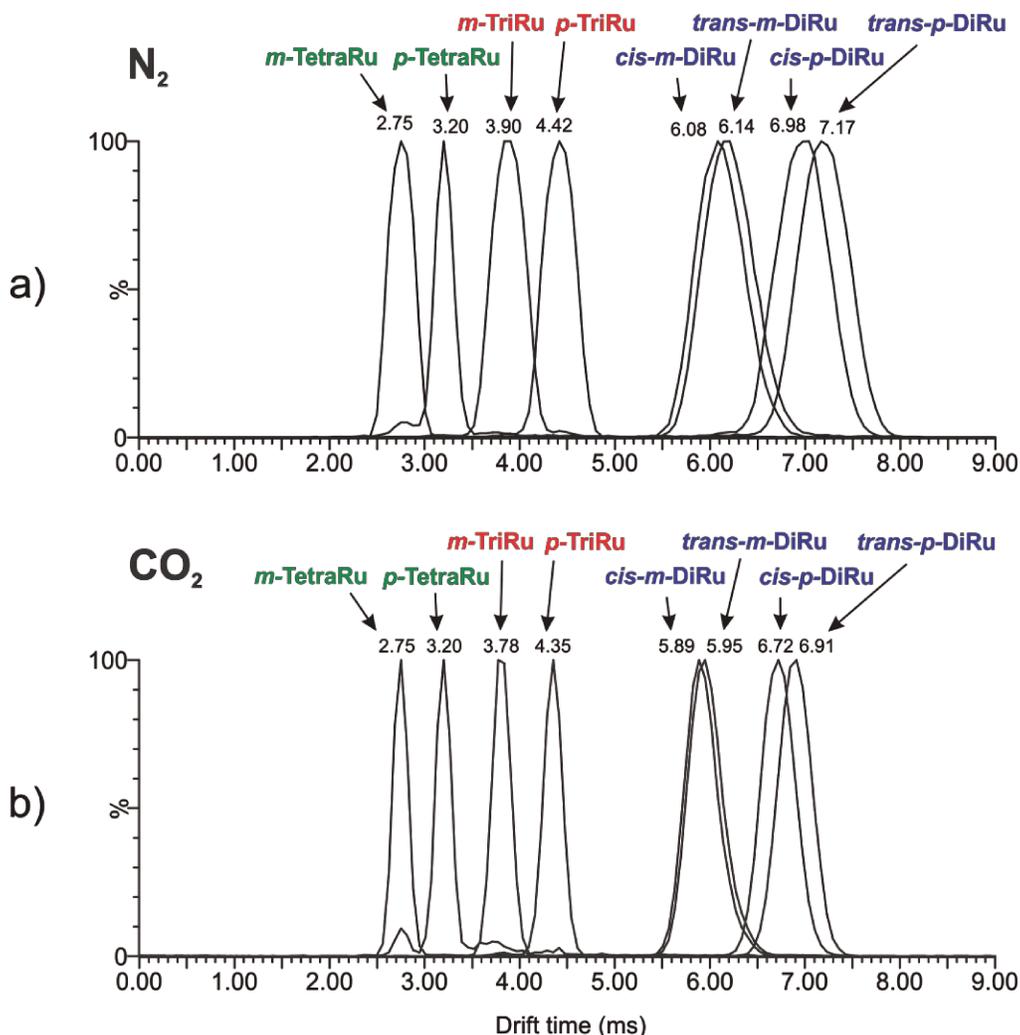
onde  $W_{1/2}$  é a largura do pico a meia altura.  $R_{p-p}$  se relaciona com  $\alpha$  and  $R_p$  da seguinte forma:

$$R_{p-p} = 0.589 R_p \frac{\alpha-1}{\alpha} \quad \text{(Equação 4)}$$

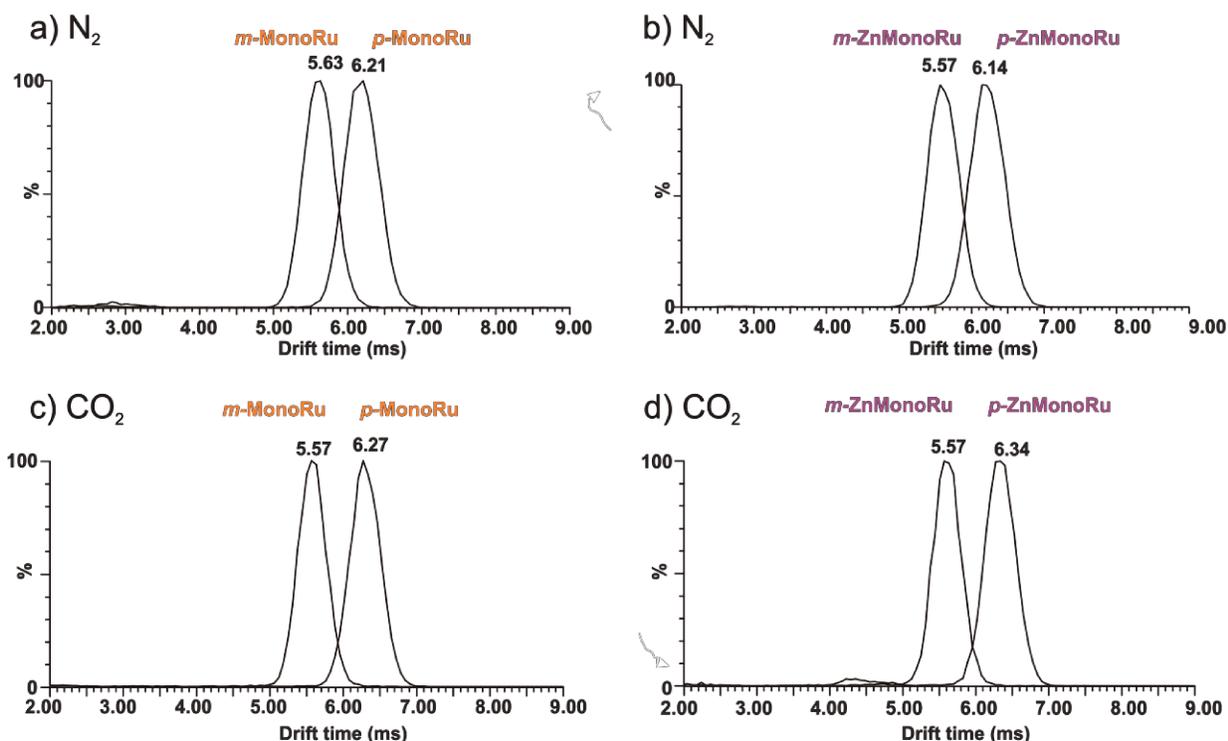
## 1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As soluções metanólicas de cada complexo de porfirina foram individualmente analisadas por ESI-TWIM-MS usando  $N_2$  como *drift gas*. A **Figura 13a** mostra os espectros de TWIM sobrepostos para as porfirinas di, tri e tetra rutenadas (DiRu, TriRu e TetraRu), enquanto que a **Figura 14a** mostra os espectros de TWIM sobrepostos para as porfirinas mono-rutenadas (MonoRu) livres e a **Figura 14b** para as porfirinas mono-rutenadas complexadas com zinco (ZnMonoRu). É importante observar que nos experimentos com as porfirinas mono rutenadas (**Figura 14**), a altura da onda de potencial foi ajustada para acelerar os íons monocarregados. Apesar do seu grande volume e massa, cada substituinte  $[Ru(bpy)_2Cl]^+$  adicionado a porfirina confere-na uma

carga extra e quanto maior é a carga do complexo, mais acelerado ele é devido a maior força de atração exercida pelo campo elétrico da cela de TWIM. Dessa forma, os complexos TetraRu (4+) apresentam *drift times* menores, seguidos por TriRu (3+) e DiRu (2+). A **Figura 13** mostra que todos os isômeros *meta* (*m*-Ru) e *para* (*p*-Ru) foram propriamente resolvidos por TWIM, sendo que os isômeros *meta* sempre apresentam *drift time* de menor valor. Essa tendência sugere que os isômeros *meta* são mais compactos do que os isômeros *para* atrevesando, portanto, consideravelmente mais rápido a cela de mobilidade.

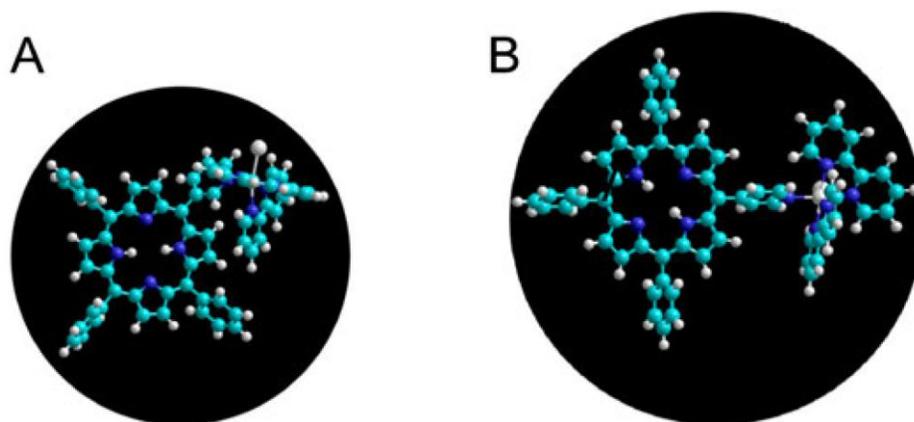


**Figura 13: Mobiligramas sobrepostos para as porfirinas multi-rutenadas: *m*-TetraRu, *p*-TetraRu, *m*-TriRu, *p*-TriRu, *cis*-*m*-DiRu, *cis*-*p*-DiRu, *trans*-*m*-DiRu e *trans*-*p*-DiRu usando (a)  $N_2$  e (b)  $CO_2$  como *drift gas*.**



**Figura 14:** Mobiligramas sobrepostos para as porfirinas mono-rutenadas livres: *m*-MonoRu e *p*-MonoRu; e mono-rutenadas complexadas com zinco: *m*-ZnMonoRu e *p*-ZnMonoRu, usando (a-b) N<sub>2</sub> e (c-d) CO<sub>2</sub> como *drift gas*.

As estruturas mais compactas dos isômeros *meta* também foram apontadas teoricamente pela otimização da estrutura, como a **Figura 15** mostra para a *m*-MonoRu e *p*-MonoRu. De fato, nas espécies *meta* substituídas o complexo de rutênio está mais deslocado em direção ao volume de rotação do anel porfirínico formando um ângulo de 120° ao invés de 180° com a posição *meso* da porfirina, gerando assim uma estrutura mais compacta.



**Figura 15: Estruturas otimizadas para as espécies monocarregadas *m*-MonoRu e *p*-MonoRu (A, B) usando o método MM-Plus e parâmetro de convergência de  $1 \times 10^{-4}$  kcal /Å,**

Já os isômeros di-substituídos *cis/trans* apresentaram *drift times* muito parecidos (**Figura 13**), indicando que a substituição em *cis* ou em *trans* não altera significativamente a seção de choque do composto, tornando, assim, impossível a resolução por TWIM-MS. Dessa forma, fica claro que o isomerismo *meta/para* no substituinte piridil tem um efeito mais pronunciado na seção de choque desses complexos catiônicos de porfirina do que o isomerismo *cis/trans* (**Esquema 1**).

As soluções metanólicas de todos complexos de porfirina também foram analisadas por ESI-TWIM-MS utilizando CO<sub>2</sub> como *drift gas*. Para a melhor visualização de como a separação das espécies e os *drift times* são afetados pela troca do *drift gas*, as **Figura 13b** e **Figura 14c-d** mostram os espectros de *drift time* adquiridos em CO<sub>2</sub> com as condições ajustadas de forma que o íon mais rápido (*m*-TetraRu ou *m*-ZnMonoRu) apresentasse *drift time* similar ao obtido em N<sub>2</sub> (2.75 ou 5.57 ms). Comparando-se as **Figura 13a** e **13b**, observa-se que a mesma ordem de eluição e *drift times* foram obtidos para todas as espécies ao utilizar tanto N<sub>2</sub> como CO<sub>2</sub>. No entanto, a utilização do CO<sub>2</sub> claramente gera picos consideravelmente mais finos, ou seja, com melhor poder de resolução ( $R_p$ ) levando conseqüentemente a uma melhor resolução pico-a-pico ( $R_{p-p}$ ).

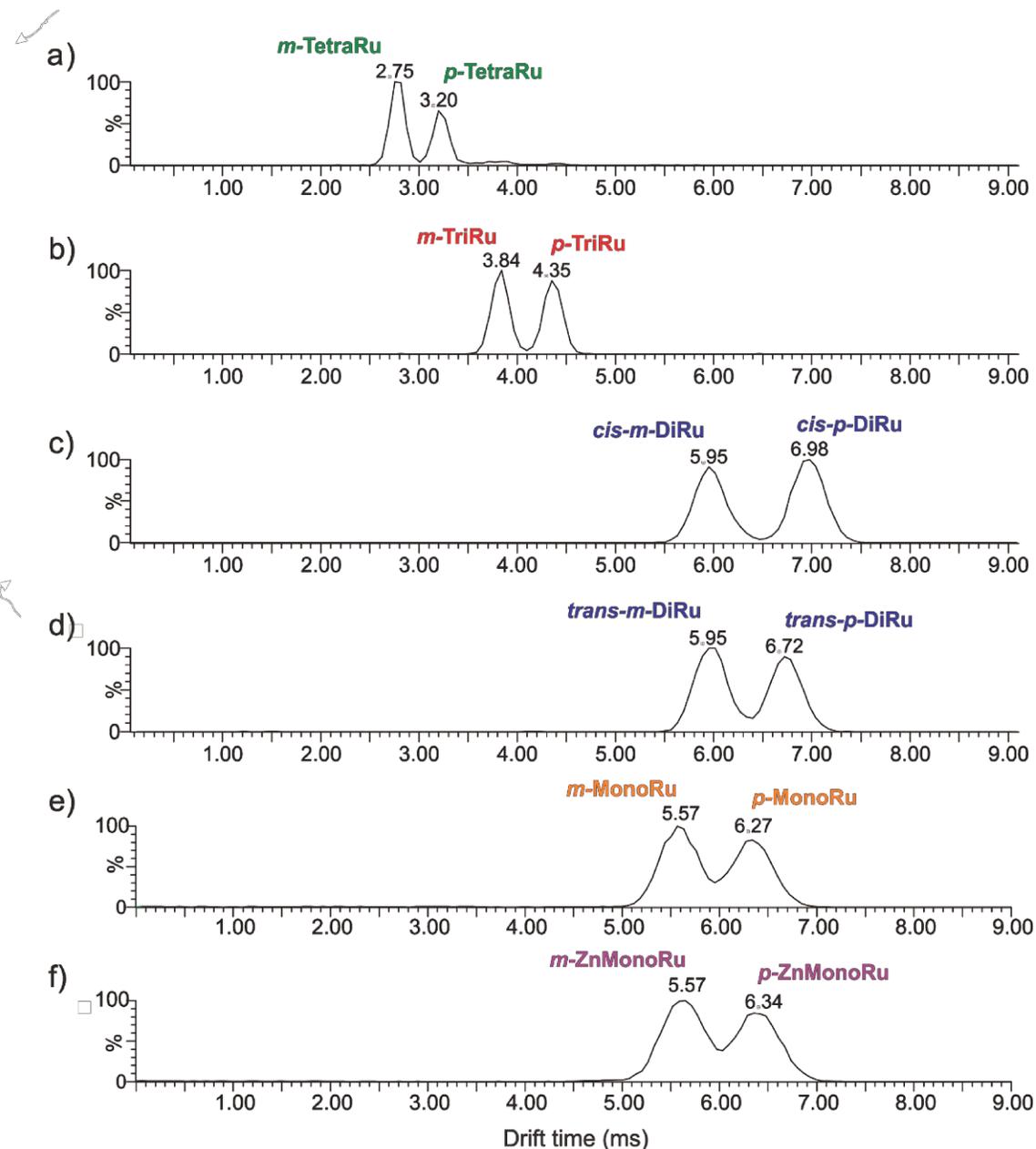
A **Tabela 1** resume os valores de  $R_{p-p}$ ,  $\alpha$  e  $R_p$  calculados tanto em  $N_2$  como em  $CO_2$ . Como discutido anteriormente, observa-se que o  $CO_2$  gera valores de  $R_{p-p}$  consideravelmente melhores do que o  $N_2$  para todos os pares de isômeros *meta/para*. Nota-se o valor extraordinário de  $R_p$  (chegando a  $R_p = 16$ ) para uma cela pequena (18,5 cm comprimento), que normalmente apresenta  $R_p \approx 10$ . A resolução entre os picos ( $R_{p-p}$ ) pode ser melhorada tanto ao melhorar o fator de separação ( $\alpha$ ), ao melhorar o poder de resolução ( $R_p$ ), ou ambos. Observa-se ao comparar os valores apresentados na **Tabela 1** que o fator de separação é similar para ambos  $N_2$  e  $CO_2$  ( $\alpha \approx 1,1$ ), porém, valores de  $R_p$  significativamente melhores foram obtidos com  $CO_2$ . Conclui-se, portanto, que o melhor valor de  $R_{p-p}$  obtido em  $CO_2$  para esses compostos deve-se principalmente ao afinamento dos picos (compactamento da nuvem de íons).

**Tabela 1: Resolução pico-a-pico ( $R_{p-p}$ ), fator de separação ( $\alpha$ ) e poder de resolução ( $R_p$ )<sup>a</sup> para cada par isomérico.**

Pares isoméricos	$N_2$			$CO_2$		
	$R_{p-p}$	$R_p^a$	$\alpha$	$R_{p-p}$	$R_p^a$	$\alpha$
<i>m</i> -MonoRu / <i>p</i> -MonoRu	0,43	10,24	1,10	0,56	11,37	1,13
<i>m</i> -ZnMonoRu / <i>p</i> -ZnMonoRu	0,42	10,92	1,10	0,63	11,14	1,14
<i>cis-m</i> -DiRu / <i>cis-p</i> -DiRu	0,56	9,85	1,14	0,74	15,50	1,14
<i>trans-m</i> -DiRu / <i>trans-p</i> -DiRu	0,70	9,03	1,17	0,89	14,17	1,16
<i>m</i> -TriRu / <i>p</i> -TriRu	0,65	8,95	1,15	0,91	15,12	1,15
<i>m</i> -TetraRu / <i>p</i> -TetraRu	0,71	8,09	1,16	1,00	13,75	1,16
<i>cis-m</i> -DiRu / <i>trans-m</i> -DiRu	0,02	9,85	1,00	0,05	15,50	1,01
<i>cis-p</i> -DiRu / <i>trans-p</i> -DiRu	0,13	10,26	1,03	0,18	16,39	1,03

<sup>a</sup> calculado para o isômero mais rápido do par.

Misturas dos pares isoméricos também foram testadas (**Figura 16**), e através da técnica de TWIM-MS usando CO<sub>2</sub>, foi possível separar todos os isômeros *meta/para*, sendo que os isômeros multi-rutenados foram separados praticamente na linha de base. Assim, a técnica mostra-se promissora para a resolução de isômeros de porfirina *meta* ou *para* substituída, principalmente com o uso de CO<sub>2</sub> como *drift gas*.



**Figura 16:** Mobiligramas para misturas dos isômeros a) *m*-TetraRu e *p*-TetraRu, b) *m*-TriRu e *p*-TriRu, c) *cis*-*m*-DiRu e *cis*-*p*-DiRu, d) *trans*-*m*-DiRu e *trans*-*p*-DiRu, e) *m*-MonoRu e *p*-MonoRu, f) *m*-ZnMonoRu e *p*-ZnMonoRu usando CO<sub>2</sub> a 1 mbar como *drift gas*.

## 1.5 CONCLUSÃO

Neste capítulo estudamos a separação de pares isoméricos (*meta/para* e *cis/trans*) de uma série de porfirinas rutenadas catiônicas pela técnica TWIM-MS usando N<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> como *drift gas*. Através das análises por TWIM-MS, verificou-se que as porfirinas substituídas em *meta* apresentam estrutura tridimensional mais compacta do que seus isômeros substituídos em *para*; enquanto que as porfirinas isoméricas substituídas em *cis/trans* apresentam estruturas tridimensionais com seção de choque muito parecida. Assim, os isômeros *meta/para* foram resolvidos na linha de base, entretanto, a resolução dos isômeros *cis/trans* não foi possível por TWIM-MS usando tanto N<sub>2</sub> como CO<sub>2</sub>. O CO<sub>2</sub> forneceu melhor resolução pico-a-pico  $R_{p-p}$  para todos os pares de isômeros *meta/para* em comparação com N<sub>2</sub>. Essa melhora é observada essencialmente pelo afinamento substancial dos picos, ou seja, pela melhora do poder de resolução ( $R_p$ ) devido ao compactamento das nuvens de íons, enquanto que o fator de separação ( $\alpha$ ) foi essencialmente o mesmo com o uso dos dois gases. Esses resultados devem guiar tentativas futuras de resolver outras misturas de porfirinas isoméricas e espécies relacionadas por TWIM-MS.



---

***CAPÍTULO 2***

***PROTÔMEROS: SEPARAÇÃO E  
CARACTERIZAÇÃO***

---



## 2.2 INTRODUÇÃO

A determinação dos sítios de protonação ou desprotonação intrinsecamente mais favoráveis em moléculas que exibem múltiplos sítios básicos ou ácidos é uma tarefa de grande relevância fundamental e prática. Diversos trabalhos têm mostrado a importância do estudo de protômeros (moléculas que diferem apenas pelo sítio de protonação ou desprotonação) em compostos interestelares,<sup>78</sup> peptídeos,<sup>79</sup> nicotina,<sup>80</sup> fluorobenzeno,<sup>81</sup> entre outros.<sup>82,83</sup> Porém a tarefa analítica envolvendo a detecção e caracterização em fase gasosa de protômeros tem sido desafiante. Diversas técnicas e cálculos teóricos têm sido empregados para a caracterização de protômeros na fase gasosa, porém resultados contrastantes têm sido relatados para vários compostos,<sup>78-83</sup> incluindo a anilina.

A anilina é usada como modelo clássico para estudos de sítio preferencial de protonação em fase gasosa, e tem sido assunto de inúmeras publicações há bastante tempo.<sup>79-85</sup> Ela possui dois sítios de protonação mais favoráveis, no átomo de N do grupo NH<sub>2</sub> ou no átomo de C do anel benzeno na posição *para* ao grupo amina. No caso da anilina, o grupo NH<sub>2</sub> a princípio seria mais básico, entretanto, por ser um grupo doador de elétrons, ele estabiliza a protonação nas posições *orto* e *para* do fenil; ao mesmo tempo que o fenil, por ser um grupo retirador de elétrons, desestabiliza a protonação no NH<sub>2</sub>.<sup>84</sup>

Cálculos teóricos foram extensivamente empregados na tentativa de determinar o sítio de protonação dessa molécula, porém, tanto resultados apontando a preferência para a protonação no nitrogênio<sup>85,86</sup> como para a protonação no carbono<sup>87</sup> foram obtidos, dependendo do nível de cálculo utilizado. A dificuldade em determinar o sítio de protonação da anilina deriva da pequena diferença de energia entre os dois protômeros formados, de apenas 1-3 kcal mol<sup>-1</sup>.<sup>87</sup>

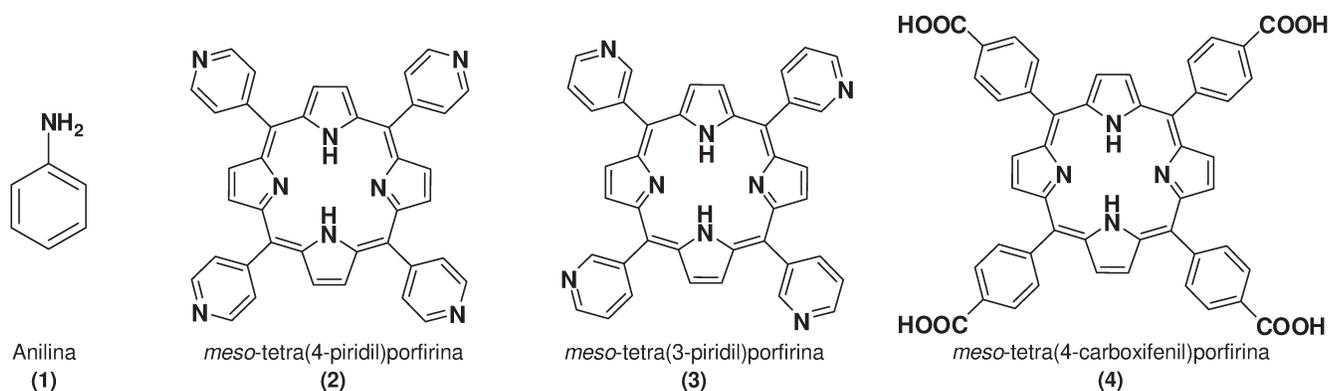
Reações íon-molécula também foram utilizadas, indicando a coexistências de dois protômeros de anilina na fase gasosa, sendo o N-protonado cineticamente favorecido.<sup>88</sup> Mais recentemente, reações íon-molécula de halobenzenos com amônia também

relataram produzir predominantemente anilina N-protonada, caracterizados por colisão e ativação.<sup>89</sup>

Apesar do extensivo trabalho executado com essa molécula protótipo, a exata proporção dos protômeros de anilina amostrados da solução e formados em fase gasosa permanece incerta. Em 1990, Karpas *et al.*,<sup>90</sup> observou dois picos de mobilidade referentes à anilina protonada em um estudo por IM-MS. Os picos foram atribuídos tentativamente aos isômeros protonados no N e no anel benzênico, entretanto a caracterização não foi realizada.

As *meso*-tetrapiridilporfirinas também são sistemas modelos intrigantes devido a possibilidade da presença de múltiplos sítios de protonação. É possível adicionar até quatro prótons aos grupos piridil periféricos e dois prótons ao anel porfirina permitindo a formação de diversos protômeros. Outro sistema interessante são as *meso*-tetracarboxifenilporfirinas, que apresentam múltiplos sítios de desprotonação, nos grupos carboxílicos periféricos e no anel porfirina. A formação de protômeros de porfirinas substituídas já foi observada em solução,<sup>91,92</sup> porém nunca foi investigada em fase gasosa.

Nesse capítulo, mostramos a detecção e separação de protômeros de anilina e de protômeros de porfirinas *meso*-substituídas (**Esquema 2**) por TWIM-MS, seguida da caracterização por experimentos de dissociação induzida por colisão (CID) após a separação por TWIM.



**Esquema 2: Estrutura das espécies estudadas.**

## 2.2 OBJETIVO

Estudar espécies com múltiplos sítios de protonação ou desprotonação, separando os protômeros por mobilidade iônica e caracterizando essas espécies por experimentos de MS/MS.

## 2.3 PARTE EXPERIMENTAL

### 2.3.1 TWIM-MS(/MS)

Os experimentos de TWIM-MS(/MS) foram realizados usando o equipamento Synapt (Waters Corp., Manchester, UK) equipado como uma fonte de ESI. Os compostos básicos (anilina e piridil-porfirinas) foram analisados no modo positivo de íons, enquanto que os compostos ácidos (carboxifenil-porfirina) foram analisados no modo negativo de íons. As amostras foram solubilizadas em metanol com 0,1 % de ácido fórmico para as análises no modo positivo, ou em metanol com 0,1 % de hidróxido de amônio para análises no modo negativo. As soluções das amostras foram, então, inseridas diretamente na fonte de ESI através de uma bomba de seringa a uma velocidade de fluxo de 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ . As condições instrumentais da fonte de ESI foram: voltagem do capilar 3,0 kV (modo positivo) ou 2,5 kV (modo negativo), cone de amostragem 30 V, cone de extração 3 V, temperatura da fonte 100 °C, temperatura de dessolvatação 100 °C, fluxo do gás de dessolvatação  $\text{N}_2$  400  $\text{mL min}^{-1}$ .

Em todos os experimentos, os íons de interesse foram selecionados/filtrados por sua  $m/z$  no quadrupolo, antes da separação por mobilidade. A pressão da cela de mobilidade foi otimizada de forma a se obter uma boa resolução entre as espécies a serem separadas, sem comprometer a sensibilidade e sem alterar a razão de abundância natural das espécies. A cela foi então operada a pressão de 1,0 mbar de  $\text{CO}_2$ , com

velocidade e altura das ondas de potencial otimizadas para cada espécie estudada de forma que os picos de mobilidade dos íons estivessem centrados na janela de *drift time*.

Para os experimentos de MS, as celas *trap* e *transfer* foram operadas a pressão de  $10^{-2}$  mbar de argônio a 6 e 4 V, respectivamente. Para os experimentos de MS/MS, os parâmetros da cela *trap* foram mantidos enquanto que a energia da cela *transfer* foi aumentada para valores otimizadas para cada espécie dependendo da estabilidade dos íons fragmentos tal que dissociação suficiente fosse alcançada para determinação das estruturas. A **Tabela 2** resume os principais parâmetros de onda e energia da cela *transfer* utilizados.

