

Universidade de São Paulo
Instituto de Física

**Espectrometria de massa por tempo de voo com
fonte *MALDI* acoplada a um acelerador de
partículas**

James Anderson Cunha

Orientadora: **Profa. Dra. Suzana Salem Vasconcelos**

Dissertação de mestrado apresentada ao
Instituto de Física para a obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Suzana Salem Vasconcelos (IFUSP)

Prof. Dr. Nilberto Heder Medina (IFUSP)

Prof. Dr. Roberto Meigikos dos Anjos (UFF)

**São Paulo
2014**

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pelo Serviço de Biblioteca e Informação
do Instituto de Física da Universidade de São Paulo

Cunha, James Anderson

Espectrometria de massa por tempo de voo com fonte MALDI acoplada a um acelerador de partículas. São Paulo, 2014.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Física. Depto. de Física Geral.

Orientador: Profa. Dra. Suzana Salem Vasconcelos

Área de Concentração: Física

Unitermos: 1. Espectrometria de massas; 2. Tempo de voo; 3. Acelerador de partículas; 4. Instrumentação; 5. Dessorção.

USP/IF/SBI-038/2014

*aos meus pais,
à Stella e ao Dust*

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas envolvidas direta e indiretamente para o desenvolvimento do projeto, em especial à Profa. Dra. Suzana Salem Vasconcelos pela orientação e contínuo otimismo e encorajamento para a conclusão deste trabalho, ao pesquisador Dr. Eduardo Luiz Augusto Macchione que atuou como um verdadeiro co-orientador neste projeto, estando sempre presente e ativo no meu aprendizado, a toda equipe do Laboratório de Instrumentação e Partículas da USP, ao professor Dr. João Alberto Mesquita Pereira pela motivação no tema abordado, ao Ricardo Menegasso pelo suporte prestado e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Resumo

Este trabalho descreve a montagem de um espectrômetro de massa por tempo de voo para análise de macromoléculas, projetado e desenvolvido no Laboratório de Instrumentação e Partículas (LIP) da USP, e apresenta os primeiros resultados obtidos com o equipamento. O espectrômetro é constituído pelo acoplamento de uma fonte de íons *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* (MALDI) com um acelerador de partículas do tipo *tandem*. O objetivo é aumentar a energia dos íons moleculares produzidos na fonte visando a uma maior eficiência de detecção de moléculas de massas elevadas. Amostras padrão de iodeto de cério (CsI) foram utilizadas para caracterização e verificação das condições de funcionamento do aparelho. O início dos estudos de moléculas de massas grandes se deu com medidas de amostras de insulina. Um método de simulação foi desenvolvido para auxiliar a análise dos espectros de massa e seus resultados foram comparados com os dados experimentais obtidos com o espectrômetro. O trabalho aponta novas possibilidades para a aplicação de aceleradores de partículas em análise de massa de macromoléculas.

Abstract

The present work describes the assembly of a time-of-flight mass spectrometer for analysis of macromolecules, designed and developed at the Instrumentation and Particle Laboratory (LIP), and presents the first results obtained with the equipment. The spectrometer is based on the coupling of a Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) ion source with a tandem type particle accelerator. The objective is to increase the molecular ions energy produced by the source, and thus improve the high mass detection efficiency. Standard samples of cesium iodide (CsI) were used for characterization and verification of the equipment operation setup. Measures of insulin samples marked the initial studies of large masses. A simulation method was developed to assist in mass spectra identification and the results were compared with experimental data obtained with the spectrometer. The results open new possibilities for the application of particle accelerators in macromolecules mass analysis.

Sumário

1	Introdução	1
1.1	Espectrômetro de Massa	3
1.2	Espectrômetro de Massa <i>MALDI-AMS</i> : motivação do projeto	4
2	Montagem Experimental	7
2.1	O Espectrômetro <i>MALDI-AMS</i>	9
2.2	A Fonte de Íons <i>MALDI</i>	11
2.2.1	A preparação de amostras	14
2.3	O Acelerador <i>Tandem</i>	16
2.4	Sistema de Detecção	17
2.5	Eletrônica e Aquisição de Dados	19
3	Métodos de Simulação	23
3.1	Simulação dos Espectros	25
3.2	Dimensões do Sistema	25
3.3	Geometria Implementada	26
3.4	A Simulação	27
3.5	Resultados das Simulações	29
4	Uma Análise Estatística	37
4.1	Expressões de Tempo de Voo	39
4.2	Algumas Definições	41
4.3	Análise Estatística dos Dados Experimentais	43
5	Análise dos Espectros de Massa	49
5.1	Amostra de CsI	51
5.2	Amostra de Insulina	53
6	Conclusão	59

Lista de Figuras

1.1	Esquema simplificado de um espectrômetro de massa.	4
1.2	Eficiências relativas de detecção em função da massa para diferentes energias de impacto.	5
2.1	Esquema de um espectrômetro de massa por tempo de voo utilizando fonte de íons <i>MALDI</i>	9
2.2	Esquema do espectrômetro <i>MALDI-AMS</i> : fonte <i>MALDI</i> acoplada ao acelerador de partículas do tipo <i>tandem</i> (comprimento total desde a amostra até o detector <i>stop 2</i> é de 8 m).	10
2.3	Foto do espectrômetro <i>MALDI-AMS</i>	12
2.4	Esquema da fonte de íons <i>MALDI</i>	12
2.5	Imagem da fonte de íons <i>MALDI</i> do LIP.	13
2.6	Imagem da fonte de íons <i>MALDI</i> montada no acelerador <i>tandem</i>	14
2.7	Técnica de fabricação de amostras para análise <i>MALDI</i> e uma foto de amostra de insulina.	16
2.8	Segundo estágio de aceleração do acelerador e célula gasosa.	18
2.9	Esquema do funcionamento do detector <i>MCP</i>	19
2.10	Esquema do funcionamento do detector <i>MSP</i>	20
2.11	Diagrama do Sistema de Aquisição de Dados.	21
2.12	Apresentação de um espectro de massa de CsI no <i>pTA</i>	21
3.1	Diagrama da geometria do espectrômetro de massa e suas dimensões.	26
3.2	Geometria implementada no <i>SIMION</i> (fora de escala).	26
3.3	Fonte <i>MALDI</i> simulada.	28
3.4	Câmara gasosa e segundo estágio de aceleração simulados.	28
3.5	Espectro de uma amostra de CsI com 0,6 MV no terminal do acelerador.	29
3.6	Resultados da simulação com o <i>SIMION</i> para a família do I^-	30
3.7	Resultados da simulação para a família do CsI^- : à esquerda trecho com o composto neutro e à direita os estados de cargas em detalhe.	30

3.8	Resultados da simulação para a família do CsI_2^- : à esquerda trecho com o composto neutro e à direita os estados de cargas em detalhe.	31
3.9	Resultados da simulação para a família do Cs_2I_3^- : à esquerda trecho com o composto neutro e à direita os estados de cargas em detalhe.	31
3.10	Resultados da simulação para a família do Cs_3I_4^- : à esquerda trecho com o composto neutro e à direita os estados de cargas em detalhe.	32
3.11	Resultados da simulação para a família do CsI^- deslocados de $0,033 \mu\text{s}$	32
3.12	Resultados da simulação para a família do CsI_2^- deslocados de $0,060 \mu\text{s}$	33
3.13	Resultados da simulação para a família do Cs_2I_3^- deslocados de $0,11 \mu\text{s}$	33
3.14	Resultados da simulação para a família do Cs_3I_4^- deslocados de $0,12 \mu\text{s}$	34
3.15	Influência da tensão da <i>Einzel</i> nos tempos de voo com a tensão no terminal do acelerador fixa em 600 kV.	35
3.16	Influência da tensão no terminal do acelerador nos tempos de voo com a tensão na <i>Einzel</i> fixa em -7 kV	36
4.1	Processo de determinação dos valores da média, mediana e moda para o pico do I^0	44
4.2	MMQ linear para os valores da média dos picos.	46
4.3	MMQ linear para os valores da mediana dos picos.	46
4.4	MMQ linear para os valores da moda dos picos.	46
4.5	MMQ quadrático para os valores da média dos picos.	47
4.6	MMQ quadrático para os valores da mediana dos picos.	47
4.7	MMQ quadrático para os valores da moda dos picos.	47
5.1	Áreas dos picos em função do módulo da tensão na <i>Einzel</i> para algumas “famílias” da amostra de CsI.	52
5.2	Gráfico da relação entre o módulo da tensão na <i>Einzel</i> que otimiza o funcionamento do espectrômetro e a tensão no terminal.	53
5.3	Influência da tensão no terminal na resolução dos picos.	54
5.4	Contagem dos picos em função da pressão na célula gasosa com gás hélio	55
5.5	Contagem dos picos em função da pressão na célula gasosa com gás nitrogênio	55
5.6	Contagem dos picos em função da pressão na célula gasosa com gás oxigênio para tensão no terminal de $0,8 \text{ MV}$	56
5.7	Junção de dois espectros de insulina obtidos em intervalos de tempo diferentes.	56
5.8	Identificação dos picos correspondentes às moléculas neutras de dois fragmentos do DHB, a partir da simulação com o <i>SIMION</i>	57
5.9	Calibração do espectro de insulina.	57

Lista de Tabelas

2.1	Relação entre a tensão no terminal do acelerador V_T e o comprimento B da barra metálica que curto-circuita trechos do estágio de aceleração. . .	17
3.1	Tempos deslocados nas famílias da amostra de CsI.	34
4.1	Valores experimentais, simulados e calculados dos tempos de voo. . . .	41
4.2	Resultados para os ajustes lineares.	44
4.3	Resultados para os ajustes quadráticos.	45
4.4	Resultados para os χ_{red}^2 nos ajustes quadráticos dos espectros experimentais.	45

Capítulo 1

Introdução

O trabalho aqui apresentado envolveu a montagem, testes e caracterização de um espectrômetro de massa por tempo de voo, projetado e desenvolvido no Laboratório de Instrumentação e Partículas (LIP) do Instituto de Física da Universidade de São Paulo (IFUSP), para a análise de macromoléculas. O espectrômetro, denominado *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Accelerator Mass Spectrometry (MALDI-AMS)*, é formado pelo acoplamento de uma fonte de íons por dessorção iônica, construída no LIP, com o acelerador *tandem* do Laboratório de Análise de Materiais por Feixes Iônicos (LAMFI) da USP.

A descrição do espectrômetro e da montagem experimental está no capítulo 2 deste trabalho. No capítulo 3, é explicado o método de simulação utilizado para auxiliar a calibração dos espectros de massa. Uma análise estatística dos dados é discutida no capítulo 4. A apresentação e análise de espectros obtidos experimentalmente estão no capítulo 5. As conclusões do trabalho são apresentadas no capítulo 6.

1.1 Espectrômetro de Massa

A espectrometria de massa adquiriu, nas últimas décadas, grande importância para estudos em diversas áreas do conhecimento, tais como física, química, bioquímica, farmácia e medicina [1–6]. O desenvolvimento de técnicas de ionização como *Eletrospray Ionization (EI)* [7] e *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)* [8–13] tem possibilitado o estudo de proteínas, peptídeos, DNA e outras biomoléculas.

O espectrômetro de massa é um instrumento analítico capaz de converter moléculas neutras em íons na forma gasosa e separá-las de acordo com a sua razão massa/carga (m/z), utilizando para isso campos eletromagnéticos. Esse equipamento atua como uma “balança” de íons de alta precisão e, em sua grande maioria, é composto por um porta-amostras, uma fonte de íons, um analisador de massa, detectores e sistema de aquisição de dados, conforme esquematizado na figura 1.1.

Como resultado, é obtido um gráfico, denominado espectro de massa, onde o eixo y representa a intensidade do sinal dos íons e o eixo x, a razão m/z [14].

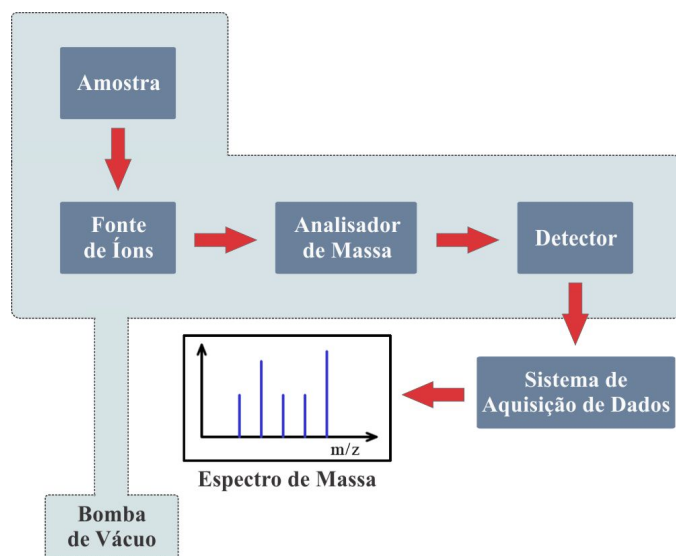


Figura 1.1: Esquema simplificado de um espectrômetro de massa.

1.2 Espectrômetro de Massa *MALDI-AMS*: motivação do projeto

Com os espectrômetros de massa atualmente disponíveis, a eficiência de detecção para moléculas de grande massa é muito pequena devido às baixas velocidades com que atingem o detector. Com esses equipamentos, a energia cinética dos íons moleculares é, em geral, elevada a valores entre 10 a 20 keV e, nessas condições, para moléculas com massas ≈ 20000 u, a eficiência de detecção é inferior a 10%.

A figura 1.2 mostra o resultado de cálculos da eficiência relativa para detecção de moléculas ionizadas, em função da massa molecular, para diferentes energias de impacto no detector [15]. A região acessível aos espectrômetros *MALDI* convencionais está destacada em cinza. Íons com massas próximas de 10^3 u são detectados com facilidade, pois mesmo em baixas energias (10 keV) a eficiência de detecção é relativamente alta. Para íons com massa entre 10^3 a 10^4 u, em energias da ordem de

10 keV, a eficiência sofre uma grande diminuição com o aumento da massa. Na faixa entre 10^4 a 10^5 u, para íons de 20 keV, a eficiência cai rapidamente. É grande a dificuldade para a detecção de moléculas com massas superiores a 10^5 u. A perda de eficiência de detecção com o aumento de massa é um dos fatores que limitam a análise através da técnica *MALDI*. Os maiores pesos moleculares já observados com *MALDI* estão na faixa de 10^5 u a 5×10^5 u.

O sucesso ou fracasso na detecção de íons massivos se deve, essencialmente, à produção, ou não, de elétrons secundários na superfície do detector de íons. Esses elétrons são responsáveis pela formação do sinal do detector, em geral placas multiplicadoras de elétrons, e sua produção está ligada diretamente à velocidade dos íons ao atingirem o detector. Quanto maior a energia dos íons, maior a probabilidade de produção de elétrons secundários.

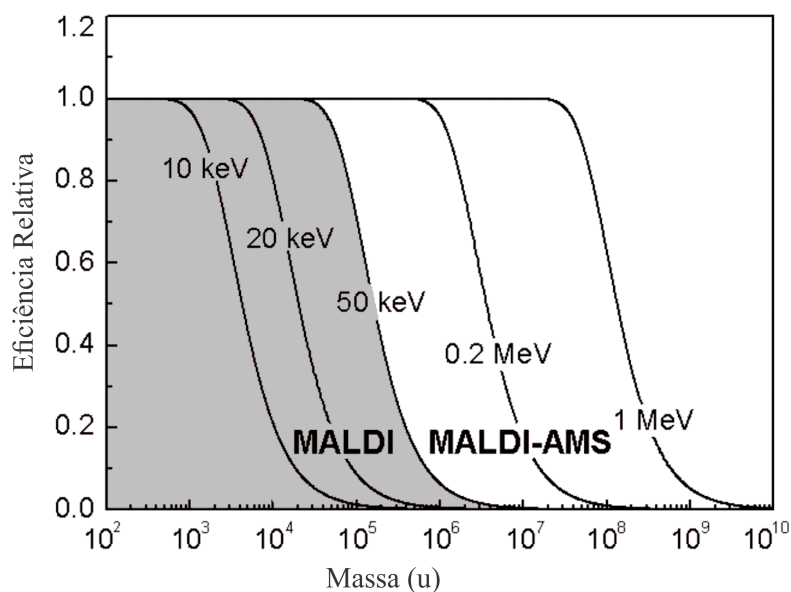


Figura 1.2: Eficiências relativas de detecção em função da massa para diferentes energias de impacto.

Com a intenção de tornar viável a análise de moléculas com massas superiores a 10^5 u, com boa resolução e alta sensibilidade, foi projetado e desenvolvido o espectrômetro de massa *MALDI-AMS* formado pelo acoplamento de uma fonte *MALDI* ao acelerador do tipo *tandem* [16]. A ideia foi utilizar o acelerador para elevar a energia dos íons moleculares e assim aumentar a sua eficiência de detecção. É um

instrumento inédito que amplia as possibilidades de análise com a técnica *MALDI*.

O acoplamento da fonte *MALDI* ao *tandem* envolveu o alinhamento óptico da fonte com o acelerador e testes de vácuo, de detectores, da eletrônica e do sistema de aquisição de dados, dentre outros. Concluída a montagem do sistema, foi realizado um estudo sistemático das condições de funcionamento do espectrômetro variando-se parâmetros do equipamento tais como a tensão no terminal do acelerador, o tipo de gás e sua pressão na câmara de troca de carga e as condições da ótica do feixe. A caracterização do equipamento, feita com a utilização de amostras padrão nas diferentes condições de funcionamento do espectrômetro, constituiu etapa fundamental que antecedeu os testes e a análise de espectros.

Esse trabalho descreve o equipamento e apresenta os primeiros resultados com ele obtidos.

Capítulo 2

Montagem Experimental

2.1 O Espectrômetro MALDI-AMS

O funcionamento esquemático de um espectrômetro de massa com fonte MALDI e analisador do tipo *Time of Flight* (ToF) está representado na figura 2.1 [17].

