Universidade de São Paulo

Instituto de Química

**Deconvolução de padrões isotopoméricos obtidos de espectros de
massas de baixa resolução para a obtenção de padrões isotópicos
elementares**

José Geraldo Alves Brito Neto

Tese de doutorado

Prof. Dr. Claudimir Lucio do Lago (orientador)

Sumário

Agradecimentos	iv
Resumo	v
Abstract	vi
Glossário	vii
1 Introdução e objetivos	1
1.1 Noções de espectrometria de massas	1
1.2 Revisão sobre análise isotópica e correlatos	10
1.3 Revisão bibliográfica sobre métodos matemáticos aplicados à espectrometria de massas	15
1.4 Objetivos	22
2 O método Z	23
2.1 Definições	24
2.2 Convolvendo padrões isotópicos e isotopoméricos	25
2.3 Implementação da convolução dos padrões isotópicos e isotopoméricos	26
2.4 Comparando padrões isotopoméricos e espectros de massas	28
2.5 Ligando as partes	28
2.6 Implementação	30
2.7 Propagação de erros	31
2.8 Exemplo de aplicação a dados de espectrometria de massas com ionização electrospray	33

3	Caracterização do método Z	38
3.1	Características experimentais estudadas e modelos utilizados	40
3.2	Fórmulas contendo apenas o elemento de interesse	44
3.3	Fórmulas contendo o elemento de interesse e um outro	54
3.4	Estudo de caso: C_{60}	65
3.5	Fixando os padrões isotópicos dos átomos acompanhantes	66
3.6	Inversão da atribuição dos padrões isotópicos de A e X	77
3.7	Sobre a escolha dos picos utilizados na regressão	88
3.8	Ajustando também a linha base	91
3.9	Implementações alternativas do método Z	93
3.10	Efeitos colaterais	96
3.11	Conclusões	100
4	Análise da razão hidrogênio/deutério através de polióis	102
4.1	Introdução e objetivos	102
4.2	Espectrometria de massas com ionização electrospray	105
4.3	Materiais e métodos	110
4.3.1	Tratamento robusto dos dados	114
4.4	Resultados e discussão	116
4.4.1	Manitol	116
4.4.2	Ácido Glucônico	118
4.4.3	Glucosamina	126
4.4.4	Borato + N-metilglucamina	129
4.5	Discussão geral dos desvios observados	130
5	Conclusões e perspectivas	136

A	Sobre dimensões de massas atômicas e moleculares e as abscissas dos espectros de massas	138
B	Levando em conta a limitação de tempo de aquisição de dados nos estudos com não-idealidades aleatórias	139
C	Listagem da Biblioteca do Método Z	141
	Referências	153

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro, sem o qual este trabalho não poderia ter sido realizado.

Ao Claudimir, meu orientador acadêmico, político, psicológico, guru espiritual e, acima de tudo, meu amigo. Nas discussões científicas, nos quebra-paus na hora de escrever os artigos e insultar os revisores em inglês, tomando cerveja (muito raramente nos últimos anos) ou falando besteira pelos corredores após os cafezinhos do B6, a orientação do Claudimir, segura, mas nunca obstrutiva, foi ajudando a dar forma não só a este trabalho, mas ao meu pensamento científico como um todo.

À Maria Carolina Blassioli Moraes (Carol), minha “sócia” durante a maior parte da pós-graduação e em cuja experiência com a técnica de espectrometria de massas com ionização electrospray eu me apoiei desavergonhadamente durante a realização de boa parte dos experimentos deste trabalho.

Ao Carlos Antonio Neves, meu grande amigo desde os tempos da graduação, cujas contribuições para este trabalho são tantas e tão pulverizadas que fica até difícil de tentar começar a enumerar.

A todos os colegas de laboratório, por terem me proporcionado um ambiente agradável de trabalho.

Ao pessoal da Nihon Kiin do Brasil, por criar o buraco negro da minha vida: o go. Em particular, aos *senseis* Watanabe, Hiramatsu, Furukawa, Fumio, Aketa, Didier Sousan, Miguel Flusser, Henri Iamashita e Rafael Caetano, e também ao sr. Yamamoto, por terem me ajudado a evoluir do nível de principiante ao de principiante entusiasmado.

Aos funcionários e professores do IQ-USP, em particular, aos da secretária de pós-graduação: Cibeles, Emiliano, Maria Inês e Milton (em ordem alfabética) pelos ótimos serviços prestados, que contribuíram significativamente para o bom andamento deste trabalho.

Enfim, à minha família, a quem eu dedico este trabalho.

Resumo

Há na literatura um grande número de publicações versando sobre métodos analíticos para a determinação de razões isotópicas através das mais diversas modalidades de espectrometria de massas. Entretanto, praticamente todos esses métodos possuem uma restrição comum em relação à gama de íons moleculares que podem ser utilizados nessas determinações: eles devem ser, ou íons elementares, ou íons cujo único átomo poli-isotópico é o elemento de interesse. Isto é obtido, ou mediante a destruição das moléculas da amostra, ou complexos tratamentos químicos para a obtenção de espécies poli-atômicas adequadas. Neste trabalho, foi desenvolvido um método matemático capaz de deconvolver o padrão isotopomérico de um íon molecular, isto é, calcular os padrões isotópicos dos átomos que o compõem dados a sua fórmula elementar e o seu espectro de massas. A principal contribuição de um método desse tipo é a ampliação da variedade de espécies químicas e modalidades de espectrometria de massas aceitáveis para análises isotópicas. O algoritmo desenvolvido foi caracterizado através da sua aplicação a um grande número de espectros simulados visando modelar a resposta do método quando submetido a algumas imperfeições experimentais típicas de espectrometria de massas e relevantes para análises isotópicas, tais como ruído, discriminação instrumental de massas, não linearidade de detecção, falta de resolução e má compensação de linha base espectral. Os resultados obtidos permitiram concluir que, ao contrário do que o senso comum às vezes possa sugerir, determinações isotópicas realizadas através de espécies poli-atômicas podem, muitas vezes, ser mais exatas e precisas que as efetuadas pelas abordagens convencionais. Concluiu-se que, de maneira geral, os resultados tendem a ser tanto melhores quanto maior for o número de instâncias do elemento de interesse na fórmula do íon molecular escolhido. Foi estudada experimentalmente a viabilidade de métodos analíticos de equilíbrio para determinações de razões isotópicas hidrogênio/deutério em amostras aquosas utilizando polióis como sondas e espectrometria de massas com ionização electrospray. Os polióis testados foram o manitol, o ácido glucônico, a glucosamina e a N-metilglucamina (através do seu complexo com o ácido bórico). Os resultados obtidos mostraram alguns desvios sistemáticos que sugerem que haja troca parcial de hidrogênios não lábeis dos polióis na fase gasosa, o que impossibilitaria esta aplicação. Sondas alternativas aos polióis são propostas.

Abstract

Several articles can be found in the literature describing methods for the determination of isotopic ratios through the various modalities of mass spectrometry. However, almost all of them have a common restriction on the type of molecular ion that can be employed in these determinations: they must be either elemental ions, or polyatomic ions whose sole polyisotopic element is the one being analysed. This is usually achieved through the destruction of the molecules, or through complex synthetic procedures. In this work, a mathematical method capable of deconvolving the isotopomeric pattern of a molecular ion, i.e., calculating the isotopic pattern of its constituent atoms given its formula and its mass spectrum, has been developed. The main contribution of such a method to the field is the broadening of the range of acceptable chemical species for isotopic analyses. The developed algorithm was characterized by applying it to a large number of simulated spectra with the objective of modelling its response to some experimental imperfections common to mass spectrometry and relevant for isotopic analyses, such as noise, instrumental mass discrimination, detection non-linearity, lack of resolution and bad baseline compensation. The results allowed us to conclude that, in spite of whatever commonsense might suggest, isotopic analyses carried out through the polyatomic approaches can, in many cases, be more exact and precise than those performed through conventional approaches. It could also be concluded that, in general, the larger the number of instances of the element of interest in the formula of the chosen ion, the better the results become. Also as part of the project, the viability of employing polyols as probes for the hydrogen/deuterium ratio in aqueous samples in equilibration methods and electrospray mass spectrometry has been studied. The studied polyols were: manitol, gluconic acid, glucosamine and N-metilglucamine (through its complex with boric acid). The obtained results showed some systematic errors that suggest that there might be a partial exchange of non-labile hydrogen atoms during the electrospray phenomenon. Alternative probes are proposed.

Glossário

Canal de m/z : Intervalo de m/z em torno de um valor central de interesse.

CID: Do inglês, *Collision-induced Dissociation*, dissociação induzida por colisão. Dissociação unimolecular de íons que colidiram com um gás inerte.

Coefficiente de autocorrelação: Estatística calculada sobre pontos de uma série temporal $X(t)$ que permite inferir o nível de dependência entre os pontos dessa série amostrados em momentos diferentes. $\rho(\tau) = \langle (X(t) - \bar{X}) \cdot (X(t + \tau) - \bar{X}) \rangle / \sigma_X^2$

Convolução: Operação matemática utilizada para “misturar” os padrões isotópicos dos elementos que compõem uma molécula para gerar o seu padrão isotopomérico.

Deconvolução: Oposto da convolução.