**Tabela 2: Parâmetros da onda de potencial (velocidade e altura) otimizados para as separações por TWIM, e valores de energia de colisão ajustados para os experimentos de MS/MS.**

Compostos	<i>m/z</i>	Espécies	Velocidade (m/s)	Altura (V)	Transfer CE (V)
Anilina	94	$[M + H]^+$	250	30	25
tetra(3-piridil)porfirina	619	$[M + H]^+$	180	30	70
tetra(4-piridil)porfirina	619	$[M + H]^+$	180	30	70
tetra(3-piridil)porfirina	310	$[M + 2H]^{2+}$	300	25	40
tetra(4-piridil)porfirina	310	$[M + 2H]^{2+}$	300	25	40
tetra(4-carboxifenil)porfirina	789	$[M - H]^-$ $[2M - 2H]^{2-}$	300	30	40
tetra(4-carboxifenil)porfirina	394	$[M - 2H]^{2-}$	300	30	22

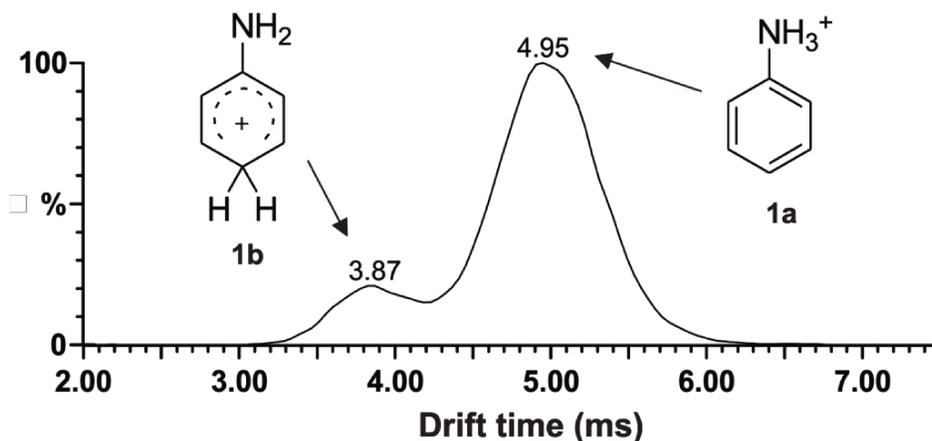
### 2.3.2 Cálculos de seção de choque teórica

A otimização estrutural foi realizada através do *software* Gaussian 03<sup>93</sup> usando a teoria do funcional da densidade (*density function theory* - DFT) no modelo B3LYP/6-

311G(d,p). As seções de choque teóricas foram calculadas usando o *software* de código aberto MOBCAL<sup>94</sup> através do algoritmo Método da Trajetória (*Trajectory Method* - TM).

## 2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O mobiligrama para a anilina protonada ( $m/z$  94,07) é mostrado na **Figura 17**, no qual observa-se dois picos resolvidos em 3,87 e 4,95 ms com uma razão de abundância de íons por volta de 1:5. Essa separação sugere que dois protômeros de anilina coexistem a temperatura ambiente na cela de mobilidade, como observado anteriormente por Karpas *et al.*<sup>90</sup>



**Figura 17:** ESI(+)-TWIM-MS para os protômeros de  $m/z$  94 amostrados de uma solução metanólica ácida (pH 4) de anilina.

A fim de caracterizar os dois protômeros separados, experimentos de espectrometria de massas sequencial (MS/MS) foram realizados na cela de colisão *transfer*, a qual está alocada entre a cela de mobilidade e o analisador de massas TOF. Dessa forma, para cada pacote de íons (pico) separado por mobilidade obtém-se um espectro de massas de íons produtos (**Figura 18**). O protômero mais lento (*drift time* 4,95 ms) e mais abundante dissocia quase exclusivamente pela perda neutra de NH<sub>3</sub>

gerando o cátion fenila de  $m/z$  77, que fragmenta-se posteriormente gerando o íon de  $m/z$  51,05 via perda neutra de acetileno( $C_2H_2$ ) (**Esquema 3**).<sup>23</sup> Note que essa perda quase exclusiva de  $NH_3$  é consistente com a espécie N-protonada **1a**. O protômero menos abundante encontrado em 3,87 ms dissocia por perda neutra de  $NH_3$  e  $C_2H_2$  (**Figura 18b**) mas também por outros caminhos competitivos indicando protonação no anel (**1b**), como retratado no **Esquema 3**. A perda de  $NH_3$  a partir de **1b** parece requerer a isomerização **1b**  $\rightarrow$  **1a**, e pode explicar os resultados contrastantes observados previamente para os protômeros de anilina amostrados com diferentes graus de ativação por colisão.

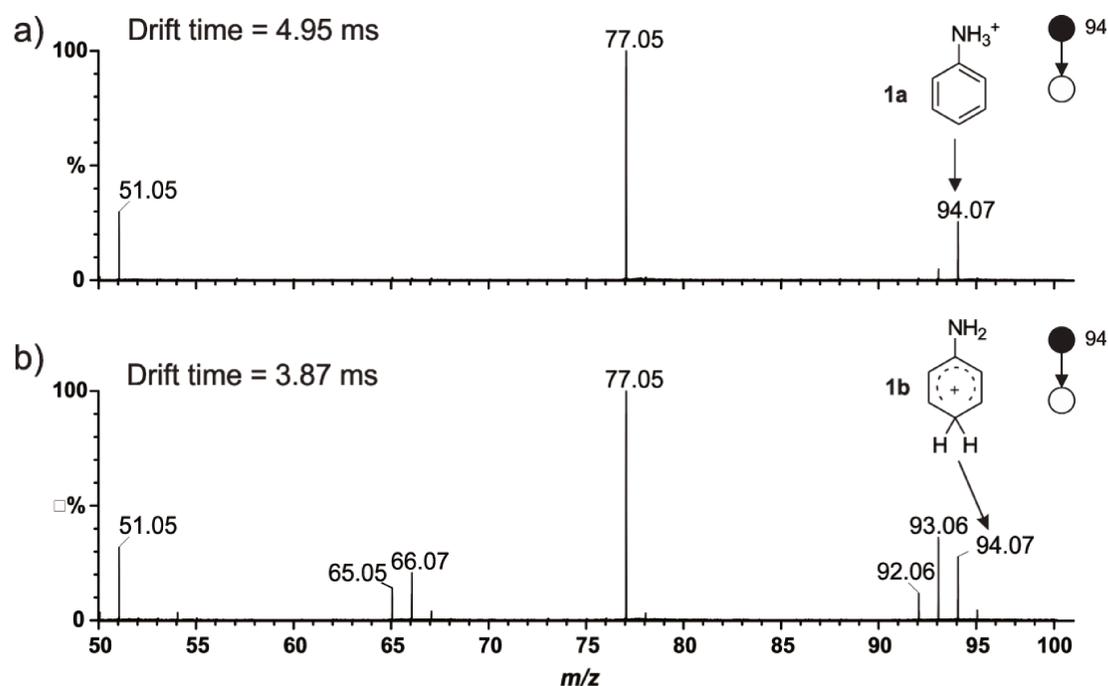
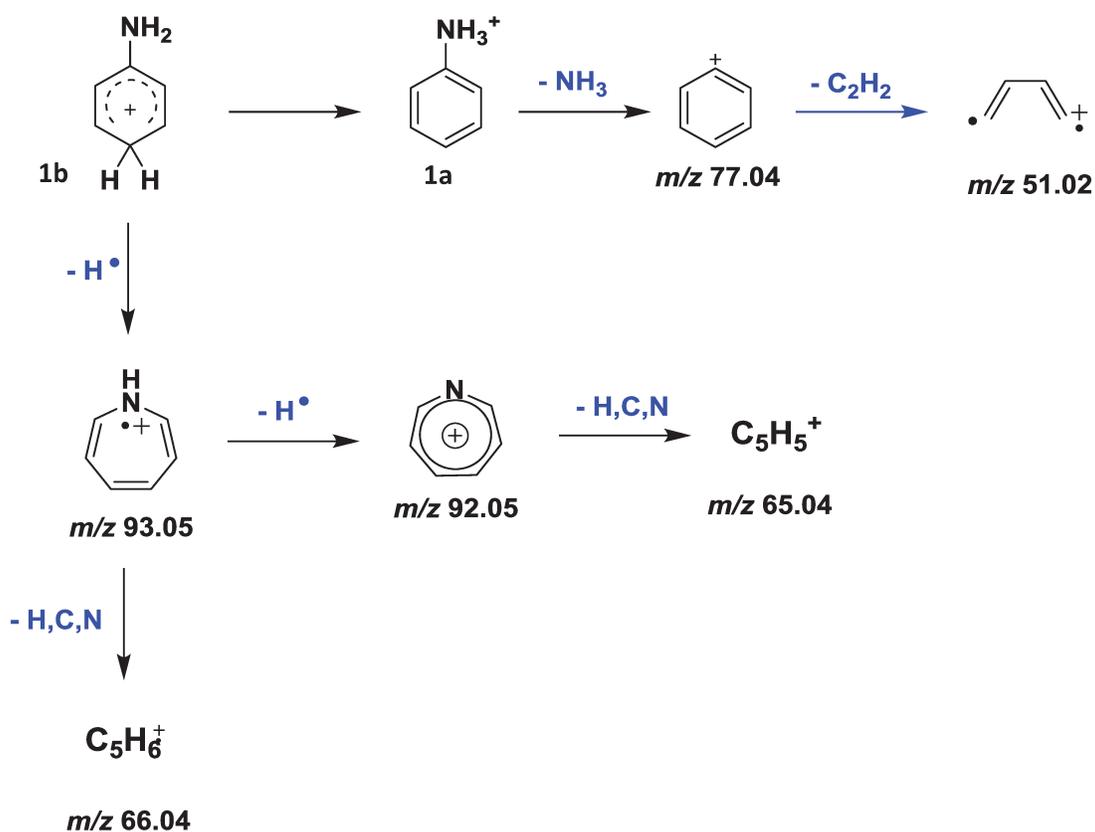


Figura 18: ESI(+)-TWIM-MS/MS dos dois protômeros de anilina de  $m/z$  94,07.



**Esquema 3: Esquema de fragmentação da anilina protonada no anel (1b).**

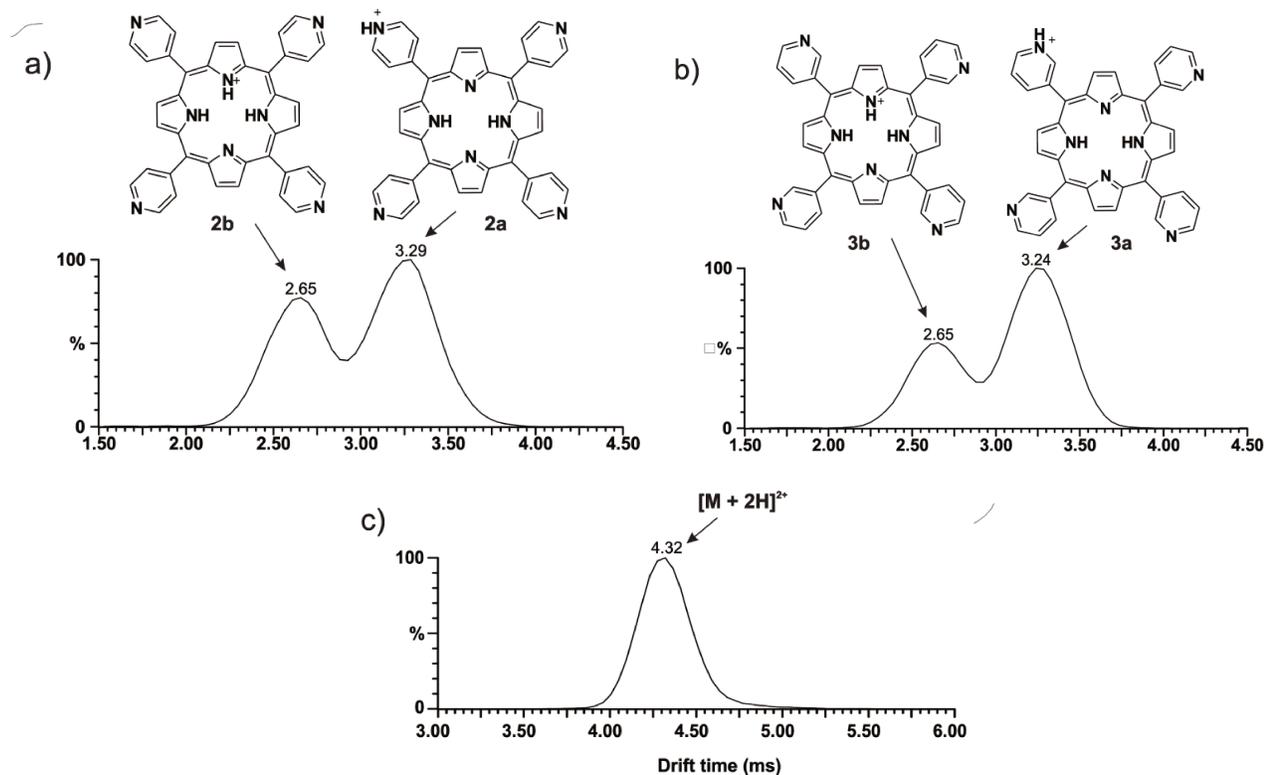
A seção de choque teórica ( $\Omega$ ) calculada para **1a** e **1b** ( $54,10 \pm 4,20 \text{ \AA}^2$  e  $53,10 \pm 4,20 \text{ \AA}^2$ , respectivamente) indica que a protonação em diferentes sítios causa uma alteração pequena ( $\sim 1,8 \%$ ) no volume e formato do íon. Portanto, a separação obtida para os protômeros é surpreendente considerando os fatores inerentes aos íons que normalmente são considerados por afetar a sua mobilidade, que são a massa, carga e  $\Omega$  (equação de Mason-Schamp). Entretanto, em alguns casos além dos aspectos físicos na dinâmica das colisões íon-molécula que ocorrem dentro da cela de mobilidade, deve-se considerar a interação química entre os íons e as moléculas do gás. No caso das anilinas, os cálculos teóricos mostraram uma grande diferença de momento de dipolo calculado para cada protômero: 7,1 D para a anilina protonada no N e 1,6 D para a anilina protonada no anel. Isso indica distribuições de carga contrastantes entre os protômeros: enquanto a carga está localizada no grupo  $\text{NH}_3^+$  para a anilina N-protonada, ela está delocalizada no anel benzeno para a C-protonada. Íons com distribuição de carga

localizada e alta polaridade, como a anilina N-protonada, apresentam maior facilidade em distorcer a nuvem eletrônica das moléculas do *drift gas* (CO<sub>2</sub>). Assim, formam heterodímeros íon-molécula com um tempo de vida mais longo que sobrevivem durante vários caminhos livres, enquanto que os íons com carga mais delocalizadas, como a anilina C-protonada, estão predominantemente livres entre as colisões. Por esse motivo, a anilina N-protonada (em 4,95 ms) leva um tempo maior para atravessar a cela de mobilidade e assim é separada da anilina C-protonada (em 3,87 ms).

As *meso*-tetrapiridilporfirinas (**Esquema 2**) também são sistemas modelos intrigantes devido a possibilidade da presença de múltiplos sítios de protonação. É possível adicionar até quatro prótons aos grupos piridil periféricos e dois prótons ao anel porfirina permitindo a formação de diversos protômeros. Portanto, a técnica de TWIM-MS foi utilizada para resolver e caracterizar as espécies presentes nas misturas desses protômeros. Soluções metanólicas dos isômeros *meso*-tetra(4-piridil)porfirina (**2**) e *meso*-tetra(3-piridil)porfirina (**3**) foram analisadas individualmente por ESI(+)-TWIM-MS. Dois picos foram observados (**Figura 19a-b**) para cada um dos isômeros monoprotônados  $[M + H]^+$  de  $m/z$  619,24 sugerindo a coexistência de dois protômeros distintos. Esse resultado indica que a protonação ocorreu não apenas no sítio mais básico dos substituintes piridil periféricos, mas também no anel porfirínico interno. Em contraste, a espécie diprotônada  $[M + 2H]^+$  de  $m/z$  310,11 exibiu um único pico no mobilograma (**Figura 19c**), sugerindo a formação predominante de apenas uma espécie duplamente carregada entre as três possíveis combinações: *cis*-piridil, *trans*-piridil e piridil-anel porfirínico. Provavelmente a espécie protonada em *cis*-piridil é a menos estável em fase gasosa, mas é muito difícil aferir qual é a mais estável entre as duas espécies duplamente carregadas remanescentes.

Esses resultados contrastam com aqueles geralmene encontrados em solução.<sup>91,92</sup> Nesse caso, a espécie monocatiônica protonada no anel não é observada porque a porfirina diprotônada é preferencialmente formada após a protonação nos sítios piridil

periféricos. Isso mostra claramente que esses sítios, com cargas mais localizadas, são mais fortemente estabilizados por solvatação do que o anel porfirínico protonado com carga positiva mais delocalizada, invertendo assim a sequência de protonação encontrada na fase gasosa.

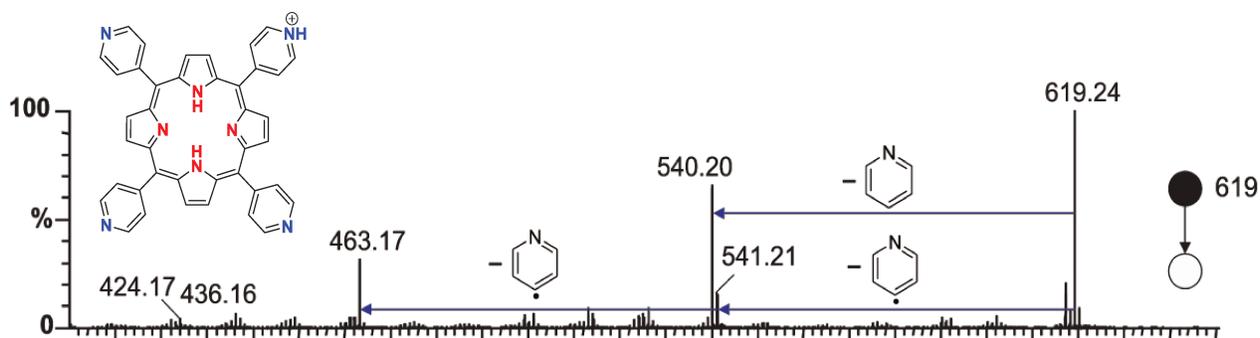


**Figura 19: ESI(+)-TWIM-MS dos protômeros monocarregados de  $m/z$  619,24 a partir de soluções metanólicas ácidas de a) tetra(4-piridil)porfirina e b) tetra(3-piridil)porfirina, e c) do protômero duplamente carregado de  $m/z$  310,11 a partir de tetra(4-piridil)porfirina.**

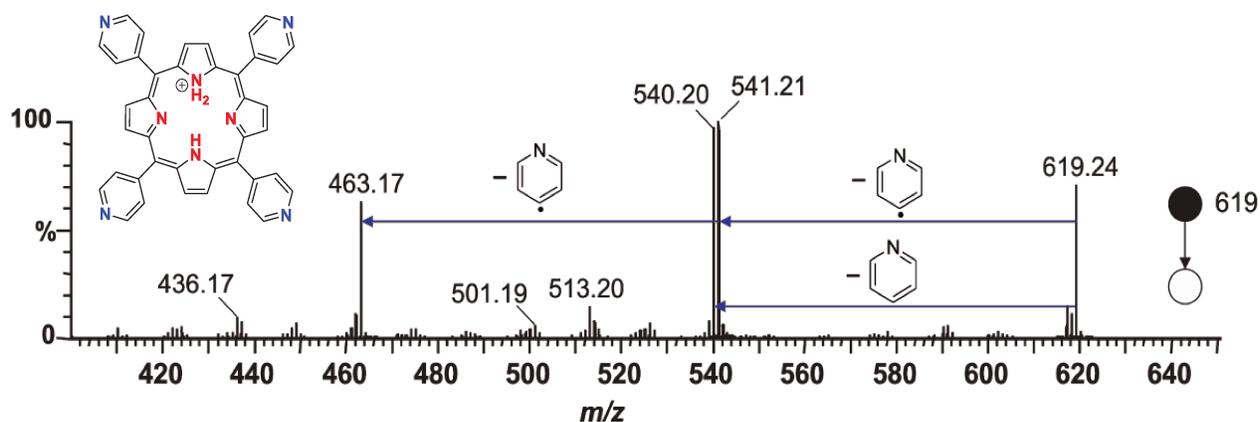
Para a caracterização das espécies separadas, foram realizados experimentos de MS/MS na cela de colisão *transfer*, ou seja, após a separação por mobilidade (MS/MS pós-TWIM). Os espectros de massas de íons produtos são mostrados na **Figura 20** para as duas espécies separadas de *meso*-tetra(4-piridil)porfirina. O protômero mais lento (em 3,29 ms) perde preferencialmente piridina neutra ( $m/z$  540,20) no processo de dissociação primário, enquanto que o protômero mais rápido (em 2,65 ms) é dissociado através da perda de piridina neutra ( $m/z$  540,20) e pela perda de piridina radicalar ( $m/z$

541,21) em extensões similares. A perda preferencial de piridina neutra é um indicativo geral de protonação no substituinte piridil, e ocorreria por uma cisão heterolítica. Enquanto que para a espécie protonada no anel porfirínico, a cisão heterolítica pode gerar a perda de piridina neutra e a cisão homolítica geraria a perda de piridina radicalar. Portanto, o protômero mais rápido **2b** pode ser atribuído a espécie protonada no N do anel porfirínico. O isômero *meso*-tetra(3-piridil)porfirina mostrou comportamento similar sob TWIM-MS/MS.

a) **Drift time = 3.29 ms**



b) **Drift time = 2.65 ms**

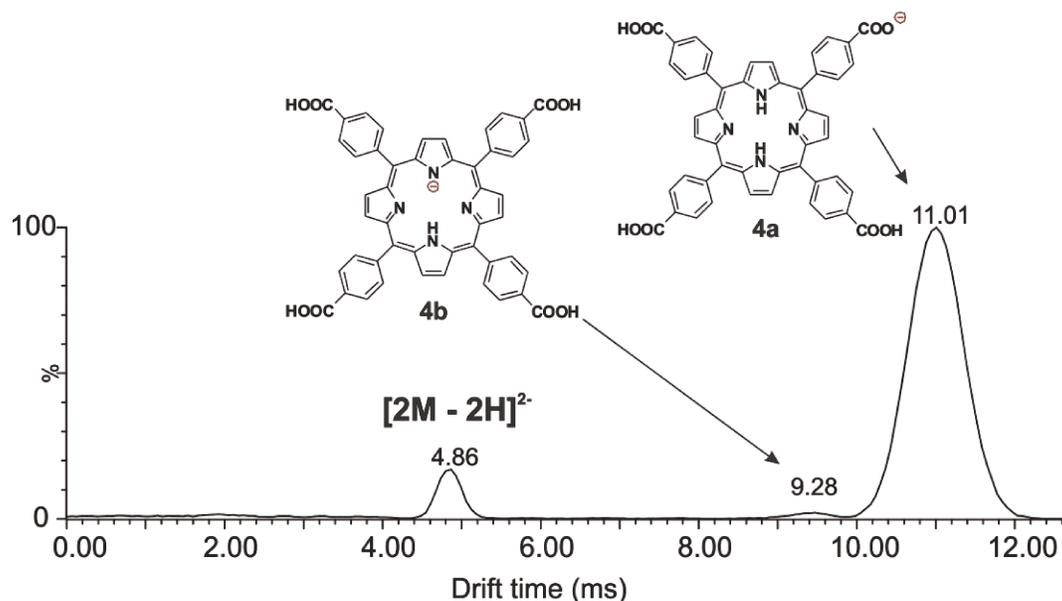


**Figura 20: ESI(+)-TWIM-MS/MS dos dois protômeros de  $m/z$  619,24 a partir de soluções metanólicas ácidas de tetra(4-piridil)porfirina.**

Conforme discutido para o caso dos protômeros de anilina, novamente a extensão da delocalização da carga parece ser útil para explicar a ordem de eluição dos

protômeros de piridil-porfirina. A densidade de carga está altamente localizada na espécie protonada no grupo piridil **2a**, que portanto deve interagir mais fortemente com as moléculas de CO<sub>2</sub> e assim é mais atrasada durante seu percurso através da cela mobilidade. Por outro lado, a carga positiva está mais delocalizada na espécie protonada no anel porfirínico **2b**, assim explicando sua eluição mais rápida (**Figura 19**). A respeito da basicidade intrínseca, o grupo piridil parece ser mais básico e sua afinidade de próton maior do que os sítios N-pirrólicos do anel porfirínico. A substituição da piridina nas posições *meta* vs *para* parece ter um efeito pequeno nessas propriedades uma vez que não foi observada alteração significativa no comportamento entre os isômeros *meso*-tetra(4-piridil)porfirina e *meso*-tetra(3-piridil)porfirina sob TWIM-MS/MS.

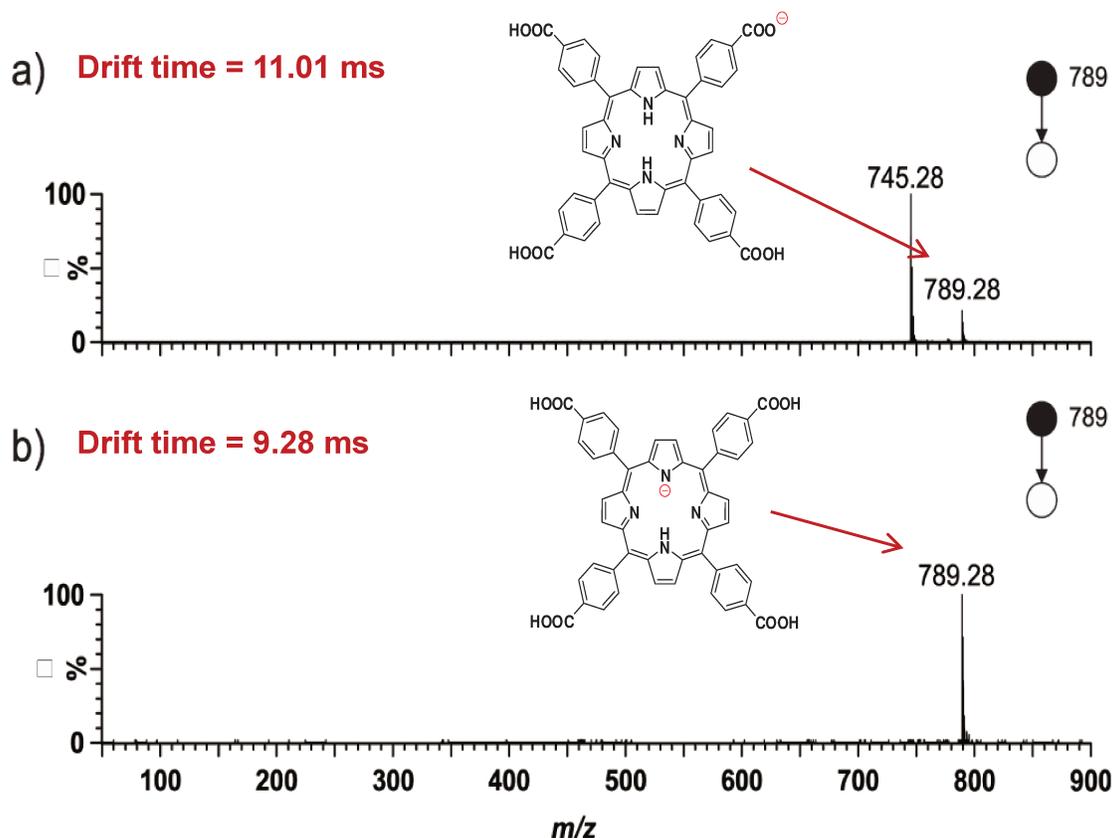
As espécies carregadas negativamente geradas pela desprotonação da *meso*-tetra(4-carboxifenil)porfirina (**4**) também foram investigadas por ESI(-)-TWIM-MS/MS e os mobiligramas para os íons selecionados de  $m/z$  789,28 são mostrados na **Figura 21**. Note que três picos foram detectados: um em 4,86 ms com separação isotopomérica de 0,5  $m/z$  revelando ser a espécie duplamente carregada  $[2M - 2H]^{2-}$ ; e dois picos adicionais em 9,28 ms e 11,01 ms correspondentes a uma dupla de espécies monocarregadas  $[M - H]^-$ , sendo a espécie em 11,01 ms muito mais abundante. Apesar da espécie  $[2M - 2H]^{2-}$  ter o dobro de volume e massa do que as espécies  $[M - H]^-$ , ela é acelerada pelo campo elétrico da cela de mobilidade por uma força duas vezes maior (devido a sua carga duas vezes maior) e por isso essa espécie viaja mais rápido apresentando um *drift time* de menor valor.