Fótons incidem na amostra e provocam a emissão de moléculas carregadas, neutras e de elétrons. A diferença de potencial existente entre a amostra e o analisador causa a aceleração dos íons cujos tempos de voo são medidos.

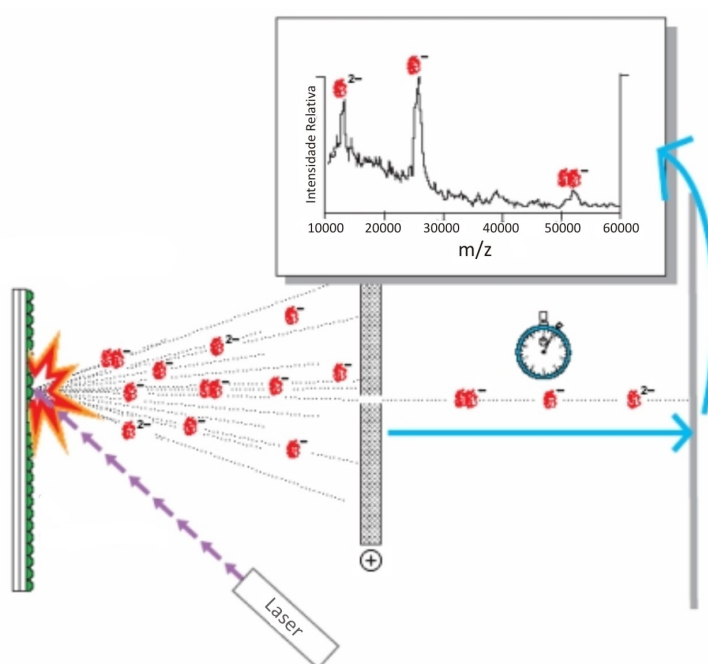


Figura 2.1: Esquema de um espectrômetro de massa por tempo de voo utilizando fonte de íons MALDI.

O diagrama do espectrômetro MALDI-AMS desenvolvido no LIP é mostrado na figura 2.2. O analisador de massa é do tipo *ToF* e o tempo de voo total de um íon corresponde ao tempo que ele leva para percorrer toda a extensão do equipamento. Moléculas com diferentes razões m/z levam tempos distintos para percorrerem os mesmos trajetos. Assim, é possível obter a razão m/z dos íons moleculares a partir da medida de seus tempos de voo.

Na fonte MALDI, um feixe pulsado de fótons, com comprimento de onda na região do ultravioleta, é gerado em um aparelho laser. Parte do feixe incide na amostra e provoca a emissão de íons, e parte, desviada por um semiespelho, é detectada por

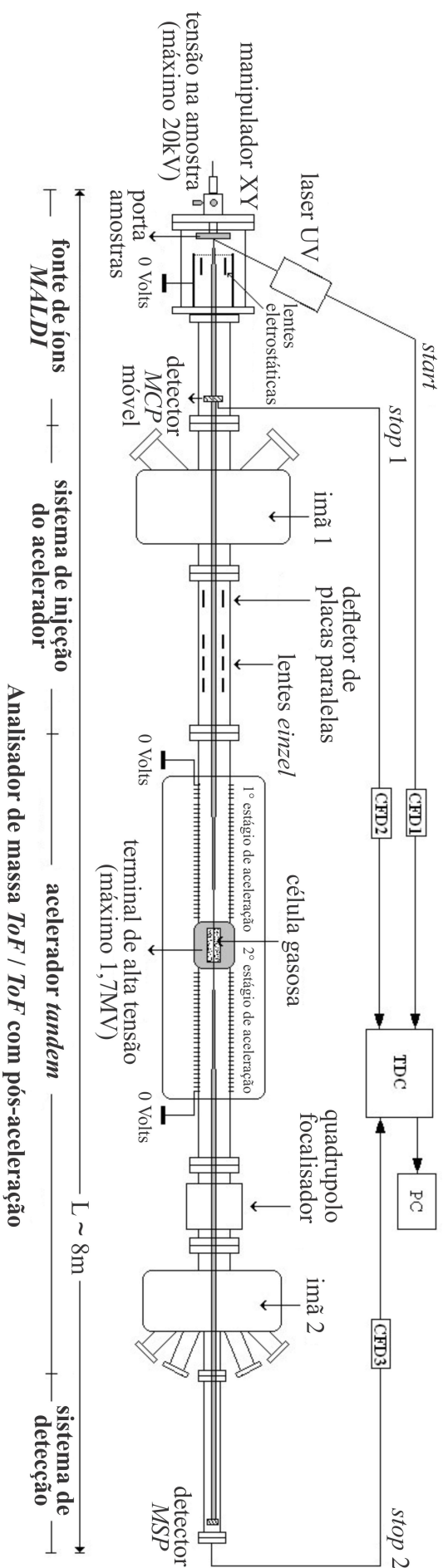


Figura 2.2: Esquema do espectrômetro MALDI-AMS: fonte MALDI acoplada ao acelerador de partículas do tipo tandem (comprimento total desde a amostra até o detector stop 2 é de 8 m).

um fotodiodo que gera um sinal (*start*) usado para disparar o sistema de aquisição de dados que irá medir o tempo de voo dos íons.

A amostra encontra-se em alta tensão negativa (-10 a -20 kV) e os íons negativos por ela emitidos são acelerados em direção a uma grade aterrada. Em seguida, caminham em uma região sem campo elétrico, penetram no primeiro estágio do acelerador, sendo aceleradas devido ao potencial positivo do terminal, atravessam uma célula com gás onde pode ocorrer perda de elétrons e fragmentação das moléculas, e, por fim, percorrem o segundo estágio do acelerador até atingirem o detector de íons cujos sinais, aqui denominados *stop 2*, são enviados para o sistema de aquisição finalizando a medida de tempo de voo.

O componente básico do sistema de aquisição, *Time to Digital Converter (TDC)*, funciona como um cronômetro digital de alta precisão, possuindo resolução temporal de sub-nanossegundos. É ele que determina o intervalo de tempo decorrido entre os sinais *start* e *stop* (1 e 2). O sinal *stop 1* é proveniente de um sistema de detecção intermediário usado para verificar a formação de íons antes que estes sejam direcionados para a entrada do acelerador. As medidas dos intervalos de tempo do TDC são enviadas a um computador que, através do programa de aquisição de dados *picosecond Time Analyzer (pTA)*, constrói os espectros de tempo de voo.

Uma foto do espectrômetro é mostrada na figura 2.3.

2.2 A Fonte de Íons MALDI

A fonte MALDI foi projetada e construída no LIP e posteriormente acoplada ao acelerador *tandem* do LAMFI. Um esquema da fonte de íons com seus principais componentes é apresentado na figura 2.4. A interação dos fótons com a amostra produz uma micro nuvem iônica que se expande no interior da câmara. O feixe de fótons é gerado por um laser ultravioleta pulsado com comprimento de onda de 337 nm, largura temporal de 3 a 4 ns e energia média por pulso de 120 μ J.

A amostra consiste de uma mistura da substância que se quer analisar (analito)

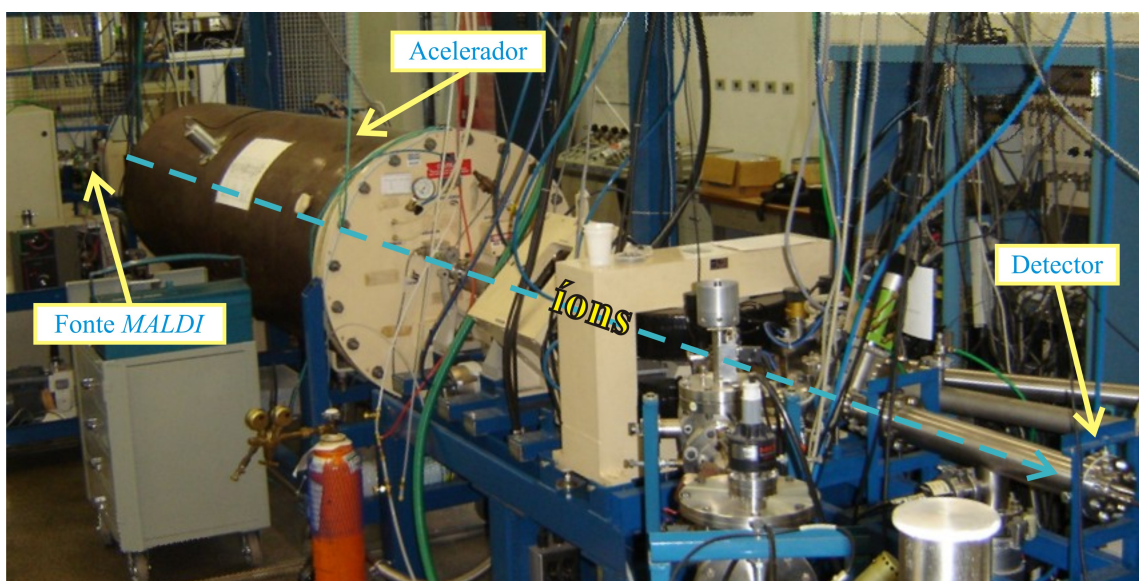


Figura 2.3: Foto do espectrômetro MALDI-AMS.

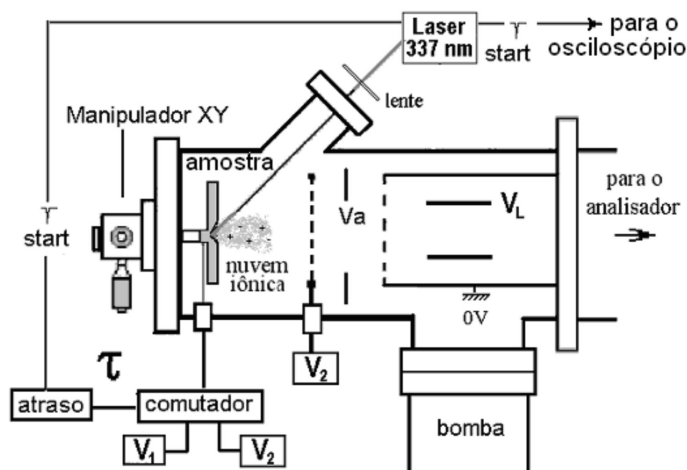


Figura 2.4: Esquema da fonte de íons MALDI.

com uma segunda substância absorvedora de luz ultravioleta (matriz), embora seja possível, dependendo do analito, dispensar o uso da matriz em uma técnica conhecida apenas como *Laser Desorption Ionization (LDI)* [18]. A interação da luz laser com a amostra provoca a volatilização de íons (ou dessorção iônica) das moléculas produzindo uma micro nuvem carregada eletricamente. Essa nuvem contém uma população de fragmentos moleculares e de moléculas intactas do analito e da matriz nas formas iônica ou neutra. Um campo elétrico, existente entre a amostra em alta tensão e uma grade de alta transmissão, acelera as moléculas que estiverem ionizadas na direção do analisador de massas e do sistema de detecção.

A fonte é equipada com um manipulador XY para deslocar o porta-amostras em relação ao ponto de incidência do laser permitindo que várias regiões da amostra possam ser ionizadas; com um sistema de lentes eletrostáticas, composto por um anel focalizador, com tensão V_a e por uma lente *Einzel*, polarizada com potencial V_L , que auxilia na focalização e transmissão dos íons para o sistema de injeção do acelerador.

A janela de quartzo por onde os pulsos do laser entram na fonte, bem como visores de vidro para a instalação de uma lâmpada dicróica e de uma câmera de vídeo para inspeção da incidência do laser na amostra são visualizados na foto da fonte MALDI da figura 2.5.

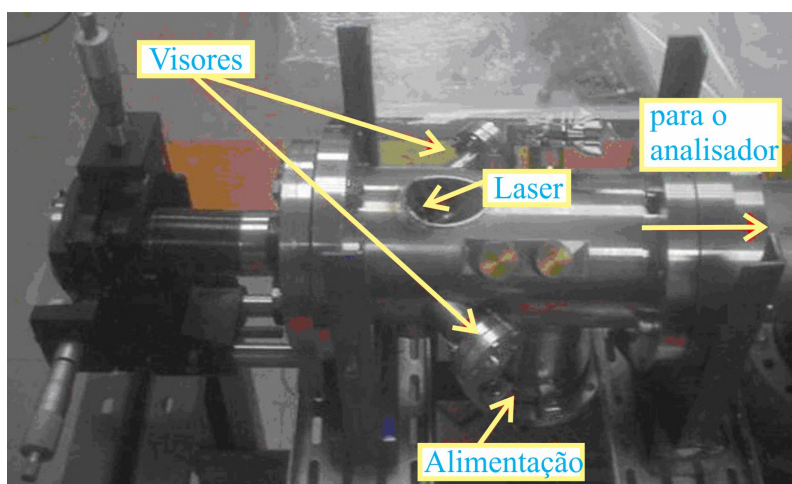


Figura 2.5: Imagem da fonte de íons MALDI do LIP.

Um sistema de extração atrasada (*delayed extraction*) pode ser utilizado na fonte de íons com a finalidade de minimizar a dispersão no tempo de voo causada pela distribuição de velocidades iniciais característica de cada íon molecular aumentando, portanto, a resolução em massa do espectrômetro. Neste modo de extração de íons, a alta tensão da amostra é ligada após a expansão livre da nuvem iônica. Dessa forma, os íons emitidos com maior energia cinética recebem menos energia potencial do campo elétrico. O atraso do instante em que a alta tensão da amostra é ligada em relação ao instante correspondente à emissão das partículas é tal que moléculas de mesma massa emitidas com velocidades iniciais diferentes cheguem ao detector de íons simultaneamente. A focalização temporal, conseguida através deste modo de

extração, pode aumentar consideravelmente a resolução em tempo do espectrômetro.

Uma foto da fonte *MALDI* do espectrômetro já acoplada ao acelerador *tandem* é apresentada na figura 2.6 onde são indicados o porta-amostras e o aparelho laser. O percurso inicial dos íons também está apresentado.

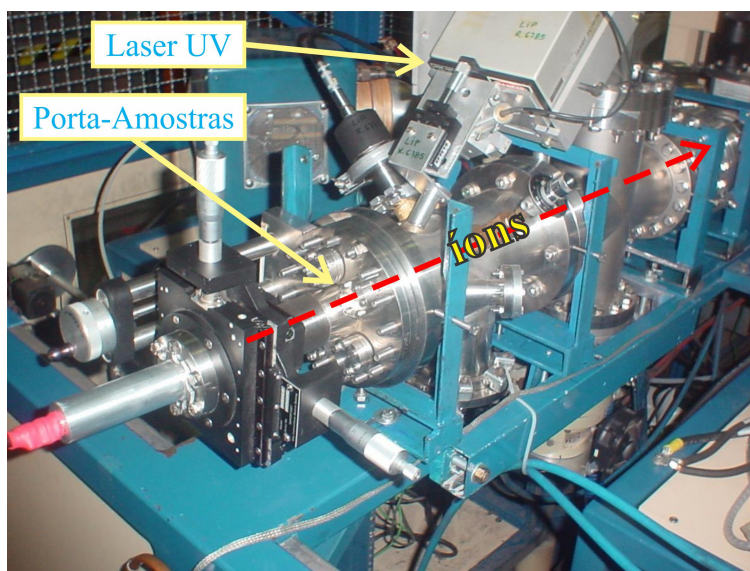


Figura 2.6: Imagem da fonte de íons *MALDI* montada no acelerador *tandem*.

2.2.1 A preparação de amostras

A caracterização e o ajuste da óptica iônica do novo espectrômetro *MALDI-AMS* foram feitos com a utilização de amostras padrão uniformes de iodeto de cério (CsI) preparadas por evaporação do sal sobre um suporte. A uniformidade é necessária para que o feixe pulsado de fótons possa induzir a emissão de íons moleculares independentemente da posição em que incide no alvo. As amostras para análise de moléculas de massas elevadas e termicamente instáveis exigem um preparo especial que envolve a utilização de matrizes com ressonância de absorção na frequência do laser [19] e não são uniformes. É o caso das amostras de insulina, utilizadas para testes do equipamento com moléculas de massa maiores. Nesse caso, a emissão iônica depende fortemente da posição de incidência dos pulsos de laser.

As amostras utilizadas na técnica *MALDI* são, em geral, preparadas como uma

camada homogênea de pequenos cristais da matriz contendo uma solução sólida do material a ser analisado. Para otimizar os resultados, existe uma variedade de matrizes bem como métodos de preparação que dependem da natureza do analito. A matriz tem o papel de absorver a energia dos pulsos de laser, provocando a dessorção e ionização de parte da amostra e, conseqüentemente, do material que se quer analisar.

As matrizes mais utilizadas para proteínas e peptídeos são os ácidos α -ciano-4-hidroxicinâmico (α -ciano), Sinapínico e 2,5-Dihidroxibenzóico (DHB).

Os ácidos α -ciano e Sinapínico são insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. Ambos possuem a vantagem de formar cristais pequenos e homogêneos, o que contribui para uma boa resolução dos espectros de massa. O primeiro, é comumente utilizado em peptídeos de até 10.000 u, tendo a desvantagem de transferir considerável energia para o analito durante o processo de dessorção e ionização, causando grande fragmentação iônica. A matriz de ácido Sinapínico é a escolha mais comum na análise de proteínas acima de 10.000 u, os íons do analito recebem menos energia e o número de fragmentações é menor.

O DHB é a matriz utilizada na preparação de glicoproteínas e também frequentemente usada em peptídeos. Diferentemente das matrizes citadas acima, é solúvel em água assim como em solventes orgânicos. A principal desvantagem é a formação de grandes pontas de cristais. A geometria da amostra não é uniforme e o espectro obtido por dessorção de diferentes pontos da amostra tem uma resolução consideravelmente menor do que o espectro obtido com matrizes de α -ciano e ácido Sinapínico. Sua principal vantagem na análise de peptídeos é o fato de ser mais tolerante a contaminantes como sais e detergentes do que outras matrizes.

Neste trabalho, as amostras de insulina foram preparadas com a matriz DHB, e a técnica de preparação empregada é apresentada na figura 2.7.