Dados heteroscedásticos: Contrário de “dados homoscedásticos”. A variância é proporcional à intensidade.

Dados homoscedásticos: Dados amostrados de uma distribuição normal. Em geral, fala-se em “dados homoscedásticos” quando a variância é independente da intensidade.

Decarga corona: Descarga elétrica que acontece na ponta do capilar de uma fonte electrospray devido a um campo elétrico excessivamente alto.

Deteção analógica: Modo de detecção para espectrometria de massas em que o sinal produzido pelo detector devido à chegada dos íons é monitorado na forma de uma corrente elétrica contínua cuja intensidade é o sinal analítico.

Deteção digital: Modo de detecção para espectrometria de massas em que os eventos de chegada de íons ao detector são contados um a um, e o sinal analítico é a frequência de chegadas.

Diluição isotópica: Técnica de análise química quantitativa em que se procura determinar a variação causada no padrão isotópico de um elemento de interesse adicionando-se à amostra uma quantidade conhecida de uma outra amostra do mesmo elemento, porém com padrão isotópico adulterado.

Discriminação instrumental de massas: Variação da sensibilidade de um espectrômetro de massas com o valor de m/z sintonizado.

ESMS: Espectrometria de massas com ionização electrospray

Expansão polinomial: Outro nome para a convolução dos padrões isotópicos.

Íon molecular: Tradicionalmente, o íon gerado pela incorporação de carga à molécula sendo analisada por espectrometria de massas. Neste trabalho, no entanto, esta expressão é usada para designar qualquer íon composto por mais de um átomo.

IPDEC: Nome de publicação do método Z.

Linha base: Nível de sinal considerado igual a zero.

MAD: Estimativa robusta da escala de uma amostra. É a mediana dos desvios absolutos em relação à mediana da amostra.

Mediana: Estimador robusto do valor esperado de uma amostra. É o quantil de ordem 50% da mesma.

Métodos de Monte Carlo: Algoritmos cujas saídas são números aleatórios. Neste trabalho, foi usado um método de Monte Carlo para fazer propagação de desvios.

Padrão isotópico: Conjunto das abundâncias relativas dos diferentes isótopos de um elemento químico

Padrão isotopomérico: Conjunto das abundâncias relativas dos diferentes isotopômeros de uma determinada espécie química (seção 2.1).

Pico base: Pico mais intenso de um espectro de massas.

simplex “morro abaixo”: Algoritmo genérico de minimização.

SIR: Do inglês, *Selected Ion Recording*, registro de íons selecionados. Modo de aquisição de dados de espectrometria de massas em que são monitorados alguns canais específicos de m/z .

Tempo morto do detector: Subestimação do sinal analítico que ocorre no modo de detecção digital em altas frequências, quando alguns eventos são ignorados por acontecerem muito próximos uns dos outros.

TIC: Do inglês, *Total Ion Current*: corrente iônica total. A integral do sinal registrado pelo detector ao longo de toda a escala de m/z .

Varredura de m/z : Modo de aquisição de dados de espectrometria de massas. O valor sintonizado pelo filtro de m/z é variado em pequenos incrementos de modo a se obter um espectro de massas quase contínuo.

Capítulo 1

Introdução e objetivos

1.1 Noções de espectrometria de massas

De maneira geral, um espectrômetro de massas é composto por três partes principais: (1) fonte de íons, (2) filtro de m/z e (3) detector. A primeira parte é responsável pela geração de íons na fase gasosa a partir das amostras. No filtro de m/z , os íons gerados na fonte são separados em função das suas relações massa/carga. O detector é responsável pela quantificação dos íons que passam pelo filtro de m/z .

A aplicação mais natural da espectrometria de massas, e a que também está ligada à sua própria criação, é a separação e análise de isótopos. Entretanto, historicamente, a sua principal aplicação em química tem sido a identificação de substâncias orgânicas, sendo mais uma das técnicas do leque de opções analíticas à disposição do químico. Mais recentemente, com o surgimento de métodos de ionização capazes de transferir macromoléculas inteiras para a fase gasosa, a espectrometria de massas também passou a ser usada para a determinação de massas moleculares desse tipo de substância, o que tradicionalmente era feito por métodos como espalhamento de luz ou cromatografia de exclusão em gel.

As principais fontes de íons são:

Ionização por elétrons O tipo de fonte mais comumente encontrado em espectrômetros de massas comerciais. Os íons são produzidos pela colisão da amostra volatilizada com um feixe de elétrons de

alta energia (tipicamente 70 eV). É principalmente aplicada a substâncias orgânicas voláteis de massas moleculares baixas (dezenas a centenas de unidades). Normalmente, devido ao excesso de energia dos elétrons, este processo de ionização também acaba levando à fragmentação das moléculas da amostra, o que, por um lado, torna os espectros mais complexos, mas, por outro, gera informações que podem ser úteis na identificação da amostra. A ionização direta por elétrons produz quase exclusivamente cátions, pois a eficiência de captura de elétrons pela maioria das moléculas orgânicas típicas é muito baixa. Devido ao baixo consumo de amostra e à necessidade de volatilidade da mesma, a ionização por elétrons é a parceira ideal da cromatografia gasosa em colunas capilares.

Ionização química Uma variante da ionização por elétrons. Nesta fonte, a amostra é misturada em fase gasosa com um gás reagente em grande excesso¹ e bombardeada pelos elétrons. Por uma questão até mesmo probabilística, as moléculas do gás reagente é que são ionizadas diretamente pelo feixe de elétrons, reagindo entre si e, eventualmente, com as moléculas da amostra, transferindo-lhes carga elétrica. Este tipo de ionização é mais brando que a ionização por elétrons convencional, pois a amostra não entra em contato direto com o feixe de elétrons de alta energia, causando assim menos fragmentação dos íons.

Ionização por plasma Neste tipo de fonte de ionização, os íons são produzidos ao nebulizar-se a amostra líquida em um plasma de argônio aquecido por acoplamento indutivo com um campo eletromagnético oscilante de radiofrequência (*ICP: Inductively Coupled Plasma*). As altas temperaturas envolvidas causam a destruição quase completa de substâncias orgânicas eventualmente presentes na amostra, o que faz com que este método seja razoavelmente robusto em relação a interferências vindas da matriz.

Ionização térmica Para a ionização térmica, a amostra é depositada sobre um filamento de rênio ou tungstênio, que é então aquecido pela passagem de uma corrente elétrica. Íons são ejetados da superfície do filamento e transportados por um campo elétrico para dentro do espectrômetro de massas. A técnica de ionização térmica, ou espectrometria de massas termiônica (*TIMS*), é utilizada principal-

¹Um gás reagente comumente utilizado é o metano. Enquanto, em condições normais de ionização por elétrons, trabalha-se a uma pressão da ordem de 10^{-5} torr na região da fonte de íons, para ionização química, mantém-se uma pressão de metano da ordem de 0,75 torr [1, página 7].

mente para análises isotópicas de muitos elementos através de íons envolvendo o átomo de interesse e oxigênio e/ou outros elementos presentes na matriz depositada.

Há na literatura muitos exemplos de métodos completos de análise isotópica de diversos elementos em amostras de interesse para geoquímica². Na verdade, *TIMS* é considerada há décadas “a” técnica para análises isotópicas rigorosas. Entretanto, nos últimos anos, a ionização com plasma de argônio vem substituindo-a para vários sistemas³. O principal problema da ionização térmica é o preparo complicado e demorado da amostra e a dificuldade de se fazê-lo de forma reprodutível.

Ionização por átomos/íons rápidos (*FAB/FIB*) A ionização acontece pela incidência sobre a amostra de um feixe de átomos de gases nobres (*FAB*) ou cátions de metais alcalinos (*FIB*) de alta energia cinética sobre a amostra. Uma variante desta técnica de ionização, mais encontrada em laboratórios de microeletrônica, é a espectrometria de massas de íons secundários (*SIMS*). Nesta técnica, o feixe de íons possui uma boa colimação e o seu ponto de incidência sobre a amostra pode ser variado. Isto permite que se faça uma varredura da superfície, analisando os íons ejetados na colisão (íons secundários), obtendo assim um mapa espacial da composição química da amostra. Além disso, pelo fato do feixe de íons efetivamente erodir a superfície, após uma calibração adequada da velocidade de penetração, é possível obter também perfis de composição em função da profundidade⁴.

Ablação e ionização por laser Este método de ionização, que é empregado principalmente para sólidos, baseia-se na incidência de um laser infravermelho de alta densidade de potência sobre a superfície da amostra. O aquecimento leva à ejeção de material da superfície (ablação) e à sua eventual ionização e fragmentação. Um exemplo de aplicação desta técnica é a análise de aerossóis com um engenhoso sistema de sincronização de disparo do laser que permite uma amostragem partícula a partícula [15].

Também são usados lasers de comprimentos de onda menores para ionização em espectrometria de massas. Um exemplo é a técnica de ionização por absorção multifotônica intensificada por ressonância (*REMPI*), onde a ionização se dá pela absorção pela molécula de interesse de mais de um

²Por exemplo, boro [2], cádmio e zinco [3], cloro [4] e urânio [5].

³Por exemplo, boro [6], disprósio [7], cálcio, ferro e selênio [8, 9].