**Figura 21: ESI(-)-TWIM-MS para os íons de  $m/z$  789,28 a partir de solução metanólica básica de tetra(4-carboxifenil)porfirina.**

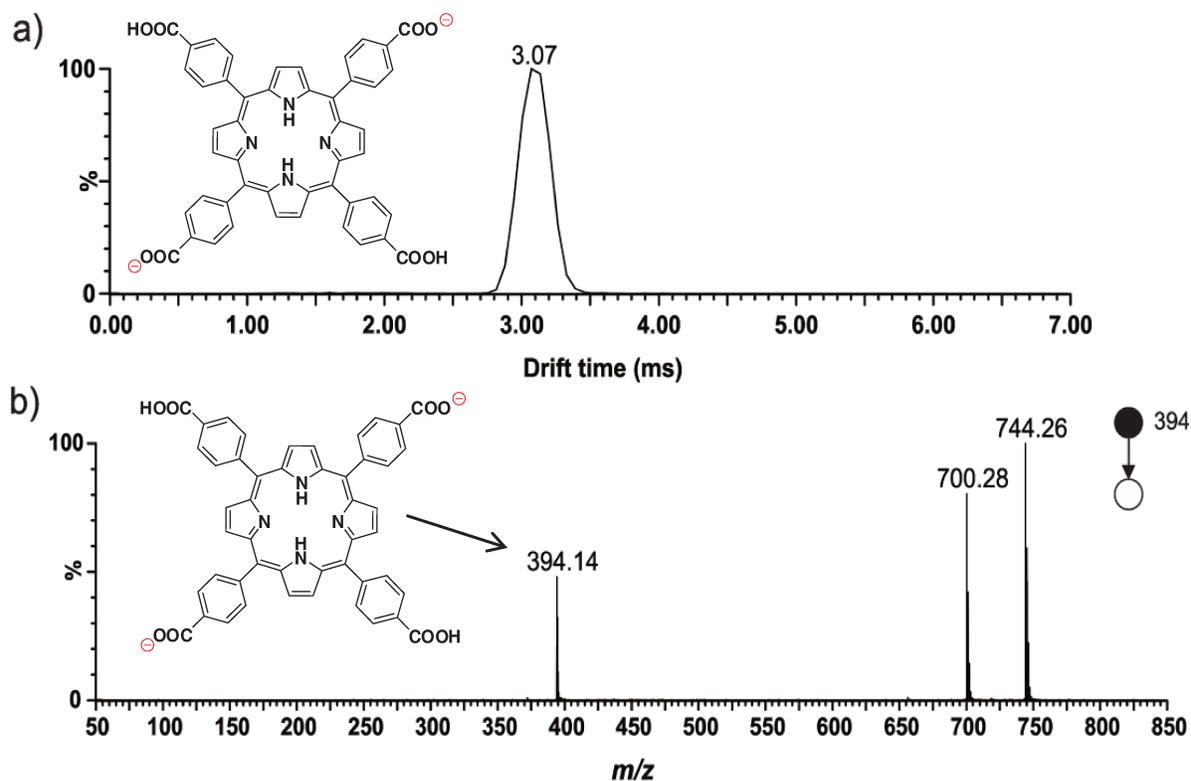
MS/MS pós-TWIM foi então realizado (**Figura 22**) e verificou-se que a espécie mais abundante, em 11,01 ms, perde facilmente e quase exclusivamente  $\text{CO}_2$  (**Figura 22a**) enquanto que a espécie menos abundante, em 9,28 ms, é muito mais estável sob as mesmas condições de CID (**Figura 22b**). A fácil perda de  $\text{CO}_2$  indica desprotonação no grupo carboxila (**4a**) enquanto que a resistência a dissociação é consistente com a desprotonação no anel porfirínico (**4b**). Além disso, a basicidade significativamente menor esperada para os substituintes fenilcarboxilato em comparação com a espécie desprotonada no anel porfirínico pode justificar a desprotonação predominante do carboxilato em **4**.

Conforme os resultados discutidos acima, a espécie monoaniônica **4a** formada pela desprotonação do ácido carboxílico periférico é observado em 11,01 ms no mobilograma (**Figura 21**), sendo mais lento do que **4b** (9,28 ms), devido a sua distribuição de carga negativa mais localizada e portanto maior interação com as moléculas do *drift gas*  $\text{CO}_2$ .



**Figura 22:** ESI(-)-TWIM-MS/MS para os dois protômeros de tetra(4-carboxifenil)porfirina.

Como mostrado na **Figura 23a**, o mobilograma da espécie duplamente desprotonada  $[M - 2H]^{2-}$  *meso*-tetra(4-carboxifenil)porfirina **4** de  $m/z$  394,14 mostra um único pico indicativo da formação da espécie duplamente carregada **4c**. Os dados de MS/MS pós-TWIM (**Figura 23b**) mostram duas perdas consecutivas de  $CO_2$  ( $m/z$  700,28 e 744,26) indicando, portanto, desprotonação em dois grupos carboxílicos, provavelmente em posição *trans*. Nesse caso, a diferença de energia para a formação da espécie desprotonada no anel porfirínico é muito maior do que para a desprotonação de um segundo ácido carboxílico, assim gerando a espécie dianiônica. Interessantemente, a espécie *cis*-carboxilato não foi observada, indicando que a repulsão eletrostática é alta o suficiente para assegurar apenas a formação da espécie *trans*-carboxilato.



**Figura 23:** a) ESI(-)-TWIM-MS e b) ESI(-)-TWIM-MS/MS para a tetra(4-carboxifenil)porfirina duplamente desprotonada de  $m/z$  394,14 indicando a formação de um único protômero duplamente carregado.

## 2.5 CONCLUSÃO

Protômeros de anilina, *meso*-tetra(3- e 4-piridil)porfirinas e *meso*-tetra(4-carboxifenil)porfirina foram separados e caracterizados através de experimentos utilizando a técnica de TWIM-MS e TWIM-MS/MS. Embora esses isômeros provavelmente apresentem volumes e formatos similares, a protonação ou desprotonação em diferentes sítios causa diferenças consideráveis na distribuição de cargas que leva a formação de heterodímeros entre os íons e as moléculas do *drift gas* (CO<sub>2</sub>) com forças e tempos de vida contrastantes, assim assegurando a resolução desses protômeros por TWIM-MS. Experimentos de MS/MS pós-TWIM permitiram a caracterização dos protômeros através de dissociações estruturalmente diagnósticas.

Observou-se a formação inusitada de espécies de porfirina protonada e desprotonada nos grupos pirrólicos do anel porfirínico. Assim, mostramos que a técnica TWIM-MS(/MS) é uma ferramenta poderosa e de futuro promissor para a investigação de acidez e basicidade intrínsecas em sítios competitivos de moléculas poli ou multifuncionais.



---

***CAPÍTULO 3***

***CARACTERIZAÇÃO DE***

***PETRÓLEO***

---



### 3.1 INTRODUÇÃO

O petróleo é sem dúvida a mistura orgânica mundialmente de maior importância econômica e energética e com a composição química mais complexa e desafiadora. Dependendo de sua origem pode constituir de cerca de 10.000 – 100.000 compostos distintos e sua composição e propriedades varia enormemente dependendo de sua natureza (lacustre, marinho), origem (tipo de rocha) e tempo de formação (evolução térmica/maturação). O valor econômico de um óleo em particular para uma refinaria depende da sua qualidade e da possibilidade em se obter um padrão de produto satisfatório que condiga com a demanda do mercado. A partir do conhecimento da composição química do petróleo e de seus destilados, a refinaria é capaz de prever e controlar as operações de petróleo, pois a sua composição revela as dificuldades que podem surgir no manuseamento, refino ou transporte do petróleo ou de seus produtos e também prever o rendimento de combustível e sub-produtos. Além disso, o conhecimento da composição química do petróleo também permite acessar a qualidade e performance dos seus produtos.<sup>95</sup>

Do ponto de vista molecular, o petróleo é uma mistura complexa, composta majoritariamente de hidrocarbonetos com pequenas quantidades de compostos orgânicos polares contendo os heteroátomos enxofre, oxigênio e nitrogênio, bem como compostos contendo constituintes metálicos, principalmente vanádio, níquel, ferro e cobre. O conteúdo de hidrocarbonetos pode ser tão alto quanto 97 % em peso em um óleo parafínico leve, ou cerca de 50 % em peso em um óleo pesado ou mesmo menos de 30 % em peso em casos específicos como no bitumen.<sup>95</sup>

#### 3.1.1 Compostos polares em petróleo

Apesar de representar apenas cerca de 5-15 % em peso da composição do petróleo, os compostos polares são altamente problemáticos desde a produção,

transporte e refino do petróleo, até a qualidade do produto final, além de serem importantes durante a exploração por agirem como biomarcadores de origem e biodegradação. A presença de traços de compostos heteroatômicos pode conceder características condenáveis para os produtos finais, levando à descoloração e/ou falta de estabilidade durante o armazenamento. Além disso, os compostos heteroatômicos contribuem para a poluição do ar pois sob a combustão nos motores de automóveis liberam gases  $\text{NO}_x$  e  $\text{SO}_x$ . Assim, para atender as regulamentações ambientais e produzir um produto de qualidade, é necessário remover os heteroátomos.<sup>96</sup> Entretanto, a remoção de enxofre pode ser dificultada pela presença de compostos nitrogenados básicos, que desativam os catalisadores do hidrotreamento. Já os ácidos presentes no petróleo, constituem outro grande problema durante o refino pois são responsáveis pela corrosão.

Por todos esses motivos, a caracterização da estrutura, composição e funcionalidade desses compostos é de extrema importância para o desenvolvimento de estratégias adequadas para a sua remoção.<sup>97</sup> Dessa forma, não é surpreendente que uma atenção considerável seja dada aos compostos heteroatômicos do petróleo, pois a tendência da indústria de refinamento ultimamente tem sido processar mais óleo pesado, bem como resíduos que contém proporções substanciais desse material heteroatômico.<sup>95</sup>

Apesar dos aspectos negativos relacionados aos compostos heteroatômicos, eles carregam informações geoquímicas úteis para rastrear os precursores biológicos das moléculas de petróleo. Por exemplo, fenóis tem sido utilizados para determinar a origem de depósitos de matéria orgânica (ex.: terrígena ou marina). Os ácidos naftênicos, quando presentes em baixa concentração, servem como fósseis geoquímicos da rocha fonte original e indicadores da maturidade do petróleo.<sup>98</sup> Assim, a determinação desses compostos também é importante na fase de exploração e para o rastreamento da origem de uma amostra e também para prospecção de grau de biodegração.

### 3.1.2 O modelo de Boduszynski

No final da década de 80, Boduszynski propôs um modelo notável sobre a composição de petróleo, que ao contrário dos outros trabalhos nesse sentido baseados na análise de um petróleo específico, o modelo proposto por Boduszynski é único por permitir a extrapolação para qualquer petróleo.<sup>99-101</sup> Ele descreve a composição do petróleo como sendo uma progressão contínua em termos de massa molar, número de heteroátomos (N, O, S) e aromaticidade em função do ponto de ebulição atmosférico equivalente (AEBP<sup>i</sup>). A **Figura 24** ilustra esta proposta em um gráfico de massa molar *versus* ponto de ebulição. O limite superior é definido pelas parafinas normais que tem o maior número de carbono e massa molar para um dado ponto de ebulição. Olhando de outra forma, para um dado número de carbono, as parafinas tem o menor ponto de ebulição. Os compostos naftênicos ebulem a uma temperatura um pouco maior e, assim, localizam-se a direita das parafinas. Hidrocarbonetos aromáticos e, especialmente compostos heteroatômicos polares, tem os maiores pontos de ebulição e são posicionados ainda mais para a direita. Os compostos mais polares, mais aromáticos e com maior número de heteroátomos caem na curva inferior. Esses são os compostos de menor massa para um dado ponto de ebulição; ou, por outra perspectiva, são os compostos com maior ponto de ebulição para uma dada massa molar.

---

<sup>i</sup> Do inglês: *atmospheric equivalent boiling point*.

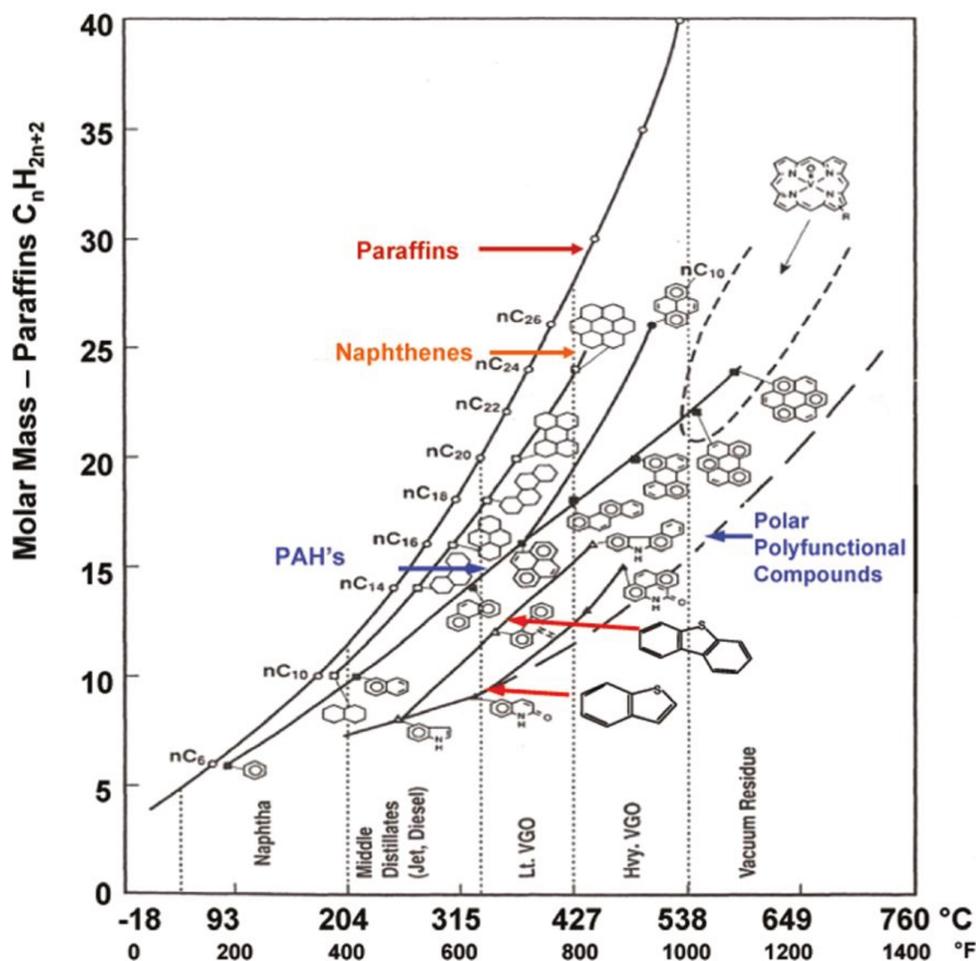


Figura 24: Modelo de Boduszynski ilustrando o efeito da massa molar e da estrutura em função ponto de ebulição.<sup>99</sup>

Desse modo, o modelo aponta uma característica importante na composição do petróleo: *diversos compostos com massas molares similares cobrem uma larga faixa de ebulição; e, do mesmo modo, um estreito corte de ponto de ebulição pode conter uma ampla faixa de massa molar.*

É mais fácil distinguir e separar as diferentes classes de compostos em um corte de destilação estreito do que no petróleo porque cada tipo de composto compreende apenas uma pequena faixa de massas molares, e a faixa de massa molar de cada tipo de composto é diferente uma das outras. Além disso, a destilação é o principal processo de

separação nas refinarias e o ponto de ebulição e a faixa de ebulição dos produtos são a base para planejar o seu uso e custo. Dessa forma, a análise composicional de cortes de destilação em laboratório torna-se bastante interessante, uma vez que além de diminuir a enorme complexidade composicional do petróleo, casa perfeitamente com o processo de destilação da refinaria.

Conforme o modelo de Boduszynski, nota-se que quanto maior o ponto de ebulição do corte, mais rico ele é em heteroátomos e compostos poliaromáticos, e maior é a faixa de massa molecular dos compostos. Dessa maneira, os cortes de alto ponto de ebulição são os mais interessantes para se estudar os compostos polares, mas ao mesmo tempo sua composição química é progressivamente mais complexa.

### 3.1.3 Análise composicional do petróleo

A espectrometria de massas (MS) através de inserção direta<sup>102</sup> ou em combinação com diferentes técnicas de separação (GC-MS<sup>103</sup>, LC-MS<sup>104</sup>) tem sido amplamente utilizada na caracterização de óleo bruto e de destilados de petróleo. De fato, desde o início da sua comercialização a espectrometria de massas esteve intimamente ligada a indústria petroquímica. Na década de 50, as companhias de petróleo investiram em espectrômetros de massas a fim de determinar pela primeira vez a composição dos destilados leves.<sup>105</sup> As fontes de ionização existentes na época (em especial a ionização por elétrons, EI) restringiam as análises para compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis. Na metade da década de 50, o surgimento da técnica GC-MS permitiu uma análise composicional mais detalhada dos cortes de destilação mais leves do petróleo.<sup>106</sup> A técnica ainda é bastante adequada para a pronta determinação composicional das frações mais leves, com ponto de ebulição entre 40-220 °C, denominadas nafta. Essa fração constitui uma mistura de hidrocarbonetos sendo ~ 50 % alcanos, ~40 % naftenos e ~10 % compostos aromáticos.<sup>100</sup>

Entretanto, quanto maior o ponto de ebulição de uma fração, mais difícil é sua análise. Os destilados médios (220-345°C) já representam um desafio para as análises por GC-MS, pois não é mais possível separar todos os compostos e a interpretação dos dados torna-se muito difícil ou impossível. Nessa faixa, a cromatografia líquida (LC) e a cromatografia com fluído supercrítico (SFC) são geralmente utilizadas para determinar a composição em termos de grupos de compostos saturados, aromáticos e polares. Recentemente, a cromatografia a gás bidimensional (GC x GC) também tem sido usada para caracterização e quantificação de frações médias e leves de petróleo.<sup>107,108</sup>

Porém, a alta complexidade das frações com ponto de ebulição maior do que 345 °C têm requerido grande esforço no desenvolvimento de técnica para este fim, uma vez que a resolução e exatidão das medidas de  $m/z$  dos espectrômetros de massas convencionais (como quadrupolos, *ion traps*, TOF) não são suficientes para fornecer informações composicionais completas. Para a atribuição da composição elementar de íons em uma mistura complexa, faz-se necessário a distinção entre várias composições de mesma massa nominal com diferentes massas exatas (por exemplo, distinguir entre CH<sub>4</sub> e O que apresentam mesma massa nominal de 16 Da, porém diferem em 0,0364 Da em massa exata). A distinção entre compostos com massa exata muito próxima tornou-se possível com o desenvolvimento e contínuo aperfeiçoamento de analisadores de massas do tipo FT-ICR<sup>i</sup> (ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier) sendo estes os únicos equipamentos capazes de prover espectros de massas com altíssimo poder de resolução e exatidão.<sup>109</sup> Devido então ao seu altíssimo poder de resolução e altíssima exatidão, o FT-ICR consegue resolver íons em unidades de mili-Daltons e através da medida da massa exata permite a atribuição inequívoca da fórmula molecular de milhares de componentes em espaço de tempo reduzido (~ 6 minutos).

---

<sup>i</sup> Do inglês: *fourier transform ion cyclotron resonance*

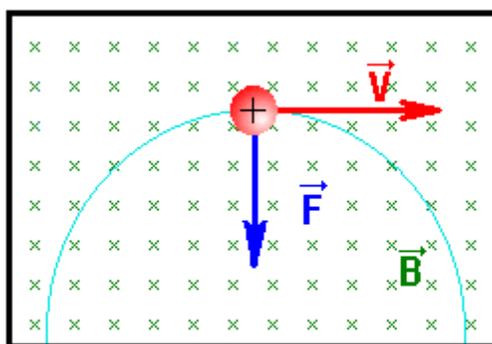
### 3.1.4 FT-ICR MS

Em 1973, Alan Marshall e Melvin Comisarow combinaram a transformada de Fourier, ressonância ciclotrônica de íons e espectrometria de massas para criar o FT-ICR MS.<sup>110</sup> A técnica é baseada no movimento circular de íons em um forte campo magnético (movimento ciclotrônico) e atualmente constitui o analisador de massas capaz de atingir os níveis mais altos de exatidão e poder de resolução.<sup>111</sup>

#### *Breve teoria do movimento ciclotrônicos dos íons*

Quando um íon entra em contato com um campo magnético constante, ele sofre uma força que torna a sua trajetória circular. Essa força, chamada de força de Lorentz ( $F_L$ ), é aplicada perpendicularmente ao movimento do íon (**Figura 25**) e expressa pela **Equação 1**, em que  $q$  é a carga do íon,  $v$  é a sua velocidade e  $B$  é a força do campo magnético.

$$F_L = \text{massa} \times \text{aceleração} = qvB \quad (\text{Equação 1})$$



Força de Lorentz

**Figura 25: Força de Lorentz aplicada a um íon sob a influência de um campo magnético.**

A força de Lorentz perpendicular a trajetória do íon age como força centrípeta e faz com que este adquira uma trajetória circular com raio  $r$ . A aceleração angular é dada por:

$$a = \frac{v^2}{r} \quad (\text{Equação 2})$$

Substituindo a **Equação 2** na **Equação 1** temos:

$$\frac{mv^2}{r} = qvB \quad (\text{Equação 3})$$

A velocidade angular ( $\omega$ ) é dada por:

$$\omega = \frac{v}{r} \quad (\text{Equação 4})$$

Substituindo a **Equação 4** na **Equação 3** e simplificando, temos a forma convencional da equação ciclotrônica (**Equação 5**) onde  $\omega$  é a frequência ciclotrônica:

$$\omega = \frac{qB}{m} \quad (\text{Equação 5})$$

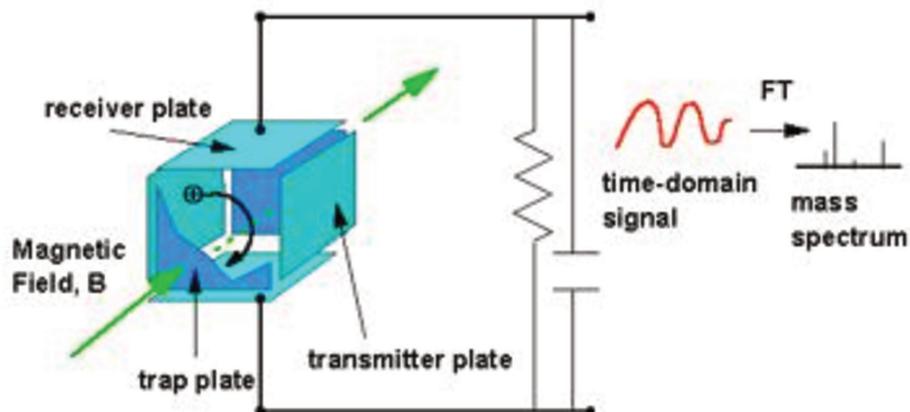
Como resultado dessa equação, a frequência ciclotrônica de um íon sob influência de um campo magnético é proporcional a razão  $(q/m)B$ . Assim, todos os íons com mesma  $m/z$  terão a mesma frequência ciclotrônica em um campo magnético constante, independentemente da sua velocidade.

#### *Funcionamento dos equipamentos de FT-ICR MS*

Para que o movimento ciclotrônico dos íons seja útil e gere um sinal detectável é necessário que os íons apresentem um movimento sincronizado (em fase) e próximo as placas de detecção. Entretanto, ao entrar na cela de ICR, íons de mesma  $m/z$  oscilam em fases distintas e apresentam raios de órbita ciclotrônica em comprimentos na ordem de sub milímetros e longe das placas de detecção das celas que variam de 1 a 2 cm. Assim, para que o sinal gerado atinja uma amplitude detectável, é necessário excitar os íons de forma ressonante através de um campo elétrico oscilante ou rotatório em fase com o campo magnético, a fim de aumentar o raio da órbita de oscilação e formar pacotes de

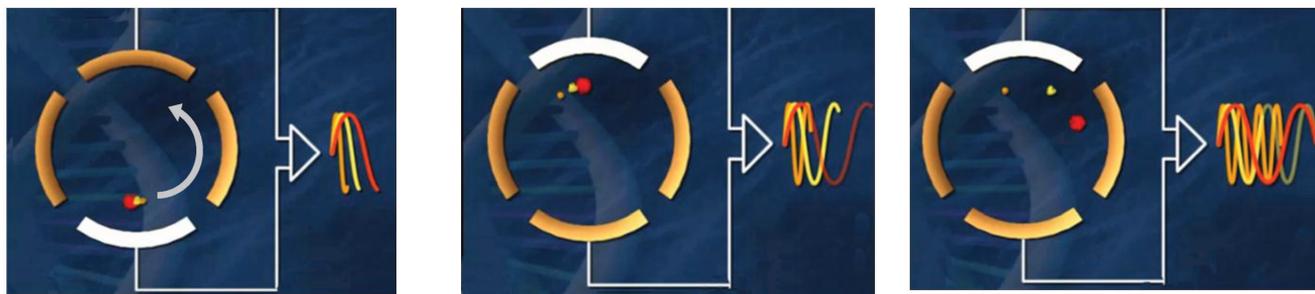
íons de mesma  $m/z$  que sejam os mais compactos e coerentes espacialmente possíveis.<sup>109</sup>

A **Figura 26** mostra um esquema de uma cela de ICR.

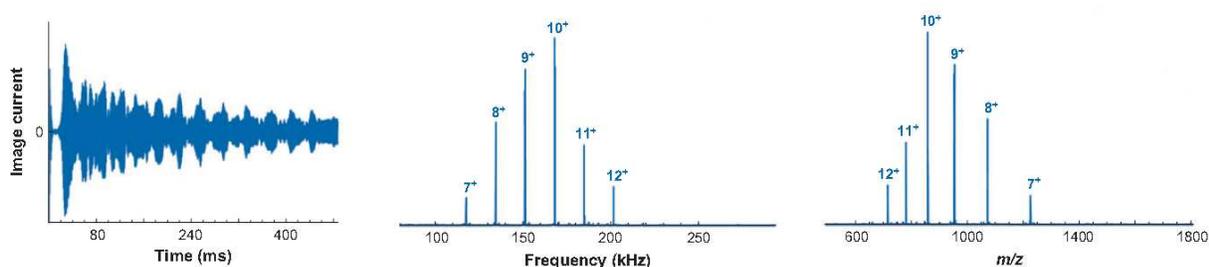


**Figura 26:** Esquema de uma cela de FT-ICR MS.<sup>112</sup>

O movimento periódico dos pacotes de íons induz uma corrente nos eletrodos de detecção e gera um sinal em domínio de tempo (**Figura 27**), que é registrado, digitalizado e convertido para um espectro de frequências através da transformada de Fourier (**Figura 28**). O espectro de frequências é então convertido a um espectro de massas através da equação ciclotrônica (**Equação 5**).



**Figura 27:** Esquema da detecção dos íons na cela de ICR.<sup>113</sup>



**Figura 28:** Imagem da corrente induzida no domínio de tempo (esquerda); espectro de frequência após a transformada de Fourier (centro); e espectro de massas depois da transformada de frequência para  $m/z$  (direita).

### 3.1.5 Mobilidade iônica para análise de petróleo

A principal limitação da técnica de FT-ICR MS, assim como todas as técnicas de MS, é a incapacidade de resolver isômeros, já que estes apresentam a mesma fórmula molecular (massa exata), e também a dificuldade em fornecer informação sobre a estrutura tridimensional dos compostos de forma direta. Nesse sentido a IM-MS torna-se uma técnica interessante para ser aplicada de forma complementar a FT-ICR MS.

A determinação de isômeros em amostras tão complexas como o petróleo é uma tarefa desafiadora, porém extremamente importante pois os isômeros podem apresentar reatividades contrastantes. Os ácidos naftênicos, por exemplo, são conhecidos por formarem depósitos durante a exploração e produção do petróleo causando diversos problemas de escoamento.<sup>114</sup> Entretanto, os ácidos aromáticos (isômeros dos ácidos naftênicos com mais de 4 ciclos) não apresentam esse problema, e a distinção entre esses compostos não pode ser feita por MS de forma direta.<sup>115</sup> Outro exemplo são os compostos sulfurados, que podem desencadear ou evitar a corrosão causada pelos ácidos naftênicos dependendo da sua estrutura (tiofenos *versus* tiois).<sup>116</sup> Os isômeros também têm sido utilizados como novas estratégias na busca de marcadores naturais

(biomarcadores) de origem e maturação através principalmente da sua interconversão.<sup>117,118</sup>

Poucos trabalhos foram publicados usando a IM-MS para análise de petróleo ou de suas frações. O primeiro trabalho publicado nessa área foi em 2008 por Russell e colaboradores.<sup>119</sup> Amostras de asfalto e de DAO<sup>i</sup> (óleo deasfaltado) foram analisadas por IM-MS usando LDI<sup>ii</sup> (ionização por dessorção a laser) como fonte de ionização e analisador de massas TOF. A presença de agregados a partir de  $m/z$  2500 na amostra de asfalto foi confirmada pela diminuição da inclinação do gráfico plotado de *drift time* versus  $m/z$ , indicando que a partir desse ponto as estruturas são mais compactas. Foi observado também que a distribuição dos compostos de DAO aparecem em uma região de *drift time* ligeiramente maior do que os compostos de asfalto, devido provavelmente ao menor conteúdo aromático e maior quantidade de cadeias alquílicas que conferem uma maior flexibilidade a estrutura das moléculas do DAO. No ano seguinte, Russell, Marshall e colaboradores<sup>120</sup> mostraram pela primeira vez o uso conjunto das técnicas de IM-MS e FT-ICR MS para análise de amostras de petróleo. Eles observaram que vários compostos são separados por IMS para uma única massa nominal mostrando a grande complexidade da amostra e a capacidade da IMS em aumentar de 3 a 5 vezes a resolução comparado com o uso apenas do analisador de massas TOF. Também foi apontado que a estrutura tridimensional dos compostos mudaria de planar para uma estrutura mais compacta com o aumento da massa, pela comparação da distribuição de mobilidade dos compostos das amostras de petróleo com a mobilidade de compostos padrões. Mais recentemente, Kim e colaboradores<sup>121</sup> usaram pela primeira vez um equipamento de TWIM-MS para análise de petróleo, utilizando uma fonte de ionização do tipo ASAP. Eles mostraram que para uma mesma série homóloga os valores de *drift time* aumentam linearmente com o aumento de grupos CH<sub>2</sub>, indicando

---

<sup>i</sup> Do inglês: *deasphalted oil*.