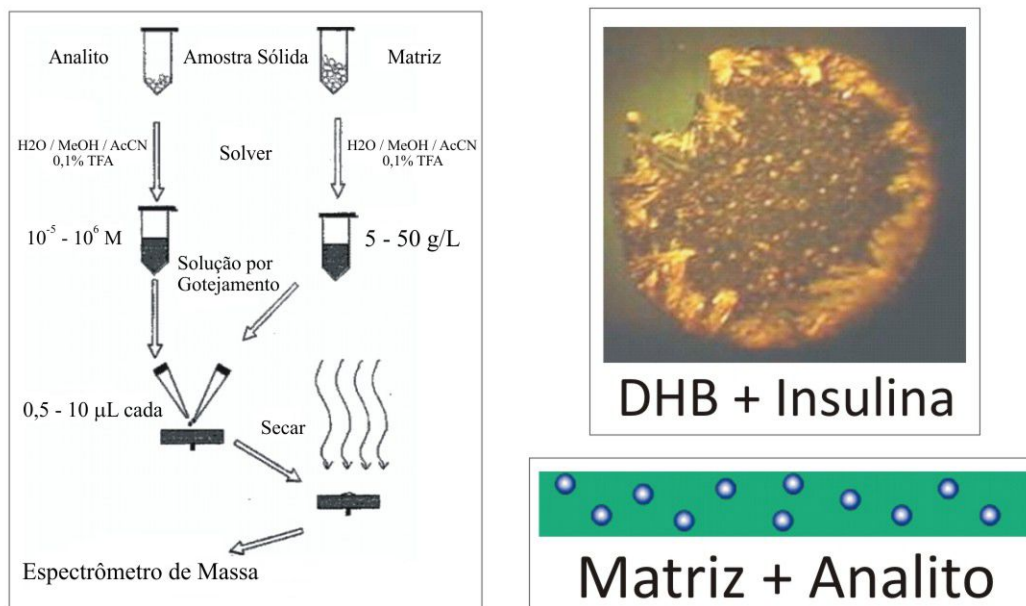


Figura 2.7: Técnica de fabricação de amostras para análise MALDI e uma foto de amostra de insulina.

2.3 O Acelerador *Tandem*

O acelerador utilizado no espectrômetro é do tipo *Pelletron-tandem*, modelo 5SDH e fica localizado no LAMFI. Esse acelerador foi construído pela *National Electrostatic Corporation (NEC)* e pode alcançar 1,6 MV de tensão em seu terminal [20].

No centro do *tandem* há uma câmara de gás (*stripper*) que opera em alta tensão positiva e, como a entrada e a saída do acelerador estão aterradas, somente os íons negativos que perderem elétrons na interação com o gás e ficarem positivos serão acelerados nos dois estágios.

A alta tensão do terminal é atingida por meio de uma correia segmentada que possui pequenos cilindros metálicos (*pellets*) isolados por uma base de nylon que são carregados eletricamente por um processo de indução eletrostática. Um eletrodo indutor negativo carrega positivamente os cilindros metálicos que, ao passarem pelo indutor perdem o contato com uma roldana guia que está aterrada e adquirem carga positiva. Ao encontrarem com a roldana que está ligada ao terminal de alta tensão, os *pellets* transferem a sua carga positiva para o terminal.

Nesse processo de alta tensão podem ocorrer descargas em forma de faíscas no ambiente próximo do tubo acelerador. Assim, é necessário envolvê-lo com um material dielétrico isolante, em geral o gás Hexafluoreto de Enxofre (SF_6) a uma pressão de 80 psi.

Quando a tensão no terminal do acelerador é inferior a 900 kV, uma barra metálica com comprimento variável curto-circuita trechos dos estágios de aceleração. Tal procedimento tem a finalidade de garantir a uniformidade do campo elétrico dentro do *tandem*. Na tabela 2.1 consta a relação entre a tensão no terminal V_T e o comprimento da barra B . A alteração das distâncias percorridas pelos íons em regiões de aceleração e de campo uniforme, devido à variação do comprimento B , provoca mudanças em seus tempos de voo.

V_T (kV)	B (cm)
≤ 100	50
101-300	40
301-500	30
501-700	20
701-900	10
> 900	0

Tabela 2.1: Relação entre a tensão no terminal do acelerador V_T e o comprimento B da barra metálica que curto-circuita trechos do estágio de aceleração.

Na figura 2.8 pode-se visualizar a câmara de gás e o segundo estágio de aceleração do *tandem*.

2.4 Sistema de Detecção

Para registrar a chegada dos íons provenientes da amostra, são utilizados dois detectores. Um, do tipo *microchannel plates* (MCP) [21], está localizado antes da entrada do acelerador para a verificação do funcionamento da fonte MALDI. Esse detector pode ser deslocado do eixo do espectrômetro para que os íons produzidos na fonte possam penetrar no acelerador. O outro detector, do tipo *microsphere plates* (MSP) [22],

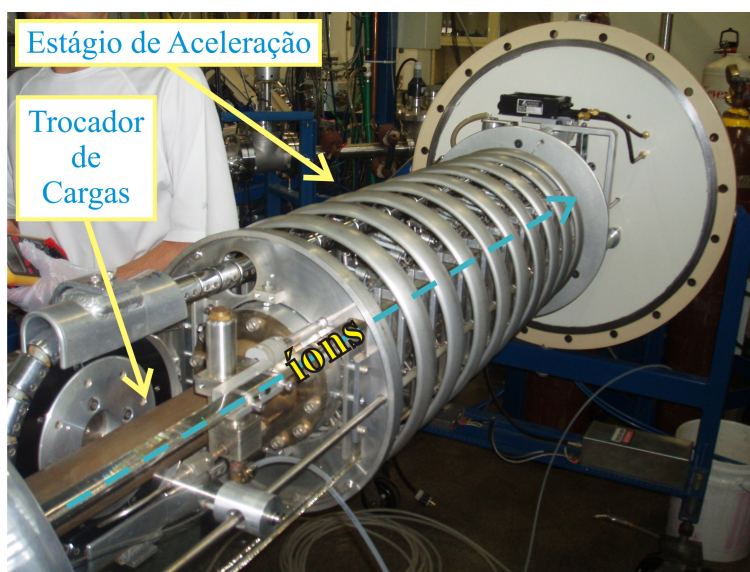


Figura 2.8: Segundo estágio de aceleração do acelerador e célula gasosa.

é colocado na saída do acelerador e fornece os sinais *stop* que encerram as medidas dos tempos de voo. Um detector *MCP* consiste de duas placas de um vidro especial, micro perfuradas, colocadas paralelamente a um anodo polarizado com alta tensão (≈ 3000 V) através de um divisor de tensão. O impacto de uma partícula (íon ou elétron) na superfície frontal do detector recoberta de material semiconductor provoca uma cascata eletrônica dentro das placas de vidro, a qual é recolhida por um anodo para formar o pulso de saída. O funcionamento do detector *MCP* está ilustrado na figura 2.9.

O detector *MSP* é revestido em ambos os lados com eletrodos condutores. Os íons primários incidem na face de baixo potencial do detector, produzindo elétrons que são acelerados através das esferas, devido ao campo elétrico existente. Em cada colisão, multiplica-se o número de elétrons, de modo que há um grande número de elétrons secundários para cada elétron primário. O funcionamento do detector *MSP* está ilustrado na figura 2.10.

Os *MCP* e *MSP* são detectores rápidos e, portanto adequados para serem utilizados em medidas de tempo de voo. Além disso, sua eficiência aumenta com a energia do íon molecular.

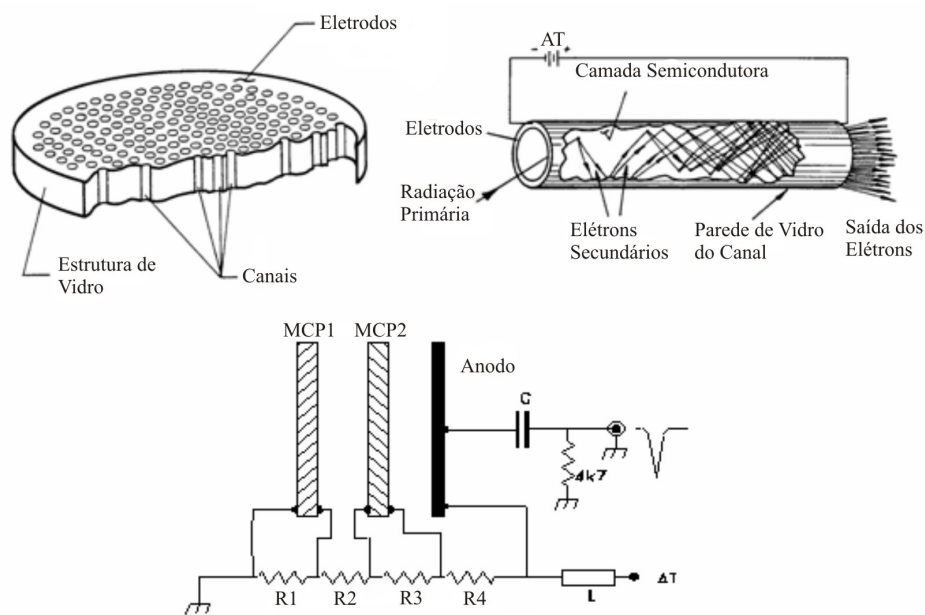


Figura 2.9: Esquema do funcionamento do detector *MCP*.

2.5 Eletrônica e Aquisição de Dados

O sistema de aquisição de dados é formado por um cronômetro eletrônico de grande precisão que é acionado por um sinal formado por parte do pulso do laser, detectado em um fotodiodo. O feixe de fótons é dividido, parte incide na amostra provocando a emissão de moléculas e parte é detectado pelo fotodiodo que gera o sinal *start*. O sinal de interrupção da medida temporal, é proveniente do detector *MSP* posicionado no fim do percurso dos íons. As medidas dos intervalos de tempo entre os sinais *start* e *stop*, juntamente com as dimensões conhecidas do sistema, permitem a identificação dos íons moleculares.

Um diagrama simplificado do sistema de aquisição de dados é apresentado na figura 2.11. O sinal *start*, proveniente de parte dos fótons do laser, dispara o *TDC* após passar por um *Constant Fraction Discriminator (CFD)*, responsável por filtrar ruídos e tratar a forma dos pulsos .

O *TDC* é um conversor tempo-digital de múltiplos *stop*, no qual todos os sinais *stop* que cheguem dentro de um intervalo de tempo pré-definido são registrados pelo conversor. Esse módulo possui a característica de medir sucessivos intervalos de

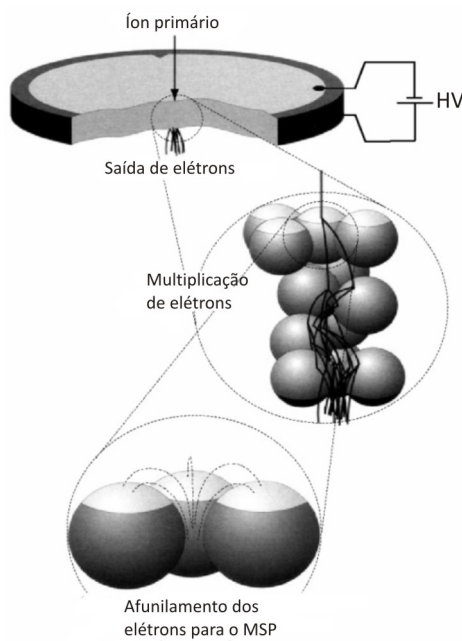


Figura 2.10: Esquema do funcionamento do detector *MSP*.

tempo relacionados a um mesmo evento que dispara o processo de contagem. Em espectrometria de massa, o uso deste tipo de cronômetro permite o registro de uma sequência de intervalos temporais relativos a íons formados em um mesmo evento de dessorção. Um novo sinal *start* é aceito somente após decorrido um período de tempo pré-programado.

A vantagem do sistema com *TDC* é a elevada resolução em tempo, sendo ideal para aplicações que necessitem de alta precisão na determinação das massas e gerando resultados satisfatórios mesmo em situações de baixas taxas de contagens. No lado negativo conta o fato deste aparelho apenas registrar a chegada dos íons sem conseguir medir quantos íons existem por evento.

Os dados registrados são enviados a um computador, onde os espectros de massa são construídos em tempo real e armazenados pelo programa *pTA*.

O *pTA*, além de apresentar os espectros como número de íons por tempo de voo, possui uma ferramenta de calibração que possibilita ler o espectro em unidades de massa atômica. Para tanto, picos de elementos conhecidos do analito são marcados no programa e suas massas servem de base para a interpolação de uma curva em unidades

de massa atômica. A título de ilustração, na figura 2.12 é mostrado um espectro de CsI visualizado no *pTA* durante as medições.

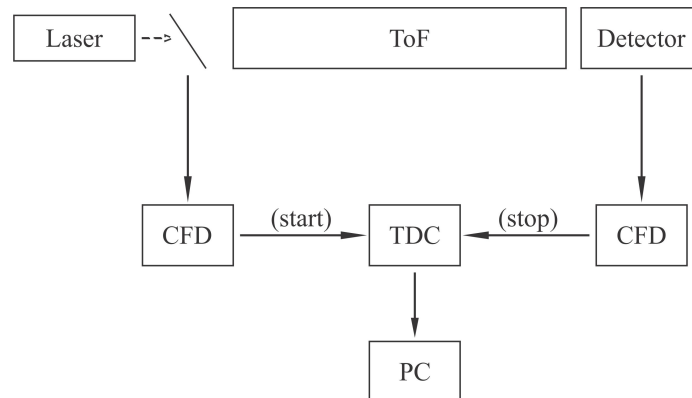


Figura 2.11: Diagrama do Sistema de Aquisição de Dados.

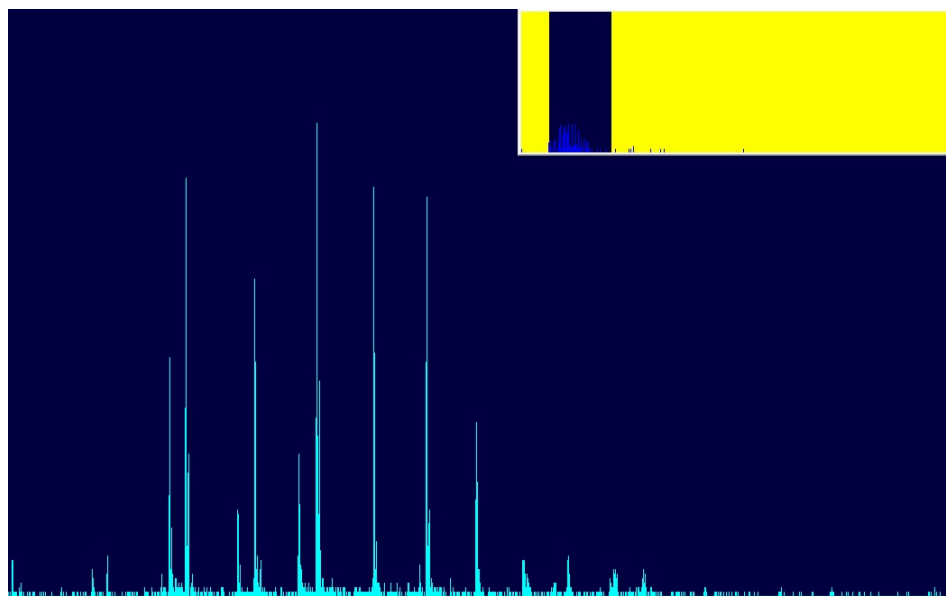


Figura 2.12: Apresentação de um espectro de massa de CsI no *pTA*.

Capítulo 3

Métodos de Simulação

3.1 Simulação dos Espectros

Com a finalidade de calibrar os espectros medidos e determinar os vários íons originados nas amostras analisadas, foi utilizado o programa *SIMION* [23].

O *SIMION* é um *software* de modelagem de campos eletrostáticos e magnéticos.

Para o processo de simulação, é necessário fornecer a geometria do espectrômetro no *SIMION* e definir os eletrodos e seus potenciais. A geometria pode ser desenhada graficamente utilizando a ferramenta de edição *Modify* dentro do *software* ou através de arquivos de geometria (extensão *.GEM*) definindo os eletrodos e sua distribuição espacial por meio de uma linguagem específica em arquivo de texto. Devido à facilidade em modificar as dimensões, adicionar elementos eletrostáticos, bem como de portabilidade, a implementação do sistema *MALDI-AMS* foi feita com arquivos de geometria.

Dada uma configuração de eletrodos e seus potenciais, o programa gera uma matriz de pontos, resolve a equação de Laplace, e simula as trajetórias de íons através da geometria fornecida. O programa permite trabalhar com simetrias axiais ou cilíndricas, sendo possível o cálculo das trajetórias completas em três dimensões.

Os íons podem ser definidos individualmente ou em grupos e entre os parâmetros que podem ser ajustados estão a energia cinética, a massa, a carga, a posição e a direção das partículas.

3.2 Dimensões do Sistema

Para a realização das simulações foi necessário medir as dimensões do espectrômetro. Um diagrama da geometria do equipamento, fora de escala, com os valores medidos é mostrado na figura 3.1.

As distâncias L_1 , L_2 e L_3 fazem parte da fonte de íons *MALDI* e L_4 representa parcialmente o sistema de injeção dos íons no acelerador. As dimensões L_5 e L_7 compreendem, nesta ordem, o primeiro e o segundo estágio de aceleração do *tandem*.