⁴Informações gerais a respeito da técnica de *SIMS* de varredura podem ser encontradas em [10]. Aplicações desta técnica em metalurgia e análise de superfícies metálicas podem ser encontradas nas referências [11, 12]. Também há aplicações na análise de superfícies poliméricas [13, 14].

fóton proveniente de um laser cuja cor coincide com uma transição eletrônica da molécula. Como a absorção multifotônica depende da ressonância da frequência do laser com uma banda de absorção eletrônica da molécula, ela pode fazer uma ionização seletiva da amostra. Há aplicações de *REMPI* na análise de misturas de, por exemplo, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, que não são facilmente diferenciáveis pelas técnicas de ionização não seletivas [16].

Dessorção e ionização por laser auxiliada pela matriz (*MALDI*) Nesta técnica, a amostra de interesse é misturada com um eletrólito e uma substância com alta eficiência de absorção de luz no comprimento de onda de um laser que será usado. A mistura é bombardeada pelo laser e o superaquecimento leva à emissão para a fase gasosa de pequenos agregados contendo a amostra, o eletrólito e a matriz. Os íons em fase gasosa são produzidos a partir desses agregados pela incorporação do eletrólito às moléculas da amostra ou pela transferência de prótons entre as moléculas da matriz e as da amostra. Por ser pouco agressivo à amostra, este método de ionização tem sido usado atualmente para ionizar macromoléculas de interesse biológico e também polímeros [17].

Ionização electrospray Uma das mais populares técnicas de ionização para espectrometria de massas da atualidade. A ionização electrospray permite transferir para a fase gasosa direto da solução uma ampla gama de substâncias polares, indo desde íons inorgânicos simples e metais de transição até macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos e diversos polímeros [18].

Segundo a proposta inicial de Yamashita e Fenn [19, 20, 21], o electrospray é gerado bombeando a solução de interesse através de um tubo capilar metálico que é mantido a um potencial (positivo ou negativo) de alguns milhares de volts em relação a um contra-eletródo posicionado em frente à sua saída. O campo elétrico leva a um acúmulo eletroforético de carga na solução na ponta do capilar e à posterior emissão de gotículas com excesso de carga. Estas gotículas passam por um processo recursivo de evaporação de solvente e fissão eletrostática que culmina com a expulsão dos íons para a fase gasosa.

Como a ionização electrospray foi usada na parte experimental deste trabalho, ela será tratada detalhadamente mais adiante nesta tese (seção 4.2, página 105).

Os filtros ou analisadores de m/z utilizam combinações de campos elétricos e magnéticos para causar

Figura 1.1: Esquema de um filtro de m/z de setor magnético

As linhas tracejadas representam as trajetórias hipotéticas de cátions com relações m/z : (A) desejada, (B) menor que a desejada e (C) maior que a desejada. O campo magnético entra no plano do desenho.

perturbações variáveis nas trajetórias dos íons que saem da fonte, de modo a diferenciá-los. Os tipos mais comuns são:

Setor magnético Os íons passam por uma região em que há um campo magnético perpendicular às suas trajetórias, o que faz com que eles descrevam arcos de circunferência. A deflexão sofrida pelos íons é função da relação m/z e da intensidade do campo magnético, que é variada de modo a permitir que apenas os íons com uma determinada relação m/z cheguem ao detector, mantido em uma posição fixa. A figura 1.1 contém um esquema de um filtro de setor magnético.

A principal vantagem do setor magnético é a baixa discriminação instrumental de massas⁵, o que faz com que este filtro seja bastante empregado em espectrômetros de massas dedicados a análises isotópicas. Além disso, quando associado sequencialmente a um setor elétrico, que possibilita a filtragem do feixe de íons por energia cinética, ou monocromação, pode-se obter alta resolução de m/z com este tipo de analisador.

⁵Para mais informações sobre este fenômeno e a sua relevância para análises isotópicas, veja a seção 3.1, página 41.

Quadrupolo Este é o tipo de analisador de massa mais comumente empregado em equipamentos comerciais de uso geral. Neste tipo de filtro, esquematizado na figura 1.2, os íons são injetados paralelamente a quatro barras metálicas às quais são aplicadas combinações de potenciais elétricos AC e DC. A variação dos potenciais DC aplicados às barras faz com que somente os íons com uma determinada relação m/z tenham trajetórias estáveis e cheguem ao final do percurso. A figura 1.2 contém também a trajetória simulada de um íon quando o filtro quadrupolar está sintonizado para a sua relação m/z ⁶.

O quadrupolo não tem uma resolução de m/z alta e a natureza complexa do fenômeno que leva à filtragem dos íons faz com que a sua transmitância não seja rigorosamente constante para os íons de diferentes relações m/z , o que leva a discriminação instrumental de massas severa. Entretanto, para os padrões de espectrometria de massas, a sua implementação é razoavelmente simples e barata, e o seu consumo de energia elétrica é razoavelmente baixo se comparado, por exemplo, com o do eletroímã do setor magnético.

A faixa de m/z analisável com um quadrupolo vai de 1 a poucos milhares, não sendo, em princípio, aplicável a macromoléculas. Entretanto, o advento da técnica de ionização electrospray, que é capaz de produzir abundantemente íons multiplamente carregados, permitiu que este tipo de filtro fosse aplicado até mesmo para moléculas de altas massas moleculares.

Ion trap O *ion trap* é parecido com o quadrupolo, porém também há uma componente do campo elétrico na direção do eixo principal. Os íons são injetados na região do analisador e lá ficam aprisionados por um intervalo de tempo da ordem de milissegundos, longo para os padrões de espectrometria de massas. O controle dos potenciais elétricos aplicados permite que íons de determinadas relações m/z sejam ejetados da armadilha.

No período de tempo que os íons permanecem aprisionados, pode-se fazer, por exemplo, com que eles colidam com um gás residual injetado, levando-os a reações que vão desde a simples dissociação induzida por colisão até reações íon-molécula mais complexas. Isto possibilita que cada um dos fragmentos da amostra produzidos inicialmente na ionização sejam “purificados” e submetidos a novas fragmentações e análises, gerando um tipo de espectrometria de massas multidimensional.

⁶A simulação foi feita utilizando o modelo publicado em [22].

Figura 1.2: (A) Esquema do filtro quadrupolar e (B) trajetória estável simulada de um íon de m/z igual a 20 em seu interior.

Os potenciais $U_x(t) = U + V_0 \cos(\omega t)$ e $U_y(t) = -U - V_0 \cos(\omega t)$ aplicados às barras são superposições de um potencial AC e um *offset* DC. A seta em (B) indica o ponto de injeção do íon no plano xy , com velocidade inicial perpendicular a este.

Analisadores concatenados, ou espectrometria de massas *tandem* Múltiplos analisadores podem ser colocados sequencialmente na trajetória dos íons desde a fonte até o detector. Neste tipo de aparelho, há dois tipos de elementos intercalados: os de análise e os de reação. Os primeiros são usados convencionalmente, isto é, para filtrar o feixe de íons de acordo com a relação m/z . Os últimos são quadrupolos ou hexapolos operados apenas com os potenciais AC, sem fazer nenhum tipo de seleção de m/z . Entretanto, na região destes elementos, gases residuais podem ser injetados para reagir com os íons e gerar novos produtos para serem analisados nos filtros seguintes.

Comercialmente, são encontrados espectrômetros de massas com três quadrupolos, sendo dois de análise e um de reação. Nestes aparelhos, é possível fazer espectrometria de massas bidimensional: a partir dos íons gerados da amostra, escolhem-se os que têm uma certa relação m/z no primeiro analisador, reage-se com um gás residual no segundo quadrupolo e separam-se os produtos no último.⁷

Ressonância ciclotrônica de íons (ICR) O ICR é um outro tipo de armadilha de íons, em que, diferentemente do *ion trap*, o aprisionamento é feito por um campo magnético. Os íons provenientes da fonte são injetados em uma cela em que há um campo magnético uniforme e intenso. Como a direção

⁷Na Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) há um espectrômetro de massas *tandem* com cinco quadrupolos, sendo dois deles de reação e três de análise [23].

de injeção é perpendicular ao campo, os íons passam a descrever órbitas circulares, ficando aprisionados na cela. O movimento de aproximação e afastamento dos íons de um par de paredes opostas da cela induz oscilações em suas distribuições de cargas, que podem ser detectadas na forma de uma corrente elétrica oscilante por um circuito ligado às paredes. A intensidade da corrente induzida é proporcional à quantidade de íons realizando a órbita, mas a sua frequência é igual à frequência de percurso da órbita circular, que, por sua vez, é inversamente proporcional⁸ à relação m/z dos íons. Ao calcular-se a transformada de Fourier da corrente medida em função do tempo, que é a superposição dos sinais induzidos pelos diferentes íons, obtém-se o espectro de massas. Por este motivo, a técnica de ressonância ciclotrônica de íons também é chamada de espectrometria de massas por transformada de Fourier.