<sup>ii</sup> Do inglês: *laser desorption ionization*.

que não há diferença estrutural significativa entre os compostos de uma série e o aumento de *drift time* estaria relacionado ao aumento de massa causado pela adição de grupos CH<sub>2</sub>. Entretanto, para os compostos que diferem apenas por unidades de H<sub>2</sub>, ou seja, pelo valor de DBE, os resultados mostraram mudanças significativas na estrutura de “*core*”, provavelmente devido a adição ou subtração de um anel benzeno.

Dessa forma, os trabalhos publicados sobre análise de petróleo por IM-MS ou TWIM-MS envolveram análises de tendências estruturais gerais dos compostos, não tendo sido feita a identificação de compostos em nenhum dos trabalhos publicados. Isso provavelmente é devido a grande complexidade da amostra, o que torna o tratamento dos dados e a interpretação dos resultados uma tarefa bastante trabalhosa. Além disso, nenhum dos trabalhos teve foco nos compostos polares do petróleo, já que foram utilizadas as fontes de ionização LDI e ASAP.

Assim, nesse Capítulo, procuramos realizar um detalhamento dos compostos presentes em cortes de destilação de petróleo de alto ponto de ebulição com relação a composição e estrutura. Para isso utilizamos a técnica TWIM-MS em conjunto com a FT-ICR MS e utilizamos além da fonte de APPI, que ioniza compostos aromáticos de uma larga faixa de polaridade, a fonte de ESI nos modos positivo e negativo de íons, para ionizar seletivamente compostos polares básicos e ácidos. Um fracionamento por número de anéis feito por HPLC-2 também foi utilizado a fim de diminuir a complexidade dos espectros e possibilitar a análise dos compostos menos abundantes.

### **3.1.6 Fontes de ionização**

Fenn e Zhang aplicaram pela primeira vez ESI para análises de combustíveis fósseis.<sup>122</sup> Uma das principais limitações do ESI seria a incapacidade de ionizar compostos apolares, altamente abundantes em petróleo. Assim, outras técnicas de ionização, como field desorption (FD) e field ionization (FI) foram usadas no passado

para análise de espécies apolares.<sup>123,124</sup> Entretanto, essas técnicas são trabalhosas pois funcionam sob vácuo e geram diferentes espécies a partir da mesma molécula (protonados, cátions radicalares e  $[M - H]^-$ ) dificultando a interpretação do espectro. Por esse motivo, APPI tornou-se a técnica mais conveniente para caracterização de frações apolares de petróleo. Entretanto, apesar de os compostos polares compreenderem apenas cerca de 15 % do petróleo, eles são as espécies mais problemáticas durante o processamento do petróleo, e carregam informações importantes sobre a origem e maturação do petróleo, o que torna a sua caracterização de extrema importância. Assim, a técnica de ESI pode ser considerada uma técnica que ioniza seletivamente os compostos polares, facilitando a análise e interpretação dos espectros. Por esse motivo que as técnicas ESI e APPI foram escolhidas para este estudo.

### 3.1.7 Algumas classificações comumente utilizadas na análise de petróleo

Os espectros de massas resultantes de análises de petróleo compreendem uma enorme quantidade de íons detectados. Para facilitar a interpretação dos dados, algumas classificações são geralmente empregadas.

Os compostos presentes em petróleo podem ser formados por “*cores*” (esqueletos moleculares base) ligados a cadeias alquílicas com número de carbonos variáveis (**Figura 29**). A **Figura 30** apresenta exemplos de possíveis “*cores*” presentes em petróleo. Assim, os compostos polares em petróleo são classificados de acordo com os heteroátomos N,S,O presentes nas moléculas. Por exemplo, um composto que possui apenas um heteroátomo de oxigênio pertence a classe O, com dois átomos de oxigênio pertence a classe O<sub>2</sub>, com um átomo de nitrogênio pertence a classe N e assim por diante.

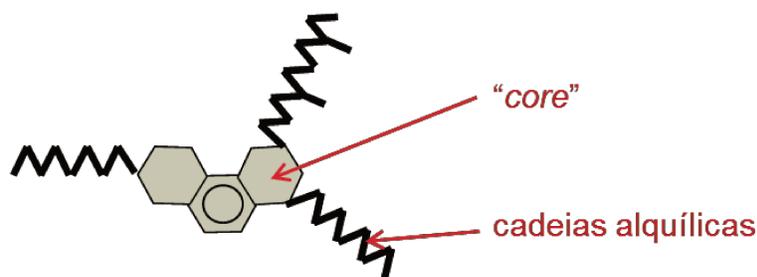


Figura 29: Estrutura ilustrativa geral de compostos presentes em petróleo.

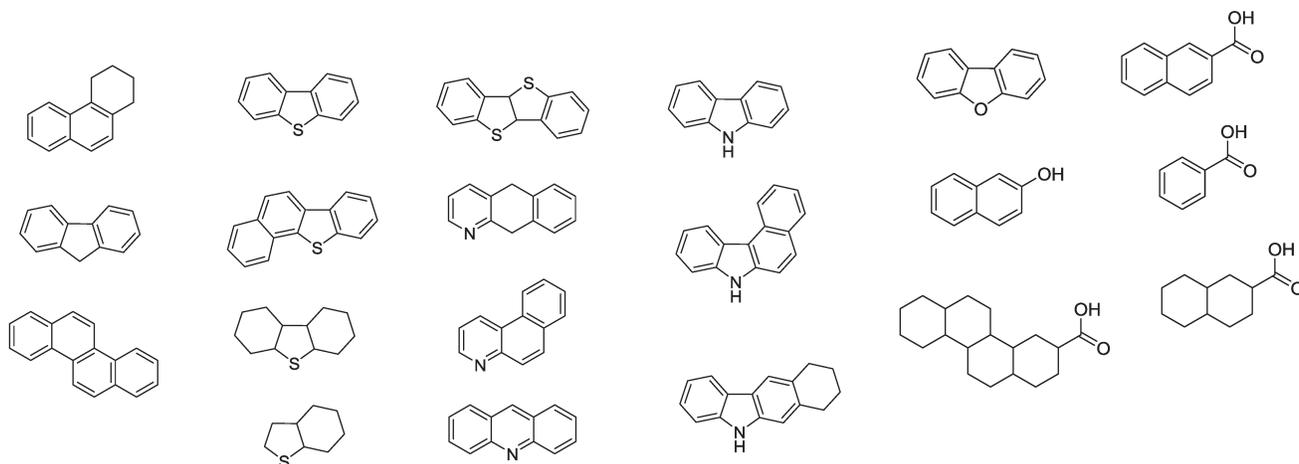


Figura 30: Exemplos de possíveis "cores" (esqueletos moleculares base) presentes em petróleo.

Outra classificação geralmente utilizada em petroleômica é baseada no número de duplas ligações ou anéis e é determinada a partir do cálculo de DBE (*double bonds equivalent*):

$$DBE = C - \frac{H}{2} + \frac{N}{2} + 1$$

onde C é o número de átomos de carbono, H é o número de átomos de hidrogênio e N é o número de átomos de nitrogênio do composto. O valor de DBE calculado por essa fórmula reflete a somatória do número de insaturações e do número de anéis do composto. Assim, a diferença de 1 unidade de DBE entre dois compostos equivale a diferença de 2 átomos de H e gera uma diferença de massa de aproximadamente 2 Da.

Por fim, compostos pertencentes a mesma classe de heteroátomos, que apresentam o mesmo valor de DBE são ditos de uma mesma **série homóloga** e diferem

apenas pelo tamanho das cadeias alquílicas (unidades metilênicas CH<sub>2</sub>), gerando uma diferença de massa entre os compostos de 14 Da.

## 3.2 OBJETIVO

Investigar o potencial da técnica TWIM-MS para o detalhamento composicional e estrutural de compostos presentes em petróleo, inclusive a separação e caracterização de isômeros de compostos polares e/ou aromáticos, através da análise de cortes de destilação de alto ponto de ebulição.

## 3.3 PARTE EXPERIMENTAL

Os experimentos apresentados neste capítulo foram realizados durante um estágio de doutorado sanduíche no exterior no *National High Magnetic Field Laboratory* (NHMFL), localizado em Tallahassee-FL, EUA, sob supervisão do Prof. Dr. Alan G. Marshall e co-supervisão do Dr. Ryan P. Rodgers.

### 3.3.1 Amostras

Três cortes de destilação (de alto ponto de ebulição) de amostras de betume (HVGO)<sup>i</sup> foram analisados: 420-450 °C, 475-500 °C e 500-525 °C. Cada corte foi fracionado por HPLC-2 fase normal em cinco frações (denominadas F1, F2, F3, F4 e F5, conforme a ordem de eluição) gerando um total de 15 frações. Cada corte de destilação, bem como cada fração de HPLC-2, foram analisados por TWIM-MS e por FT-ICR MS utilizando quatro modos de ionização diferentes: APPI(+), ESI(+), ESI(-)

---

<sup>i</sup> *High vacuum gas oil.*

utilizando hidróxido de amônio como dopante e ESI(-) utilizando hidróxido de tetra metil amônio (TMAH).<sup>i</sup>

### ***3.3.2 Fracionamento por HPLC-2***

O sistema de HPLC-2<sup>125</sup> combina a separação de duas colunas com a determinação quantitativa tanto da aromaticidade quanto da massa a partir do uso de dois detectores. Nesse trabalho utilizou-se o sistema de HPLC Waters Alliance equipado com as colunas de fase normal de dinitroanilinopropil (DNAP) e propilaminociano (PAC) e os detectores PDA<sup>ii</sup> (determinação de aromaticidade) e ELS<sup>iii</sup> (determinação de massa). A coluna PAC tem a função de separar os compostos saturados e com um anel aromático, enquanto que a coluna DNAP separa os compostos com maior número de anéis aromáticos. Para o escopo desse trabalho a separação dos compostos saturados não é necessária, uma vez que esses compostos não são ionizados pelas fontes utilizadas (ESI e APPI). Assim, os compostos foram separados apenas pela coluna DNAP.

O método de HPLC-2 foi otimizado utilizando uma mistura de padrões de hidrocarbonetos poliaromáticos contendo diferentes números de anéis aromáticos, a fim de se obter cinco frações separadas pelo número de anéis aromáticos, da seguinte forma: F1 (saturados + um anel aromático); F2 (dois anéis aromáticos); F3 (três anéis aromáticos), F4 (quatro anéis aromáticos) e F5 (cinco ou mais anéis aromáticos). Foi utilizado um gradiente dos solventes hexano, diclorometano e álcool isopropílico e a condição ótima encontrada está apresentada na **Tabela 3**.

---

<sup>i</sup> Do inglês: *tetramethylammonium hydroxide*

<sup>ii</sup> Detector por arranjo de fotodiodo (do inglês: *photodiode array*).

<sup>iii</sup> Detector evaporativo de espalhamento de luz (do inglês: *evaporative light scattering*).

**Tabela 3: Gradiente da fase móvel otimizado para o fracionamento por HPLC-2.**

<b>Tempo (min)</b>	<b>Hexano</b>	<b>Diclorometano</b>	<b>Álcool isopropílico</b>
0,0 – 7,0	100 %	0 %	0 %
7,1 – 17,0	95 %	5 %	0 %
17,1 – 27,0	85 %	15 %	0 %
27,1 – 37,0	60 %	40 %	0 %
40,1 – 50,0	10 %	90 %	0 %
50,1 – 60,0	0 %	90 %	10 %
60,1 – 65,0	0 %	100 %	0 %
65,1 – 90,1	100 %	0 %	0 %

Para o fracionamento das amostras (os três cortes de destilação), 40 mg de cada corte foram diluídos em 2 mL de hexano e injetados no cromatógrafo, coletando-se as 5 frações separadas F1, F2, F3, F4 e F5. As frações de 5 corridas foram então combinadas e secas sob fluxo contínuo de nitrogênio. O **Anexo I** apresenta os cromatogramas obtidos para os três cortes de destilação.

### ***3.3.3 Soluções para as análises por espectrometria de massas***

Para as análises por espectrometria de massas, soluções estoque foram preparadas ressuspensando as frações de HPLC-2 coletadas em 5 mL de tolueno. Já as soluções estoque dos cortes de destilação sem o fracionamento por HPLC-2 foram preparadas dissolvendo 10 mg da amostra em 5 mL de tolueno.

Para as análises por ESI, 0,5 mL da solução estoque foram diluídos em 0,5 mL de metanol com 2% de ácido fórmico para ESI(+), 2% de hidróxido de amônio ou 0,5% de TMAH para ESI(-). Para as análises por APPI, soluções de 500 µg/mL das amostras em

tolueno foram preparadas. As soluções foram então analisadas por TWIM-MS e por FT-ICR MS através de infusão direta usando uma bomba de seringa.

### **3.3.4 TWIM-MS**

Os experimentos de TWIM-MS foram realizados utilizando um espectrômetro de massas Synapt G2 HDMS (Waters Corp., Manchester, UK), nas instalações da Waters Corporation em Beverly-MA, EUA. As condições gerais de ESI foram: voltagem de capilar 2,5 kV ou 3,0 kV (modos negativo e positivo, respectivamente), voltagem do cone de amostragem 70 V, voltagem do extrator 4,0 V. Para APPI utilizou-se: repeller 2,0 kV, cone 40 V, cone extrator 4,0 V.

A pressão da cela de mobilidade foi otimizada de modo a se obter a melhor resolução (quanto maior a pressão, maior a resolução) sem comprometer a sensibilidade em toda a faixa de  $m/z$ . A cela de mobilidade foi operada a 2,9 mbar de  $N_2$ . A altura e velocidade da onda de potencial foram otimizadas de forma que os compostos de toda a faixa de  $m/z$  da amostra (~ 200-900) apresentassem mobilidade na faixa de 2,0 -9,0 ms. Os valores ótimos foram velocidade da onda de potencial 450 m/s e altura da onda 40 V. Os íons separados por mobilidade foram então transferidos para o analisador de massas TOF. Os espectros de massas foram adquiridos na faixa de  $m/z$  100 -1200, uma média de poder de resolução de  $m/\Delta m_{50\%} > 15.000$  em  $m/z$  500 com 10-30 ppm de erro de massa foi alcançada para todas as amostras.

### **3.3.5 FT-ICR MS**

Os experimentos de FT-ICR MS foram realizados em um espectrômetro de massas desenvolvido e montado no laboratório NHMFL, equipado com um magneto supercondutor de 9,4 T.<sup>126</sup> Os íons gerados na fonte de ionização de ESI foram acumulados no primeiro de dois octápolos por 300-1000 ms. Os íons gerados por APPI

foram acumulados diretamente no segundo octapolo (250-500 ms) antes de um esfriamento por colisão com gás hélio e transferência para um *ion trap* tipo Penning cilíndrico (cela de ICR). Os íons foram então acelerados para um raio de órbita ciclotrônica detectável (próximo a placa de detecção, uma vez que a detecção é realizada por indução de corrente) por uma faixa ampla de frequência de varredura de excitação (~90-700 kHz numa velocidade de varredura de 50 Hz  $\mu\text{s}^{-1}$  e uma amplitude pico-a-pico de 400 V em  $m/z$  600). Aquisições múltiplas em domínio de tempo (150-200) foram somadas para cada amostra, e então transformadas pela transformada de Fourier<sup>127</sup> em frequências e convertidas para  $m/z$ .<sup>128</sup> Os espectros de massas foram calibrados internamente por uma série homóloga (compostos que diferem em composição elementar por múltiplos inteiros de  $\text{CH}_2$ ) extensa (20-30 picos) de maior abundância relativa. Uma média de poder de resolução de  $m/\Delta m_{50\%} > 600.000$  em  $m/z$  500 com 100-400 ppb de erro de massa foi alcançada para todas as amostras.

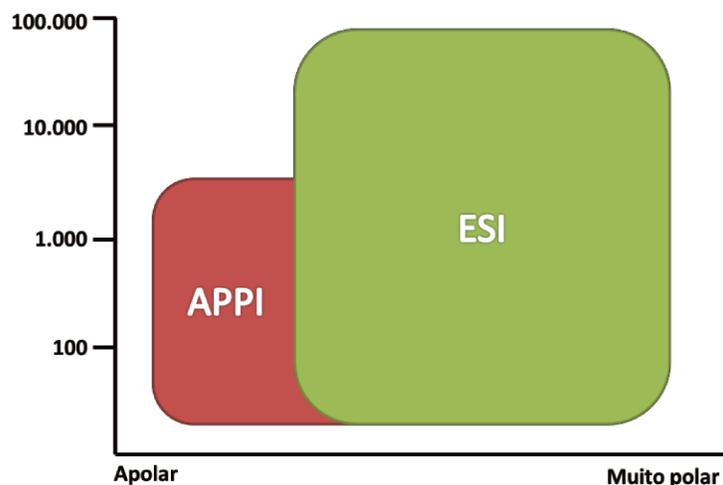
### 3.3.6 Cálculos teóricos de seção transversal de choque

A otimização estrutural foi realizada através do *software* Gaussian 3<sup>93</sup> usando a teoria do funcional da densidade (DFT) no modelo B3LYP/6-311G(d,p). As seções de choque teóricas foram calculadas usando o *software* de código aberto MOBCAL<sup>94</sup> através do algoritmo Método da Trajetória (TM).

## 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cada fonte de ionização ou modo de ionização permite a ionização de diferentes classes de compostos. A fonte de ionização ESI possibilita a ionização e transferência para a fase gasosa de compostos de polaridade média a alta, sendo que em geral no modo positivo de íons são ionizados compostos básicos pela adição de um próton  $[\text{M} +$

$H]^+$  e no modo negativo de íons, compostos ácidos pela subtração de um próton  $[M - H]^-$ . Já a fonte de ionização por APPI ioniza compostos aromáticos em uma larga faixa de polaridade, gerando espectros mais complexos por permitir a formação de íons radicalares  $[M]^+$  além das espécies protonadas ou desprotonadas. Desse modo, utilizamos diferentes modos de ionização para estudar seletivamente as diferentes classes de compostos presentes no petróleo (**Figura 31**).



**Figura 31: Ilustração comparativa entre as faixas de polaridade e massa molar dos compostos ionizados por ESI e APPI.**

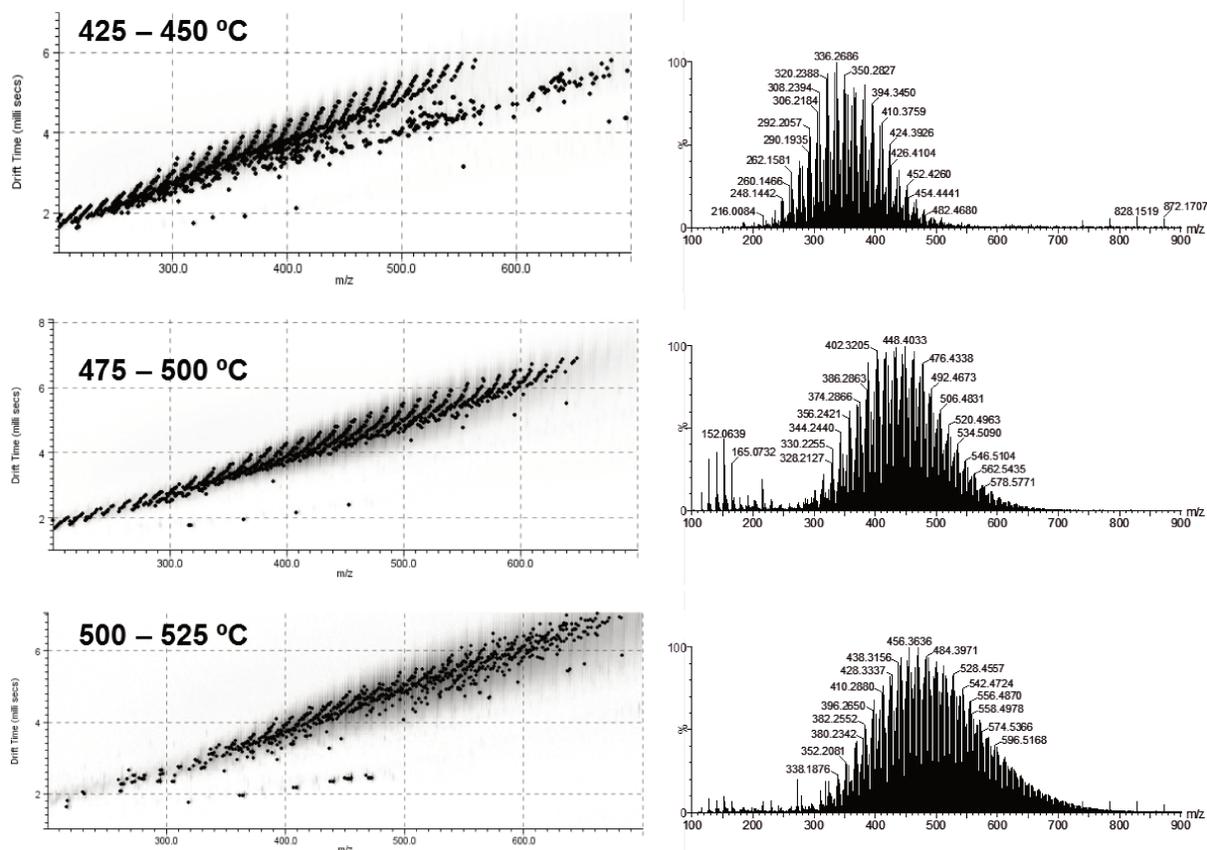
### 3.4.1 Análises por eletrospray no modo positivo de íons

#### 3.4.1.1 Cortes de destilação sem fracionamento por HPLC-2

A destilação é a primeira etapa na refinaria para a simplificação do petróleo em um número de frações (ou cortes) variando em ponto de ebulição e composição. Ela reduz o enorme número de grupos quimicamente distintos presentes no petróleo limitando seu tamanho (número de carbono) bem como sua diversidade estrutural em cada fração.<sup>100</sup> Por esse motivo, optamos por estudar cortes de destilação de alto ponto de ebulição, a fim de reduzir a complexidade da amostra e ao mesmo tempo ser possível

estudar os compostos polares, que são abundantes em cortes de alto ponto de ebulição. Vale ressaltar que mesmo após a destilação, os cortes de alto ponto de ebulição ainda apresentam uma grande complexidade contendo milhares de compostos quimicamente distintos.

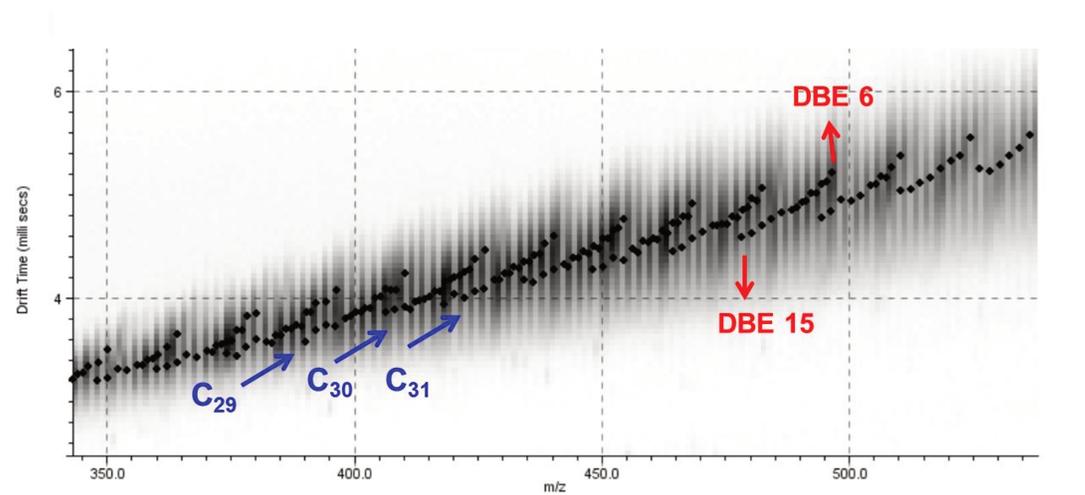
A **Figura 32 (direita)** mostra os espectros de massas para os três cortes de destilação obtidos por ESI(+). Nota-se que quanto maior o ponto de ebulição do corte, o centro da distribuição de  $m/z$  é deslocado progressivamente para valores maiores e a faixa de distribuição de massas é mais ampla. O mesmo é também observado para as análises feitas em todos os outros modos de ionização (**Anexos II, III e IV**) e segue o modelo de Boduszynski.<sup>99</sup> Conforme o modelo, a massa molar média dos compostos aumenta progressivamente com o aumento do ponto de ebulição do corte (**Figura 24**). Além disso, a complexidade da composição do corte aumenta com o ponto de ebulição devido ao aumento do número de possíveis composições elementares com o aumento do número de carbonos, gerando a distribuição de massas mais amplas nos cortes de maior temperatura.



**Figura 32: ESI(+)-TWIM-MS para os três cortes de destilação. Esquerda: espectro 2D de mobilidade ( $m/z$  x drift time); direita: espectro de massas.**

Os experimentos de TWIM-MS geram dados em três dimensões ( $m/z$ , drift time, intensidade). A **Figura 32 (esquerda)** mostra os gráficos 2D de mobilidade, obtido com o *software* DriftScope, para os três cortes de destilação por ESI(+). Esse gráfico apresenta  $m/z$  na abcissa e drift time (ms) na ordenada e cada ponto representa a centroide para o pico de cada espécie detectada. Para facilitar a visualização das tendências de mobilidade, a **Figura 33** apresenta uma aproximação de uma região do gráfico 2D para o destilado de 475-500 °C analisado. Notam-se pequenos grupos de íons com tendência linear de mobilidade. Cada grupo corresponde a compostos com um determinado número de carbonos, diferindo apenas pela DBE, ou seja, por unidades de  $H_2$  e assim estão espaçados por 2 unidades de  $m/z$ . Para cada número de carbono, as espécies com maior DBE apresentam sempre o menor drift time. Essas espécies são

mais compactas devido ao maior número de ligações insaturadas (que são mais curtas) e também de anéis aromáticos que por serem planares resultam em menores valores de seção de choque. A mesma tendência é observada dentro de todas as classes de compostos nos diferentes modos de ionização. Para cada série homóloga, novamente é notada uma tendência linear de mobilidade, sendo que os compostos com maior número de carbono apresentam menor mobilidade (maior *drift time*)

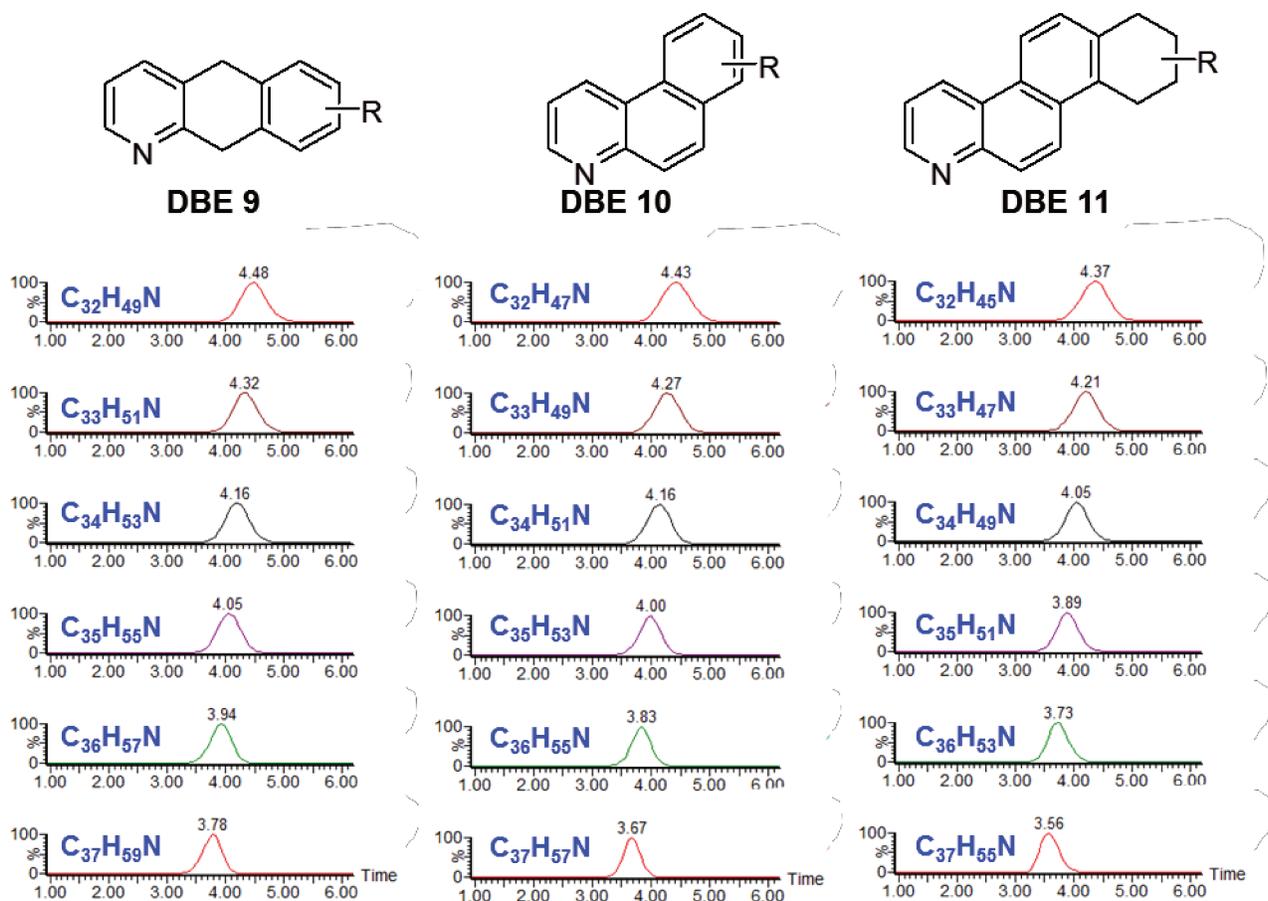


**Figura 33: Aproximação de uma região do gráfico 2D de mobilidade mostrando a tendência dos compostos de petróleo.**

A fonte de ionização ESI possibilita a ionização e transferência para a fase gasosa de compostos de polaridade média a alta, sendo que no modo positivo de íons são ionizados compostos básicos pela adição de um próton. Dessa forma, por ESI(+) foram detectados, quase que exclusivamente compostos da classe N (derivados de piridina) nos cortes de destilação sem fracionamento por HPLC-2.