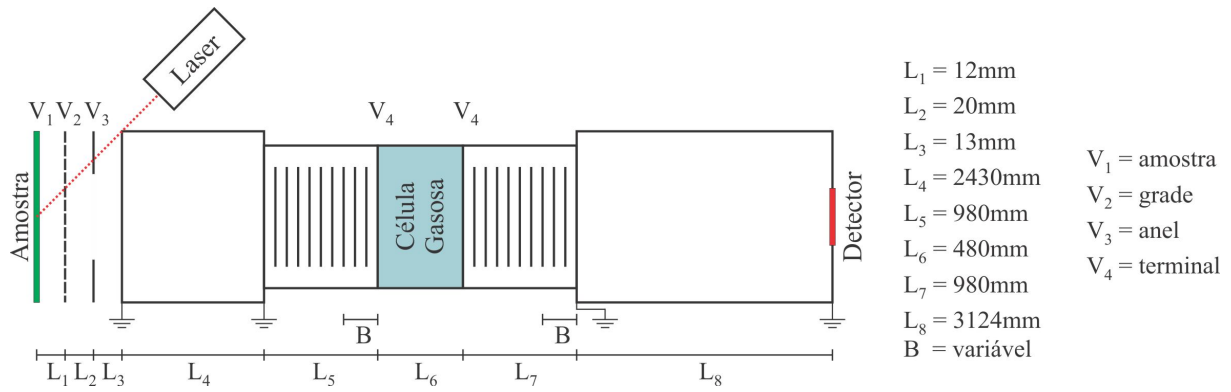


Figura 3.1: Diagrama da geometria do espectrômetro de massa e suas dimensões.

Após o último estágio de aceleração, os íons percorrem L_8 até atingirem o detector *MSP*. A extensão da câmara gasosa na direção da trajetória dos íons é dada por L_6 . A distância B é variável e depende da tensão aplicada nos terminais do acelerador conforme descrito na seção 2.3. Um aumento do comprimento em B indica que módulos do acelerador foram aterrados. Dessa forma, devido à variação em B , as dimensões L_5 , L_6 , L_7 e L_8 também vão ser alteradas, sendo necessário reconfigurar a geometria simulada.

3.3 Geometria Implementada

A geometria do *MALDI-AMS* foi implementada no *SIMION* com simetria do tipo cilíndrica, um corte longitudinal do sistema simulado e de seus elementos é mostrado na figura 3.2.

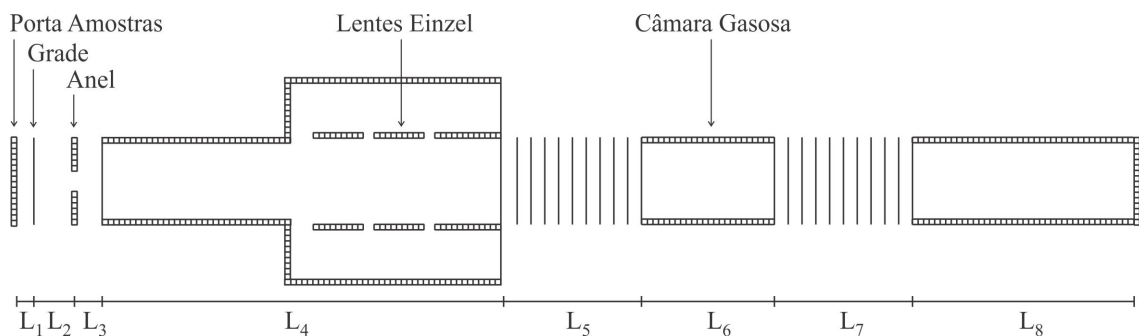


Figura 3.2: Geometria implementada no *SIMION* (fora de escala).

Os elementos representados por um quadriculado são eletrodos que impedem

a passagem do feixe de íons. As linhas verticais são elementos transparentes à passagem das partículas, atuam como grades ideais de alta transmissão e podem ter seus potenciais alterados, permitindo mudanças dos campos eletrostáticos nos setores simulados. As estruturas simuladas do suporte da amostra, da grade existente na fonte *MALDI* e do anel estão indicadas na figura 3.2.

O suporte das amostras é polarizado com tensão negativa e a grade está em tensão positiva. Esse é o primeiro estágio de aceleração do espectrômetro e sua principal função é de injetar no acelerador os íons que saem da amostra devido aos fótons que nela incidem. O anel, também representado na figura 3.2, funciona como uma lente eletrostática que, juntamente com o conjunto de lentes *Einzel*, possibilita a focalização do feixe para que os íons percorram toda a extensão do equipamento e sejam detectados no final da trajetória.

3.4 A Simulação

Com a geometria implementada no *SIMION*, é necessário executar o processo de refinamento dos potenciais para a resolução da equação de Laplace com os eletrodos criados. O método aqui utilizado é o chamado *Fast Adjust Array*, que leva em conta a propriedade de solução aditiva da equação de Laplace. Nele, os potenciais de cada eletrodo são resolvidos separadamente possibilitando a alteração da tensão de cada eletrodo de forma rápida, muito útil para as simulações de variadas energias no terminal do acelerador e nas lentes eletrostáticas de focalização do espectrômetro.

Após o refinamento, é possível definir os potenciais de cada eletrodo e então iniciar o processo de simulação.

A fonte *MALDI* simulada é vista em detalhe na figura 3.3. Foram ajustados os potenciais usualmente utilizados de -12 kV na amostra, $+1$ kV na grade e $-2,5$ kV no anel, algumas linhas equipotenciais geradas pelo *SIMION* estão presentes na imagem.

A alta tensão no terminal do acelerador é simulada através da segmentação dos estágios de aceleração em vários eletrodos como pode ser visualizado na figura

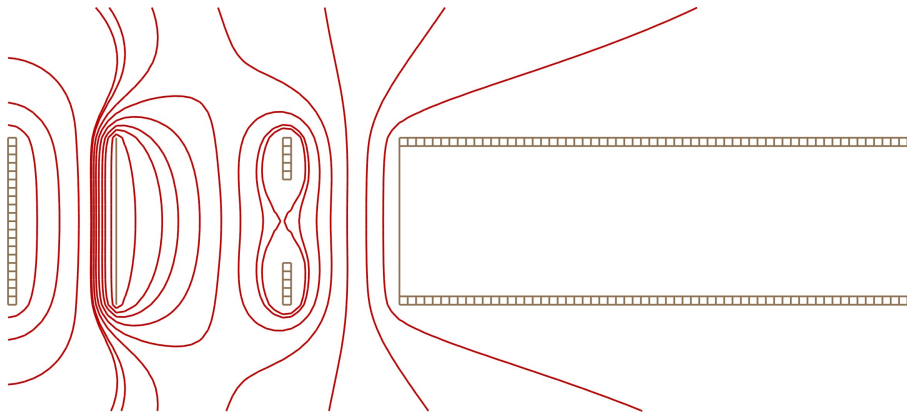


Figura 3.3: Fonte MALDI simulada.

3.2. A segmentação do estágio de aceleração, além de reproduzir um campo elétrico uniforme através do incremento gradual dos potenciais até a tensão máxima definida no terminal do acelerador, também possibilita simular os trechos que são curto-circuitados quando a tensão no terminal é inferior a 900 kV, conforme mencionado na seção 2.3 (variação dos comprimentos dos segmentos L_5 , L_6 , L_7 e L_8). Na figura 3.4 são indicadas parte da câmara gasosa e do segundo estágio de aceleração do *tandem* simulados com algumas linhas equipotenciais destacadas em vermelho.

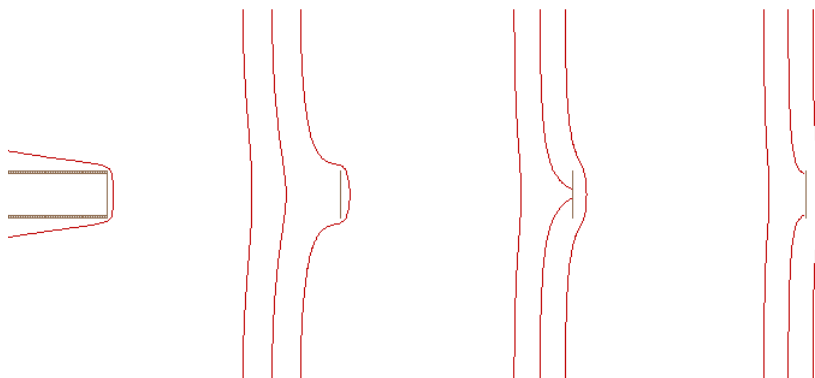


Figura 3.4: Câmara gasosa e segundo estágio de aceleração simulados.

Para enfim simular os tempos de voo é necessário inserir no *SIMION* os dados dos íons que serão analisados como a posição e energias iniciais, carga elétrica e massa. Os resultados da simulação podem ser visualizados na tela do computador durante a simulação ou alternativamente, o programa pode ser configurado para

gerar um arquivo de texto contendo as seguintes informações: o tempo de voo, energia, velocidade e as posições finais dos íons.

3.5 Resultados das Simulações

Um espectro de CsI, obtido experimentalmente no sistema *MALDI-AMS* com gás nitrogênio (N_2) à pressão de $5,2 \times 10^{-7}$ torr na câmara gasosa e com tensão no terminal do acelerador igual a 0,6 MV, é apresentado na figura 3.5.

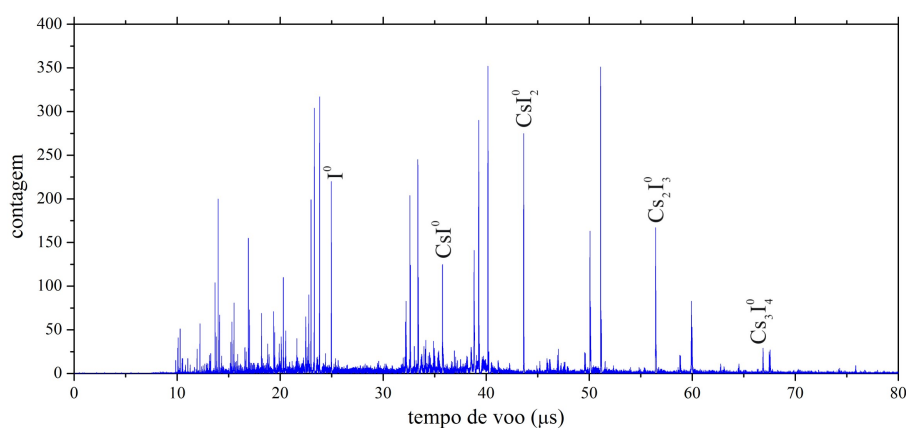


Figura 3.5: Espectro de uma amostra de CsI com 0,6 MV no terminal do acelerador.

Devido às tensões na fonte *MALDI*, dentre os íons que saem da amostra, denominados precursores, somente os negativos são acelerados e penetram no *tandem*. Esses íons são acelerados no primeiro estágio do acelerador e ao colidirem com as moléculas do gás, no interior da câmara, podem sofrer trocas de carga e/ou fragmentações, gerando íons “filhos” positivos ou negativos com diversos estados de cargas. Os íons positivos são novamente acelerados no segundo estágio.

Através de simulações no *SIMION* foram identificadas as diversas “famílias” geradas pela amostra de CsI e que aparecem no espectro da figura 3.5. O CsI possui a característica de formar aglomerados devido a interação com o laser de ultravioleta, com as seguintes composições $Cs_{(n+1)}I_n^+$ para as formas positivas e $Cs_nI_{(n+1)}^-$ para as negativas, com n inteiro positivo. As figuras 3.6 a 3.10 apresentam trechos expandidos do espectro do CsI destacando cada uma das “famílias”. Os picos em azul

correspondem aos resultados experimentais e as linhas vermelhas aos resultados obtidos a partir de simulações feitas com o *SIMION*.

A família do I^- é mostrada na figura 3.6. Nas figuras 3.7, 3.8, 3.9 e 3.10 são apresentadas as famílias do CsI^- , CsI_2^- , $Cs_2I_3^-$ e $Cs_3I_4^-$, respectivamente.

Na figura 3.6 são identificados o composto neutro I^0 e os estados de carga de I^{1+} a I^{5+} gerados a partir do íon precursor I^- ao colidir com as moléculas de N_2 na câmara gasosa. Para os íons CsI^- e $Cs_nI_{(n+1)}^-$, nas figuras 3.7, 3.8, 3.9 e 3.10, os estados de cargas identificados correspondem aos átomos de Cs e I provenientes da quebra da estrutura dos íons precursores.

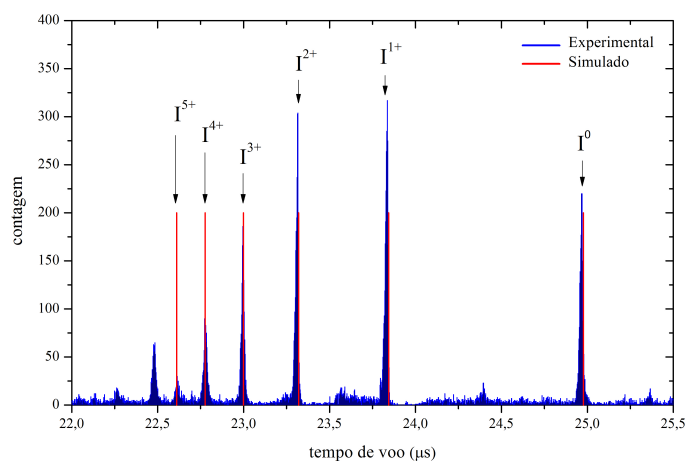


Figura 3.6: Resultados da simulação com o *SIMION* para a família do I^- .

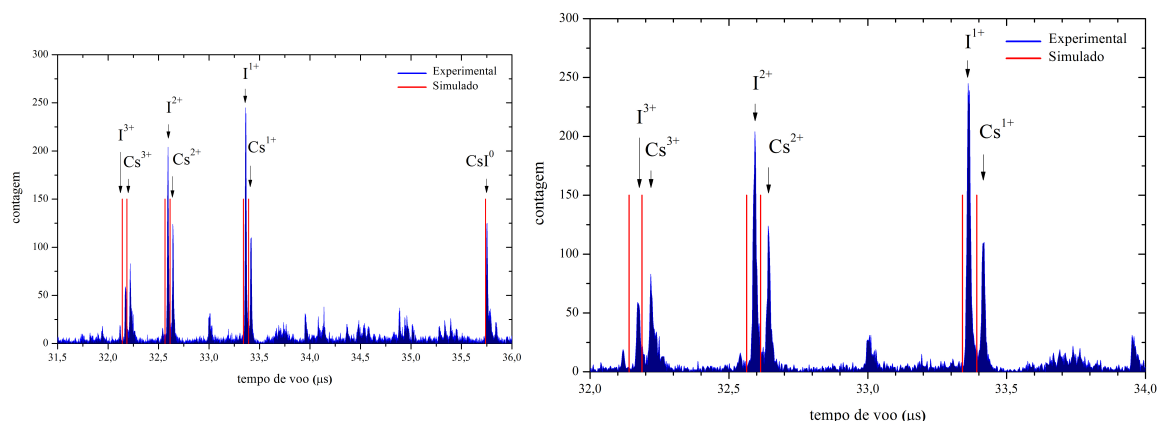


Figura 3.7: Resultados da simulação para a família do CsI^- : à esquerda trecho com o composto neutro e à direita os estados de cargas em detalhe.

Os resultados da simulação aparecem deslocados em tempo com relação aos dados experimentais. Tais deslocamentos são aproximadamente constantes para cada

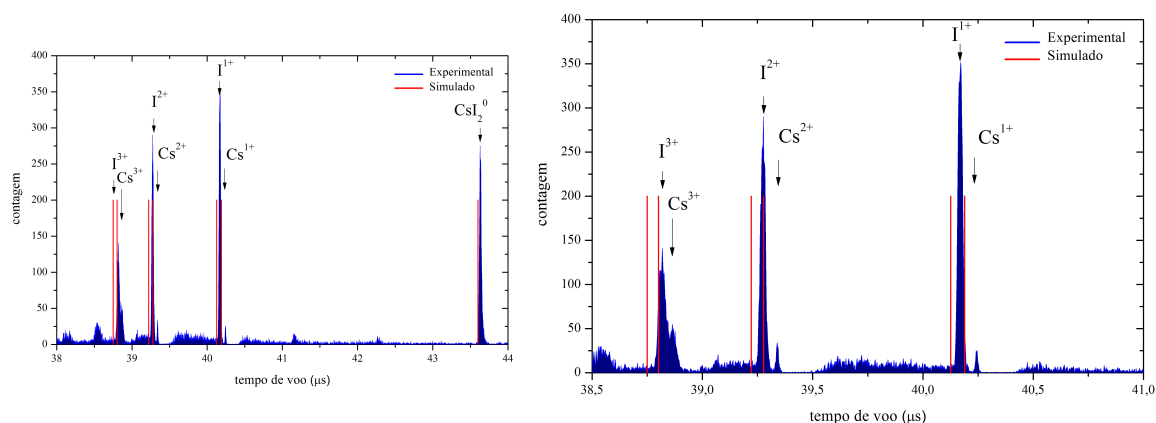


Figura 3.8: Resultados da simulação para a família do CsI_2^- : à esquerda trecho com o composto neutro e à direita os estados de cargas em detalhe.