Na verdade, apenas o movimento ciclotrônico dos íons não é suficiente para que se adquira um espectro de massas. Se os íons estiverem uniformemente distribuídos ao longo de toda a órbita, não haverá corrente induzida nos eletrodos, pois as suas componentes em oposição de fase se cancelarão. Antes que o espectro possa ser adquirido, é necessário fornecer energia aos íons para que o pacote todo passe a mover-se concentrado em uma pequena região de uma órbita mais externa. Fornece-se energia aos íons pela aplicação de potenciais alternados de frequências adequadas às paredes metálicas da cela.⁹

O fato de os íons permanecerem na cela por longos períodos de tempo permite que múltiplas etapas de reação e análise sejam executadas, fazendo assim espectrometria de massas multidimensional. Outro atrativo da técnica de *ICR* é a alta resolução de m/z e também as altas precisão e exatidão com que se podem medir as massas dos íons. Isso se deve ao fato de a informação de massa ser codificada em uma frequência da ordem de quilohertz, uma das grandezas que o ser humano sabe medir melhor.

Tempo de voo (*ToF: Time of Flight*) Conceitualmente, o mais simples dos analisadores de m/z . Em sua implementação mais ingênua, os íons gerados na fonte são simplesmente acelerados por uma diferença de potencial elétrico em direção ao detector e a informação de m/z é obtida do tempo transcorrido desde a extração da fonte até a chegada ao detector. Entretanto, nos últimos anos este

⁸ Assume-se aqui que todos os íons são injetados com a mesma energia cinética na cela.

⁹ Na verdade, os potenciais aplicados não são necessariamente funções harmônicas do tempo. Usa-se frequentemente a aplicação de potenciais abrangendo uma banda larga de frequências para excitar toda uma faixa de m/z simultaneamente. A aplicação de potenciais com dependências temporais mais complexas permite que sejam realizados alguns truques bastante interessantes com os íons. Um exemplo disso é a técnica de “Transformada de Fourier inversa de formas de onda armazenadas” (*SWIFT: Stored Waveform Inverse Fourier Transform*), em que o potencial é sintetizado por conversão digital-analógica a partir da sua representação em frequências armazenada em um computador [24].

filtro sofreu um grande número de modificações que permitiram aumentar a sua resolução e intervalo útil de m/z . Dentre estas modificações está o *reflectron* e o *ToF* ortogonal [25, 26, 27, 28].

O analisador por tempo de voo é de construção extremamente simples, não precisando nem de campos magnéticos intensos, como no caso do setor magnético e do *ICR*, nem de uma complexa eletrônica analógica de potência para a produção de campos elétricos alternados de altas frequências e amplitudes, como no caso do quadrupolo. Outra vantagem do *TOF* é que, abrindo-se mão da alta resolução de m/z , pode-se miniaturizá-lo bastante, o que permite que se simplifique o sistema de vácuo do espectrômetro de massas.

A necessidade de sincronização entre a extração dos íons da fonte e o início da contagem do tempo faz com que o analisador por tempo de voo seja mais naturalmente adaptado a técnicas pulsadas de ionização, como *MALDI*, do que a técnicas com produção contínua de íons, como *electrospray*.

Há alguns tipos de detectores para espectrometria de massas. Estes dispositivos são responsáveis pela transformação dos eventos de chegada dos íons vindos do filtro de m/z em sinais eletrônicos registráveis. Estes detectores podem ser divididos em dois grupos: com ou sem multiplicação de elétrons. Os detectores do primeiro grupo, que é composto pelos multiplicadores de elétrons, dinodos contínuos e fotomultiplicadoras¹⁰, transformam o evento inicial de chegada do íon em uma avalanche de elétrons através de múltiplas colisões/ejeções com dinodos em cascata mantidos a potenciais progressivos¹¹. Ao segundo grupo pertencem as taças de Faraday (*Faraday cups*), que são pequenos copos metálicos que simplesmente geram uma corrente elétrica capturando os íons do feixe. Esses detectores são muito menos sensíveis que os com multiplicação, mas são preferidos para espectrômetros de massas dedicados a análises isotópicas rigorosas. Isto é devido à sua simplicidade, que permite que se construam aparelhos contendo múltiplos detectores colocados em posições diferentes¹², o que, associado a um setor magnético, permite monitorar múltiplos canais de m/z simultaneamente, conferindo robustez em relação a oscilações da produção de íons na fonte.

¹⁰Fotomultiplicadoras também são usadas em espectrometria de massas. Os íons colidem inicialmente com um cintilador, gerando fótons, que são amplificados pela fotomultiplicadora. A vida útil da multiplicadora é ampliada, pois ela não entra em contato direto, nem com os íons, nem com os gases residuais do aparelho.

¹¹No caso do dinodo contínuo, a cascata de colisões/ejeções acontece com um único dinodo cuja superfície é mantida com um gradiente de potencial.

¹²Em alguns aparelhos, a posição das taças de Faraday em relação à saída do setor magnético é controlada precisamente com um microposicionador, e a sensibilidade das taças em função do ponto de incidência do feixe é monitorada rigorosamente.

O sinal elétrico gerado pelos detectores pode ser monitorado de duas formas: digital e analógica. Quando operado no modo digital, os pulsos gerados pelo detector quando da chegada de um íon são contados individualmente e a resposta registrada é o número de eventos por unidade de tempo. Neste modo, praticamente toda a informação de interesse é tirada da frequência de eventos e a intensidade da corrente gerada pelo detector tem pouca importância. Quando a intensidade do feixe é muito alta (maior que 10^7 Hz) e os eventos não podem ser distinguidos claramente, trabalha-se no modo analógico, em que se monitora uma corrente média produzida pelo detector. Neste caso, a unidade atribuída ao sinal registrado é arbitrária.

1.2 Revisão sobre análise isotópica e correlatos

Talvez os exemplos mais tradicionais do uso de medidas de razões isotópicas sejam os sistemas de datação indireta, muito utilizados em geociências, onde se procura obter informações temporais a partir das razões entre certos pares de isótopos assumindo determinados modelos a respeito de fenômenos naturais que levem ao fracionamento dos mesmos. Outras propriedades como temperatura da crosta terrestre e do manto em tempos ancestrais também podem ser inferidas através de medidas de razões isotópicas mediante modelos adequadas.

As razões isotópicas também encontram aplicações interessantes em nutrição e áreas correlatas. Um exemplo de relevância atual dessas aplicações é a detecção do uso de testosterona sintética por atletas. A testosterona – hormônio sexual masculino – é produzida em pequenas quantidades pelos testículos e induz, entre várias outras modificações corporais, o aumento da massa muscular. Entretanto, além de ser profundamente prejudicial à saúde do usuário, o consumo de testosterona sintética por atletas profissionais é proibido pelos principais órgãos controladores mundiais dos esportes. A testosterona é sintetizada endogenamente a partir do colesterol, tendo como intermediário metabólico a dehidroepiandrosterona. Após o seu uso, ela é transformada ainda em androstanodiol antes de ser eliminada. O androstanodiol produzido através desta longa via metabólica tem uma razão isotópica $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ que varia pouco entre pessoas com hábitos alimentares não muito diferentes. Entretanto, a admissão de testosterona sintética perturba esta “impressão digital” isotópica a ponto de permitir que o *doping* seja detectado.

Para estas análises, normalmente é empregado um tipo especial de espectrômetro de massas acoplado

a um cromatógrafo a gás chamado genericamente de espectrômetro de massas para o monitoramento de razões isotópicas (*IRMM: Isotope Ratio Monitoring Mass Spectrometer*) [29]. A saída da coluna do cromatógrafo é ligada a um pequeno forno contendo CuO, NiO ou Pt a temperaturas da ordem de 900°C, que é usado para converter todo o carbono da amostra em CO₂. Este é então analisado para a razão ¹²C/¹³C com ionização por elétrons.

Isótopos radioativos são frequentemente utilizados como traçadores em estudos bioquímicos, entretanto, em muitos casos, isótopos estáveis também podem ser usados para este fim com vantagens. Neste tipo de estudo, administra-se a um organismo vivo um precursor sintetizado com reagentes isotopicamente enriquecidos e depois analisa-se a razão isotópica do elemento em questão em amostras onde os produtos de biossíntese podem estar contidos. Dessa forma, infere-se o destino do precursor administrado.

Um exemplo de aplicação prática deste tipo de abordagem é a análise da eficiência de absorção de ferro pelo aparelho digestivo humano. Administram-se aos pacientes quantidades conhecidas de Fe enriquecido no isótopo estável ⁵⁸Fe misturado na comida e depois mede-se a razão isotópica ⁵⁸Fe/⁵⁶Fe em amostras de sangue retiradas deles. A diferença entre a composição isotópica natural do ferro contido no sangue dos pacientes e a medida, junto com a concentração total de ferro no sangue e a massa de ferro administrada permite que se infira a eficiência de absorção de ferro pelo aparelho digestivo. Walczyk e colaboradores [9] realizaram um estudo sobre a influência do ácido ascórbico na eficiência de absorção de ferro por crianças utilizando esta metodologia.

Na verdade, a aplicação descrita acima é apenas um exemplo de uma metodologia mais geral de análise quantitativa chamada diluição isotópica, em que se procura determinar a concentração de um elemento de interesse em uma amostra medindo a perturbação causada no seu padrão isotópico pela adição de uma quantidade conhecida de uma amostra isotopicamente adulterada do mesmo. Pode-se dizer que se trata de uma versão ideal da padronização interna, isto é, quando tanto o padrão quanto o analito têm praticamente o mesmo comportamento químico.