Uma inspeção detalhada dos resultados mostra que para cada composto da classe N, há apenas um pico de mobilidade resolvido. A **Figura 34** mostra como exemplo os mobiligramas extraídos para os íons mais abundantes do espectro de massas, atribuídos a compostos das séries homólogas com DBE 9, 10 e 11, porém o mesmo é observado ao longo de toda a faixa de  $m/z$ . Esse resultado indica a inexistência de isômeros ou a presença de isômeros com seção de choque muito semelhante, que portanto não são

resolvidos por mobilidade iônica. Os compostos básicos da classe N presentes em petróleo são derivados de piridina, assim a **Figura 34** mostra também algumas possibilidades de estrutura para esses compostos.



**Figura 34:** Mobiligramas extraídos para íons mais intensos do espectro de massas, atribuídos a compostos das séries homogêneas com DBE 9, 10 e 11 da classe N, a partir de análises por ESI(+) do corte de destilação 475-500 °C.

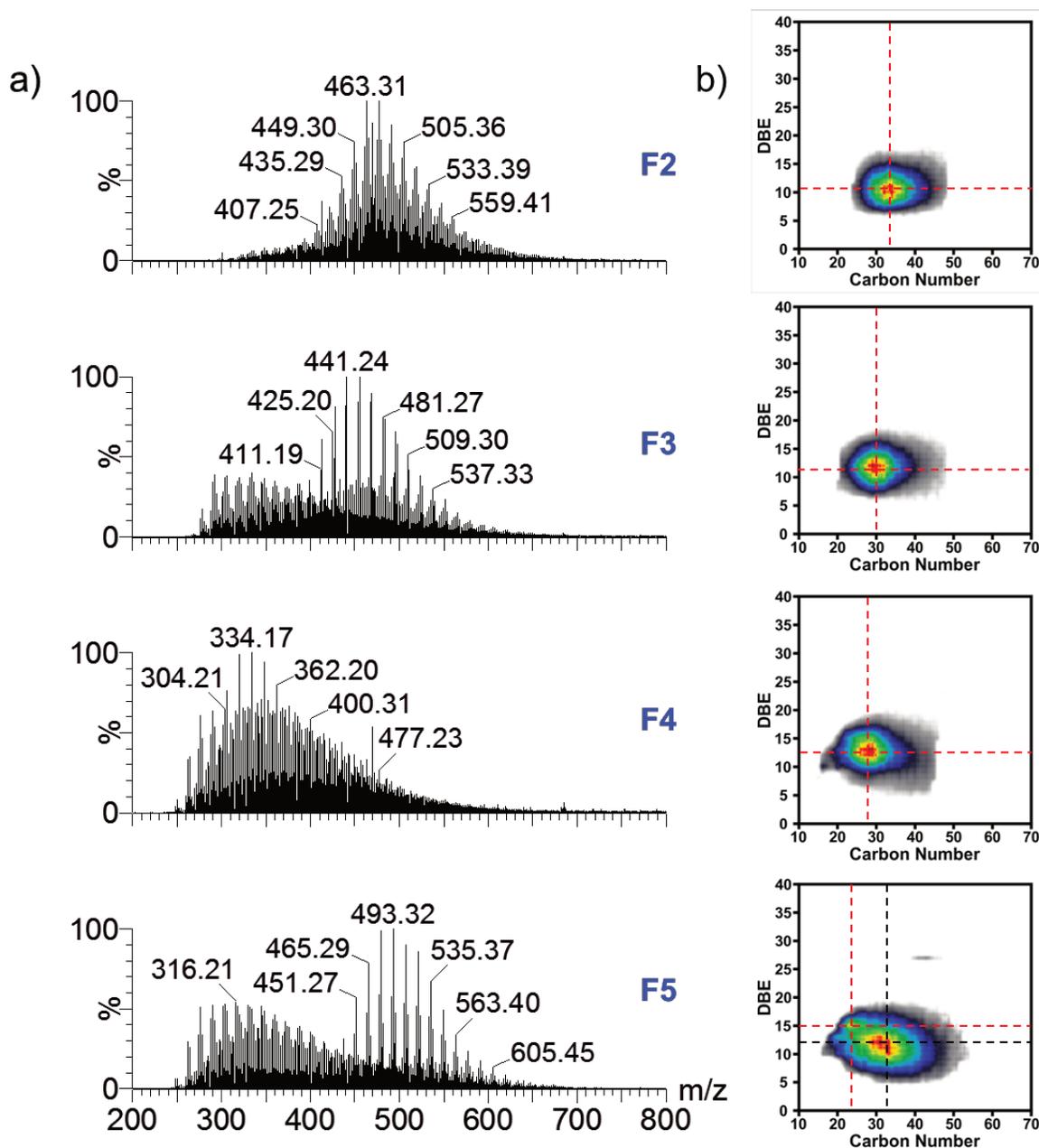
### 3.4.1.2 Frações por HPLC-2: simplificação dos espectros de massas e detecção de classes menos abundantes

A **Figura 35a** mostra os espectros de massas para as frações de HPLC-2 do corte 475-500 °C, como exemplo. O espectro para a fração F1 não é mostrado pois os compostos apolares presentes nela não são ionizados nesse modo. Para facilitar a

visualização das tendências, o diagrama de DBE vs número de carbonos foi plotado para a classe N (classe mais abundante da amostra) e é mostrado na **Figura 35b**. Nota-se que as primeiras frações a eluïrem (mais apolares) contém compostos com DBE menor do que as últimas frações a eluïrem (dentro de uma mesma classe). Por exemplo, o valor de DBE mais abundante dos compostos da classe N é de ~10 na F2, passando para ~12 na F3 e ~13 na F4 (**Figura 35b**). Isso era esperado já que os compostos com maior valor de DBE (maior aromaticidade) são também mais polares. Com relação às tendências de número de carbono, a **Figura 35b** também mostra que as primeiras frações a eluïrem possuem compostos com maior número de carbono (dentro de uma mesma classe), e portanto maior peso molecular. Por exemplo, os compostos da classe N apresentam número de carbono mais abundante de ~33 na F2, passando para ~30 na F3, e ~27 na F4. Conforme o modelo de Boduszynski,<sup>99</sup> em um mesmo corte de destilação os compostos com maior peso molecular são as parafinas (apolares) e os compostos com menores pesos moleculares têm progressivamente maior aromaticidade e número de heteroátomos em sua estrutura (mais polares) (**Figura 24**). Assim, o maior peso molecular obtido por TWIM-MS para as frações mais apolares confirma o modelo de Boduszynski de progressão contínua dos compostos em petróleo.

Com relação a fração F5, duas distribuições estão presentes, uma delas segue a tendência observada nas outras frações, ou seja, o valor de DBE mais abundante aumenta para ~15 e o número de carbono mais abundantes diminui para ~23, enquanto que na distribuição mais ampla, observa-se uma ligeira diminuição no valor de DBE (~13) em relação a F4 e aumento no número de carbonos (~30). Na realidade, a F5 é uma fração residual, em que todos os compostos retidos na coluna de HPLC são arrastados, portanto ela contém além dos compostos mais polares da amostra, uma mistura dos compostos que deveriam ter eluído nas frações anteriores. Por esse motivo, o diagrama de DBE vs número de carbono da F5 apresenta as duas distribuições, sendo uma referente aos compostos mais polares da amostra, que seguem as tendências das

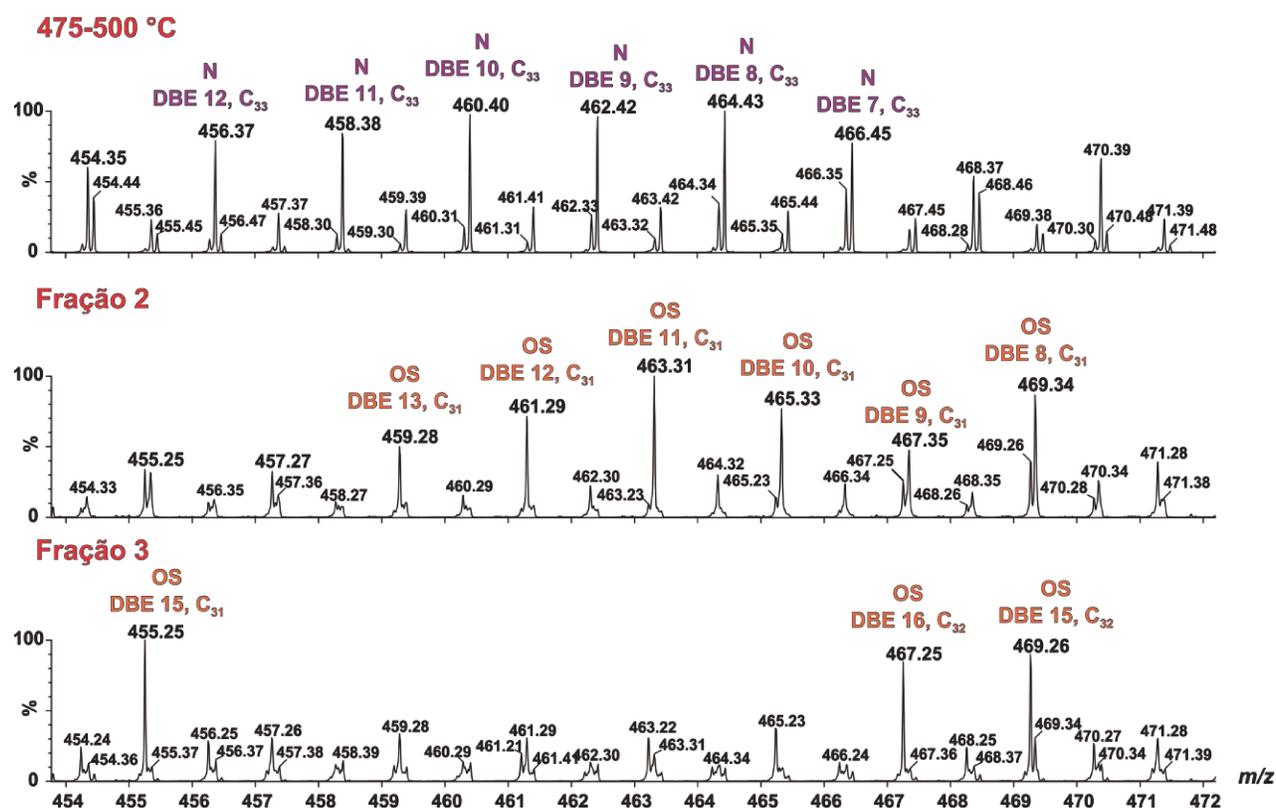
frações anteriores, e a outra, mais ampla, reflete a soma dos resíduos dos compostos de todas as outras frações.



**Figura 35: a) Espectros de massas e b) diagrama DBE vs Número de Carbonos para a classe N para as análises das frações F2, F3, F4 e F5 por ESI(+).**

Como discutido anteriormente, para os cortes de destilação sem fracionamento por HPLC-2, a classe N é quase exclusivamente observada. Entretanto, o fracionamento

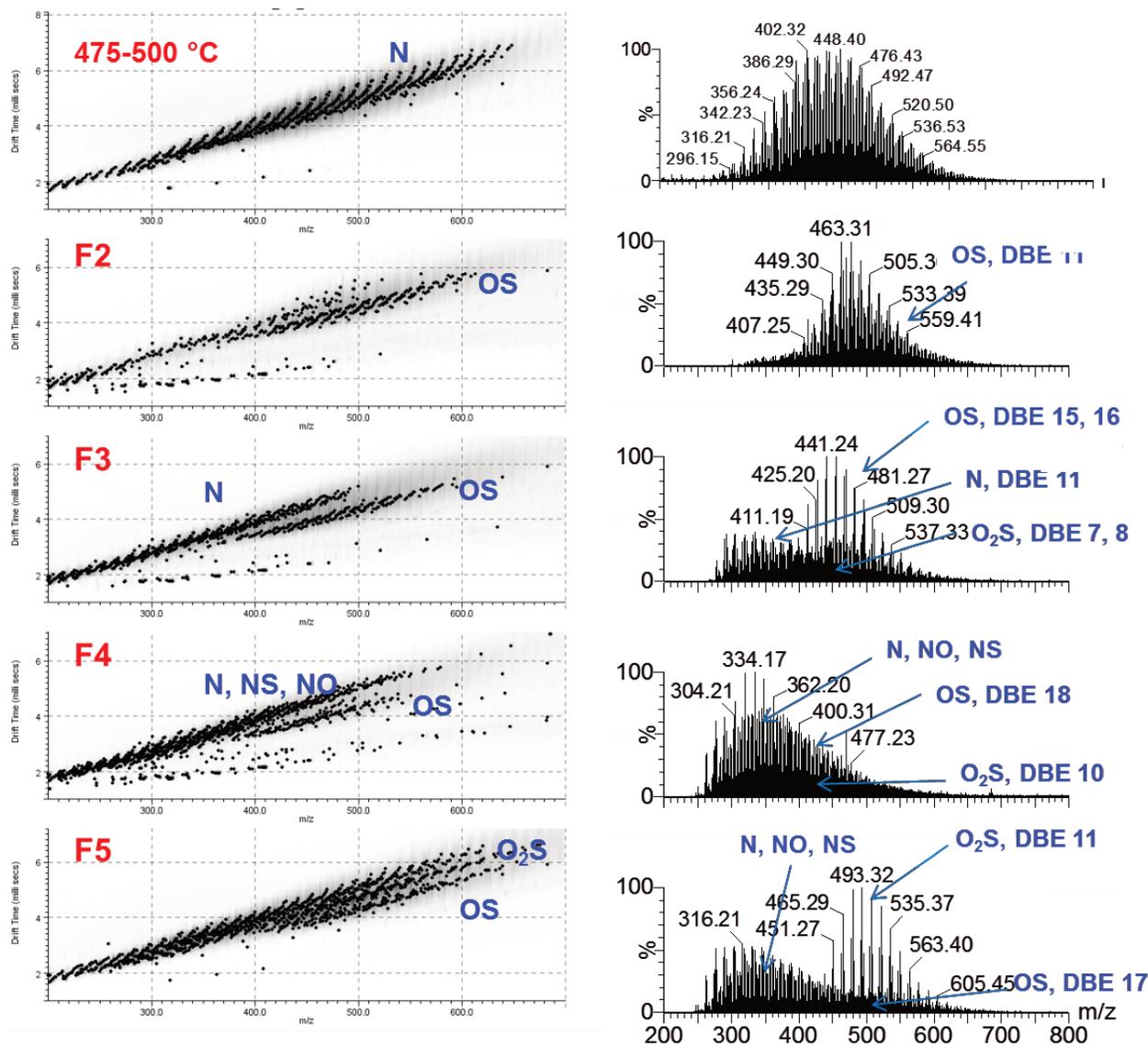
da amostra por HPLC-2 permitiu que classes menos abundantes, como OS, O<sub>2</sub>S, NS e NO fossem detectadas. A classe OS (sulfóxidos) é detectada majoritariamente na F2 e sua abundância diminui progressivamente nas frações posteriores. A classe N, bastante abundante na amostra, é detectada nas frações de F2 a F5, enquanto que as classes NS e NO são majoritariamente encontradas na F4, e a classe OS<sub>2</sub> aparece na F5. A atribuição das classes foi possível pela comparação manual com os resultados por FT-ICR MS. A **Figura 36** compara a aproximação do espectro de massas na região de  $m/z$  454 - 472 para as análises do corte de destilação e das frações F2 e F3. Nota-se que o fracionamento possibilitou a detecção dos compostos da classe OS, que tem sua ionização suprimida pelos compostos mais básicos da classe N, quando o corte de destilação é analisado sem fracionamento por HPLC-2.



**Figura 36:** Aproximação do espectro de massas na região de  $m/z$  454 - 472 para as análises do corte de destilação e das frações F2 e F3.

A **Figura 37** mostra os plots 2D de mobilidade para o corte de destilação de 475-500 °C e suas frações de HPLC-2 de F2 a F5. Nota-se no plot 2D de todas as frações

duas bandas claramente separadas. Uma análise detalhada dos espectros de massas exportados de cada região mostra que a banda inferior (com menor *drift time*) corresponde aos compostos OS e a banda superior aos compostos N, NS e NO. Na F5 há ainda o surgimento de uma terceira banda separada, que é correspondente aos compostos da classe O<sub>2</sub>S. A mobilidade das classes N, NS e NO são muito parecidas e as bandas de *drift time* estão sobrepostas. Isso mostra que a estrutura tridimensional para essas classes é semelhante. Já as classe OS e O<sub>2</sub>S estão claramente separadas, possuindo uma estrutura bem mais compacta. Isso mostra o potencial da técnica em confirmar a estrutura geométrica dos compostos sulfurados do petróleo e futuros trabalhos podem ser realizados para a diferenciação de compostos sulfurados reativos e não reativos através da análise de frações específicas.



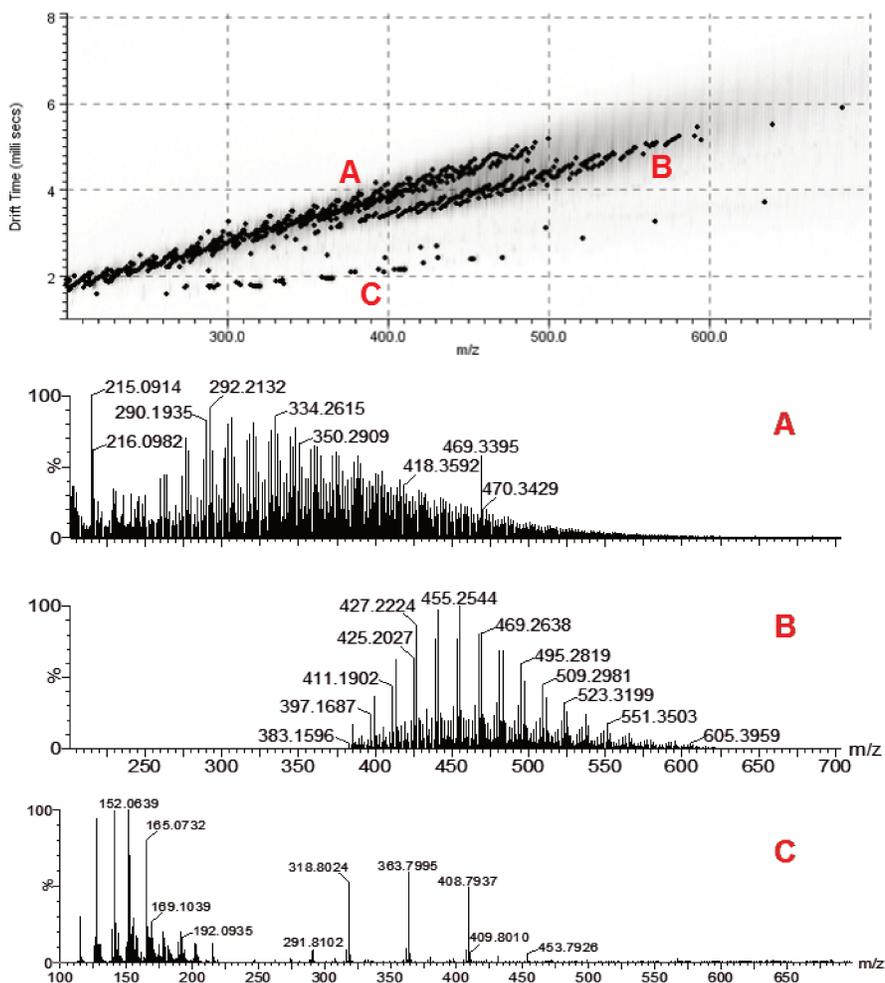
**Figura 37:** ESI(+)-TWIM-MS para o corte de destilação 475-500 °C e suas cinco frações de HPLC-2. Esquerda: espectro 2D de mobilidade ( $m/z$  x *drift time*); direita: espectro de massas.

Como discutido anteriormente, as análises dos cortes de destilação sem o fracionamento permitiram o estudo detalhado dos compostos da classe N, o que levou a conclusão de que não há isômeros com seção de choque diferentes, pois só foi detectado um pico de mobilidade para cada íon do espectro de massas. Para os compostos das classes NS, NO, OS e O<sub>2</sub>S, o estudo em detalhe foi feito através das análises das

diferentes frações por HPLC-2, entretanto, também não foram encontrados isômeros separados por mobilidade.

### 3.4.1.3 *Eliminação de contaminantes*

Além de fornecer informação estrutural dos compostos e separar isômeros, a TWIM também é útil para simplificar o espectro de massas e eliminar os contaminantes dos espectros de massas tornando-se uma técnica poderosa na análise, rastreamento e remoção de aditivos adicionados ao petróleo na fase de extração. A **Figura 38** mostra como exemplo o plot 2D de mobilidade para a fração F3 do corte de destilação de 475-500 °C. Nota-se a presença de três regiões de íons claramente separados (A, B e C). Como já discutido, a região A é referente aos compostos nitrogenados e a região B aos compostos OS. Os espectros de massas de cada região podem ser extraídos separadamente, simplificando sua interpretação. Já na região C encontram-se compostos com *drift time* bem menores e exportando seu espectro de massas, nota-se que esses compostos são contaminantes. Dessa forma, através da técnica TWIM-MS é possível facilmente identificar e eliminar interferentes ou aditivos não inerentes ao petróleo no espectros de massas.



**Figura 38: (+)ESI-TWIM-MS para a fração F3 do corte de destilação 475-500 °C. Acima: plot 2D de mobilidade ( $m/z$  x  $drift\ time$ ); e abaixo: espectros de massas exportados de cada região.**

### 3.4.2 Análises por eletrospray no modo negativo de íons

A fonte de ionização por eletrospray no modo negativo de íons (ESI(-)) ioniza compostos polares com caráter ácido. Quando uma base fraca, como  $\text{NH}_4\text{OH}$  é usada como dopante, os ácidos carboxílicos são predominantemente ionizados pois são os compostos com maior caráter ácido no petróleo. Quando TMAH é usado, há uma maior competição pela carga e a ionização dos compostos com menor caráter ácido é favorecida,<sup>129</sup> como os compostos da classe N neutros (derivados de pirrol).

Conforme discutido para as análises por ESI(+), os espectros obtidos por ESI(-) para os cortes de destilação também mostram a tendência prevista por Boduszynski, em que os valores de  $m/z$  são centrados em valores progressivamente maiores com o aumento da temperatura de ebulição e as faixas de  $m/z$  tornam-se mais amplas, tanto nas análises com  $\text{NH}_4\text{OH}$  como nas análises com TMAH (**ANEXO II e III**).

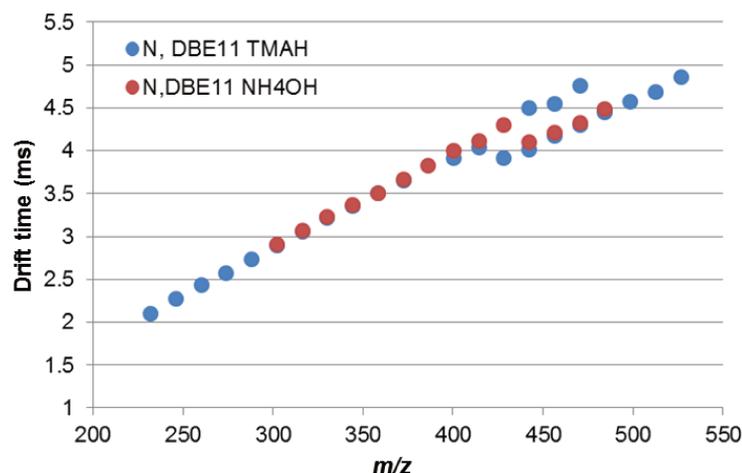
Nas análises usando ambos os dopantes, as primeiras frações a eluir apresentam distribuições de razões  $m/z$  centradas em valores maiores, pois contém compostos mais apolares que devem ter pesos moleculares maiores do que os compostos polares do mesmo corte de destilação (de acordo com o modelo de Boduszynski).<sup>99</sup>

Em todas as frações de HPLC-2 analisadas usando  $\text{NH}_4\text{OH}$  a classe majoritariamente detectada foi  $\text{O}_2$ , mas também foram detectados compostos da classe N (derivados de pirróil) em menor intensidade. Os compostos  $\text{O}_2$  são detectados nas frações de F2 a F5, sendo que sua abundância aumenta nas últimas frações eluídas (mais polares). Já os compostos da classe N são detectados nas frações F4 e F5.

Nas análises usando TMAH, os compostos majoritários são da classe N, detectados em todas as frações, mas sua abundância aumenta nas últimas frações eluídas (mais polares). Nas primeiras frações também são detectados compostos da classe O (derivados de furano, fenóis ou álcoois), que não são detectados nos cortes de destilação sem o fracionamento nem nas análises das frações usando  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Já os compostos da classe  $\text{O}_2$  não são detectados nas análises com TMAH.

A fim de verificar se os compostos da classe N detectados nas análises usando TMAH são os mesmos detectados nas análises com  $\text{NH}_4\text{OH}$ , plotou-se o gráfico de *drift time* versus número de carbono para as séries homólogas mais abundantes (**Figura 39**). Nota-se que usando ambos os dopantes, os compostos da classe N apresentam mobilidade similar, indicando que os mesmos compostos dessa classe são ionizados quando ambos dopantes são utilizados. Entretanto, nota-se que o uso de TMAH promove uma maior seletividade para a classe N, possibilitando a detecção dos

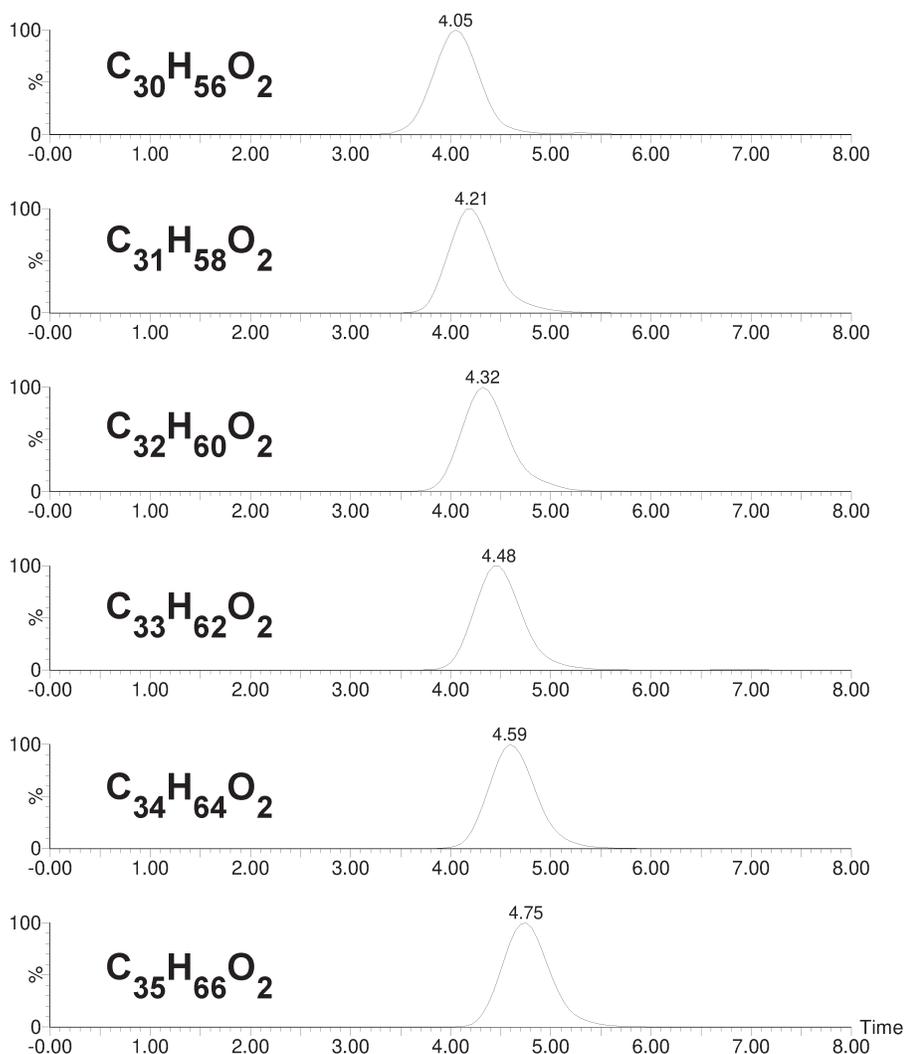
compostos de uma faixa mais ampla de  $m/z$  e de DBE. Assim, optou-se por estudar a mobilidade desses compostos através das análises usando TMAH.