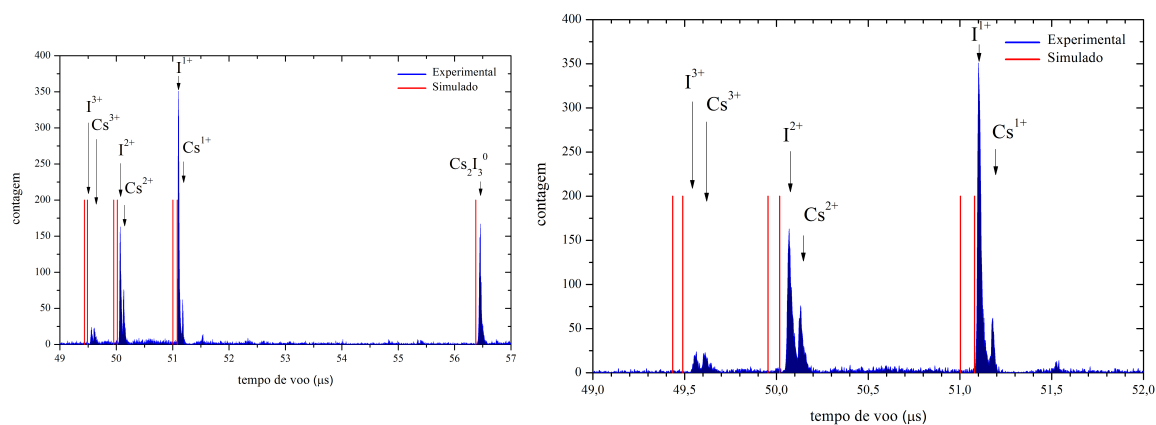


Figura 3.9: Resultados da simulação para a família do Cs_2I_3^- : à esquerda trecho com o composto neutro e à direita os estados de cargas em detalhe.

família, ou seja, deslocando toda a família proveniente do íon precursor i por um valor Δt_i os valores simulados passam a coincidir com os dados experimentais. Os resultados visuais destes deslocamentos são apresentados nas figuras 3.11, 3.12, 3.13 e 3.14, o ajuste referente ao íon precursor I^- foi omitido devido ao deslocamento ser imperceptível visualmente. A necessidade de deslocar os tempos de voo calculados não impossibilitou a determinação dos diversos picos. Deslocamentos temporais em relação aos dados experimentais são esperados e estão em parte associados à eletrônica envolvida na obtenção dos espectros. Os sinais gerados e processados não são recebidos instantaneamente pelo sistema de aquisição de dados. Devido à dimensão de todo o aparato experimental e à ordem de grandeza dos tempos medidos, fatores como tempo de resposta dos detectores, comprimentos dos cabos e

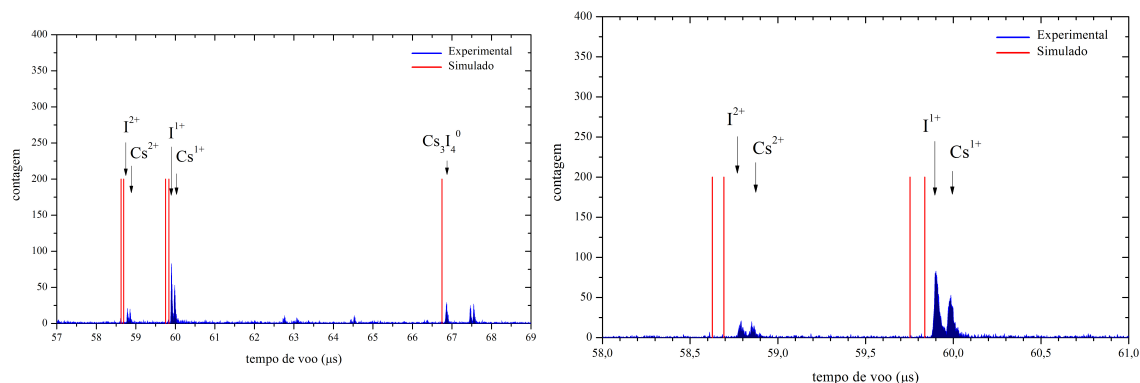


Figura 3.10: Resultados da simulação para a família do Cs_3I_4^- : à esquerda trecho com o composto neutro e à direita os estados de cargas em detalhe.

tempo de processamento dos dados gerariam uma diferença de tempo constante para todas as famílias que não apareceria nas simulações, pois, nesta, não há atrasos eletrônicos. As diferenças entre os tempos de voo da simulação e os medidos, referentes a cada família, estão na tabela 3.1. Os resultados obtidos indicam que as simulações constituem auxílio importante para a calibração de espectros.

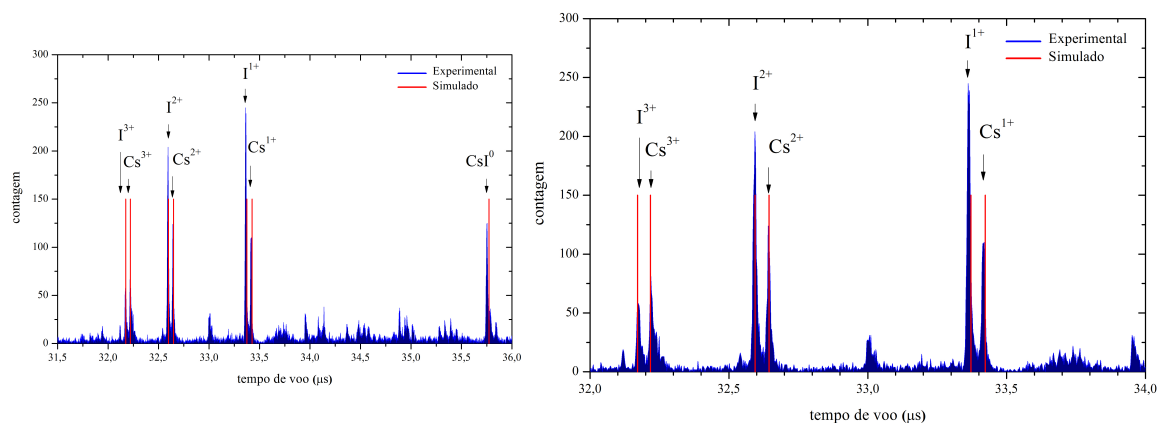


Figura 3.11: Resultados da simulação para a família do CsI^- deslocados de $0,033 \mu\text{s}$.

Utilizando o método de simulação foi feito um estudo da influência da variação da tensão da *Einzel* nos tempos de voo dos íons. Esse estudo é apresentado na figura 3.15 e compara os valores simulados com os resultados experimentais. Nele, observa-se que as estruturas simuladas reproduzem os efeitos medidos experimentalmente e que há um aumento no tempo de voo quando a tensão na *Einzel* é aumentada. Tal comportamento é esperado tanto para as partículas neutras quanto para os íons positivos uma vez que a lente *Einzel* está agindo sobre os íons negativos

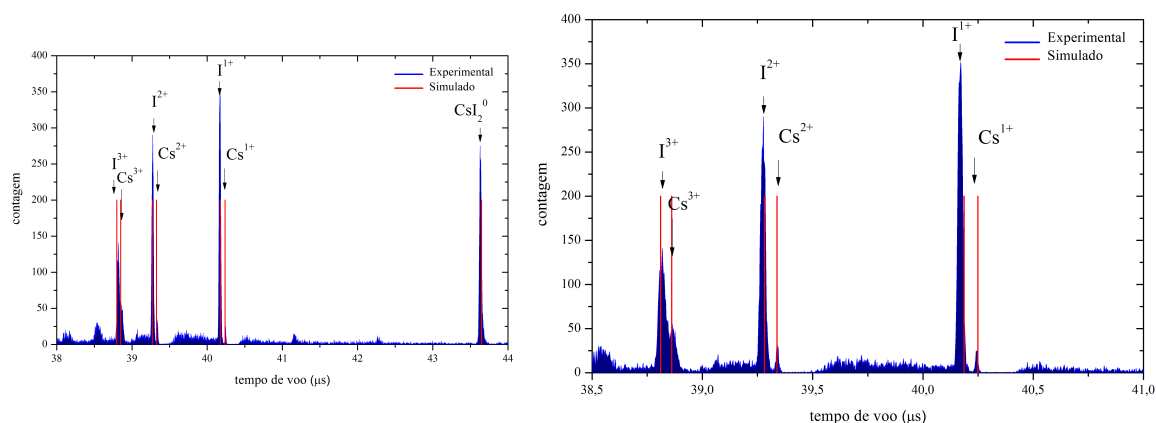


Figura 3.12: Resultados da simulação para a família do CsI_2^- deslocados de $0,060 \mu\text{s}$.

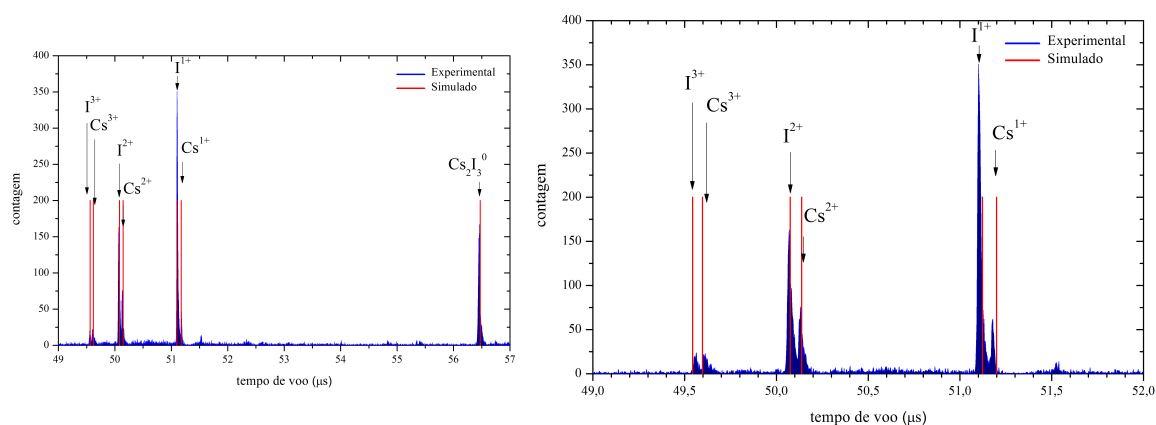


Figura 3.13: Resultados da simulação para a família do Cs_2I_3^- deslocados de $0,11 \mu\text{s}$.

precursores provenientes da fonte antes que estes penetrem no acelerador.

As curvas experimental e simulada dos gráficos da figura 3.15 tornam-se mais afastadas conforme o aumento da massa das moléculas analisadas. Esse fato corrobora com o comportamento observado na tabela 3.1, que mostra que quanto maior a massa do íon precursor, maior é o deslocamento entre os tempos de voo simulados e as medidas experimentais.

No gráfico da figura 3.16 é apresentado um estudo similar onde a tensão na *Einzel* foi fixada em -7 kV e verificou-se a influência da variação da tensão no terminal do acelerador nos tempos de voo dos íons. Novamente a simulação reproduziu o comportamento dos dados experimentais.

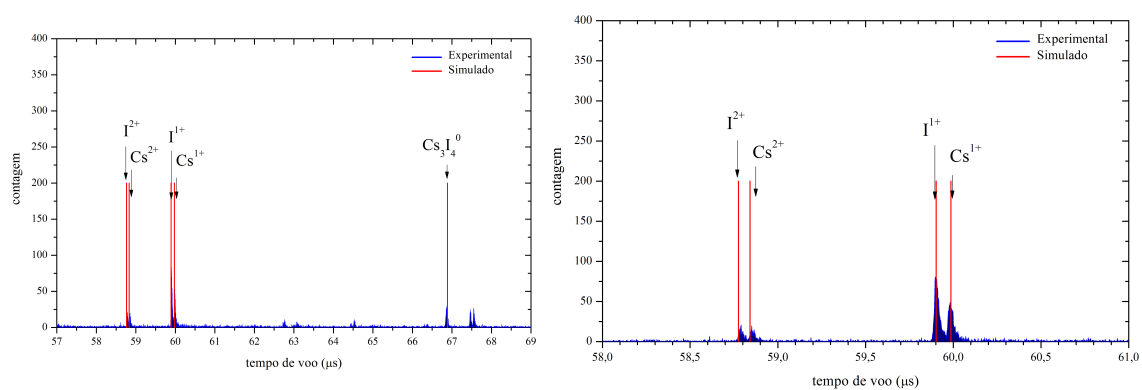
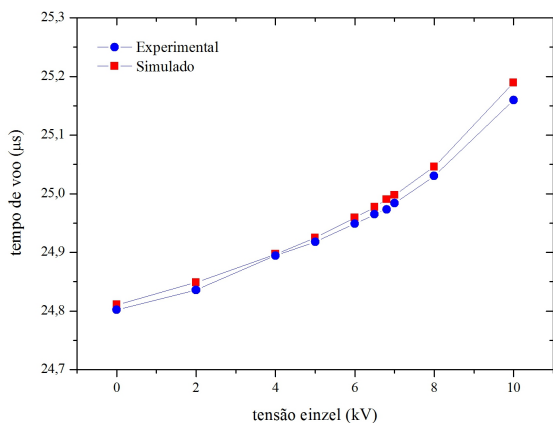


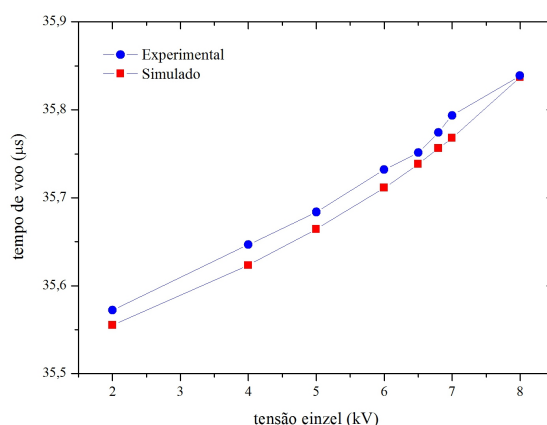
Figura 3.14: Resultados da simulação para a família do Cs_3I_4^- deslocados de 0, 12 μs .

Família	Tempo deslocado (μs)
I^-	0,0038
CsI^-	0,033
CsI_2^-	0,060
Cs_2I_3^-	0,11
Cs_3I_4^-	0,12

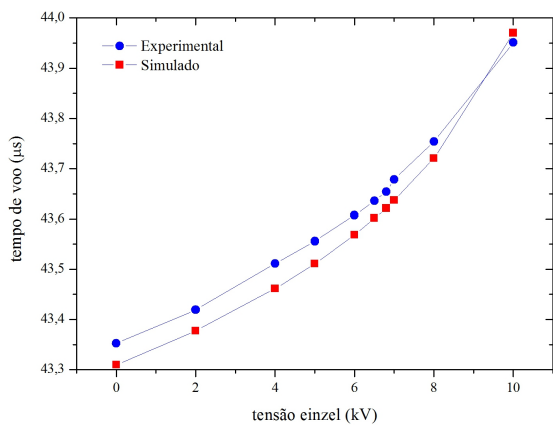
Tabela 3.1: Tempos deslocados nas famílias da amostra de CsI.



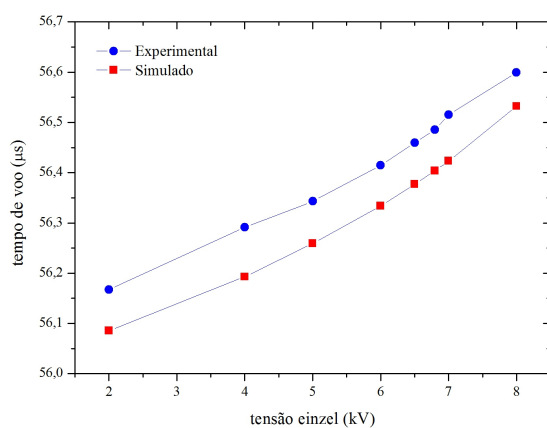
(a) Tempo de voo do I^0 .



(b) Tempo de voo do CsI^0 .



(c) Tempo de voo do CsI_2^0 .



(d) Tempo de voo do $Cs_2I_3^0$.

Figura 3.15: Influência da tensão da *Einzel* nos tempos de voo com a tensão no terminal do acelerador fixa em 600 kV.

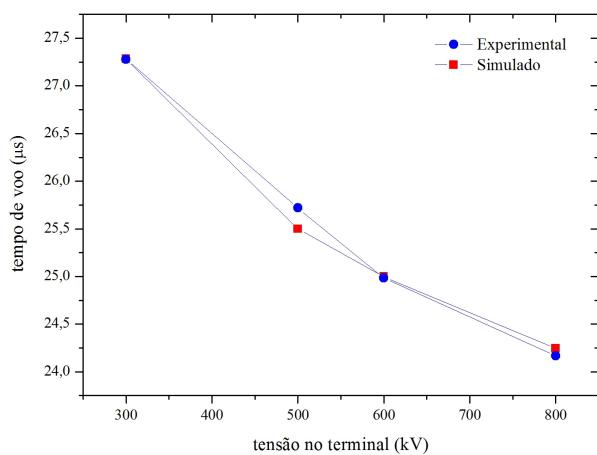
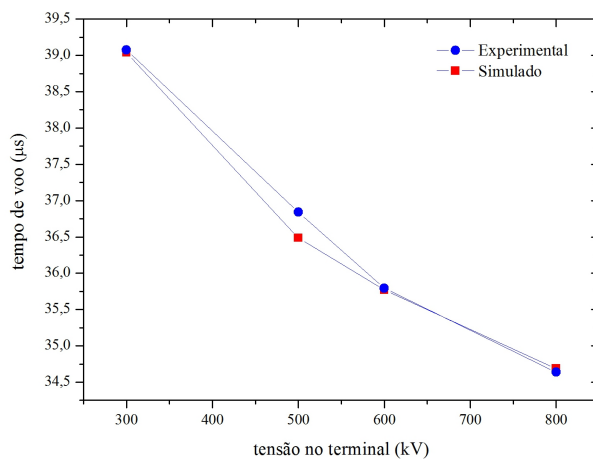
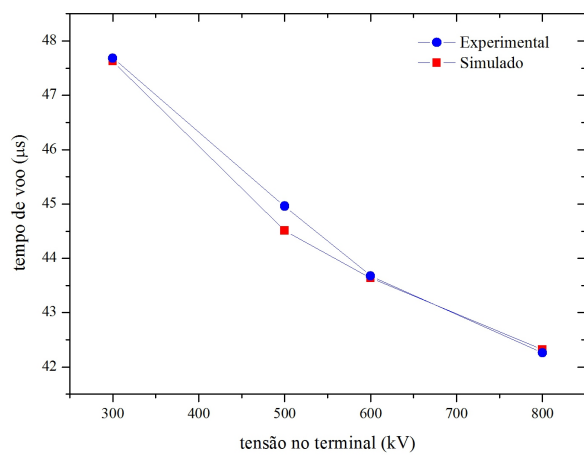
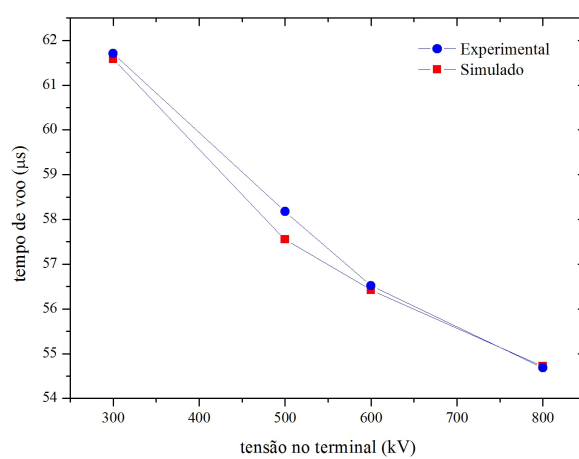
(a) Tempo de voo do I^0 .(b) Tempo de voo do CsI^0 .(c) Tempo de voo do CsI_2^0 .(d) Tempo de voo do $Cs_2I_3^0$.