As aplicações dos isótopos como traçadores e a diluição isotópica baseiam-se no fato de que eles têm comportamentos químicos muito parecidos. Por outro lado, também há aplicações baseadas justamente no fato de que os isótopos têm comportamentos químicos ligeiramente diferentes. Um dos exemplos mais interessantes dessas aplicações é a determinação da paleoacidez dos oceanos [30]. Determinou-se experimentalmente que o ácido bórico (B(OH)₃) com o isótopo ¹⁰B é ligeiramente

mais forte que o com o isótopo ^{11}B , isto é, o equilíbrio químico:

é ligeiramente deslocado para a direita. A constante desse equilíbrio, determinada experimentalmente, vale 1,0194. A consequência direta disso é que as razões isotópicas $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$ no ácido bórico e no borato, além de serem em geral diferentes, também são funções do pH do meio. A figura 1.3 contém os desvios por mil da razão isotópica $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$ no borato em função do pH em relação à razão natural. Estes desvios foram calculados com base na constante do equilíbrio acima, na constante de dissociação do ácido bórico “isotopicamente médio” ($\text{p}K_a=9,28$) e considerando que a razão isotópica do boro total é igual à natural. No extremo de pH alto da curva, quando o borato é a espécie predominante, a razão isotópica $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$ no borato tende à natural. Por outro lado, para pH baixo, quando praticamente todo o boro encontra-se na forma de ácido bórico, o pouco borato presente no meio tem uma razão isotópica bastante alterada.

Entretanto, é o borato, devido à sua característica aniônica, que tende a ligar-se aos sedimentos, formando depósitos que acabam ficando ocluídos no leito dos corpos d’água. Isso quer dizer que, ao medir-se a razão isotópica $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$ em uma amostra de sedimento, na verdade, está sendo determinada a razão isotópica $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$ do borato que foi depositado no momento da sua formação. Esta razão vai permitir que se infira a posição do equilíbrio de fracionamento isotópico na dissociação do ácido bórico e, conseqüentemente, o pH do meio em que aquele borato encontrava-se.

A técnica mais utilizada para a determinação de razões isotópicas é a espectrometria de massas. Normalmente, procura-se transferir o elemento de interesse da amostra para a fase gasosa, transformando-o, em um íon, ou elementar, ou molecular, porém cujo único elemento poli-isotópico é o elemento de interesse. Uma técnica de ionização que favorece a formação de íons elementares é a ionização por plasma (*ICP-MS*). Técnicas que geram íons moleculares são, por exemplo, ionização térmica, por elétrons e electrospray.

Quando se trabalha com íons elementares ou moleculares simples¹³, as razões isotópicas são obtidas a partir dos espectros simplesmente dividindo as intensidades dos feixes de íons correspondentes a cada

¹³“Simples” quer dizer que o único elemento poli-isotópico desses íons é o de interesse. A fórmula elementar não precisa ser simples.

Figura 1.3: Desvio por mil em relação ao valor natural da razão $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$ em função do pH

um dos isótopos. Outras vezes, geram-se óxidos na fase gasosa. Nestes casos, é necessário corrigir as intensidades registradas para compensar a interferência dos isótopos do oxigênio. Este tipo de interferência, que é justamente o objeto de estudo deste trabalho, será tratado mais rigorosamente mais adiante.

Nas aplicações típicas, em geral, procura-se tirar conclusões a partir de variações muito pequenas das razões isotópicas. Isso faz com que um rigor muito grande acompanhe este tipo de medida. A simplicidade conceitual da razão isotópica e do seu processo de medida podem dar a falsa impressão de que se trata de um método absoluto, isto é, cujos resultados podem ser relacionados diretamente com os padrões do sistema internacional de unidades, sem o intermédio de calibrações. Entretanto, devido às imperfeições que afetam os espectrômetros de massas reais, quase sempre é necessário fazer uma compensação através de padrões isotópicos certificados¹⁴. Isso faz com que a precisão e exatidão finais da razão isotópica obtida fiquem atreladas às do padrão isotópico utilizado. Em muitos casos, trabalha-se com mais de um padrão isotópico, sendo um deles usado para corrigir os erros do

¹⁴Padrões isotópicos certificados são amostras reais ou sintéticas contendo um ou mais elementos de interesse, sobre cuja composição isotópica se atingiu um consenso. Esta composição consensual é determinada submetendo a amostra a análises independentes por diferentes laboratórios e consolidando os resultados.

instrumento. A razão é normalmente reportada na forma de um desvio em relação à do outro padrão:

$$\delta r = 1000 \frac{r_{\text{medida}} - r_{\text{padrão}}}{r_{\text{padrão}}}$$

Conforme já fora mencionado, há uma restrição severa sobre as espécies químicas que podem ser utilizadas para determinações de razões isotópicas. Em geral, ou o único elemento poli-isotópico na fórmula destas moléculas é o elemento de interesse, ou então estas espécies são óxidos simples. A razão para esta restrição é o fato de que o que se observa nos espectros de massas são, na verdade, os padrões isotopoméricos¹⁵ dos íons em questão, e estes últimos podem ter formatos bastante diferentes dos padrões isotópicos, que são as grandezas desejadas. Estas restrições excluem até mesmo íons contendo múltiplas instâncias do elemento de interesse.

Os pesquisadores da área têm investido uma grande dose de energia e criatividade no desenvolvimento de métodos que permitam obter os elementos de interesse nas espécies químicas apropriadas, que normalmente envolvem apenas átomos como flúor, fósforo, oxigênio e os metais alcalinos sódio e cério. Por exemplo, para a análise isotópica de C, normalmente recorre-se à combustão, conforme fora citado no início desta seção. Para outros elementos, é necessário recorrer a procedimentos mais complicados. O cloro, por exemplo, de um composto orgânico clorado, precisa ser convertido quantitativamente a cloreto de metila para análise por espectrometria de massas com ionização por elétrons. Um método otimizado para a síntese de CH₃Cl a partir de organoclorados foi publicado há não muito tempo [31]. Este trabalho propõe que se converta o cloro da amostra em CuCl por aquecimento a 550°C durante duas horas na presença de CuO e, posteriormente, converta-se o CuCl a CH₃Cl por aquecimento a 300°C durante mais duas horas na presença de iodeto de metila. Já o Fe precisa ser convertido no complexo volátil Fe(PF₃)₅ antes da análise com ionização por elétrons [32].

Os exemplos acima deixam claro que maneiras de ampliar a gama de espécies químicas aceitáveis para análises isotópicas seriam contribuições importantes para a área. Seria possível simplificar procedimentos experimentais e incluir novas modalidades de espectrometria de massas à lista das usáveis para análises isotópicas, hoje restrita principalmente à ionização térmica, *ICP* e por elétrons.

¹⁵Uma definição rigorosa de “padrão isotopomérico” encontra-se na página 24. Por ora, um exemplo é suficiente. O padrão isotopomérico é a mistura dos padrões isotópicos dos elementos que compõem um íon molecular. Por exemplo, se o padrão isotópico do átomo de cloro é [³⁵Cl=0,75, ³⁷Cl=0,25.], o padrão isotopomérico da molécula hipotética Cl₂ é [³⁵Cl₂=0,75², ³⁵Cl³⁷Cl=2·0,75·0,25, ³⁷Cl₂=0,25²].

A proposta desse trabalho é desenvolver um método matemático que permita calcular os padrões isotópicos dos átomos que compõem um determinado íon molecular simplesmente conhecendo a sua fórmula elementar e o seu espectro de massas.

1.3 Revisão bibliográfica sobre métodos matemáticos aplicados à espectrometria de massas

À primeira vista, a informação contida em um espectro de massas é muito simples. Cada pico, cuja relação m/z encontra-se na abscissa, representa um íon gerado a partir da amostra utilizada. De fato, conceitualmente, a espectrometria de massas é muito mais simples do que outras técnicas espectroscópicas corriqueiramente utilizadas em química, como, por exemplo, as espectroscopias de absorção no infravermelho e Raman, ou então a espectroscopia de ressonância magnética nuclear, cujos resultados só podem ser interpretados recorrendo, pelo menos, à mecânica quântica. Isto sugere que a identificação da substância que gerou um espectro de massas e seus fragmentos seja uma tarefa trivial. Entretanto, na prática, interpretar um espectro de massas é uma tarefa mais complexa do que interpretar os resultados obtidos através da maioria das técnicas espectroscópicas.

A razão desta dificuldade é a alta degenerescência da abscissa do espectro de massas. Enquanto, nas outras técnicas espectroscópicas, normalmente é possível fazer uma associação quase que um para um entre o eixo x e as funções químicas, na espectrometria de massas isto não é possível. Por exemplo, ao interpretar-se um espectro de absorção no infravermelho, tem-se sempre em mente que carbonilas absorvem entre 1690 e 1760 cm^{-1} , hidrogênios de alcanos, de 2850 a 2960 cm^{-1} , etc [33]. No caso de RMN, também é possível associar os deslocamentos químicos (abscissas) dos sinais de absorção aos grupos funcionais. Por outro lado, a massa de um íon molecular não depende dos seus grupos funcionais, mas apenas das identidades dos seus átomos. Naturalmente, a maneira como um íon molecular se fragmenta depende dos seus grupos funcionais, mas há que se concordar que a associação entre rotas de fragmentação e grupos funcionais com simples massas e abundâncias de fragmentos é muito mais complexa e sujeita a ambigüidades. Mesmo a comparação com bancos de espectros pode levar a erros crassos quando estes bancos não são cuidadosamente montados para a classe de compostos com que se deseja trabalhar.