**Figura 39:** Comparação da mobilidade da série homóloga da classe N, DBE 11, usando TMAH e NH<sub>4</sub>OH como dopante.

### 3.4.2.1 Identificação de isômeros da classe O<sub>2</sub>

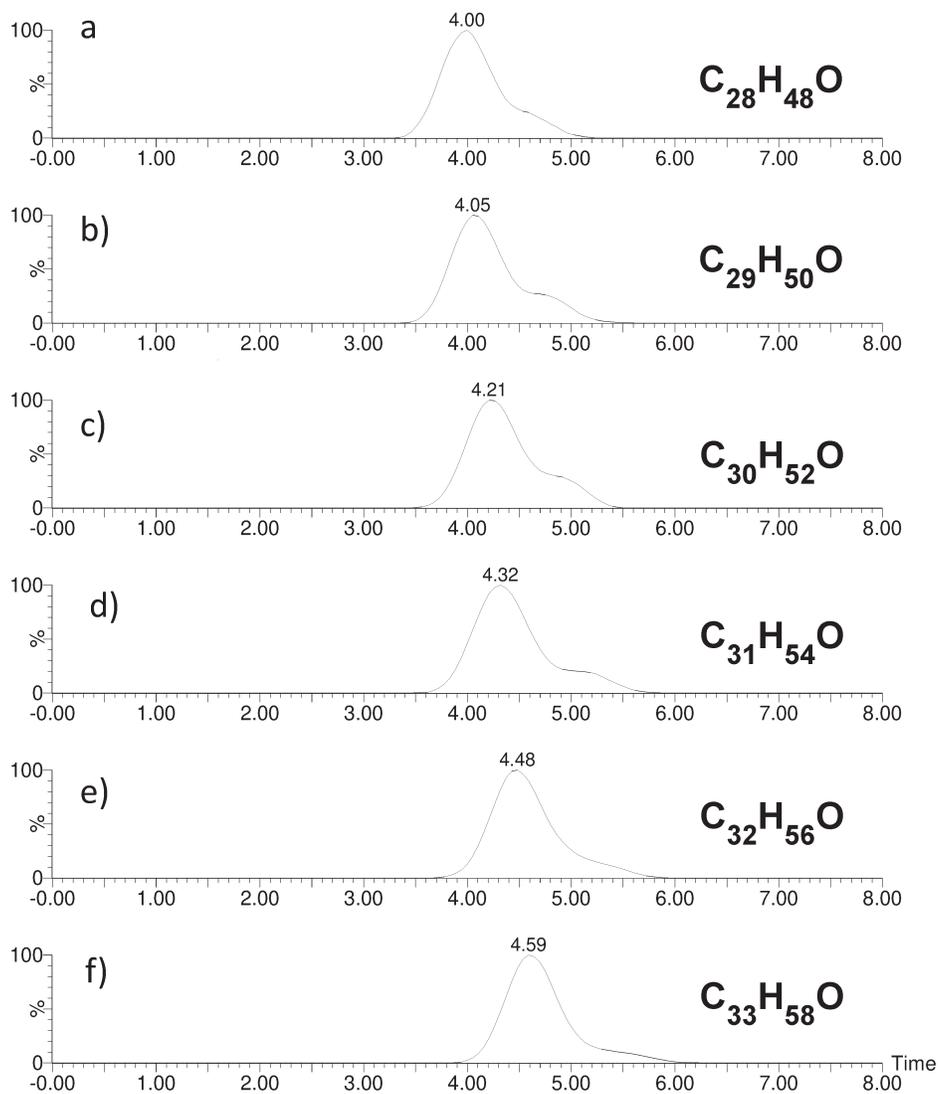
Os compostos mais abundantes da classe O<sub>2</sub> pertencem às séries homólogas com DBE 2 e 3. Para esses compostos, o mobilograma extraído (**Figura 40**) mostra uma tendência linear de mobilidade durante toda a faixa de  $m/z$ . Apenas um pico é observado no mobilograma extraído para cada íon, indicando a presença de “cores” (esqueletos moleculares base) com apenas uma estrutura (ou estruturas com seção de choque similares). A série homóloga mais intensa é a com DBE 3, que corresponde provavelmente a ácidos carboxílicos com dois cicloalcanos em sua estrutura (anéis naftênicos). Os compostos com DBE maiores então seriam ácidos carboxílicos com números diferentes de cicloalcanos.



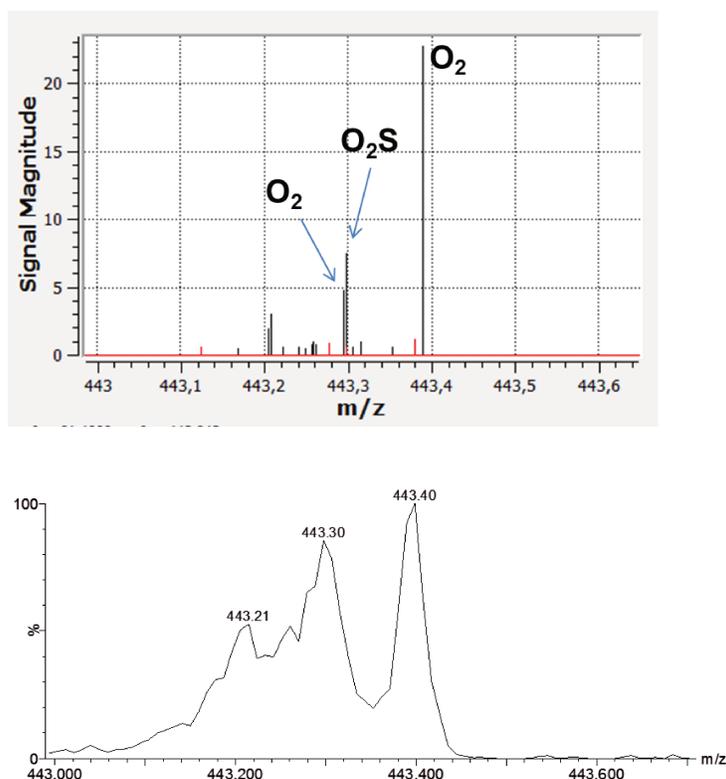
**Figura 40: Mobiligramas extraídos para íons das séries homogêneas com DBE 3 da classe  $O_2$ , a partir de análise por ESI(-) do corte de 500 – 525 °C.**

Entretanto, o fracionamento por HPLC-2 permite o estudo de séries homogêneas menos abundantes, nesse caso, os compostos com DBE maior do que 3 eluem nas frações mais polares, em especial na F5. Os mobiligramas extraídos para os compostos com DBE 5 (Figura 41) mostram, interessantemente, o aparecimento de um segundo pico de mobilidade, sugerindo a coexistência de compostos com mesma  $m/z$  mas seção de choque distintas. Esses compostos podem ser isômeros que apresentam estrutura de “core” diferentes, ou então podem ser compostos isôbaros (fórmulas moleculares diferentes) que não puderam ser resolvidos por massa devido a resolução insuficiente do

analisador TOF. Para solucionar esta dúvida, a análise do espectro de massas obtido pelo analisador de altíssima resolução e altíssima exatidão FT-ICR MS é bastante útil, pois é capaz de identificar a presença de isóbaros com defeitos de massa muito parecidos. A **Figura 42** mostra, como exemplo, a aproximação na região de  $m/z$  443,000 - 443,600 do espectro de massas obtido da F5 (rica em compostos  $O_2$  com DBE 5) no corte de 500 – 525 °C por FT-ICR MS. Nessa região, o íon de  $m/z$  443,40 cujo mobilograma apresenta dois picos (**Figura 41c**), é atribuído ao composto de fórmula molecular  $C_{30}H_{52}O_2$  (DBE 5). Nota-se que um único íon na região desse composto aparece mesmo no espectro de massas obtido por FT-ICR MS, indicando que a separação dos picos de mobilidade deve-se de fato a presença de isômeros com estruturas de “*core*” distintas.

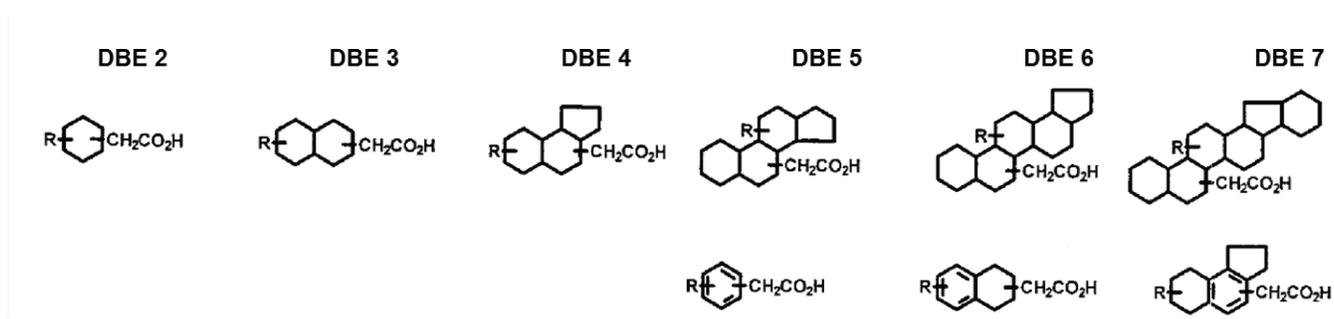


**Figura 41: Mobiligramas extraídos para íons da série homóloga com DBE 5 da classe O<sub>2</sub>, a partir de análise por ESI(-) do corte de 500 – 525 °C.**



**Figura 42:** Aproximação do espectro de massas da F5 no corte de 500 – 525 °C na região de  $m/z$  443,000-443, 600 obtido pelos analisadores de massa do tipo FT-ICR (acima) e TOF (abaixo).

Sabe-se que os ácidos carboxílicos presentes em petróleo podem apresentar estrutura com uma série de anéis naftênicos, anéis aromáticos ou ambos (**Figura 43**).<sup>130</sup> Dessa forma, as espécies O<sub>2</sub> com DBE 5 podem conter em sua estrutura quatro anéis naftênicos ou então um anel aromático. A coexistência dessas duas estruturas (anéis naftênicos *versus* anéis aromáticos) na amostra pode explicar a presença dos dois picos de mobilidade detectados para os compostos da série homóloga com DBE 5. Explicaria também a inexistência de isômeros para os compostos com DBE inferior a 5, já que é impossível a presença de um anel aromático nesses compostos.



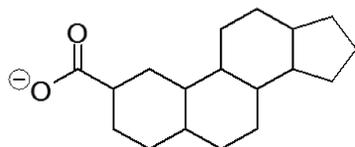
**Figura 43: Possíveis estruturas dos ácidos carboxílicos presentes majoritariamente em petróleo.**<sup>130</sup>

Considerando então a presença desses isômeros com diferentes estruturas de “core” (aromáticos/naftênico), o próximo passo seria a atribuição das estruturas aos picos. A princípio, o “core” com um anel aromático seria bem mais compacto do que o “core” com quatro anéis naftênicos. Entretanto, para que isômeros (mesma fórmula molecular) apresentem essas estruturas de “cores”, os ácidos com anel aromático devem apresentar uma cadeia alquílica mais longa do que seu isômero correspondente com anéis naftênicos, uma vez que o “core” do último já engloba um maior número de carbonos. Desse modo, o volume ocupado pela cadeia alquílica mais longa também deve ser considerado.

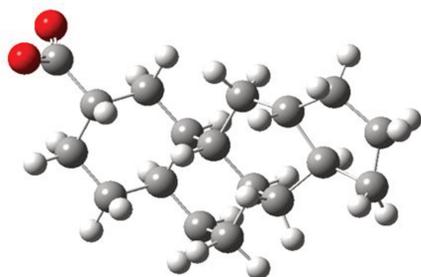
Alguns trabalhos comparam a mobilidade de compostos análogos com mesmo número de carbono cíclicos e acíclicos e mostram que as estruturas cíclicas são bem mais compactas do que as cadeias lineares.<sup>131</sup> A partir dessa informação, é possível inferir que os compostos aromáticos seriam os mais volumosos, uma vez que apresentam cadeias lineares mais longas do que seus análogos com anéis naftênicos.

Para confirmar essa informação, calculamos a seção transversal de choque para duas estruturas hipotéticas de ácidos carboxílicos isoméricos (**Figura 44**). Os cálculos mostraram que de fato o isômero com anel aromático é cerca de 20 % mais volumoso do que o isômero com anéis naftênicos (107,0 e 128,8 Å<sup>2</sup>, respectivamente). Assim, conclui-se que os íons com maior mobilidade (menor *drift time*) correspondem aos

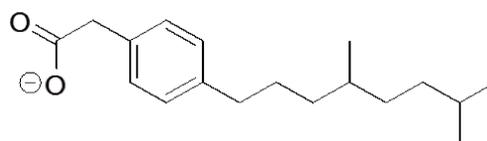
compostos mais compactos com estrutura de “core” formada por anéis naftênicos, enquanto que os íons com menor mobilidade correspondem aos compostos com “core” formado por anel aromático.



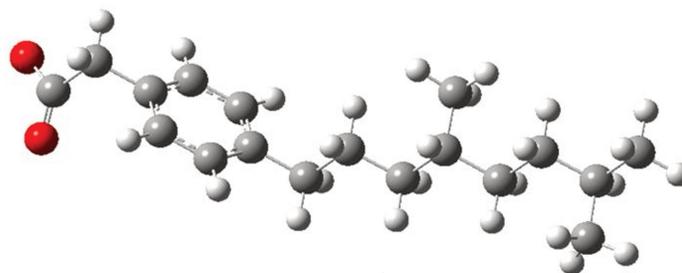
Chemical Formula:  $C_{18}H_{27}O_2^-$   
Exact Mass: 275.20



107.0 Å<sup>2</sup>



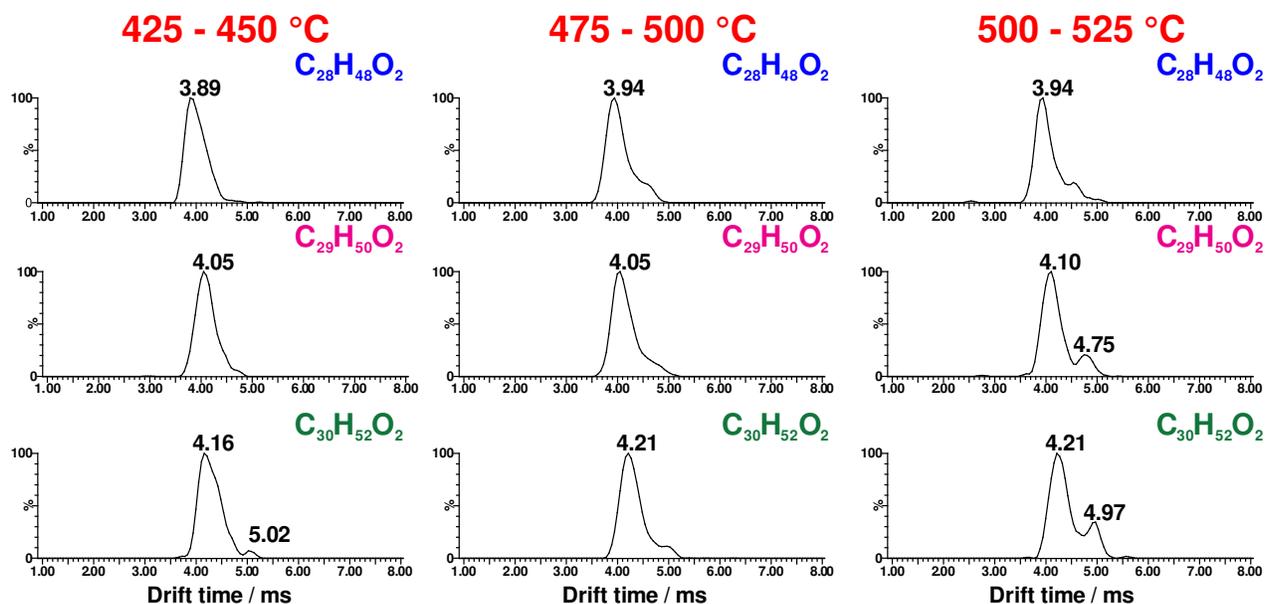
Chemical Formula:  $C_{18}H_{27}O_2^-$   
Exact Mass: 275.20



128.8 Å<sup>2</sup>

**Figura 44: Fórmulas estruturais (acima) e estruturas otimizadas (abaixo) para dois isômeros hipotéticos de ácidos carboxílicos (desprotonados) com DBE 5.**

Comparando o mobilograma para esses compostos de DBE 5 nos três cortes de destilação (**Figura 45**), a abundância relativa entre os ácidos naftênicos e os ácidos carboxílicos aumenta em função do ponto de ebulição. Enquanto que os ácidos naftênicos são quase que exclusivamente detectados no corte de 425 – 450 °C, uma abundância relativa de 4:1 é observada no corte de 500 – 525 °C. Portanto, a TWIM-MS permitiu verificar que os cortes de destilação com maior ponto de ebulição são mais ricos em ácidos aromáticos. Dessa forma, a técnica mostra ser capaz de diferenciar isômeros de ácidos carboxílicos em petróleo, inclusive oferecendo informação sobre a abundância relativa dos compostos na amostra.

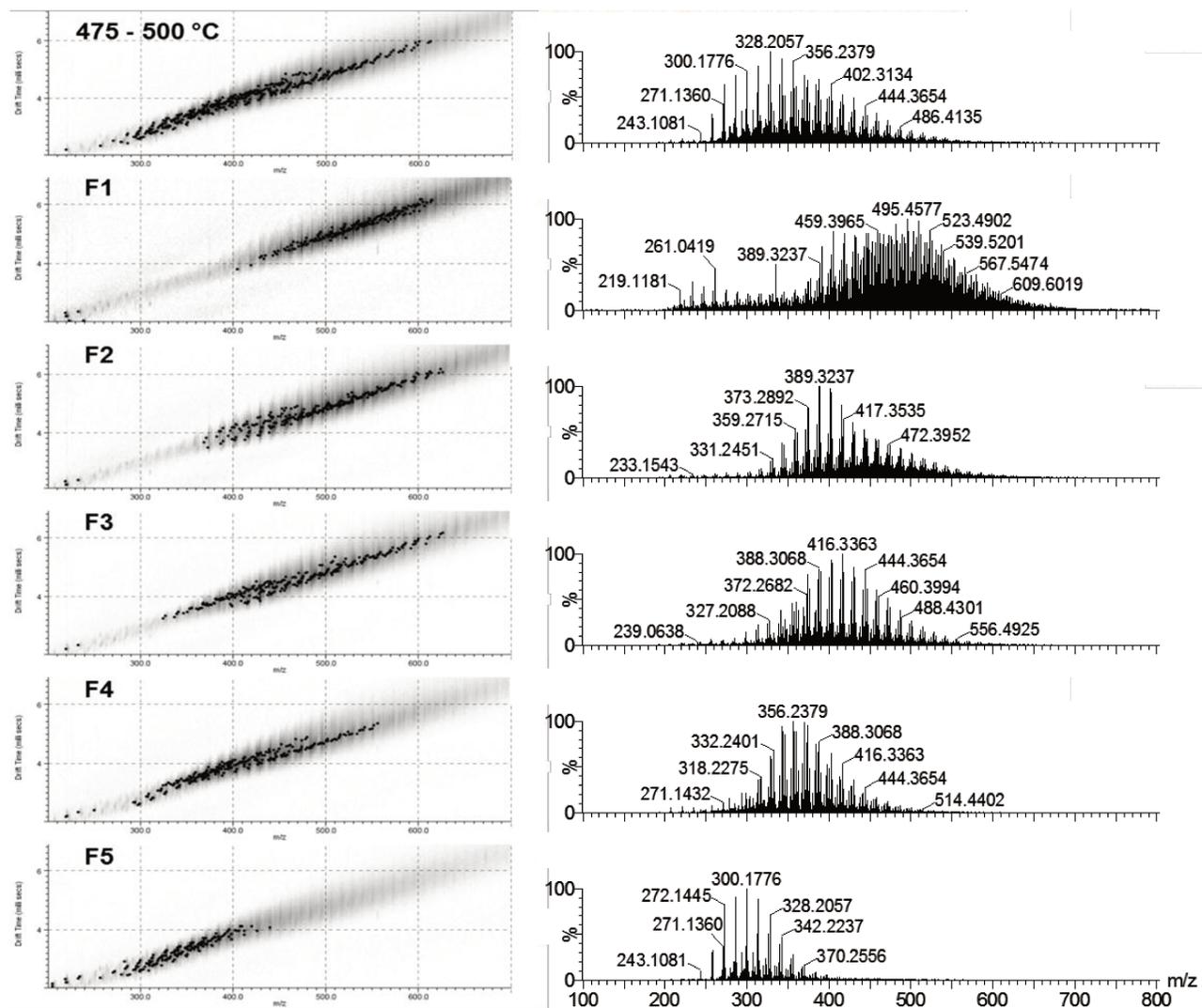


**Figura 45: Mobiligrama para os compostos mais abundantes da classe  $O_2$  com DBE 5 nos três cortes de destilação.**

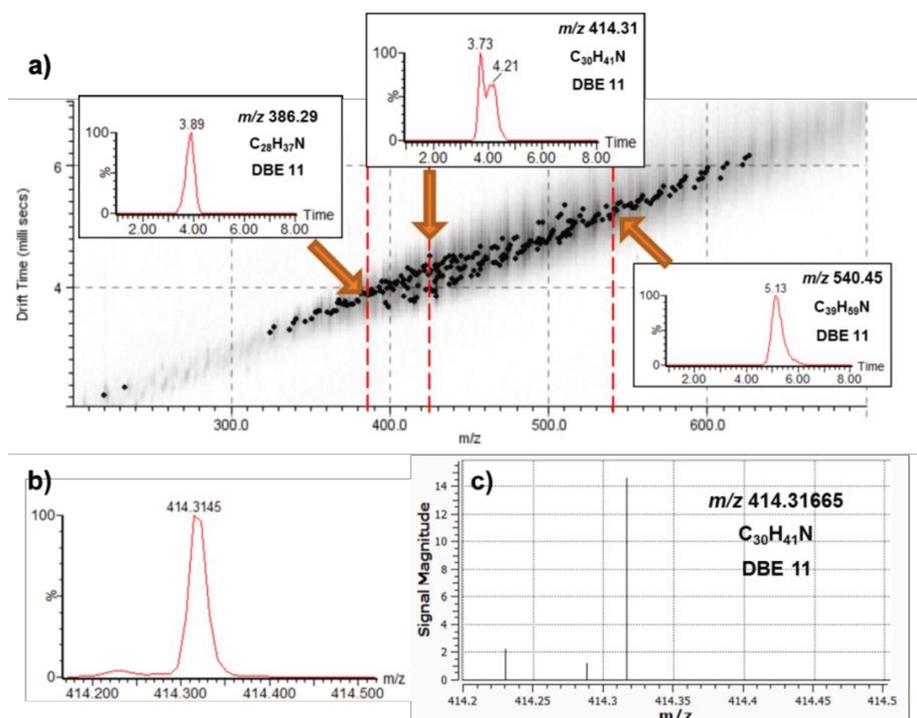
### 3.4.2.2 Identificação de isômeros da classe N

Nas frações a partir da F2 analisadas por TMAH, os compostos da classe N são quase que exclusivamente detectados. Nos espectros 2D de mobilidade para essas frações, nota-se a presença de duas bandas ligeiramente separadas (**Figura 46**). O plot 2D ampliado para a F3 (na qual os compostos N predominam o espectro de massas) é mostrado na **Figura 47** como exemplo. Observa-se que as duas bandas compreendem faixas de razão  $m/z$  diferentes, os compostos com menor mobilidade (banda de cima, maior *drift time*) estão na faixa de  $m/z$  300 – 510, enquanto que os compostos mais compactos (menor *drift time*) estão na faixa de  $m/z$  400 – 610. Assim, o mobiligrama extraído para o íon de  $m/z$  386,29 atribuído a  $C_{28}H_{37}N$  (**Figura 47a**, detalhe a esquerda) e o extraído para o íon de  $m/z$  540,45 atribuído a  $C_{39}H_{59}N$  (detalhe a direita) mostram cada um apenas um pico. Já o mobiligrama extraído para o íon de  $m/z$  414,31 atribuído a  $C_{30}H_{41}N$  apresenta dois picos separados. Como discutido para os compostos da classe  $O_2$ , dois picos de mobilidade indicam a presença de compostos com estrutura de “cores”

diferentes, que podem ser isômeros ou espécies que não foram resolvidas por massa devido ao poder de resolução insuficiente do analisador TOF (**Figura 47b**). Para resolver essa questão utiliza-se o espectro de massas obtidos pelo analisador de altíssima resolução FT-ICR (**Figura 47c**), que nesse caso mostra apenas um íon em  $m/z$  414,31665. Portanto, as duas espécies separadas por TWIM-MS são isômeros.

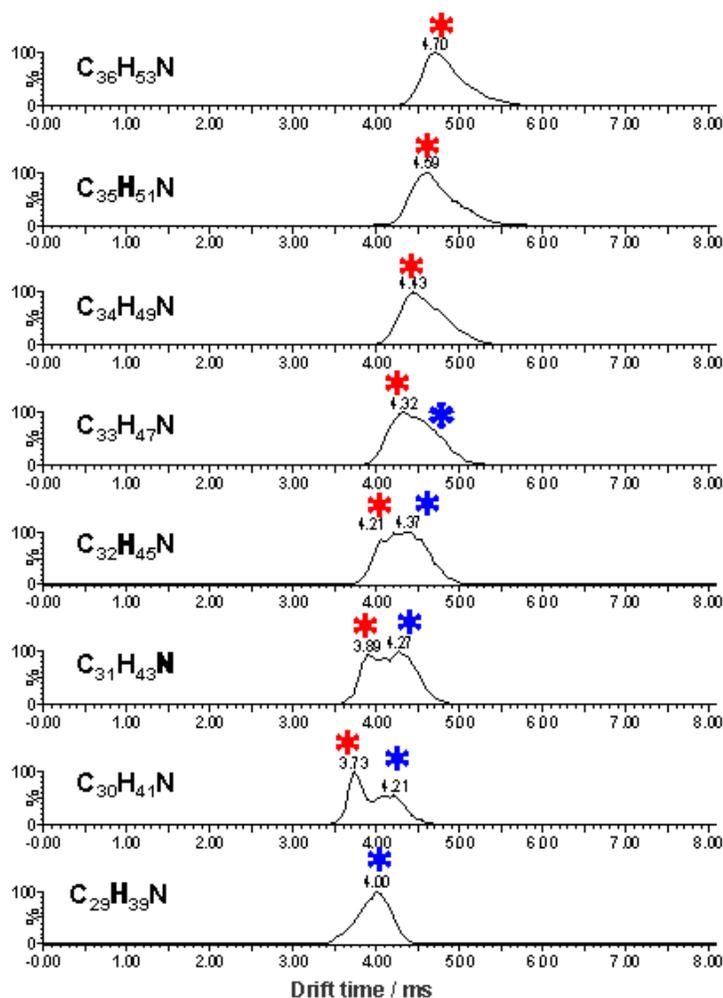


**Figura 46: ESI(-)-TWIM-MS (usando TMAH como dopante) para o corte de destilação 475-500 °C e suas cinco frações de HPLC-2. Esquerda: espectro 2D de mobilidade ( $m/z$  x drift time); direita: espectro de massas.**



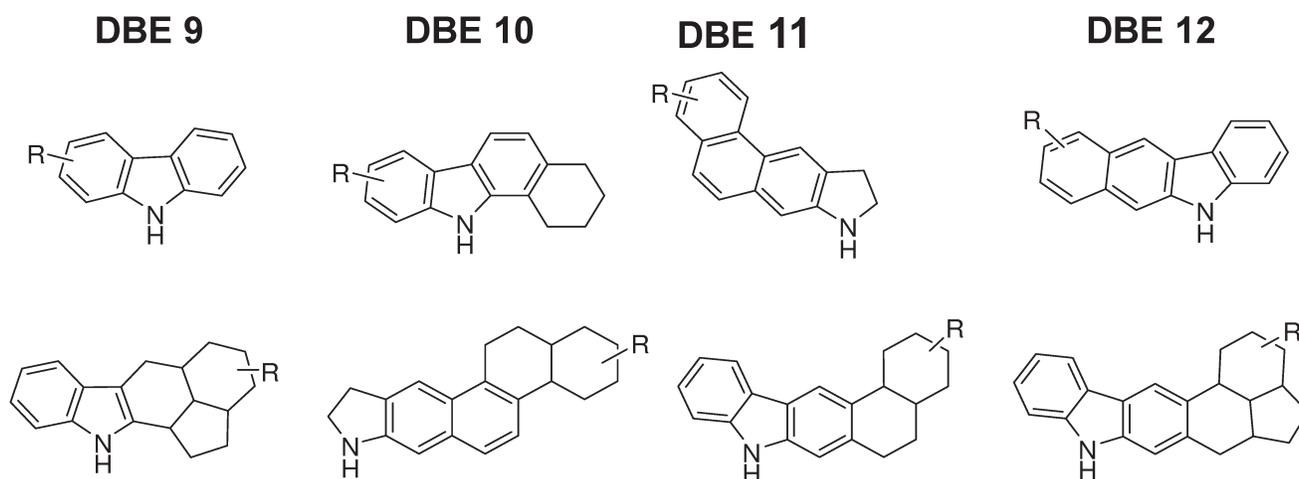
**Figura 47:** ESI(-)-MS (usando TMAH como dopante) para a F3 do corte de destilação 475-500 °C. a) ampliação do espectro 2D de mobilidade ( $m/z$  x *drift time*), b) espectro de massas pelo analisador TOF e c) espectro de massas pelo analisador de altíssima resolução FT-ICR MS.