Figura 3.16: Influência da tensão no terminal do acelerador nos tempos de voo com a tensão na *Einzels* fixa em -7 kV.

Capítulo 4

Uma Análise Estatística

4.1 Expressões de Tempo de Voo

É importante salientar que a calibração de espectros de tempo de voo obtidos com esse novo equipamento é bastante complexa. Já foi mencionado que os íons negativos emitidos pela amostra e acelerados no primeiro estágio do *tandem* podem, na câmara de gás, perder um ou mais elétrons, tornando-se neutros ou positivos. Também há a possibilidade dos íons permanecerem negativos. Sendo assim, o segundo estágio do acelerador é percorrido por moléculas neutras, positivas e negativas e para cada uma das três situações há uma expressão diferente para o tempo de voo. A possibilidade de fragmentação das moléculas ao colidirem com o gás da câmara de troca de carga é outro fator que dificulta a análise dos espectros de tempo de voo.

A obtenção das equações de tempo de voo envolvem conceitos clássicos de cinemática e eletricidade. Esses conceitos são aplicados nos diferentes segmentos do espectrômetro, levando em consideração as variadas distâncias e campos eletromagnéticos em cada estágio de aceleração. O desenvolvimento das expressões de tempo de voo é baseado no mesmo diagrama do método de simulação, apresentado na figura 3.1 da seção 3.2 e onde estão indicadas as distâncias percorridas pelas moléculas e os elementos onde há tensões aplicadas. Neste caso, porém, os estágios de aceleração são considerados regiões contínuas, diferenciando-se do tratamento dado anteriormente, no qual tais trechos eram divididos em etapas, o que lhes conferia maior proximidade da real construção do acelerador.

As moléculas emitidas pela amostra são submetidas a um primeiro potencial acelerador ao longo da distância L_1 , atravessam as distâncias L_2 , L_3 e L_4 em movimento aproximadamente uniforme com a velocidade adquirida ao longo do trecho L_1 , percorrem o primeiro estágio de aceleração do *tandem* (L_5) e chegam à célula gasosa (L_6). No segundo estágio de aceleração do *tandem* (L_7), o movimento das moléculas depende das características de massa e carga resultantes de sua passagem pela célula gasosa. Partículas negativas são desaceleradas, partículas

positivas são novamente aceleradas, enquanto as partículas neutras não sofrem influência deste estágio de aceleração. Na distância L_8 todas as partículas se deslocam com movimento uniforme.

Nos primeiros seis estágios do aparato experimental (até a célula gasosa da figura 3.1), a expressão de tempo de voo para uma molécula de massa m e carga q , proveniente da amostra é

$$\Delta t_{L_1 \rightarrow L_6} = \left[2L_1 \sqrt{\frac{V_1}{V_1 - V_2}} + 2 \frac{L_2 + L_3}{V_2} (V_1 + \sqrt{V_1^2 - V_1 V_2}) + L_4 \right. \\ \left. + 2 \frac{L_5 - B}{V_4} (V_1 + \sqrt{V_1^2 - V_1 V_4}) + (L_6 + B) \sqrt{\frac{V_1}{V_1 - V_4}} \right] \sqrt{\frac{m}{2qV_1}}. \quad (4.1)$$

Se uma molécula, após as possíveis fragmentações e/ou trocas de carga na célula gasosa, deixar o estágio denominado L_6 com massa m' e carga nula, não sofrerá os efeitos do campo elétrico no segundo estágio do *tandem*. Assim, a expressão de tempo de voo para essa molécula nos dois últimos percursos do trajeto é

$$\Delta t_{L_7 \rightarrow L_8}^N = (L_7 + L_8) \sqrt{\frac{m}{2q(V_1 - V_4)}}. \quad (4.2)$$

Nesse caso, o tempo de voo depende exclusivamente da massa com que a partícula iniciou o percurso. Isso se deve ao fato da molécula neutra percorrer os dois últimos estágios em movimento uniforme, com a velocidade com que saiu da célula gasosa. Se a molécula que deixar a célula gasosa tiver massa m' e carga q' (positiva ou negativa), os efeitos do campo elétrico nos estágios seguintes devem ser considerados e a expressão referente ao movimento nessa parte do percurso é

$$\Delta t_{L_7 \rightarrow L_8}^{\pm} = \frac{(L_7 - B) m'}{q' V_4} \left(\sqrt{2 \left[V_1 \frac{q}{m} + V_4 \left(\frac{q'}{m'} - \frac{q}{m} \right) \right]} - \sqrt{\frac{2q}{m} (V_1 - V_4)} \right) \\ + (L_8 + B) \sqrt{\frac{mm'}{2qm' (V_1 - V_4) + 2q'mV_4}}. \quad (4.3)$$

Além da realização de simulações, foram efetuados cálculos dos tempos de voo para identificação dos picos do espectro da figura 3.7 da seção 3.5.

A tabela 4.1 apresenta os valores de tempos de voo para a “família” do CsI obtidos experimentalmente, obtidos pelo processo de simulação com o *SIMION* e os calculados com uso das expressões 4.1, 4.2 e 4.3.

Moléculas	Experimental (μs)	<i>SIMION</i> (μs)	Calculado (μs)
CsI^0	35,75	35,74	35,78
Cs^{+1}	33,42	33,39	33,04
I^{+1}	33,36	33,34	32,98
Cs^{+2}	32,64	32,61	32,45
I^{+2}	32,59	32,56	32,40
Cs^{+3}	32,22	32,19	32,10
I^{+3}	32,17	32,14	32,05

Tabela 4.1: Valores experimentais, simulados e calculados dos tempos de voo.

Analisando a tabela 4.1, pode-se concluir que as simulações e cálculos são ferramentas úteis e complementares no procedimento de calibração dos espectros e identificação dos vários íons originados nas amostras analisadas.

4.2 Algumas Definições

Como o pico do espectro é uma distribuição, é necessário verificar qual estimativa do valor verdadeiro possui menor incerteza. Para tanto, foram analisadas as estimativas da média, mediana e moda [24] das distribuições experimentais.

Considerando que n é o número total de intervalos de um histograma, f_i a frequência do i -ésimo intervalo, t_i a posição correspondente ao centro do i -ésimo intervalo e definindo $\sum_{i=1}^n f_i = A$, os intervalos para a média, a moda e a mediana são encontrados através de

$$t_{media} = \frac{\sum_{i=1}^n t_i f_i}{A} \quad (4.4)$$

$$t_{mediana} = t_m, \text{ tal que } \sum_{i=1}^m f_i = \frac{A}{2} \quad (4.5)$$

$$t_{moda} = t_p, \text{ onde } p \text{ é o intervalo de maior frequência.} \quad (4.6)$$

A incerteza inicial da distribuição de cada pico pode ser estimada através do desvio padrão que pode ser obtido por

$$\sigma^2 = \frac{1}{A-1} \sum_{i=1}^n (t_i - \bar{t})^2 f_i. \quad (4.7)$$

Porém o desvio padrão da média é apenas uma estimativa inicial, sendo que as incertezas na média (σ_{media}), mediana ($\sigma_{mediana}$) e moda (σ_{moda}) podem ser obtidas considerando que

$$\sigma_{media}^2 = \alpha \sigma^2 \quad (4.8)$$

$$\sigma_{mediana}^2 = \beta \sigma^2 \quad (4.9)$$

$$\sigma_{moda}^2 = \gamma \sigma^2, \quad (4.10)$$

sendo α , β e γ constantes.

Assim, é possível perceber que a melhor estimativa para o valor do pico em estudo é a que possui menor constante (menor incerteza). A partir da definição do desvio padrão é possível determinar uma relação entre a constante e o χ^2 reduzido

$$\sigma^2 = \frac{1}{A-1} \sum_{i=1}^n (t_i - \bar{t})^2 f_i \implies \frac{(A-1)\sigma^2}{\sigma_\lambda^2} = \sum_{i=1}^n \frac{(t_i - \bar{t})^2}{\sigma_\lambda^2} = \chi^2. \quad (4.11)$$

Ou seja,

$$\frac{\chi^2}{A-1} = \frac{\sigma^2}{\sigma_\lambda^2} \implies \chi_{red}^2 = \lambda. \quad (4.12)$$

Portanto, quanto menor for o χ^2 , menor será a incerteza da estimativa do valor verdadeiro.

4.3 Análise Estatística dos Dados Experimentais

A partir das equações de tempo de voo para as moléculas neutras (equações 4.1 e 4.2), percebe-se que é possível escrever o tempo de voo total das moléculas neutras na forma

$$t = K \sqrt{\frac{m}{q}}, \quad (4.13)$$

onde K depende apenas das distâncias e das tensões aplicadas no espectrômetro, ou seja, $K \equiv K(L, V)$ é constante para uma mesma configuração do sistema.

Dessa maneira, é esperado um modelo linear entre o tempo de voo das moléculas neutras e a raiz das massas dos íons precursores. É interessante observar que, de acordo com as equações 4.1 e 4.3, o tempo de voo dos íons que chegam ao detector não é linear com a raiz da massa.

Para fazer um ajuste linear do tempo de voo das moléculas neutras pela raiz da massa, foi necessário estimar o valor de cada pico estudado. Para isso, o ruído de fundo foi removido utilizando o método de ajuste linear, conforme é mostrado pela figura 4.1b, e determinado os valores da média, mediana e moda para a distribuição. A figura 4.1 exemplifica o método descrito para o pico do I^0 , sendo que o mesmo procedimento foi adotado para os picos do CsI^0 , CsI_2^0 , $Cs_2I_3^0$, $Cs_3I_4^0$ e $Cs_4I_5^0$.

A seguir foi feito o ajuste linear a partir do Método dos Mínimos Quadrados (MMQ) [24] utilizando a média, a mediana e a moda como estimativas do valor verdadeiro e o desvio padrão como estimativa inicial da incerteza. Os ajustes e os gráficos de resíduos para cada estimativa adotada são apresentados nas figuras 4.2

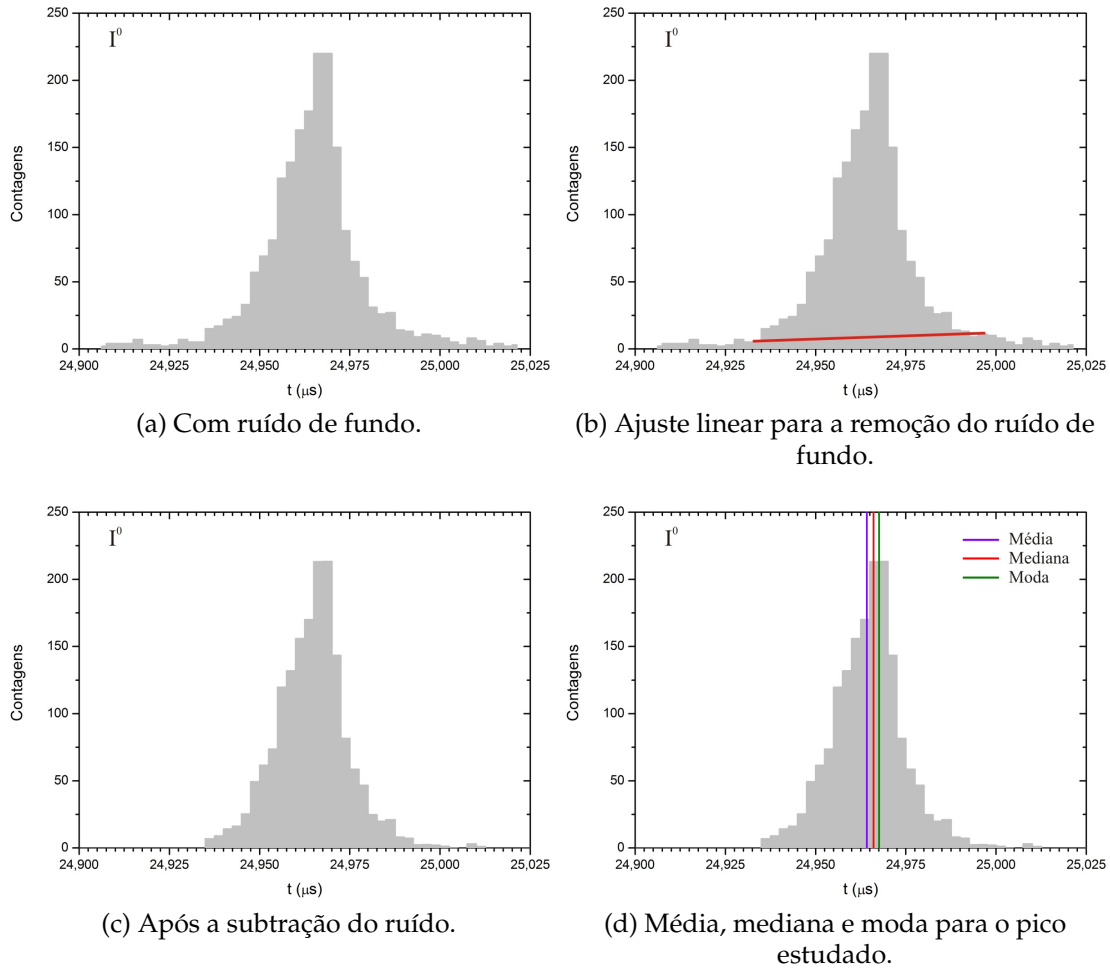


Figura 4.1: Processo de determinação dos valores da média, mediana e moda para o pico do I^0 .

a 4.4 e os resultados do ajuste são mostrados na tabela 4.2.

	t_{media}	$t_{mediana}$	t_{moda}
Coefficiente angular	2.22376(3)	2.22352(3)	2.22328(3)
Coefficiente linear	-0.0892(5)	-0.0852(5)	-0.0821(5)
χ^2	975	1093	2472
χ^2_{red}	244	273	618

Tabela 4.2: Resultados para os ajustes lineares.

A partir da análise do ajuste, pode-se perceber que mesmo que o ajuste linear seja visualmente adequado ao modelo proposto nos três casos, o gráfico de resíduos mostra uma tendência dos dados experimentais, indicando que o tempo de voo das moléculas não tem comportamento linear com a raiz quadrada da massa. Tal observação pode ocorrer por causa da precisão do tempo de voo (da ordem de

nanossegundos) que pode evidenciar alguma influência quadrática ou até cúbica de parâmetros do equipamento no tempo de voo das moléculas.

Como foi concluído que os dados experimentais não seguem um comportamento linear, o MMQ foi utilizado novamente, porém, desta vez para um ajuste de uma função quadrática da forma

$$y = ax^2 + bx + c. \quad (4.14)$$

Os ajustes quadráticos e os gráficos de resíduos para cada estimativa adotada são apresentados nas figuras 4.5 a 4.7; os valores obtidos com esses ajustes estão na tabela 4.3. Os resultados indicam que o ajuste quadrático para os dados experimentais é uma boa aproximação para as moléculas estudadas.

	t_{media}	$t_{mediana}$	t_{moda}
a	$1.22814918(18) \times 10^{-4}$	$1.34741260(18) \times 10^{-4}$	$1.86278177(18) \times 10^{-4}$
b	2.219216135(25)	2.218531948(25)	2.216393418(25)
c	$5.04037(20) \times 10^{-2}$	$4.25772(20) \times 10^{-2}$	$2.32526(20) \times 10^{-2}$
χ^2	122	95	510
χ_{red}^2	41	32	170

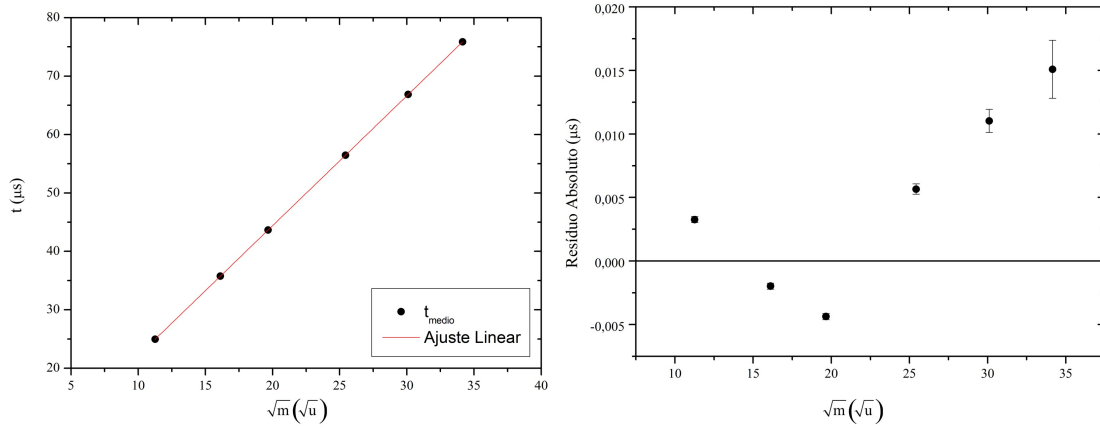
Tabela 4.3: Resultados para os ajustes quadráticos.

O ajuste quadrático foi feito para outros dois espectros e os valores do χ^2 reduzido para cada espectro utilizando a média, a mediana e a moda são apresentados na tabela 4.4.

	Espectro	t_{media}	$t_{mediana}$	t_{moda}
χ_{red}^2	1	41	32	170
	2	41	22	21
	3	51	39	59

Tabela 4.4: Resultados para os χ_{red}^2 nos ajustes quadráticos dos espectros experimentais.