Por essas razões, um cérebro humano devidamente treinado, com sua inigualável capacidade de reco-

nhecimento de padrões, ainda é uma ferramenta essencial na interpretação de um espectro de massas. Não é à toa que a interpretação de espectros de massas de substâncias orgânicas com ionização por elétrons foi o carro abre-alas das aplicações de inteligência artificial em química [34]. Desde a década de 1960 muita pesquisa tem sido feita no sentido de desenvolver algoritmos e programas que auxiliem os especialistas humanos nesta tarefa [35, 36].

Uma linha de pesquisa explorada por alguns autores foi a determinação de composições elementares a partir das distribuições isotopoméricas registradas no espectro de massas. Genericamente, estes métodos são chamados de “análise de padrões isotópicos” e procuram descobrir qual é a fórmula do íon molecular simplesmente comparando a sua distribuição isotopomérica com distribuições simuladas para íons de diferentes fórmulas [37]. A maneira de se fazer a comparação entre os padrões isotopoméricos e o espectro também foi objeto de estudo. Blom [38] propôs que a comparação fosse feita, não diretamente entre as intensidades dos picos, mas entre os momentos de primeira e segunda ordem e, às vezes, ordens superiores das distribuições. Lago propôs um método baseado em estatística bayesiana para resolver o problema, porém este não foi muito bem compreendido pela comunidade [39].

Na verdade, estas abordagens encontram duas dificuldades fundamentais: (1) a explosão combinatória para fórmulas complexas e (2) a ambigüidade dos padrões isotópicos dos elementos comumente encontrados em moléculas orgânicas. Por exemplo, muitas vezes, a precisão experimental não permite diferenciar através do padrão isotopomérico a troca de um átomo de nitrogênio por um radical metileno (CH_2), visto que ambos têm a mesma massa inteira. Alguns erros sistemáticos a que estão sujeitos os espectros de massas podem complicar ainda mais esse quadro. Estas dificuldades fizeram com que muitas dessas linhas de pesquisa fossem abandonadas ao longo do tempo.

Outra metodologia de determinação de composição elementar – que foi muito explorada e que encontrou mais sucesso – é a baseada nas massas exatas dos fragmentos, obtidas com espectrômetros de massas de alta resolução. Nesta abordagem, que se baseia no fato de que prótons e nêutrons têm massas ligeiramente diferentes, procura-se determinar a massa de um fragmento com o máximo possível de exatidão e depois determinar a combinação de elementos químicos que levou a ela. Transforma-se o problema de determinação de composição em um de determinar os coeficientes de uma combinação linear envolvendo apenas números inteiros. O problema dessa abordagem era a necessidade de espectrômetros de massas de alta resolução, até não muito tempo atrás, caros e de difícil operação.

Vários programas semi-automáticos de interpretação de espectros de massas de substâncias orgânicas foram divulgados na literatura [35, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46]. De maneira geral, todos estes métodos recorrem algumas heurísticas simples abstraídas do conhecimento acumulado da área para tentar identificar parte dos íons presentes no espectro ou, pelo menos, facilitar a identificação por um ser humano. De posse das identidades de alguns íons, pode-se fazer uma regressão linear múltipla dos seus padrões isotopoméricos sobre o espectro experimental e obter as intensidades relativas dos íons, ou então “limpar” o espectro substituindo os padrões isotopoméricos dos íons identificados pelos seus picos mono-isotópicos, isto é, o pico correspondente ao isotopômero de composto pelos isótopos mais leves de cada elemento¹⁶.

Na década de 1990 houve uma ressurgência na área quando alguns pesquisadores, notoriamente Gasteiger, da Alemanha, e colaboradores passaram a advogar o uso de redes neurais artificiais para fazer a interpretação dos espectros de massas [47, 48]. Infelizmente, os autores só conseguiram demonstrar a aplicabilidade dos seus métodos à interpretação de espectros com ionização por elétrons de algumas butilaminas, notoriamente bem comportados, e não foi dada continuidade à linha¹⁷.

Um dos problemas que afeta a análise de distribuições isotopoméricas é a correta identificação das mesmas quando há superposição de íons diferentes no espectro, ou interferências isobáricas. Um tipo particularmente comum¹⁸ de interferência isobárica em espectros de massas de substâncias orgânicas com ionização por elétrons é a dos íons $M-nH$, isto é, íons que diferem uns dos outros por apenas alguns átomos de hidrogênio. Na verdade, este tipo de interferência também é observado em espectros de massas de metais de transição com ionização electrospray e constitui um problema para a determinação de razões isotópicas [53]. Métodos matemáticos, alguns deles baseados em estatística multivariada, foram propostos para tentar eliminar a interferência dos íons $M\pm nH$, obtendo o padrão isotopomérico de um deles e as abundâncias relativas de todos [51, 52].

Um filão da que está muito em voga hoje em dia é o da análise de macromoléculas biológicas. As portas da espectrometria de massas foram abertas para estas moléculas frágeis, polares e de altas massas com o surgimento de novos métodos de ionização como o electrospray e a dessorção/ionização

¹⁶Essas vozes foram sendo silenciadas à medida que os avanços na computação foram permitindo o armazenamento de bancos de espectros cada vez maiores e sistemas de busca nesses bancos passaram a ser vendidos casadamente com os CG-EM de bancada.

¹⁷Os próprios autores, sensíveis aos ventos da ciência moderna, acabaram redirecionando os seus esforços para áreas onde as perspectivas de reconhecimento rápido (ou publicação rápida) fossem melhores [49, 50].

¹⁸Um levantamento estatístico por Moraes e colaboradores [51, 52] mostra que, na verdade, longe de ser algo excepcional, a interferência isobárica por íons $M\pm nH$ é a regra quando se trabalha com ionização por elétrons.

por laser auxiliada pela matriz (*MALDI*). Uma vez tornada possível a transferência para a fase gasosa dessas moléculas inteiras, floresceu toda uma nova linha de métodos computacionais para a análise e interpretação desses espectros de massas, com características bastante diferentes dos tradicionalmente encontrados com a ionização por elétrons.

A aparição de íons moleculares com múltiplas cargas, algo extremamente raro com ionização eletrônica, tornou-se comum e, muitas vezes, desejável¹⁹. Para lidar com estes espectros, métodos matemáticos para, por exemplo, identificar as várias instâncias de uma mesma macromolécula com cargas diferentes, determinar os seus estados de carga e consolidar as informações contidas em todos eles foram criados. No jargão da área, estes métodos são chamados de “deconvolução” [54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61]. Apesar do nome, estes métodos não têm qualquer relação com o objeto de estudo desta tese.

A determinação de massas moleculares de proteínas em extratos celulares, que normalmente é feita por eletroforese em gel de poliacrilamida, pode ser feita de forma bem mais simples e exata. Métodos matemáticos para tentar calcular a massa “mono-isotópica” de uma proteína a partir da sua distribuição isotopomérica foram desenvolvidos [62, 63]. Outra linha que vem gerando muitas aplicações comerciais é a de seqüenciamento de proteínas por espectrometria de massas multidimensional, ou a identificação de mutações e modificações pós-traducionais por comparação com bancos de dados genômicos [64, 65, 66]. Alguns pesquisadores ousadamente sugerem que até mesmo seja possível substituir todo o aparato de separação cromatográfica comumente usado em bioquímica por espectrometria de massas multidimensional de alta resolução [67].

Um problema que surge recorrentemente no desenvolvimento de métodos para a interpretação de espectros de massas é o do cálculo das distribuições isotopoméricas dados a fórmula elementar do íon e as abundâncias isotópicas dos átomos que o compõem. Apesar de tratar-se de um problema razoavelmente simples, um número considerável de trabalhos na área de química foram publicados a esse respeito [68, 36, 69, 70, 71, 72, 73, 74]. Muitos são artigos voltados para a área de ensino, e têm como objetivo expor o problema para alunos de graduação e propor uma metodologia mais ou menos genérica para resolvê-lo. Outros trazem otimizações e implementações supostamente inovadoras, mas

¹⁹É a produção abundante de íons moleculares com múltiplas cargas que permite que quadrupolos convencionais, com alcances de m/z de poucos milhares de unidades, sejam capazes de filtrar íons com massas de centenas de milhares de unidades de massa atômica.

cuja aceitação para publicação só pode ser compreendida levando em conta, ou a falta de intimidade dos químicos com a computação, ou eventuais facilidades de acesso de certos grupos de pesquisa a alguns periódicos. Outros, entretanto, trazem idéias e maneiras de se encarar o problema interessantes. Na verdade, este problema pode assumir várias formas. Talvez a mais direta de todas seja encarar os padrões isotópicos e isotopoméricos como distribuições de probabilidades de variáveis aleatórias com valores discretos (as massas). Esta interpretação permite que se chegue rapidamente à conclusão de que a operação que “mistura” os padrões isotópicos para gerar os isotopoméricos é uma convolução²⁰. Uma outra associação equivalente, bastante popular na área de química, é dos padrões isotópicos e isotopoméricos com polinômios. A idéia é representar os padrões isotópicos/isotopoméricos como polinômios cujos coeficientes são as abundâncias relativas dos isótopos/isotopômeros:

$$p(\mathbf{a}; x) = a_0 + a_1x + \cdots a_nx^{n-1}$$

onde o vetor $\mathbf{a}$ contém as abundâncias isotópicas/isotopoméricas e x é a variável do polinômio.