Para melhor visualizar essa tendência, a **Figura 48** mostra os mobiligramas extraídos para toda a série homóloga com DBE 11. Nota-se que o mobiligrama extraído para o composto  $C_{29}$  mostra um pico com um pequeno ombro a esquerda. Com o aumento do número de carbono, o pico a esquerda (menor *drift time*) tem abundância relativa crescente, até que a partir do composto  $C_{33}$  ele se torna o mais abundante. A mesma tendência é observada para os compostos de todas as séries homólogas da classe N nesse modo. Assim, os resultados de TWIM mostram que os compostos dessa classe passam de uma estrutura mais volumosa (menor mobilidade) a uma estrutura mais compacta conforme o número de carbonos aumenta.



**Figura 48:** Mobiligramas extraídos para compostos da classe N de DBE 11 por ESI(-), usando TMAH como dopante.

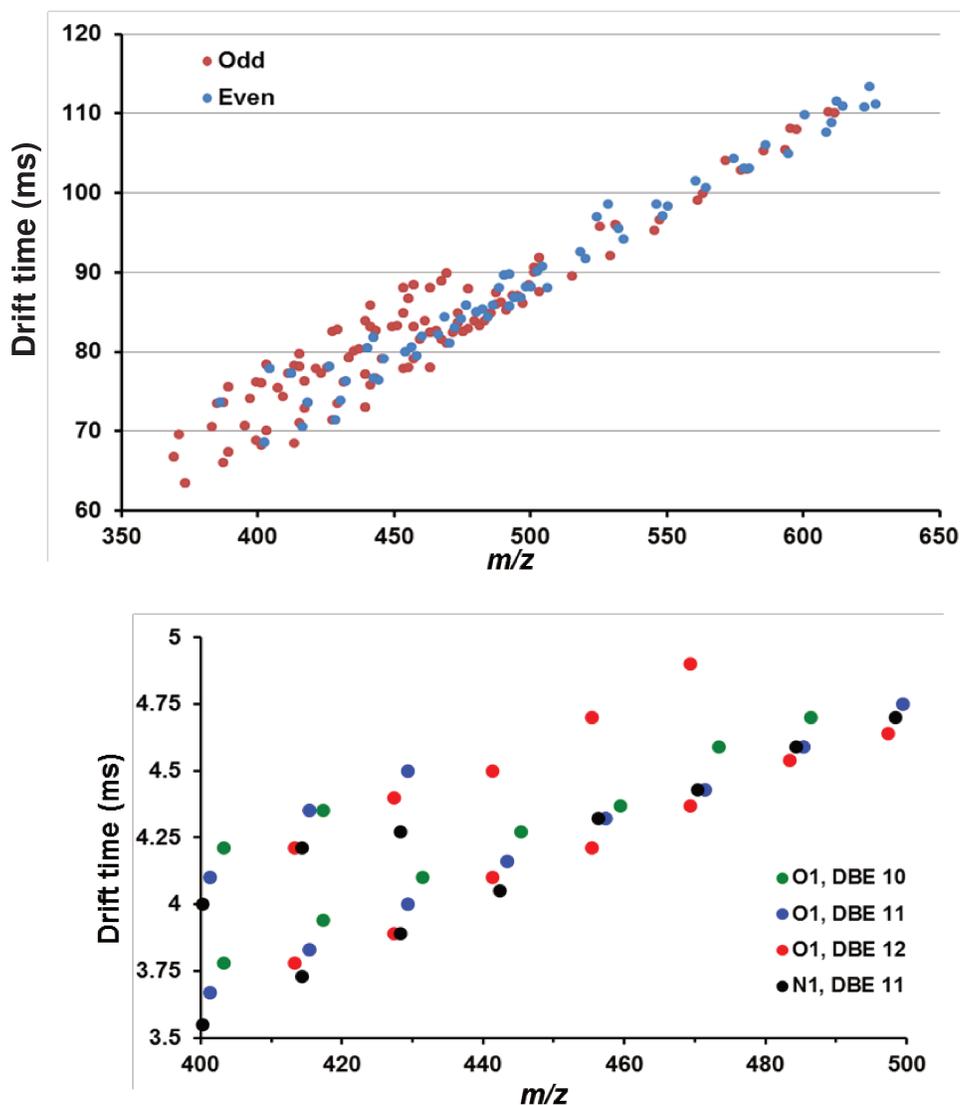
Assim como discutido para os compostos da classe  $O_2$ , as duas estruturas de “core” detectadas podem corresponder a uma estrutura de “core” mais aromática *versus* uma estrutura com maior número de anéis naftênicos. Isso explica as faixas de  $m/z$  de cada série de isômeros, o “core” mais aromático apresenta menor número de carbonos do que o “core” naftênico e por esse motivo a distribuição dos compostos com essa estrutura está centrada em menores valores de  $m/z$ . Possíveis estruturas para esses compostos são mostradas na **Figura 49**.



**Figura 49:** Estruturas hipotéticas para os compostos isoméricos da classe N detectados por ESI(-).

### 3.4.2.3 Identificação de isômeros da classe O

Para a classe O, detectada nas frações F1 e F2, foram observadas tendências similares às aquelas observadas para os compostos da classe N, pelo mesmo procedimento. A **Figura 50** mostra duas comparações entre as mobilidades extraídas para os compostos dessas duas classes. Na figura acima foram plotados os íons detectados mais abundantes na análise da F1. Nessa fração estão presentes apenas compostos das classes N e O, sendo que os íons com  $m/z$  ímpar correspondem aos compostos da classe O e os íons com  $m/z$  par aos compostos da classe N (tomou-se o cuidado de usar um *threshold* alto de forma a evitar a extração da mobilidade dos íons isotopólogos de  $C^{13}$ ). Na figura abaixo, extraiu-se manualmente a mobilidade de compostos de séries homólogas das duas classes. Nota-se claramente que as duas classes possuem mobilidade semelhante e seguem a mesma tendência, com a presença de isômeros até aproximadamente  $m/z$  450. Assim, pode-se inferir que os compostos da classe O seriam derivados do furano, por apresentarem estruturas semelhantes aos compostos derivados do pirról. Entretanto, os resultados não são conclusivos e novos experimentos de TWIM-MS e MS/MS seriam necessários para a confirmação da estrutura.

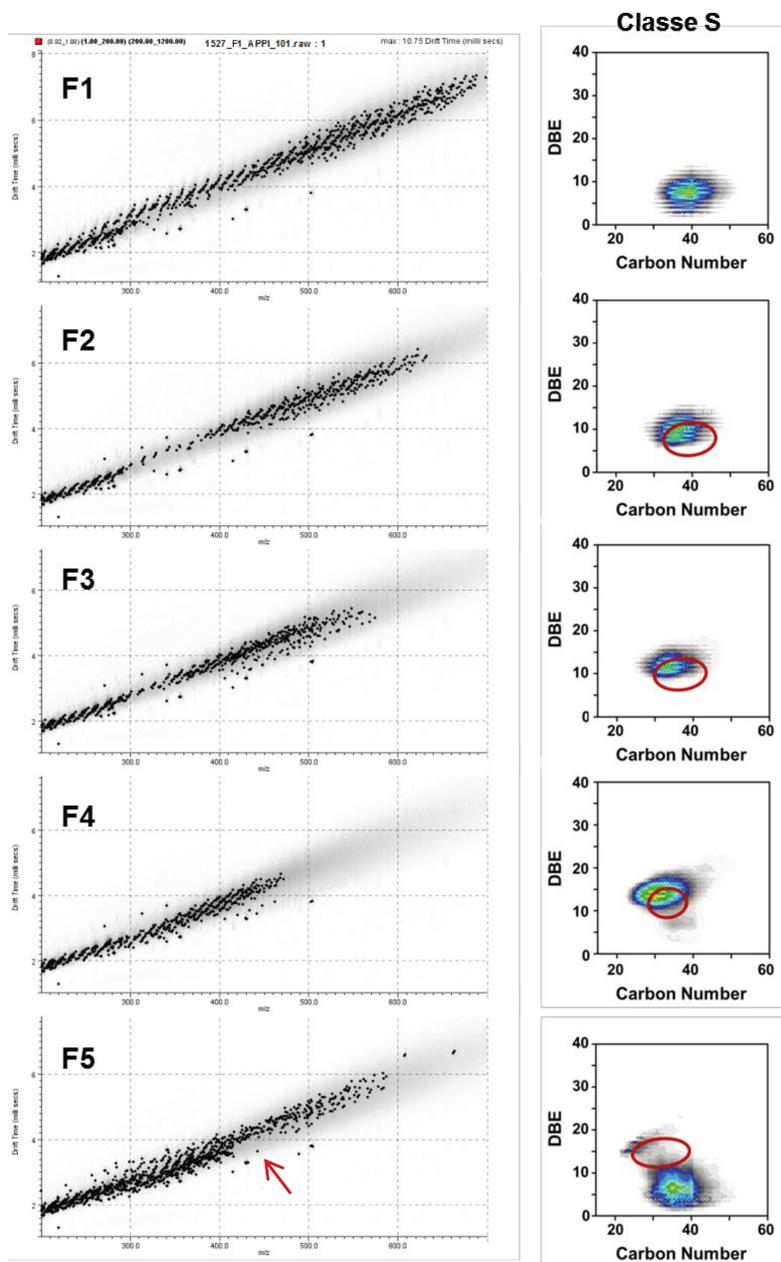


**Figura 50:** Comparação da mobilidade dos compostos das classes N e O por ESI(-) usando TMAH. Acima: compostos de  $m/z$  ímpar (vermelho) versus compostos de  $m/z$  par (azul) extraídos da análise da F2. Abaixo: mobilidade extraída para compostos da classe O com DBE 10-12 e da classe N DBE 11.

### 3.4.3 Análises por fotoionização a pressão atmosférica

Os principais compostos detectados nesse modo de ionização pertencem às classes S, S<sub>2</sub> e hidrocarbonetos aromáticos. A **Figura 51** mostra o espectro 2D de mobilidade para as frações de HLPC-2 do corte de destilação 500-525 °C e o diagrama de DBE vs número de carbonos para a classe S (classe mais abundante), obtidos por

APPI(+)-FT-ICR MS. Os círculos vermelhos mostram o contorno da distribuição dos compostos na fração anterior, a fim de facilitar a comparação. A primeira fração a eluir (F1, mais apolar) possui compostos com pesos moleculares maiores, como visto pelo maior número de carbonos médio (~ 40 carbonos) e também pelos maiores valores de  $m/z$  (até  $m/z \sim 700$ ) no plot 2D de mobilidade (esquerda). As frações subsequentes, que apresentam polaridade aumentando, têm pesos moleculares diminuindo progressivamente até a F4, que possui número de carbono médio ~ 30, faixa de massas até  $m/z \sim 480$  e maior aromaticidade e quantidade de heteroátomos/carbono. Conforme o modelo de Boduszynski,<sup>99</sup> em um mesmo corte de destilação os compostos com maior peso molecular são as parafinas (apolares) e os compostos com menores pesos moleculares têm progressivamente maior número de heteroátomos em sua estrutura (mais polares). Assim, o maior peso molecular obtido por TWIM-MS para as frações mais apolares confirma o modelo de Boduszynski de progressão contínua dos compostos em petróleo. Comparando o diagrama de DBE vs número de carbono de cada fração com a fração anterior (círculos vermelhos), nota-se que o centro da distribuição de uma fração coincide com a borda da distribuição da fração anterior, mais uma vez indicando o caráter contínuo das espécies presentes no petróleo quando comparado aos níveis de aromaticidade (maior DBE).



**Figura 51: (+)APPI-TWIM-MS para as cinco frações de HPLC2 do corte de destilação 500-525 °C. Esquerda: espectro 2D de mobilidade ( $m/z$  x *drift time*); direita: diagrama de DBE vs número de carbonos para a classe S por FT-ICR MS. Os círculos vermelhos mostram a posição da distribuição da fração anterior.**

A fração F5, entretanto, mostra um comportamento diferente apresentando duas distribuições, uma na região maltênica e outra na região característica de asfaltenos ( $DBE/C \approx 0,9$ )<sup>132</sup>. Essa última fração é residual e portanto lava a coluna de HPLC arrastando os compostos residuais que deveriam ter eluído nas frações anteriores.

Assim, a distribuição maltênica para essa fração pode ser considerada uma somatória de resíduos das frações anteriores. Já a distribuição na região característica de asfaltenos é esperada para essa fração, que deve conter as espécies mais polares e com maior número de anéis aromáticos. Nota-se um espaço vazio (“*gap*”) na F5 entre as distribuições de asfaleno e de malteno no diagrama de DBE *vs* número de carbonos. Um comportamento semelhante já havia sendo observado pelo grupo de trabalho do NHMFL em amostras contendo asfaleno e malteno utilizando inserção direta sem prévia separação. Esse *gap* a princípio contradiz o modelo de Boduszynski pois seria uma evidência de descontinuidade nos compostos de petróleo. Por outro lado, se a progressão contínua dos compostos em petróleo for verdadeira, o material que deveria ser detectado na região onde encontra-se o *gap* pode estar associado em forma de agregados com pesos moleculares altos demais para serem detectados pela janela analítica das técnicas utilizadas. Se esses agregados existirem, o seu processamento é muito difícil e o rendimento na produção de combustíveis é muito baixo, o que é economicamente ruim. Além disso, eles são responsáveis pela deposição em colunas de extração e de transferência. Dessa forma, é importante investigar a estrutura dos compostos que formam agregados para encontrar uma forma de desestabilizar esses agregados para que o seu processamento seja otimizado e para prevenir entupimentos das colunas de extração e de transferência.

Comparando o diagrama de DBE *vs* número de carbono para a F5 e a F4, nota-se que a distribuição da F4 completa perfeitamente o espaço vazio (*gap*) existente no diagrama da F5. Dessa forma, o material referente a região de *gap* parece estar contido na fração F4 e então o fracionamento por HPLC-2 permitiu acessar essas espécies, que encontram-se muito pouco intensas na amostra sem fracionamento.

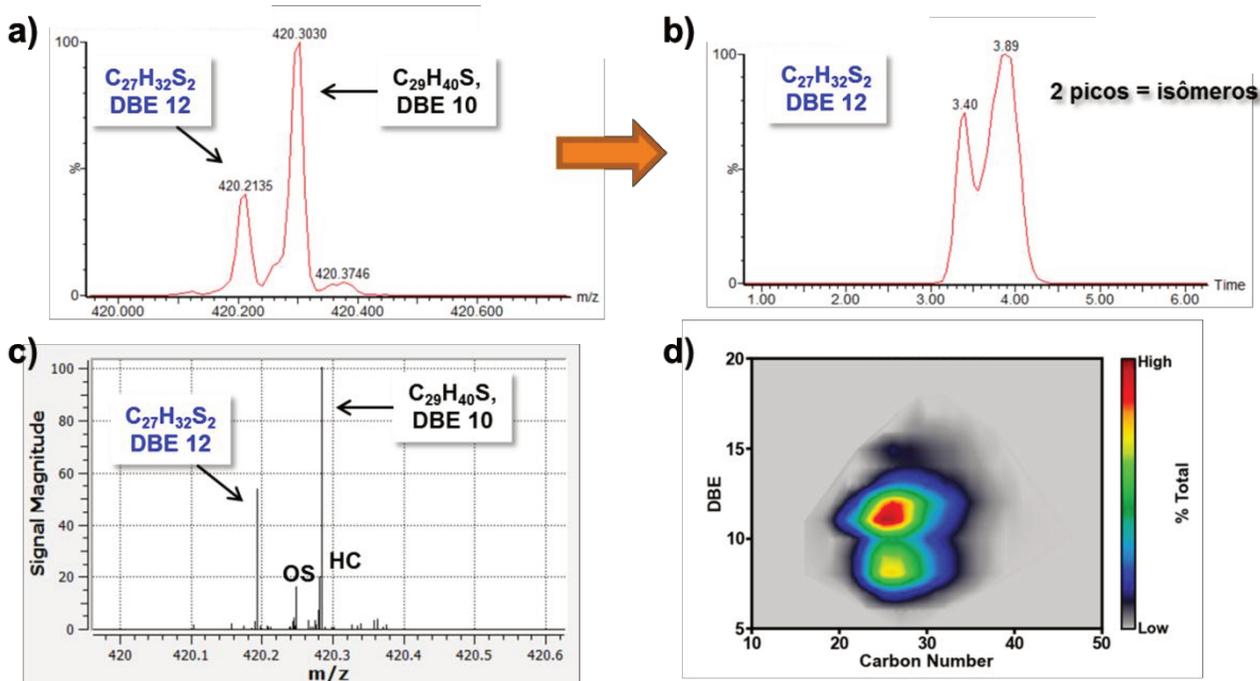
No espectro 2D de mobilidade da F5 também nota-se a presença de um “*gap*” na faixa de razões *m/z* correspondente ao *gap* observado nos resultados de FT-ICR MS. Essa observação mostra que os resultados obtidos por TWIM-MS refletem muito bem

aqueles obtidos por FT-ICR MS, mostrando que a utilização da técnica TWIM-MS é eficaz para análise de petróleo e sua utilização conjunta com a FT-ICR MS é bastante adequada. A partir da identificação da F4 como contendo os compostos da região do “gap”, novos experimentos de TWIM-MS estão sendo planejados para aprofundar o conhecimento sobre a estrutura dessas espécies.

### 3.4.3.1 Identificação de isômeros

O mobiligrama extraído para os compostos de classe  $S_2$ , mostra duas séries com *drift times* diferentes, ou seja, para cada  $m/z$  dois *drift times* são atribuídos. Como exemplo, na **Figura 52a** é mostrado uma aproximação do espectro de massas da região de  $m/z$  400,00 – 420,60 onde o íon em  $m/z$  420,21 é atribuído à espécie  $C_{27}H_{32}S_2$ . A **Figura 52b** então mostra o mobiligrama referente ao íon em  $m/z$  420,21, que apresenta dois picos separados em 3,40 ms e 3,89 ms. A presença desses dois picos indica que duas espécies com  $m/z$  420,21 mas estruturas tridimensionais diferentes coexistem. Essas duas espécies a princípio podem ser isômeros ou então podem ser compostos isóbaros (fórmulas moleculares diferentes) que não puderam ser resolvidos por massa devido a resolução insuficiente do analisador TOF. O espectro de massas obtido pelo analisador de altíssima resolução FT-ICR (**Figura 52c**), entretanto, mostra nessa região de  $m/z$  apenas um único íon ( $m/z$  420,1940), indicando então que se trata inequivocamente de duas espécies isômeros. O mesmo é válido para os íons de todas as séries homólogas da classe  $S_2$ , portanto, dois “cores” com estruturas diferentes existem para essa classe. O diagrama de DBE *vs* número de carbono para a classe  $S_2$  (**Figura 52d**) também é uma indicação da presença de dois “cores” distintos, pois apresenta uma distribuição bimodal. Novamente os dois “cores” poderiam ser atribuídos a estruturas mais aromáticas *versus* estruturas mais naftênicas, entretanto, experimentos de MS/MS ainda seriam necessários para a atribuição da estrutura de cada “core”.

A concordância entre os dados de TWIM-MS e FT-ICR MS também é claramente notada na comparação entre a **Figura 52a** e **50c**, pois os mesmos íons com intensidades parecidas são detectados nos espectros de massas por ambas técnicas.

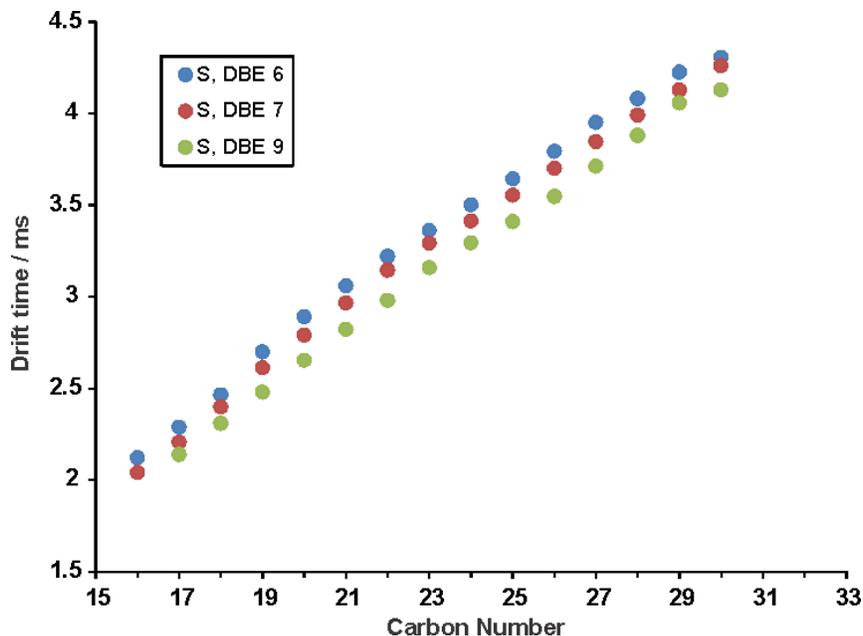


**Figura 52: Identificação de isômeros da classe  $S_2$ .** a) Espectro de massas obtido pelo analisador TOF (instrumento de TWIM-MS); b) mobiligrama para o íon em  $m/z$  420.21; c) espectro de massas de altíssima resolução obtido pelo analisador FT-ICR; d) diagrama de DBE vs número de carbonos para a classe  $S_2$ .

A análise detalhada para os compostos hidrocarbonetos mostrou uma diversidade de isômeros presentes, sendo que o mobiligrama extraído para cada íon mostra picos alargados que possibilitam notar a presença de ao menos 3 espécies com  $\Omega$  distintos, mas não distintos o suficiente para essas espécies serem completamente resolvidas. Dessa forma, para a adequada identificação da estrutura dessas espécies, seria necessário realizar novos experimentos com condições otimizadas especificamente para essa classe de compostos, para desse modo tentar melhorar a resolução dessas espécies.

Para os compostos da classe S, novamente não foi possível observar picos bem resolvidos para a mobilidade extraída de cada íon, mas sim picos alargados com presença de ombros. Nesse caso, plotando-se o *drift time* mais abundante extraído para

cada íon em função do número de carbono (**Figura 53**), nota-se uma ligeira mudança na inclinação de cada série homóloga que ocorre aproximadamente a partir do número de carbono 23. Esses resultados novamente mostram o potencial da técnica em estudar as estruturas desses compostos presentes em petróleo, entretanto, experimentos adicionais de TWIM-MS otimizados para essa classe e experimentos de MS/MS seriam necessários para investigar a possível estrutura desses compostos.



**Figura 53: Drift time vs. número de carbono para os compostos da classe N com DBE 6, 7 e 9.**

### 3.5 CONCLUSÃO

A análise por TWIM-MS dos cortes de destilação sem o fracionamento por HPLC-2 permite o estudo dos compostos mais abundantes na amostra de uma forma rápida, já que evita a etapa mais lenta da análise, que é o fracionamento por HPLC-2. Entretanto, o fracionamento do corte de destilação permite um maior detalhamento da amostra de duas formas: 1) permite a detecção de classes e séries homólogas menos abundantes ou com menor eficiência de ionização, que são suprimidas pelas classes mais abundantes e/ou com maior eficiência de ionização quando a análise por TWIM-MS é feita diretamente no destilado; 2) permite a distinção entre compostos de  $m/z$

próximas, já que simplifica o espectro de massas compensando o menor poder de resolução do TOF. Essas vantagens tornam-se bastante interessantes quando se trabalha com misturas tão complexas como o petróleo.

A utilização da técnica de TWIM-MS mostrou ser capaz de diferenciar séries de isômeros, que possuem estruturas de “*core*” (esqueleto molecular base) distintas, para as classes O<sub>2</sub>, N neutro (derivados de pirróil), O e S<sub>2</sub>. Experimentos de MS/MS ainda seriam úteis para ajudar a identificar a estrutura desses “*cores*”. Para outras classes como hidrocarbonetos e sulfurados, picos alargados com presença de ombros indicam a presença de pelo menos 3 isômeros com seção de choque ( $\Omega$ ) distintas, mas que não foram completamente resolvidos por TWIM. Como nesses experimentos utilizamos uma condição otimizada geral para todas as amostras, experimentos futuros de TWIM otimizados especialmente para cada classe devem apresentar resultados interessantes e esclarecedores sobre esses isômeros. A calibração com respeito a mobilidade também seria um experimento interessante, pois assim é possível obter um valor experimental de  $\Omega$  para os compostos, que pode então ser comparado com valores de  $\Omega$  teórica calculados para estruturas hipotéticas.

A utilização da técnica de TWIM-MS também permitiu a separação de classes dos compostos de acordo com sua diferença de mobilidade, mostrando seu potencial para a análise estrutural de diferentes classes.

Outra área interessante de potencial uso da técnica TWIM-MS é na identificação e eliminação de contaminantes das amostras de petróleo, pois estes normalmente apresentam estruturas bem diferentes do que os compostos do petróleo, sendo claramente separados por mobilidade. Nesse sentido, a técnica também é útil para a simplificação dos espectros de massas, pela exportação dos espectros de massas a partir de diferentes regiões de mobilidade das classes separadas.

Por fim, os resultados também indicam uma grande concordância entre os dados de TWIM-MS e FT-ICR MS com relação as espécies detectadas nos espectros de

massas, ressaltando a adequação da utilização das duas técnicas em conjunto de forma complementar. Para todas as classes de compostos identificadas nos quatro modos de ionização, encontrou-se evidências que comprovam o modelo de progressão contínua de composição do petróleo, proposto por Boduszynski.



---

***CONCLUSÃO GERAL E  
PERSPECTIVAS***

---



Nesse trabalho mostramos o potencial da técnica IM-MS em diferentes áreas de aplicação, com foque principal na separação de isômeros. A IM-MS, em especial a TWIM-MS, mostrou ser uma ferramenta bastante interessante que confere uma versatilidade valiosa a espectrometria de massas, adicionando informação sobre a estrutura tridimensional dos íons e possibilitando a resolução de isômeros com  $\Omega$  diferentes, como verificado nos Capítulos 1 e 3. Além disso, a IM-MS mostrou também ser capaz de diferenciar íons com mesma massa, carga e  $\Omega$ , apenas pela sua diferença de distribuição de carga, que gera interações com intensidades contrastantes entre os íons e as moléculas do gás, como mostrado pela separação dos protômeros (Capítulo 2). Essa observação é muito interessante e pode inaugurar uma linha de aplicações da técnica, em que as separações sejam feitas pela diferença de distribuição de carga dos íons. Sugere também o uso da IM-MS como uma nova ferramenta para o estudo do sítio de protonação ou desprotonação mais provável em espécies com múltiplos sítios possíveis. A partir dos resultados mostrados no Capítulo 1, esperamos guiar futuras tentativas de resolver outras misturas de porfirinas isoméricas e outras espécies supramoleculares por IM-MS. Os resultados mostrados no Capítulo 3 sugerem que a IM-MS fornece dados sobre os compostos em petróleo que podem ser aproveitados em diversas situações, como separação de isômeros, estudo da estrutura tridimensional dos compostos e eliminação de contaminantes. Assim, acredita-se que após experimentos otimizados especificamente para cada classe de compostos, e/ou pela análise de frações contendo classes específicas, possa se ter um estudo interessante sobre as espécies isoméricas presentes no petróleo e sobre a estrutura tridimensional dos compostos de cada classe, estudando, por exemplo, as estruturas “ilha” *versus* “arquipélago” em asfaltenos. Assim, futuramente pode ser desenvolvido um método baseado em IM-MS para rápida caracterização de isômeros em amostras de petróleo. Para isso, seria interessante o desenvolvimento de uma ferramenta de tratamento de dados (*software*) visto a enorme

complexidade da amostra, que torna o seu tratamento de dados manual muito trabalhoso.