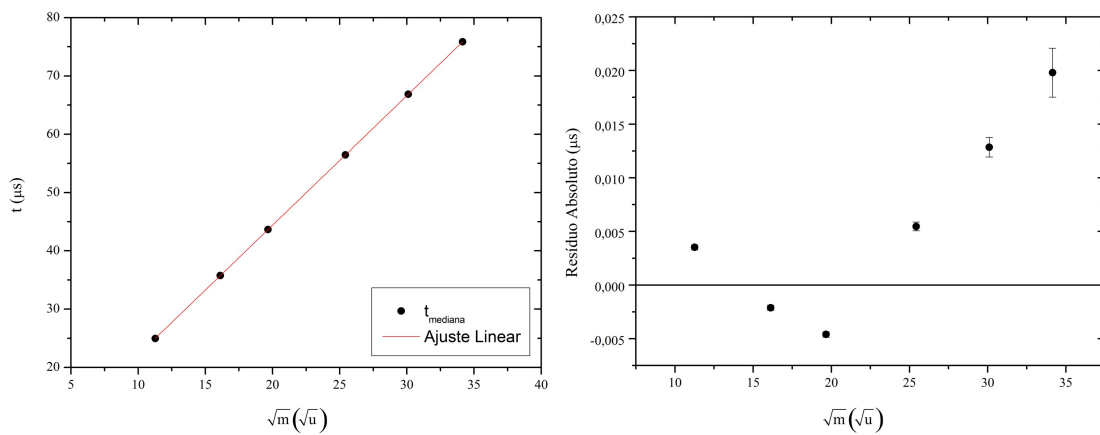
De maneira geral, para a aproximação quadrática, parece existir uma tendência de que a estimativa através da mediana possui menor incerteza, sendo assim, a melhor estimativa para o tempo de voo verdadeiro do pico.



(a) Ajuste linear.

(b) Gráfico de resíduos do ajuste.

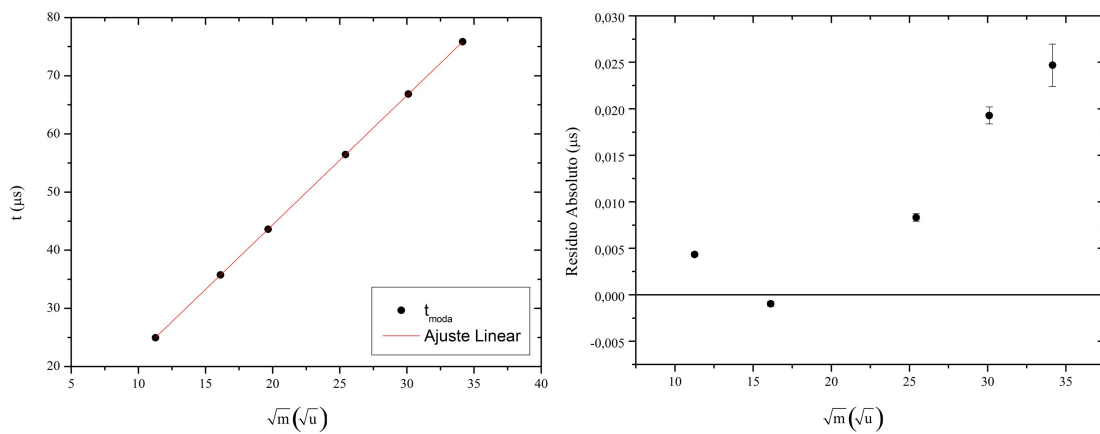
Figura 4.2: MMQ linear para os valores da média dos picos.



(a) Ajuste linear.

(b) Gráfico de resíduos do ajuste.

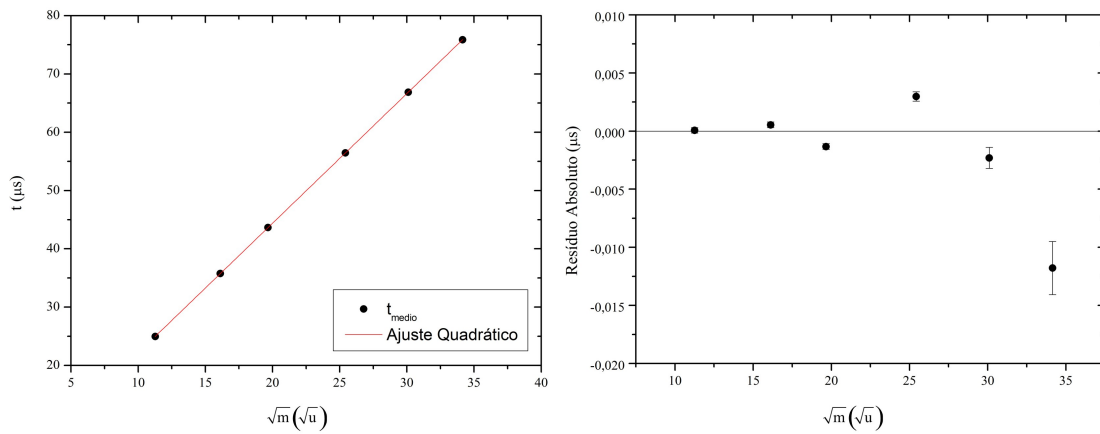
Figura 4.3: MMQ linear para os valores da mediana dos picos.



(a) Ajuste linear.

(b) Gráfico de resíduos do ajuste.

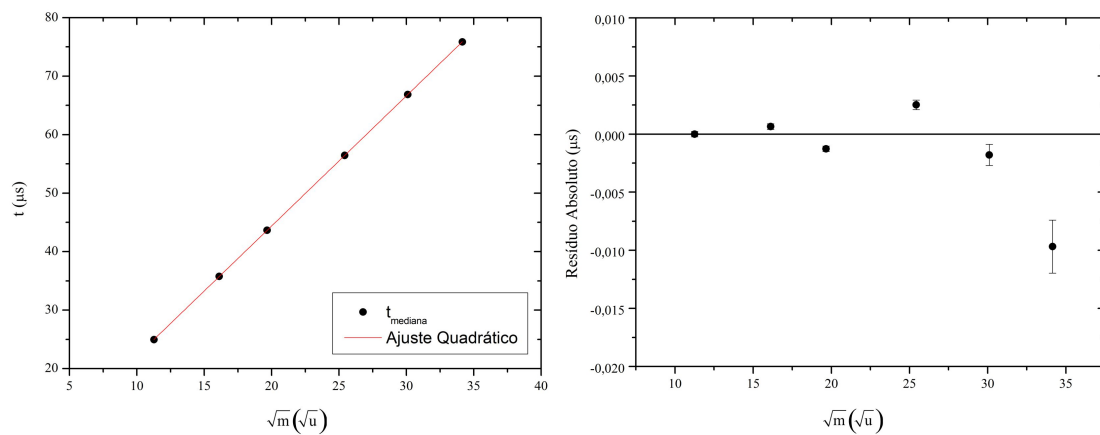
Figura 4.4: MMQ linear para os valores da moda dos picos.



(a) Ajuste quadrático.

(b) Gráfico de resíduos do ajuste.

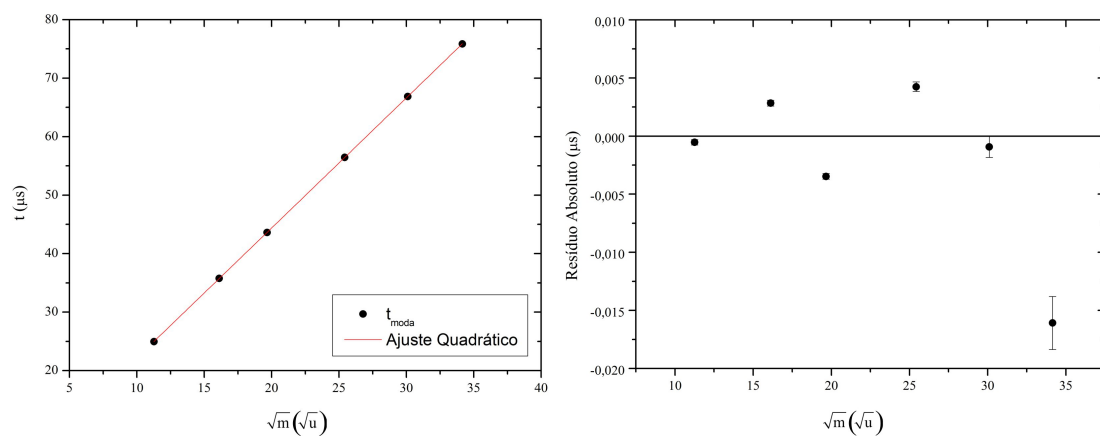
Figura 4.5: MMQ quadrático para os valores da média dos picos.



(a) Ajuste quadrático.

(b) Gráfico de resíduos do ajuste.

Figura 4.6: MMQ quadrático para os valores da mediana dos picos.



(a) Ajuste quadrático.

(b) Gráfico de resíduos do ajuste.

Figura 4.7: MMQ quadrático para os valores da moda dos picos.

Capítulo 5

Análise dos Espectros de Massa

5.1 Amostra de CsI

Para a caracterização e testes iniciais do espectrômetro foram utilizadas amostras padrão uniformes de CsI, cuja massa molecular é 259,8 u. Nessas amostras, o feixe pulsado de fótons pode induzir a emissão de íons moleculares em qualquer posição do alvo, diferentemente do que ocorre com as amostras de material orgânico que não são uniformes.

Utilizando as amostras de CsI foi feito um estudo sistemático do comportamento do espectrômetro variando-se a tensão no terminal do acelerador e parâmetros relacionados à óptica do feixe molecular. Tais medidas apontaram as condições adequadas de operação do sistema.

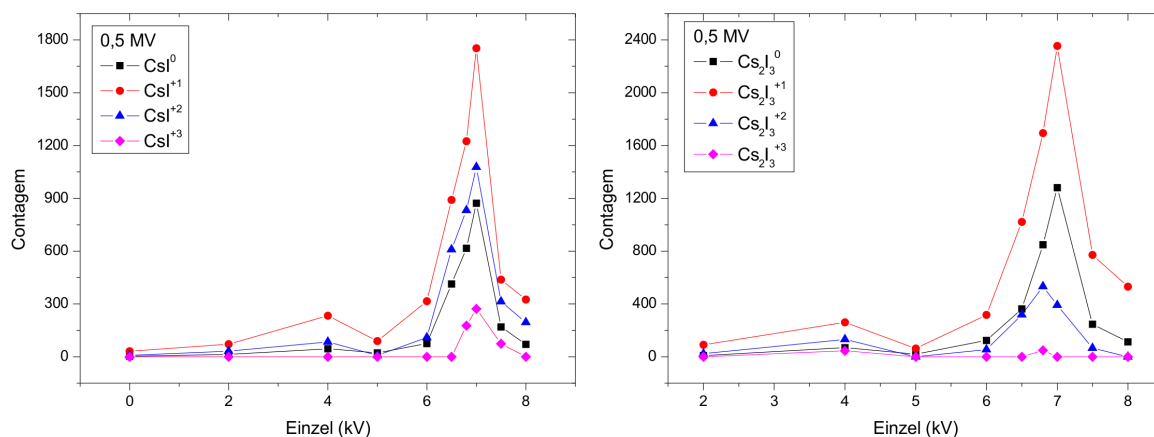
Um dos componentes para controle do feixe de íons é a lente eletrostática *Einzel*, cuja localização no aparato instrumental é mostrada na figura 2.2.

Foi realizado um estudo visando determinar o valor de tensão a ser utilizada na lente que permitisse otimizar a transmissão de íons para o interior da máquina. Com a tensão da amostra fixada, foram feitas análises para estudar a relação entre a área dos picos das distribuições temporais dos íons em função da tensão na *Einzel* (em módulo) para três diferentes tensões no terminal do acelerador. Os resultados obtidos são apresentados nos gráficos da figura 5.1. Pode-se concluir, para essas medidas, que a máxima transmissão dos íons através do espectrômetro *MALDI-AMS*, ocorre entre 6 e 8 kV.

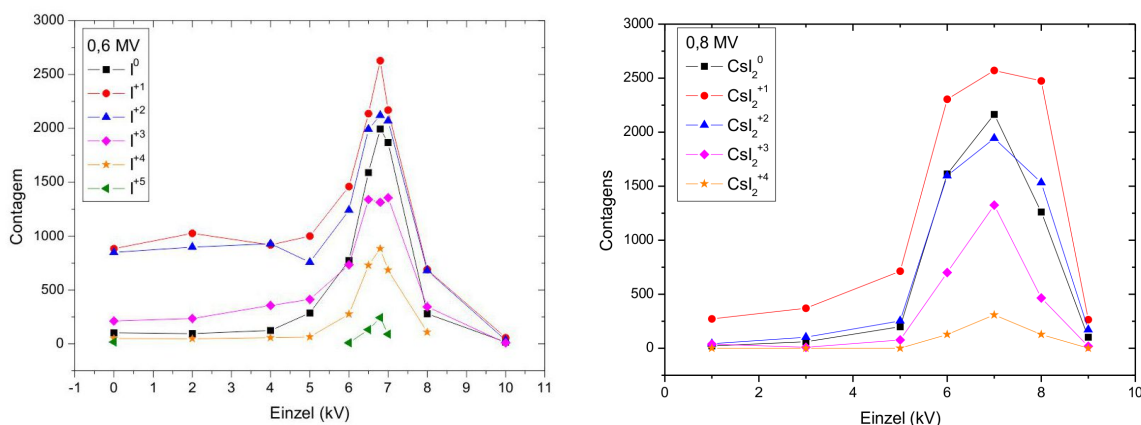
O gráfico da figura 5.2 apresenta os valores da tensão da lente *Einzel* em função da tensão do terminal do acelerador onde foi observada a máxima transmissão de íons.

Para a determinação da faixa de valores de tensão no terminal do acelerador para a qual os espectros têm melhor resolução, foi feito um estudo da dependência da resolução do pico com a tensão no terminal do *tandem*. O resultado, apresentado na figura 5.3, mostra uma melhor resolução para valores de potencial entre 0,5 e 0,8 MV.

Para a escolha do tipo de gás a ser utilizado e de sua pressão na câmara de troca de carga do acelerador, foi fixada a tensão do terminal e foi feita a variação da



(a) Tensão no terminal de 0,5 MV.



(b) Tensão no terminal de 0,6 MV.

(c) Tensão no terminal de 0,8 MV.

Figura 5.1: Áreas dos picos em função do módulo da tensão na *Einzel* para algumas “famílias” da amostra de CsI.

pressão dos gases hélio (He), nitrogênio (N₂) e oxigênio (O₂). Os resultados para cada gás são mostrados nos gráficos das figuras 5.4 a 5.6. A comparação desses resultados mostra que com o gás oxigênio há uma maior contagem nos picos. Portanto, foi possível concluir que esse gás, para a situação em estudo, é o indicado para a maior passagem das moléculas pela câmara gasosa.

Pode-se notar também que em cada um dos gráficos, o comportamento da curva para a família do iodo é semelhante e apresenta valores máximos para a pressão menor que 1 μ Torr. Assim, foi possível concluir que a pressão do gás no trocador de carga deve ser menor que 1 μ Torr.

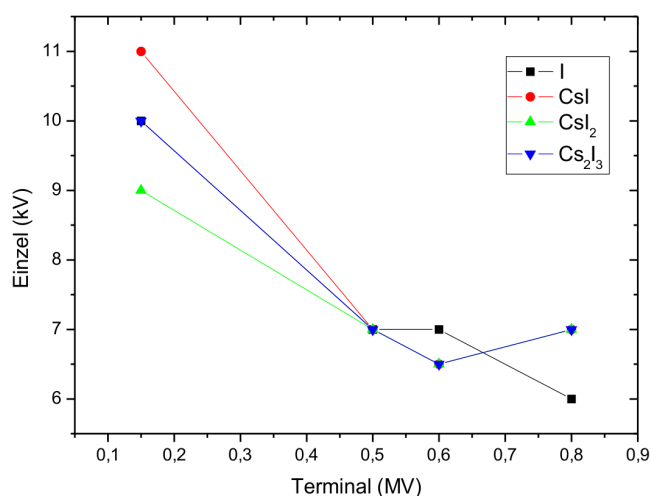


Figura 5.2: Gráfico da relação entre o módulo da tensão na *Einzel* que otimiza o funcionamento do espectrômetro e a tensão no terminal.

5.2 Amostra de Insulina

A análise do espectro de insulina (5080 u) representou o início dos testes do comportamento do espectrômetro *MALDI-AMS* com amostras de massas mais elevadas.

Os espectros apresentados na figura 5.7 foram medidos com amostras de insulina preparadas com matriz DHB com a seguinte configuração do espectrômetro: -18 kV na amostra, $+1$ kV na grade, -2.5 kV no anel, -10 kV na lente Einzel e $0,8$ MV no terminal do acelerador (sem a utilização de barras). As figuras 5.7a e 5.7b correspondem, respectivamente, a medidas realizadas com e sem corrente (30 A) no imã localizado na saída do acelerador. No primeiro caso, o campo magnético do imã desvia as partículas carregadas e apenas as moléculas neutras chegam no detector.

Para iniciar o processo de identificação dos picos do espectro de insulina da figura 5.7a, foram feitas simulações com o programa *SIMION* utilizando a geometria implementada e descrita seção 3.3.