Com esta associação, a operação de convolução de dois padrões equivale à multiplicação dos polinômios associados a ambos. Para construir o padrão isotopomérico de um íon molecular, basta multiplicar os polinômios associados aos padrões isotópicos dos átomos que o compõem, elevados aos seus respectivos números de fórmula. Talvez a melhor proposta de implementação computacional desse esquema seja devida a Yergey e Kubinyi [75, 76]²¹.

O método de Kubinyi funciona muito bem para moléculas não muito grandes, mas é lento para macromoléculas. Rockwood e outros [77, 78, 79] propuseram um método “rápido” para o cálculo de espectros de resolução finita de macromoléculas. Neste trabalho, as distribuições isotópicas e isotopoméricas de resolução infinita são representadas por combinações lineares de funções delta:

$$p(\mathbf{a}, \mathbf{m}, m) = \sum_{j=1}^n a_j \delta(m - m_j) \quad (1.1)$$

onde $\mathbf{a}$ e $\mathbf{m}$ contêm as abundâncias e as massas exatas²² dos isótopos/isotopômeros. No domínio das massas, o espectro de resolução finita da molécula é dado pela convolução dos padrões isotópicos dos

²⁰Para detalhes formais desta associação, veja a seção 2.2 página 25.

²¹O sistema proposto por Kubinyi é usado neste trabalho. A seção 2.3, na página 26, contém a descrição detalhada da implementação.

²²Neste caso, não é feita a aproximação de massas inteiras, de amplo uso na interpretação de espectros de moléculas pequenas.

átomos que o compõem com uma função de forma de pico:

$$p(m) = \underbrace{p_1(m) * \dots * p_1(m)}_{\nu_1 \text{ vezes}} * \underbrace{p_2(m) * \dots * p_2(m)}_{\nu_2 \text{ vezes}} * \dots * s(m) \quad (1.2)$$

onde $s(m)$ é a função de forma de pico e os $p_i(m)$ e ν_i são o padrão isotópico (na forma da equação 1.1) do elemento de índice i e o seu número de fórmula respectivamente.

Calculando a transformada de Fourier dos dois lados da equação 1.2, obtém-se no domínio recíproco:

$$P(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} p(m) e^{i\omega m} dm = S(\omega) \cdot \prod_{i=1}^n P_i(\omega)^{\nu_i} \quad (1.3)$$

onde $S(\omega)$ é a transformada de Fourier da função de forma de pico e as funções $P_i(\omega)$ são as dos padrões isotópicos atômicos:

$$P_i(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} p_i(m) e^{i\omega m} dm = \sum_{j=1}^{n_i} a_{ij} e^{i\omega m_{ij}}$$

onde, agora, a_{ij} e m_{ij} são a abundância relativa e a massa do isótopo de índice j do elemento de índice i . ω é a variável conjugada à massa, sem significado físico.

A proposta de Rockwood e colaboradores [77, 78, 79] é postular uma função de forma de pico e calcular a transformada de Fourier da distribuição isotopomérica em um certo número de valores de ω . De posse dessa função, calcula-se uma aproximação ponto a ponto da distribuição isotopomérica no domínio das massas através de uma transformada de Fourier discreta inversa. Os autores justificam que este método é interessante para moléculas grandes, pois, a convolução transforma-se em uma multiplicação no domínio recíproco e os números de fórmula transformam-se em meros expoentes inteiros, como na equação 1.3. O tempo de computação acaba ficando mais dependente da resolução com que se deseja obter o espectro de massas, do que da fórmula da molécula propriamente dita.

Entretanto, este método só serve para obter espectros de resolução finita e com um perfil de pico arbitrariamente postulado. Ele não tem grande aplicação em interpretação de espectros de moléculas pequenas, onde o uso de espectros de resolução “infinita”²³ é generalizado. Por outro lado, segundo

²³Em espectrometria de massas de baixa resolução de moléculas pequenas, assume-se que o instrumento só é capaz de resolver picos separados por pelo menos uma unidade de massa, e os espectros transformam-se em simples listas de intensidades em valores de m/z inteiros, ou, como é muito comum, espectros de “palitos” fi nos.

os autores, para a geração de espectros simulados de macromoléculas para comparação com espectros experimentais, por exemplo, este método é útil.

Se, por um lado, vários trabalhos já foram publicados a respeito da convolução de padrões isotópicos, isto é, do cálculo de distribuições isotopoméricas de moléculas a partir da fórmula e dos padrões isotópicos atômicos, por outro, pouco esforço foi dedicado ao processo inverso, isto é, o cálculo dos padrões isotópicos atômicos a partir do padrão isotopomérico e da fórmula. Na minha opinião, isto se deve ao fato de que, primeiro, o problema da deconvolução é mais difícil que o da convolução e, segundo, que, à primeira vista, não há utilidade para a deconvolução na interpretação.

De fato, o problema da convolução é muito mais simples que o da deconvolução. A primeira envolve uma operação direta, que permite até mesmo que se estabeleça uma relação funcional analítica entre as entradas (padrões isotópicos e fórmula) e a saída (padrão isotopomérico). A resposta é determinada inequivocamente pelos dados. Já no caso da operação inversa, não é possível, em geral, estabelecer uma relação funcional analítica. Algum tipo de procedimento numérico iterativo vai ser necessário. Além disso, para muitas fórmulas moleculares, a deconvolução é desesperançosamente ambígua, isto é, mais de um conjunto de padrões isotópicos explica o padrão isotopomérico. Em outros casos, imperfeições experimentais no padrão isotopomérico determinado podem introduzir ambigüidades e causar grandes deformações nos padrões isotópicos calculados.

Na verdade, de tempos em tempos, uma ou outra faceta do problema da deconvolução de padrões isotopoméricos surge na literatura e recebe algum tipo de solução específica. Por exemplo, conforme já fora dito na seção anterior, razões isotópicas de alguns elementos são determinadas a partir de espectros de massas de seus óxidos aplicando uma correção simples para a interferência do padrão isotópico do oxigênio. Ainda na década de 1970, Hugentobler e colaboradores [71] propuseram que o polinômio associado a um padrão isotopomérico poderia ser dividido pelo associado a um fragmento para obter o padrão isotopomérico do fragmento restante; uma proposta que flerta com a deconvolução dos padrões isotopoméricos.

A própria idéia de usar íons moleculares contendo mais de um elemento poli-isotópico para fins de análises isotópicas não é nova. Na década de 1970 Genty [80] publicou algumas fórmulas matemáticas que permitiriam que se calculasse a razão isotópica de um elemento de interesse na presença de outros elementos poli-isotópicos. Entretanto, as equações apresentadas são válidas apenas para

moléculas contendo um ou dois elementos poli-isotópicos e com limitações sobre os números de isótopos dos mesmos. Ao longo da década de 1990, até o ano 2000, Datta e colaboradores publicaram alguns artigos explorando vários aspectos da determinação de razões isotópicas de B e Li através do íon Li_2BO_2^+ , produzido por ionização térmica [81, 82, 83, 84]. Mais um caso de deconvolução de padrões isotopoméricos que recebeu uma solução particular.

As instâncias do problema da deconvolução de padrões isotopoméricos não estão restritas à química analítica. Na década de 1990, Hellerstein e colaboradores [85] publicaram em um periódico da área médica um artigo propondo um método chamado de *MIDA* (*Mass Isotopomer Distribution Analysis*). O propósito desse método é extrair informações cinéticas de estudos metabólicos com traçadores isotópicos analisando a forma das distribuições isotopoméricas dos produtos. Uma das etapas do método envolve o cálculo do grau de enriquecimento isotópico de um elemento de interesse, ou seja, um caso particular da deconvolução do padrão isotópico do elemento de interesse da distribuição isotopomérica. Entretanto, a implementação sugerida pelos autores deixa muito a desejar.

Vários pesquisadores já se depararam ao longo das décadas com o problema da deconvolução de padrões isotopoméricos e até propuseram soluções para ele aplicadas aos seus casos específicos. Entretanto, ninguém ainda deu o passo seguinte, na verdade, bastante óbvio, que é a formulação de um método genérico para a resolução do problema, isto é, a obtenção dos padrões isotópicos dos átomos que compõem um dado íon molecular dados a sua fórmula elementar e o seu espectro de massas. Este é o objetivo deste trabalho.

1.4 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho é desenvolver um método genérico de deconvolução de padrões isotopoméricos obtidos de espectros de massas de baixa resolução com o objetivo de obter os padrões isotópicos dos átomos que o compõem.

Um objetivo secundário deste trabalho é a verificação da viabilidade de abordagens de análises isotópicas baseadas em íons moleculares contendo múltiplos elementos poli-isotópicos apoiadas no método de deconvolução.

Capítulo 2

O método Z

O método Z¹ é o produto principal deste trabalho. Trata-se de um algoritmo que permite estimar as abundâncias isotópicas dos átomos que compõem um determinado íon molecular dados o espectro de massas desse íon e a sua fórmula elementar. Conforme fora discutido na introdução (seção 1.3, página 21), esta é uma instância do problema de deconvolução de padrões isotopoméricos.