---

***REFERÊNCIAS***  
***BIBLIOGRÁFICAS***

---



- <sup>1</sup> Tyndall, A. M., Powell, C. F., *Proc. R. Soc. Lond. A*, **1931**, 134, 125-136.
- <sup>2</sup> Bradburry, N. E., Nielsen, R. A., *Phys. Rev.*, **1936**, 49, 388-393.
- <sup>3</sup> Revercomb, H. E.; Mason, E. A. *Anal. Chem*, **1975**, 47, 970-983.
- <sup>4</sup> Collin, D.C.; Lee, M.L.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, 372, 66-73.
- <sup>5</sup> Eiceman, G.W. *Critical Rev. Anal. Chem.* **1991**, 22, 471-489.
- <sup>6</sup> Ewing, R.G.; Atkinson, D.A.; Eiceman, G.A.; Ewing, G.J. *Talanta* **2001**, 54, 515-529.
- <sup>7</sup> McDaniel, E.W.; Martin, D.W.; Barnes, W.S. *Rev. Sci. Instrum.* **1962**, 33, 2-7.
- <sup>8</sup> Albritton, D.L.; Miller, T.M.; Martin, D.W.; McDaniel, E.W. *Phys. Rev.* **1968**, 171, 94-102.
- <sup>9</sup> McDaniel, E.W.; *J. Chem. Phys.* **1970**, 52, 3931-3935.
- <sup>10</sup> McAfee Jr., K.B.; Sipler, D.P.; Edelson, D. *Phys. Rev.* **1967**, 160, 130-135.
- <sup>11</sup> Edelson, D.; Morrison, J.A.; McKnight, L.G.; Sipler, D.P. *Phys. Rev.* **1967**, 164, 71-75.
- <sup>12</sup> Young, C.E.; Edelson, D.; Falconer, W.E. *J. Chem. Phys.* **1970**, 53, 4295-4302.
- <sup>13</sup> Karasek, F.W.; Cohen, M.J.; Carroll, D.I. *J. Chromatogr. Sci.* **1971**, 9, 390-392.
- <sup>14</sup> Lawrence, A.H. *Anal. Chem.* **1986**, 58, 1269-1272.
- <sup>15</sup> Lawrence, A.H.; Nanji, A.A. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **1988**, 16, 345-347.
- <sup>16</sup> Kim, S.H.; Spangler, G.E. *Anal. Chem.* **1985**, 57, 567-569.
- <sup>17</sup> Kuk, Y. Jarrold, M.F.; Silverman, P.J.; Bower, J.E.; Brown, W.L. *Phys. Rev. B* **1989**, 39, 11168-11170.
- <sup>18</sup> Kemper, P.R.; Bowers, M.T. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1990**, 1, 197-207.
- <sup>19</sup> Wu, C.; Siems, W. F.; Asbury, G. R.; Hill, H. H. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 4929
- <sup>20</sup> Gillig, K. J.; Ruotolo, B.; Stone, E. G.; Russell, D. H.; Fuhrer, K.; Gonin, M. Schultz, A. J. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 3965.

- <sup>21</sup> Clemmer D. E.; Hudgins R. R.; Jarrold M. F. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1995**, *117*, 10141.
- <sup>22</sup> [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Ion\\_mobility\\_spectrometry\\_diagram.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Ion_mobility_spectrometry_diagram.svg). Cc-by-sa Jeff Dahl.
- <sup>23</sup> Johnson, P. V.; Beegle, L. W.; Kim, H. I.; Eiceman, G. A.; Kanik, I. *Int. J. Mass Spectrom.* **2007**, *262*, 1-15.
- <sup>24</sup> Johnson, P.V.; Beegle, L.W.; Kim, H.I.; Eiceman, G.A.; Kanik, I. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2007**, *262*, 1-15.
- <sup>25</sup> Creaser, C.S.; Griffiths, J.R.; Bramwell, C.J.; Noreen, S.; Hill, C.A.; Thomas, C.L.P. *Analyst* **2004**, *129*, 984-994.
- <sup>26</sup> Hoffman, E.; Stroobant, V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. 2 ed. John Wiley & Sons: Nova Iorque, 2001.
- <sup>27</sup> Fenn, J.B.; Mann, M.; Meng, C.K.; Wong, S.F.; Whitehouse, C.M. *Science*, **1989**, *246(4926)*, 64-71.
- <sup>28</sup> Hoffmann, E.; Stroobant, V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. 2 ed. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, **2001**.
- <sup>29</sup> Cole, R.B. *Electrospray ionization mass spectrometry: fundamentals, instrumentation and applications*. 1 ed. John Wiley & Sons, Ltd: Nova Iorque, **2007**.
- <sup>30</sup> Robb, D.B.; Covey, T.R.; Bruins, A.P. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3653-3659.
- <sup>31</sup> Agilent Technologies website: <http://www.chem.agilent.com>.
- <sup>32</sup> Kanu, A. B.; Dwivedi, P.; Tam, M.; Matz, L.; Hill, H. H. *J. Mass Spectrom.* **2008**, *43*, 1
- <sup>33</sup> Buryakov, I.A.; Krylov, E.V.; Nazarov, E.G.; Rasulev, U.K. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* **1993**, *128*, 143-148.
- <sup>34</sup> Guevremont, R. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1058*, 3-19.
- <sup>35</sup> Waters Corporation website: <http://www.waters.com>.
- <sup>36</sup> Hoaglund-Hyzer, C. S.; Counterman, A. E.; Clemmer, D. E. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 3037.

- <sup>37</sup> Pringle, S. D.; Giles, K.; Wildgoose, J. L.; Williams, J. P.; Slade, S. E.; Thalassinou, K.; Bateman, R. H.; Bowers, M. T.; Scrivens, J. H., *Int. J. Mass Spectrom.* **2007**, *261*, 1-12
- <sup>38</sup> Giles, K.; Pringle, S. D.; Worthington, K. R.; Little, D.; Wildgoose, J. L.; Bateman, R. H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 2401-2414
- <sup>39</sup> Giles, K.; Williams, J.P.; Campuzano, I. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25*, 1559-1566.
- <sup>40</sup> Trimpin, S.; Clemmer, D.E. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 9073.
- <sup>41</sup> Hoskins, J.N.; Trimpin, S. Grayson, S.M. *Macromolecules* **2011**, *44*, 6915-6918.
- <sup>42</sup> Sunyoung, L.; Li, Z.; Valentine, S.J.; Zucker, S.M.; Webber, N.; Reilly, J.P.; Clemmer, D.E. *Int. J. Mass Spectrom.* **2012**, *309*, 154-160.
- <sup>43</sup> Shvartsburg, A.A.; Hudgins, R.R.; Dugourd, P.; Jarrold, M.F. *Chem. Soc. Rev.* **2001**, *30*, 26.
- <sup>44</sup> Lalli, P.M.; Corilo, Y.E.; Sa, G.F.; Daroda, R.J.; Souza, V.; Souza, G.H.M.F.; Campuzano, I.; Ebeling, G.; Dupont, J.; Eberlin, M.N. *Chem. Phys. Chem.* **2011**, *12*, 1444-1447.
- <sup>45</sup> Clemmer, D.E.; Hudgins, R.R.; Jarrold, M.F. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10414-10242.
- <sup>46</sup> von Helden, G.; Wyttenbach, T.; Bowers, M. T. *Science*; **1995**, *267*, 1483-1485.
- <sup>47</sup> Li, X.; Chan, Y.-T.; Casiano-Maldonado, M.; Yu, J.; Carri, G.A.; Newkome, G.R.; Wesdemiotis, C. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 6667-6674.
- <sup>48</sup> Benassi, M.; Corilo, Y.E.; Uria, D.; Augusti, R.; Eberlin, M.N. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, *20*, 269
- <sup>49</sup> Zhu, M.; Bendiak, B.; Clowers, B.; Hill, H.H. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 1853.
- <sup>50</sup> Li, H.; Giles, K.; Bendiak, B.; Kaplan, K.; Siems, W.F.; Hill, H.H. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 3231-3239.
- <sup>51</sup> Shvartsburg, A.A.; Isaac, G.; Leveque, N.; Smith, R.D.; Metz, T.O. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2011**, *22*, 1146-1155.

- <sup>52</sup> Dwivedi, P.; Wu, C.; Matz, L.M.; Clowers, B.H.; Siems, W.F.; Hill, H.H. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 8200.
- <sup>53</sup> Romão, W.; Lalli, P.M.; Franco, M.F.; Sanvido, G.; Schwab, N.V.; Lanaro, R.; Costa, J.L.; Sabino, B.D.; Bueno, M.I.M.S.; Sa, G.F.; Daroda, R.J.; Souza, V.; Eberlin, M.N. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400*, 3053-3064.
- <sup>54</sup> Santos, J.J.; Toma, S.H.; Lalli, P.M.; Riccio, M.F.; Eberlin, M.N. Toma, H.E.; Araki, K. *Analyst* **2012**, *137*, 4045-4051.
- <sup>55</sup> Santos, L.F.A.; Iglesias, A.H.; Pilau, E.J.; Gomes, A.F.; Gozzo, F.C. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, *21*, 2062-2069.
- <sup>56</sup> Shvarstburg, A.A.; Creese, A.J.; Smith, R.D.; Cooper, H.J. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (18), 6918-6923.
- <sup>57</sup> Sorrilha, A. E. P. M.; Gozzo, F. C.; Pimpim, R. S.; Eberlin, M. N. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1996**, *7*, 1126
- <sup>58</sup> Gross, M. L.; Lin, P-H; Franklin, S. J. *Anal. Chem.* **1972**, *44*, 974.
- <sup>59</sup> Tao, W. A.; Gozzo, F. C.; Cooks, R. G. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1692.
- <sup>60</sup> Wu, L.; Meurer, E. C.; Young, B.; Yang, P.; Eberlin, M. N.; Cooks, R. G. *Int. J. Mass Spectrom.* **2004**, *231*, 103.
- <sup>61</sup> Araki, K.; Toma, H.E. *Quim. Nova* **2002**, *25*, 962-975.
- <sup>62</sup> Kadish, K.M.; Smith, K.M.; Guillard, R. *The Porphyrin Handbook*; Academic Press, San Diego, 2000-2003, Vol. 1-20.
- <sup>63</sup> Setsune, J. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2004**, *8*, 93.
- <sup>64</sup> Jurowa, M.; Schuckman, A.E.; Batteas, J.D.; Drain, C.M. *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *10/20*, 2297.
- <sup>65</sup> Rocha, R.C.; Araki, K., Toma, H.E.; *Inorg. Chim. Acta*; **1999**, *285*, 197-202
- <sup>66</sup> Araki, K.; Silva, C.A.; Toma, H.E.; Catalani, L.H. Medeiros, M.H.G.; Mascio, P.D. *J. Inorg. Biochem.* **2000**, *78*, 269.
- <sup>67</sup> McMillin, D.R.; Shelton, A.H.; Bejune, A.; Fanwick, P.E.; Wall, R.K. *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249*, 1454.

- <sup>68</sup> Zupán, K.; Egyeki, M.; Tóth, K. Fekete, A.; Herényi, L.; Módos, K.; Csík, G. *J. Photochem. Photobiol. B* **2008**, *90*, 105.
- <sup>69</sup> Engelmann, F.M.; Losco, P.; Winnischofer, H.; Araki, K.; Toma, H.E. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2002**, *6*, 33.
- <sup>70</sup> Engelmann, F.M.; Mayer, I.; Gabrielli, D.S.; Toma, H.E.; Kowaltowski, A.J.; Araki, K.; Baptista, M.S. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2007**, *39*,175.
- <sup>71</sup> Tomazela, D.M.; Gozzo, F.C.; Mayer, I.; Engelmann, F.M.; Araki, K.; Toma, H.E.; Eberlin, M.N. *J. Mass Spectrom.* **2004**, *39*, 1161-1167
- <sup>72</sup> Sorrilha, A. E. P. M.; Gozzo, F. C.; Pimpim, R. S.; Eberlin, M. N. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1996**, *7*, 1126.
- <sup>73</sup> Tao, W. A.; Gozzo, F. C.; Cooks, R. G. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1692.
- <sup>74</sup> Wu, L.; Meurer, E. C.; Young, B.; Yang, P.; Eberlin, M. N.; Cooks, R. G. *Int. J. Mass Spectrom.* **2004**, *231*, 103
- <sup>75</sup> Corilo, Y. E.; Eberlin, M. N. *J. Mass Spectrom.* **2008**, *43*, (12), 1636-40
- <sup>76</sup> Fleisher, E.B.; Shachter, A.M. *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 3763.
- <sup>77</sup> Tabrizchi, M.; Rouholahnejad, F.; *Talanta*; **2006**, *69*, 87–90.
- <sup>78</sup> Largo, a.; Barrientos, C. *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 9864.
- <sup>79</sup> Cox, K.A.; Gaskell, S.J.; Morris, M.A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1996**, *7*, 522.
- <sup>80</sup> Graton, J.; Berthelot, M.; Gal, J.-F.; Girard, S.; Laurence, C.; Lebreton, J.; Le Questel, J.-Y.; Maria, P.-C.; Naus, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10552.
- <sup>81</sup> Dopfer, O.; Solca, N.; Lemaire, J.; Maitre, P.; Crestoni, M.-E.; Fornarini, S. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 7881
- <sup>82</sup> Wood, K.V.; Burinsky, D.J.; Cameron, D.; Cooks, R.G. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 5236.
- <sup>83</sup> Pachuta, S.J.; Isern-Flecha, I.; Cooks, R.G. *Org. Mass Spectrom.* **1986**, *21*, 1.
- <sup>84</sup> Hashimoto, S.-I.; Yamada, S.I.; Koga, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*(23), 7452-7453.
- <sup>85</sup> Pollack, S. K.; Devlin, J. L.; Summerhays, K. D.; Taft, R. W.; Hehre, W. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 4583.

- <sup>86</sup> Lau, Y. K.; Kebarle, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 7452.
- <sup>87</sup> Russo, N.; Toscano, M.; Grand, A.; Mineva, T. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 4017.
- <sup>88</sup> Smith, R. L. ; Chyall, L. J.; Beasley, B. J.; Kenttamaa, H. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7971.
- <sup>89</sup> Flammang, R.; Dechamps, N.; Pascal, L.; Van Haverbeke, Y.; Berbaux, P.; Nam, P. C.; Nguyen, M. T. *Org. Chem. Lett.* **2004**, *1*, 23.
- <sup>90</sup> Karpas, Z.; Berant, Z.; Stimac, R. M. *Struct.Chem.* **1990**, *1*, 201.
- <sup>91</sup> Winnischofer, H.; Engelmann, F.M.; Toma, H.E.; Araki, K. *Inorg. Chim. Acta* **2002**, *338*, 27.
- <sup>92</sup> Stepanek, P.; Andrushchenko, V.; Ruud, K.; Bour, P. *J. Phys. Chem. A* **2012**, *116*, 778.
- <sup>93</sup> Frish, M. J. *et al.* Gaussian 03, revision E.01 Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, **2004**
- <sup>94</sup> a) Mesleh, M. F.; Hunter, J. M.; Shvartsburg, A. A.; Schatz, G. C.; Jarrold, M. F. *J. Phy. Chem.* **1996**, *100*, 16082-16086. b) Jarrold, M.F. website <http://www.indiana.edu/~nano/Software/mobcal.txt>.
- <sup>95</sup> Speight, J.G. *Handbook of Petroleum Analysis*. John Wiley and Sons, Inc.: Nova Iorque, 2001.
- <sup>96</sup> Hughey, C.A.; Rodgers, R.P.; Marshall, A.G.; Walters, C.C.; Qian, K.; Mankiewicz, P. *Org. Geochem.* **2004**, *35*, 863-880.
- <sup>97</sup> Hughey, C.A.; Hendrickson, C.L.; Rodgers, R.P.; Marshall, A.G. *Energy Fuels* **2001**, *15*(5), 1186-1193.
- <sup>98</sup> Hughey, C.A.; Rodgers, R.P.; Marshall, A.G.; Qian, K.; Robbins, W.K. *Org. Geochem.* **2002**, *33*, 743-759.
- <sup>99</sup> Boduszynski, M.M. *Energy Fuels* **1987**, *1*, 2-11.
- <sup>100</sup> Altgelt, K.H.; Boduszynski, M.M. *Composition and Analysis of Heavy Petroleum Fractions*. CRC Press: Nova Iorque, 1994.
- <sup>101</sup> McKenna, A.M.; Purcell, J.M.; Rodgers, R.P.; Marshall, A.G. *Energy Fuels* **2010**, *24*, 2929-2938.
- <sup>102</sup> Zhan, D.; Fenn, J. B. *Int. J. Mass Spectrom.* **2000**, *194*, 197-208

- <sup>103</sup> Killops, S. D.; Readman, J. W. *Org. Geochem.* **1985**, *8* (4), 247-257.
- <sup>104</sup> Felix, G.; Bertrand, C.; Vangastel, F. *Chromatographia* **1985**, *20*(3), 155-160
- <sup>105</sup> Rodgers, R.P.; Schaub, T. M.; Marshall A. G. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 20A.
- <sup>106</sup> Gohlke, R.S.; McLafferty, F.W. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4*, 367-371.
- <sup>107</sup> Mullins, O.C.; Ventura, G.T.; Nelson, R.K.; Betancourt, S.S.; Raghuraman, B.; Reddy, C.M. *Energy Fuels* **2008**, *22*, 496-503.
- <sup>108</sup> Reddy, C.M.; Nelson, R.K.; Sylva, S.P.; Xu, L.; Peacock, E.A.; Raghuraman, B.; Mullins, O.C. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1148*, 100-107.
- <sup>109</sup> Marshall, A.G.; Hendrickson, C.L.; Jackson, G.S. *Mass Spectrom. Rev.* **1998**, *17*, 1-35
- <sup>110</sup> Comisarow, M.B.; Marshall, A.G. *Chem. Phys. Letters* **1974**, *25*, 282-283.
- <sup>111</sup> Schaub, T.M.; Hendrickson, C.L.; Horning, S.; Quinn, J.P.; Senko, M.W.; Marshall, A.G. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 3985-3990.
- <sup>112</sup> Giga-Proteómiqúe website: [http://www.giga.ulg.ac.be/jcms/cdu\\_15868/bruker-ft-ms-apex-qe-94t-fticr-ms](http://www.giga.ulg.ac.be/jcms/cdu_15868/bruker-ft-ms-apex-qe-94t-fticr-ms).
- <sup>113</sup> W. M. Keck FT-ICR Mass Spectrometry Laboratory website: <http://keck.med.yale.edu/prochem/fticrfaq.htm>.
- <sup>114</sup> Mapolelo, M.M.; Stanford, L.A.; Rodgers, R.P.; Yen, A.T.; Debord, J.; Asomaning, S.; Marshall, A.G. *Energy Fuels* **2009**, *23*, 349-355.
- <sup>115</sup> Hsu, C.S.; Dechert, G.J.; Robbins, W.K.; Fukuda, E.K. *Energy Fuels* **2000**, *14*, 217-223.
- <sup>116</sup> Yépez, Omar. *Fuel* **2005**, *84*, 97-104.
- <sup>117</sup> Sivan, P.; Datta, G.C.; Singh, R.R. *Org. Geochem.* **2008**, *39*, 1620-1630.
- <sup>118</sup> Oliveira, C.R.; Ferreira, A.A.; Oliveira, C.J.F.; Azevedo, D.A.; Santos Neto, E.V.; Aquino Neto, F.R. *Org. Geochem.* **2012**, *46*, 154-164.
- <sup>119</sup> Becker, C.; Qian, K.; Russell, D.H. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 8592-8597.
- <sup>120</sup> Fernandez-Lima, F.A.; Becker, C.; McKenna, A.M.; Rodgers, R.P.; Marshall, A.G.; Russell, D.H. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 9941-9947.

- <sup>121</sup> Ahmed, A.; Cho, Y.J.; No, M.-H.; Koh, J.; Tomczyk, N.; Giles, K.; Yoo, J.S.; Kim, S. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 77-83.
- <sup>122</sup> Zhan, D.L.; Fenn, J. B. *Int. J. Mass Spectrom.* **2000**, *194*, 197-208.
- <sup>123</sup> Schaub, T.M.; Hendrickson, C.L.; Quinn, J.P.; Rodgers, R.P.; Marshall, A.G. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1317-1324.
- <sup>124</sup> Schaub, T.M.; Rodgers, R.P.; Marshall, A.G. *Energy Fuels* **2005**, *19*, 1566-1573.
- <sup>125</sup> Robbins, W. J. *Chromatogr. Sci.* **1998**, *36*, 457-466.
- <sup>126</sup> Senko, M.W.; Hendrickson, C.L.; Pasa-Tolic, L.; Marto, J.A.; White, F.M.; Gue, S.; Marshall, A.G. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, *10*, 1824-1828.
- <sup>127</sup> Marshall, A. G.; Verdun, F. R. *Fourier Transforms in NMR, Optical, and Mass Spectrometry : A User's Handbook*, Elsevier: Amsterdam, 1990.
- <sup>128</sup> Shi, S. D. H.; Drader, J. J.; Freitas, M. A.; Hendrickson, C. L.; Marshall, A. G. *Int. J. Mass Spectrom.* **2000**, *196*, 591.
- <sup>129</sup> Marshall, A.G.; Juyal, P.; Rodgers, R.P. Tallahassee, FL. *Electrospray ionization mass spectrometry methodology*. US 2010/0230587, 5 Feb. 2010, 16 Set. 2010.
- <sup>130</sup> Qian, K.; Robbins, W.K.; Hughey, C.A.; Cooper, H.J.; Rodgers, R.P.; Marshall, A.G. *Energy Fuels* **2001**, *15*, 1505-1511.
- <sup>131</sup> Karpas, Z. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, **1989**, *93*, 237-242.
- <sup>132</sup> Hsu, C.S.; Lobodin, V.V.; Rodgers, R.P.; McKenna, A.M.; Marshall, A.G. *Energy Fuels* **2011**, *25*, 2174-2178.

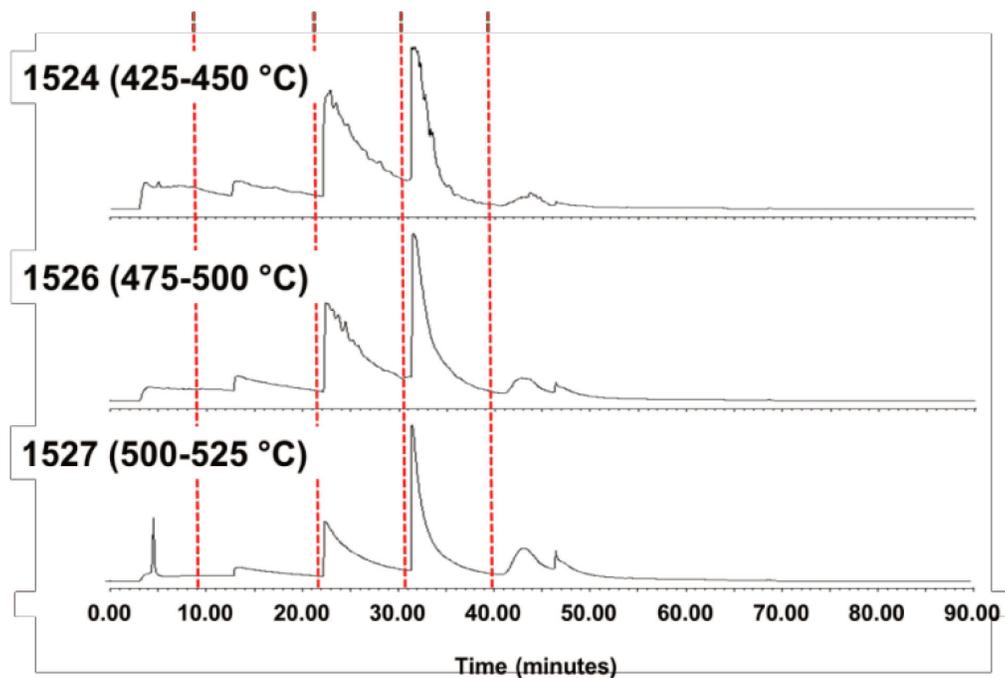
---

# ***ANEXOS***

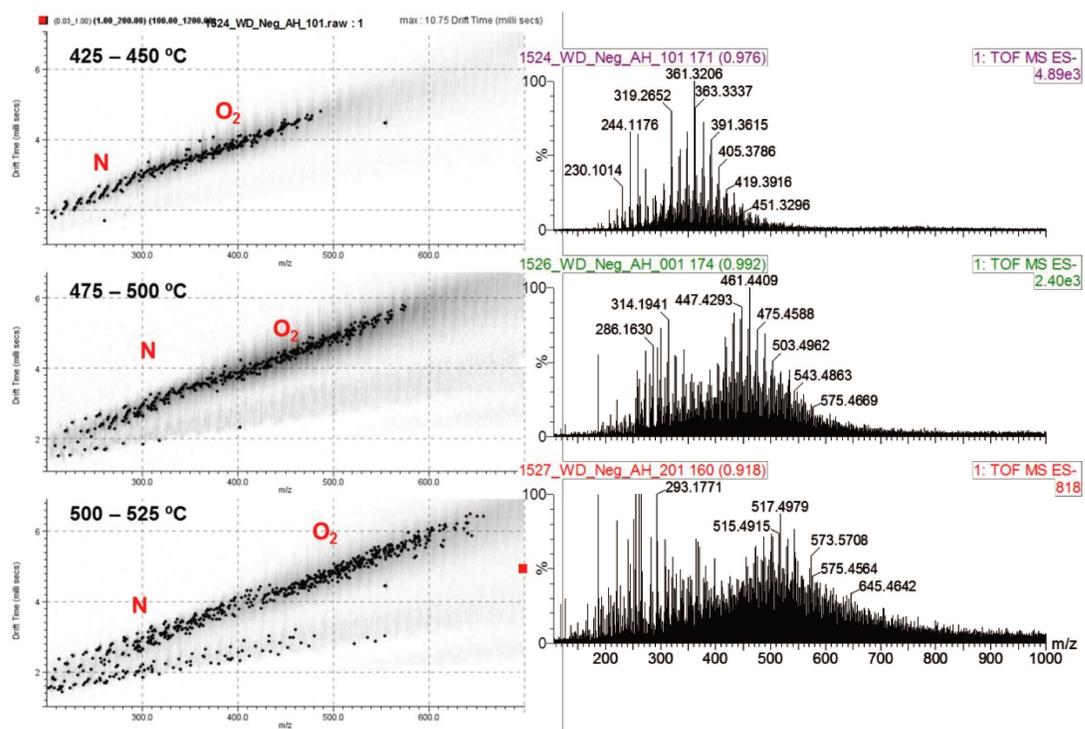
---



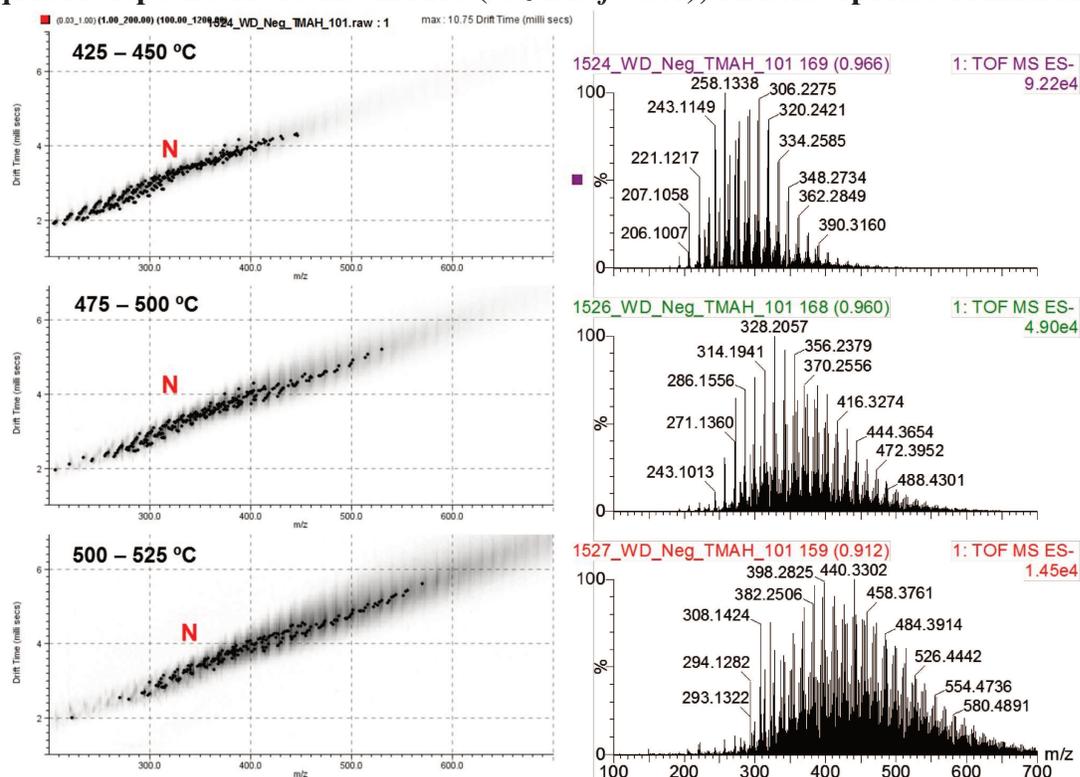
**ANEXO I: Cromatograma do fracionamento por HPLC-2 para os três cortes de destilação.**



**ANEXO II: ESI(-)-TWIM-MS para os três cortes de destilação usando  $\text{NH}_4\text{OH}$  como dopante. Esquerda: espectro 2D de mobilidade ( $m/z \times \text{drift time}$ ); direita: espectro de massas.**



**ANEXO III: ESI(-)-TWIM-MS para os três cortes de destilação usando TMAH como dopante. Esquerda: espectro 2D de mobilidade ( $m/z$  x *drift time*); direita: espectro de massas.**



**ANEXO IV: APPI(+)-TWIM-MS para os três cortes de destilação. Esquerda: espectro 2D de mobilidade ( $m/z$  x *drift time*); direita: espectro de massas.**