A figura 5.8 apresenta os picos identificados a partir da simulação, sendo possível perceber que os resultados simulados das cadeias α e β e da insulina estão consideravelmente mais a esquerda dos picos experimentais. Esse comportamento já

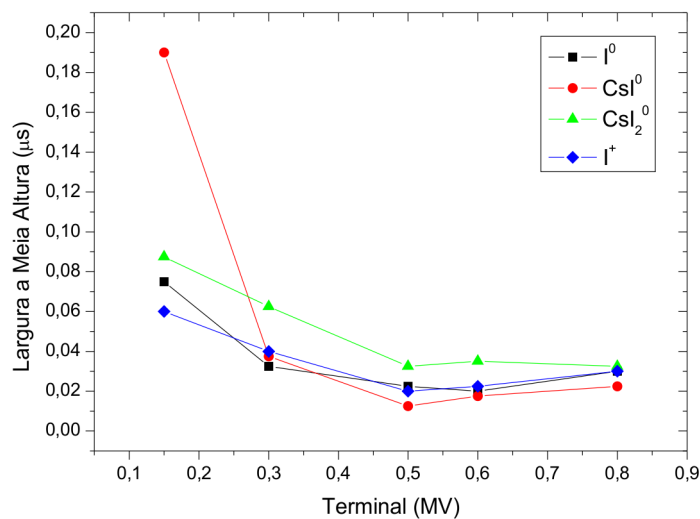
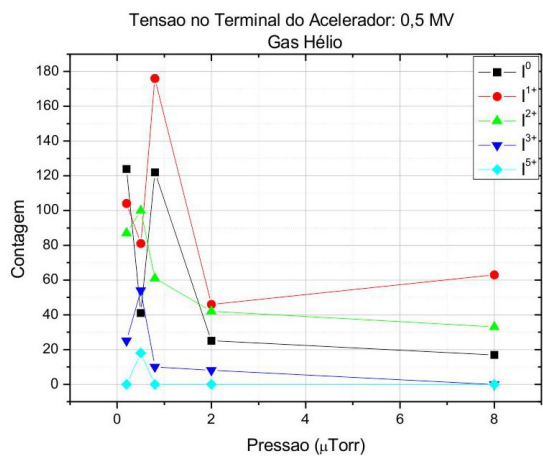


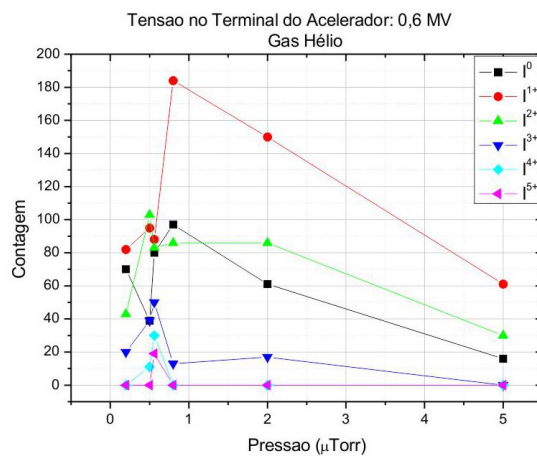
Figura 5.3: Influência da tensão no terminal na resolução dos picos.

era esperado, pois, conforme resultados anteriores, o método de simulação produz tempos de voo menores do que os respectivos experimentais. Como a massa molecular da insulina é maior do que a do CsI, essa diferença se torna mais significativa.

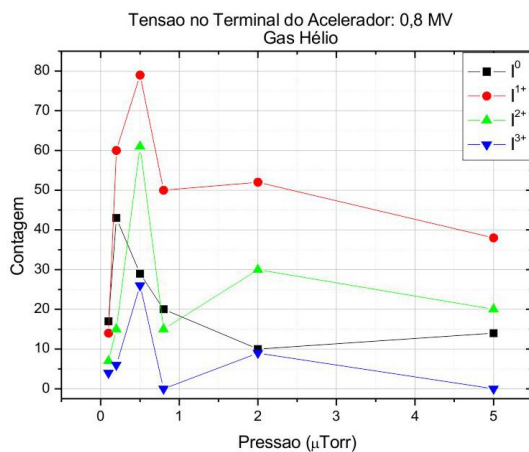
Com a identificação dos seis picos da figura 5.8 foi possível fazer uma calibração para determinar as possíveis massas dos demais. A figura 5.9 apresenta o gráfico da calibração e o ajuste de um polinômio segundo grau.



(a) Tensão no terminal de 0, 5 MV.

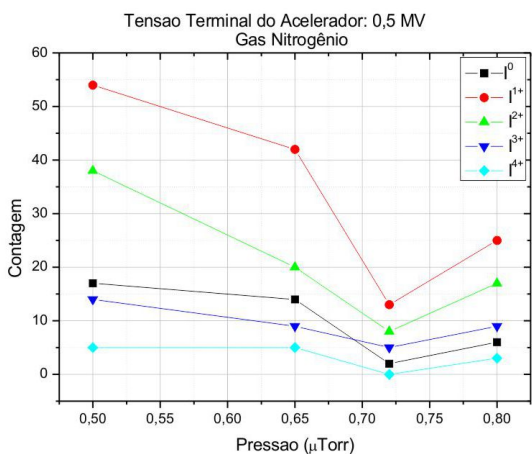


(b) Tensão no terminal de 0, 6 MV.

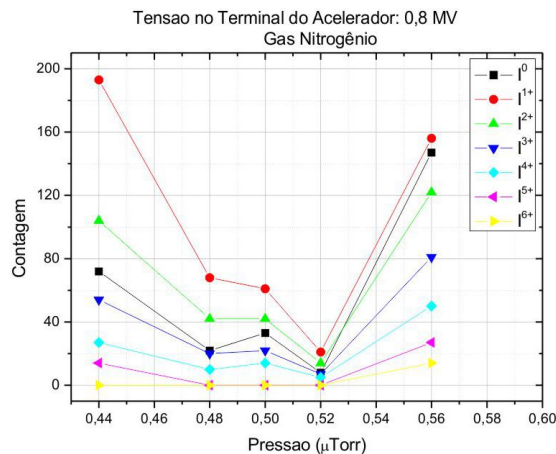


(c) Tensão no terminal de 0, 8 MV.

Figura 5.4: Contagem dos picos em função da pressão na célula gasosa com gás hélio



(a) Tensão no terminal de 0, 5 MV.



(b) Tensão no terminal de 0, 8 MV.

Figura 5.5: Contagem dos picos em função da pressão na célula gasosa com gás nitrogênio

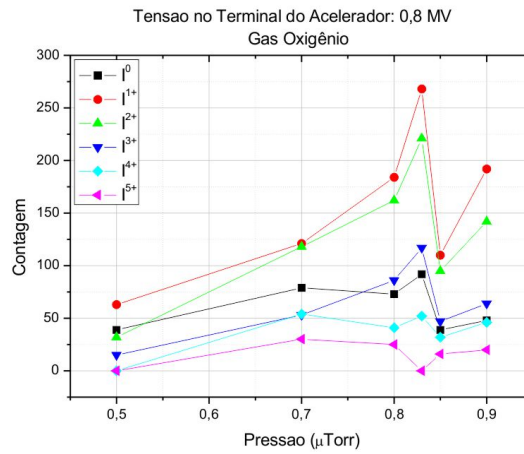
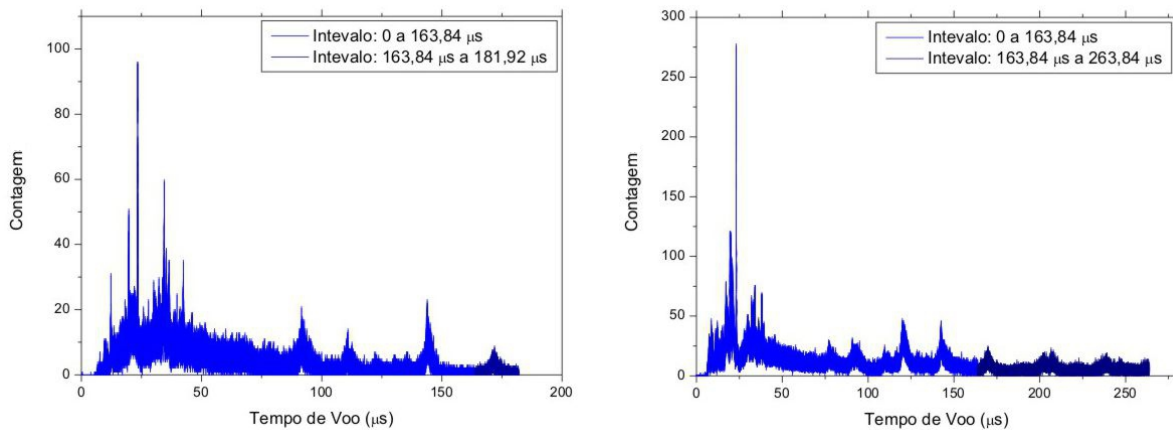


Figura 5.6: Contagem dos picos em função da pressão na célula gasosa com gás oxigênio para tensão no terminal de 0,8 MV.



(a) Espectro de insulina com corrente de 30 A no ímã do acelerador.

(b) Espectro de insulina sem corrente no ímã do acelerador.

Figura 5.7: Junção de dois espectros de insulina obtidos em intervalos de tempo diferentes.

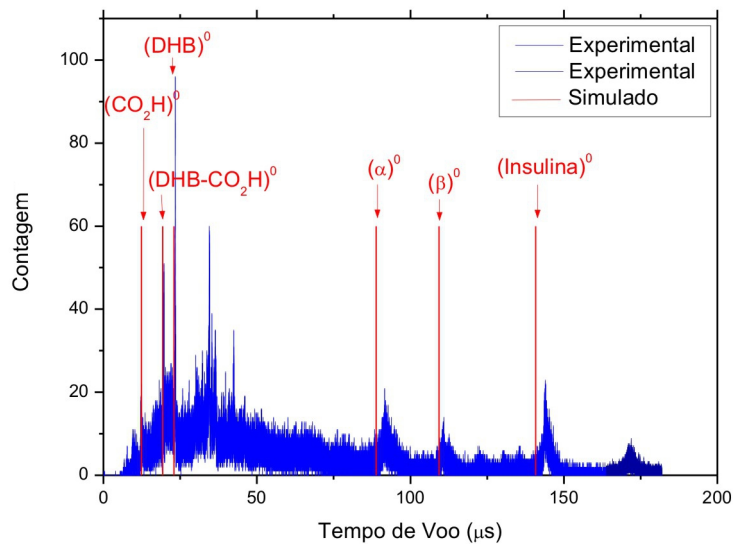


Figura 5.8: Identificação dos picos correspondentes às moléculas neutras de dois fragmentos do DHB, a partir da simulação com o *SIMION*.

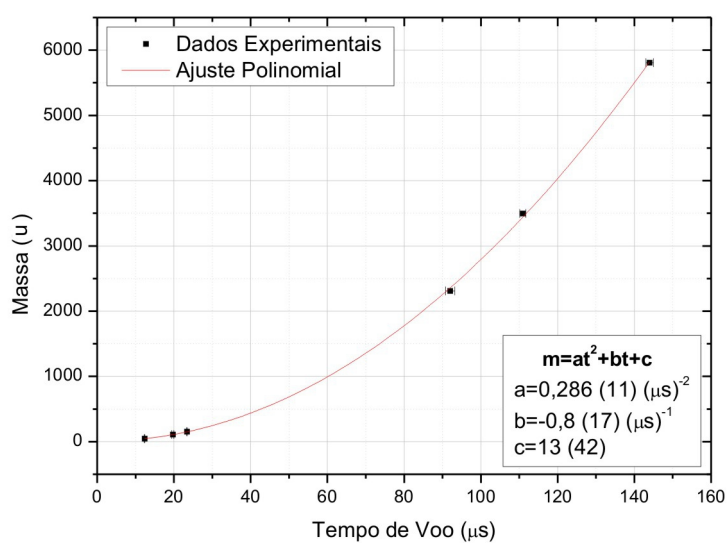


Figura 5.9: Calibração do espectro de insulina.

Capítulo 6

Conclusão

Neste trabalho é apresentada uma nova técnica de espectrometria de massa por tempo de voo com uso de um espectrômetro constituído pelo acoplamento de uma fonte de íons *MALDI* com um acelerador de partículas do tipo *tandem*. Esse equipamento, desenvolvido no Laboratório de Instrumentação e Partículas (LIP) da USP, denominado sistema *MALDI-AMS*, tem o objetivo de elevar a energia dos íons produzidos na fonte *MALDI* e, assim, melhorar a eficiência de detecção de moléculas de massas elevadas.

Trata-se de um equipamento inovador e complexo, que envolve a produção de íons moleculares, sua aceleração em diversos estágios, com passagem em uma câmara de gás que promove a troca de carga das partículas e, eventualmente, provoca sua fragmentação. Estruturas de focalização, como o anel eletrostático da fonte de íons e as lentes *Einzel* do acelerador, são utilizadas para que o feixe de íons moleculares, proveniente da fonte *MALDI*, seja injetado no acelerador e percorra toda a extensão do espectrômetro que tem cerca de 8 m de comprimento.

Devido a essa complexidade, amostras padrão de CsI foram preparadas para as tomadas de dados iniciais no equipamento e serviram como base para caracterização das condições de funcionamento do espectrômetro. Parâmetros como tensão nas lentes *Einzel*, pressão e tipo de gás no trocador de cargas do acelerador foram estudados com esse tipo de amostra.

Verificou-se que, no caso das amostras de CsI, existe uma região de máxima transmissão dos íons através do espectrômetro na faixa de tensão nas lentes *Einzel* entre 6 e 8 kV. O estudo mostrou ainda que, para esse material, a câmara gasosa com gás oxigênio em pressões abaixo de 1 μ Torr fornece as condições com maior contagem nos picos das distribuições dos espectros de massa. As melhores resoluções foram obtidas com o terminal do acelerador operando entre 0,5 e 0,8 MV. Tais parâmetros são o *setup* inicial nas tomadas de dados com outras amostras, servindo como base para reprodutibilidade das medidas no equipamento.

Dois métodos de identificação das distribuições dos espectros foram testados.

Um deles, através de simulação, utilizando o programa *SIMION* e o outro por meio de cálculos de tempos de voo. Ambos produziram resultados importantes para auxiliar na identificação dos diversos picos dos espectros de massa. A geometria do sistema *MALDI-AMS* implementada no programa *SIMION*, no entanto, mostrou-se mais versátil ao possibilitar a reprodução dos efeitos de componentes do acelerador, como as lentes *Einzel*, que foram simuladas, e geraram resultados iguais aos verificados experimentalmente.

O estudo do espectrômetro para amostras de massas elevadas iniciou-se com a insulina, cuja massa molecular é de 5808 u. Com a simulação, utilizando o *software SIMION*, foram identificados diversos picos do espectro dessa amostra. A partir desses picos também foi possível fazer a calibração do espectro de insulina. O conhecimento de tal espectro auxilia no estudo de macromoléculas no espectrômetro *MALDI-AMS*.

O trabalho apresentado, descrevendo a montagem do novo equipamento, seus primeiros resultados e mostrando a viabilidade da aplicação de aceleradores de partículas em análises de massa de macromoléculas, constitui importante registro de uma inovadora técnica em espectrometria de massa.

Referências Bibliográficas

- [1] E. de Hoffmann and V. Stroobant, *Mass Spectrometry Principles and Applications*, Third ed. (Wiley Interscience, 2007).
- [2] G. Siuzdak, *The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology*, Second ed. (MCC Press, 2006).
- [3] R. J. Cotter, *Time-of-Flight Mass Spectrometry: Instrumentation and Applications in Biological Research*, First ed. (American Chemical Society, 1997).
- [4] R. G. Cooks, Z. Ouyang, Z. Takats, and J. M. Wiseman, *Ambient Mass Spectrometry*, *Science* **311**, 1566 (2006).
- [5] R. Aebersold and M. Mann, *Mass Spectrometry-Based Proteomics*, *Nature* **422**, 198 (2003).
- [6] A. Dell and H. R. Morris, *Glycoprotein Structure Determination by Mass Spectrometry*, *Science* **291**, 2351 (2001).
- [7] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, and C. M. Whitehouse, *Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules*, *Science* **246**, 64 (1989).
- [8] J. A. P. Pereira *et al.*, *A Simple Model for the MALDI Effect Description*, *Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo* **24**, 58 (2005).
- [9] R. D. Macfarlane, *Mass Spectrometry of Biomolecules: from PDMS to MALDI*, *Brazilian Journal of Physics* **29**, 422 (1999).
- [10] M. Karas and F. Hillenkamp, *Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10,000 daltons*, *Analytical Chemistry* **60**, 2299 (1988).
- [11] K. Tanaka, *The Origin of Macromolecule Ionization by Laser Irradiation (Nobel Lecture)*, *Angewandte Chemie International Edition* **42**, 3861 (2003).
- [12] F. Hillenkamp and J. Peter-Katalinic, *MALDI-MS: A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications*, First ed. (Wiley-VHC, 2007).

- [13] E. L. A. Macchione *et al.*, *Um Espectrômetro de Massa por Tempo de Voo com Reflectron*, Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo **24**, 31 (2005).
- [14] J. H. Gross, *Mass Spectrometry: A Textbook*, First ed. (Springer Verlag, 2004).
- [15] I. S. Gilmore and M. P. Seah, *Ion Detection Efficiency in SIMS: Dependencies on Energy, Mass and Composition for Microchannel Plates Used in Mass Spectrometry*, International Journal of Mass Spectrometry **202**, 217 (2000).
- [16] J. A. P. Pereira *et al.*, Time of flight accelerator mass spectrometry (tof-ams) of large molecular ions at mev energies, in *Application of Accelerators in Research and Industry: 20th International Conference*, 2009.
- [17] K. Tanaka, Prêmio nobel de química, <http://nobelprize.org/>, 2002.
- [18] D. S. Peterson, *Matrix-free methods for laser desorption/ionization mass spectrometry*, Mass Spectrometry Reviews **26**, 19 (2007).
- [19] V. Horneffer *et al.*, *Matrix analyte interaction in MALDI-MS: Pellet and nano-electrospray preparations*, Int. J. of Mass Spectr. **249** (2006).
- [20] Acelerador de partículas tandem, <http://www2.if.usp.br/lamfi/acelerador.htm>.
- [21] J. L. Wisa, *Microchannel Plate Detectors*, Nuclear Instruments and Methods **162**, 587 (1979).
- [22] A. S. Tremsin, J. F. Pearson, J. E. Lees, and G. W. Fraser, *The Microsphere Plate: A New Type of Electron Multiplier*, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment **368** (1996).
- [23] D. A. Dahl, (Idaho National Engineering Laboratory, Chemical Materials and Processes Department, Lockheed Idaho Technologies Company, Idaho Falls, ID 83415).
- [24] J. H. Vuolo, *Fundamentos da Teoria de Erros* (Edgard Blücher, 1996).