Neste trabalho, decidiu-se encaminhar o problema da deconvolução como um de regressão não linear, isto é, desenvolveu-se um método que calcula as abundâncias isotópicas atômicas que, através da receita implícita na fórmula elementar, geram um espectro de massas que mais se aproxima de um outro espectro, experimental. Para tanto, são necessários dois componentes básicos: (1) uma maneira genérica de se calcular o espectro de massas de um íon molecular dados a sua fórmula elementar e as abundâncias isotópicas dos seus átomos componentes e (2) uma metodologia para se variarem as abundâncias isotópicas atômicas de modo a reproduzir o espectro de massas experimental. Os componentes usados na versão final do algoritmo são, para a primeira tarefa, um método de expansão polinomial e, para a segunda, o método simplex “morro abaixo”.

Antes de entrar nos detalhes do funcionamento do método Z, é necessário definir algumas expressões que serão usadas recorrentemente. Algumas delas já foram usadas na introdução, porém sem uma definição formal.

¹O método Z foi publicado com o nome de método IPDec (*Isotopomer Pattern Deconvolution*) [86] para evitar colisões com o nome de um outro algoritmo aplicado à determinação de cargas de macromoléculas ionizadas por electrospray chamado de *z-score* [55].

Caso o leitor esteja interessado em uma justificativa para a escolha do nome “Método Z”, cheque a seção 3.10 (página 96).

para uma formula elementar contendo apenas uma instância de um único elemento químico.

É o padrão isotopomérico que é medido em um espectro de massas quando se considera que as frequências relativas dos eventos de surgimento de íons de diferentes m/z são iguais às suas abundâncias relativas, ou probabilidades de aparecimento. Isto é justificado pelo fato de se estar lidando com números muito grandes de eventos.

2.2 Convolvendo padrões isotópicos e isotopoméricos

O objetivo desta seção é deduzir um método genérico para o cálculo de padrões isotopoméricos a partir de fórmulas elementares e padrões isotópicos atômicos.

Sejam a e b dois padrões isotopoméricos correspondentes a fragmentos moleculares A e B quaisquer. Deseja-se calcular c , o padrão isotopomérico do fragmento molecular C cuja fórmula é AB .

A massa de uma molécula C escolhida aleatoriamente de uma população é igual à soma das massas dos fragmentos A e B que a compõem, que, por sua vez, são variáveis aleatórias discretas cujas distribuições de probabilidades são os padrões isotopoméricos a e b respectivamente. Isto quer dizer que o padrão isotopomérico da molécula de fórmula AB é a distribuição de probabilidade de uma variável aleatória igual à soma de duas outras variáveis aleatórias cujas distribuições são os padrões isotopoméricos a e b , e cujos valores são as massas possíveis dos fragmentos A e B .

Portanto, a probabilidade de que se obtenha uma molécula de massa m dentre as da população das de fórmula AB é:

$$\begin{aligned} c_m &= P\{m_A + m_B = m \mid m_A \approx a \text{ e } m_B \approx b\} = \\ &= \sum_{m'} a_{m'} b_{m-m'} \end{aligned} \quad (2.1)$$

onde os limites da somatória correspondem aos valores de m' tais que tanto $a_{m'}$ quanto $b_{m-m'}$ fazem sentido dados os padrões isotopoméricos a e b . Da mesma forma, os limites para o índice m do vetor c são dados em função das dimensões dos vetores a e b .

A somatória da equação 2.1 corresponde à convolução dos dois vetores a e b :

$$c = a * b \quad (2.2)$$

onde o símbolo $*$ representa a operação de convolução.

O argumento acima pode ser estendido para uma fórmula elementar qualquer $A_{\nu_A}B_{\nu_B}\dots$:

$$y = \underbrace{a * \dots * a}_{\nu_A \text{ vezes}} * \underbrace{b * \dots * b}_{\nu_B \text{ vezes}} * \dots \quad (2.3)$$

onde cada vetor é convolvido um número de vezes igual ao número de fórmula do seu elemento.

Desta forma, para calcular o padrão isotopomérico de uma molécula de fórmula elementar conhecida, basta que se convolvam os padrões isotópicos dos elementos que a compõem, sendo que cada padrão isotópico atômico comparece na convolução um número de vezes igual ao número de fórmula do seu elemento correspondente.

Esta metodologia de cálculo de padrões isotopoméricos também é chamada na literatura de expansão polinomial [76]. Esta denominação surge quando se considera que os padrões isotopoméricos são polinômios cujos coeficientes são as abundâncias isotopoméricas. Neste caso, a operação de convolução da equação 2.2 corresponde à multiplicação dos polinômios associados aos padrões isotópicos atômicos elevados aos seus respectivos números de fórmula.

2.3 Implementação da convolução dos padrões isotópicos e isotopoméricos

Como a convolução de vetores efetuada de acordo com a equação 2.1 possui as propriedades comutativa e associativa, a convolução dos padrões isotópicos atômicos para a obtenção do padrão isotopomérico molecular não precisa ser necessariamente implementada na ordem descrita na equação 2.2, envolvendo um a um os padrões isotópicos atômicos. Na verdade, para calcular o padrão isotopomérico de uma molécula de fórmula complexa, é mais vantajoso realizar um número menor de convoluções de padrões isotopoméricos grandes do que um grande número de convoluções de padrões isotopoméricos pequenos [75, 76].

Neste trabalho, a convolução foi implementada utilizando um esquema de construção binária ilustrado no fluxograma da figura 2.1. Neste diagrama, assume-se que o vetor **temp** inicial já contém um padrão isotopomérico intermediário ao qual será convolvido ν vezes o padrão isotopomérico **a**. A implementação deste esquema em linguagem C encontra-se na listagem da biblioteca do método Z:

Figura 2.1: Fluxograma da implementação da convolução de múltiplas instâncias de um padrão isotópico no método Z.

apêndice C, página 147, rotina `poly_expand`.

A implementação da convolução de dois vetores também não é feita através da somatória da equação 2.1, mas através de um *loop* duplo sobre os dois vetores sendo convolvidos. A cada iteração, um elemento do vetor de saída é incrementado de acordo com a equação:

$$y_{i+j} = y_{i+j} + a_i b_j$$

onde i e j são os índices dos *loops* sobre os dois vetores de entrada, y é o vetor de saída e a e b são os vetores de entrada. Esta rotina (`convolve`) encontra-se no apêndice C, página 148.

2.4 Comparando padrões isotopoméricos e espectros de massas

Os padrões isotópicos e isotopoméricos são distribuições de probabilidades, sendo assim normalizados para soma igual a 1. Já as ordenadas dos espectros de massas possuem unidades associadas a elas, que podem ser arbitrárias ou não. Entretanto, é esperado que os picos do espectro de massas sejam proporcionais às abundâncias do padrão isotopomérico que o gerou. A função escolhida para medir a discrepância entre um padrão isotopomérico e um espectro de massas é a soma dos quadrados das diferenças entre as intensidades dos picos do espectro e os do padrão isotopomérico multiplicados por um fator de escala²:

$$R = \sum_i (I_i - kY_i)^2 \quad (2.4)$$

onde I_i e Y_i são os i -ésimos picos do espectro de massas e do padrão isotopomérico respectivamente.

O fator de escala k é calculado em função do padrão isotopomérico de modo a minimizar a somatória da equação 2.4. A expressão analítica para k é:

$$k = \frac{\sum_i Y_i I_i}{\sum_i Y_i^2} \quad (2.5)$$

Nas somatórias das equações 2.4 e 2.5, os limites de recursão do índice i foram deixados em branco para indicar que estas somatórias não precisam ser executadas sobre o padrão isotopomérico ou espectro inteiro. Na verdade, implementou-se o método Z de modo que seja possível escolher quais picos do padrão isotopomérico e do espectro de massas devem ser comparados. Isto é feito através de uma máscara binária (vide apêndice C, página 142, protótipo da rotina `metodoz5_adjust`).

2.5 Ligando as partes

Método de minimização O algoritmo escolhido para variar as abundâncias isotópicas atômicas de modo a minimizar a discrepância entre o padrão isotopomérico calculado e o espectro de massas ex-

²A função R definida na equação 2.4 não é a única possível, nem é necessariamente a melhor para todos os casos. Existem outras possibilidades. Por exemplo, quando dispõe-se de informações a respeito da variância da intensidade de cada pico do espectro, cada elemento da somatória pode ser dividido pela variância do pico espectral correspondente, levando assim a uma regressão ponderada. Esta estatística pode levar a resultados melhores que a da equação 2.4 quando os dados experimentais têm comportamento heteroscedástico. Na verdade, conforme será descrito mais adiante, o algoritmo de minimização utilizado na implementação é genérico o suficiente para permitir a substituição da função R com bastante facilidade.

perimental, calculada através das equações 2.4 e 2.5, foi o método simplex “morro abaixo” (*downhill simplex*) [87]. Se comparado a métodos que utilizam as derivadas (ou estimativas delas) de primeira e segunda ordens da função sendo minimizada com respeito aos parâmetros variacionais, o simplex “morro abaixo” exige em geral um número maior de avaliações da função para que se atinja o ponto de mínimo. Por outro lado, a independência das derivadas permite que o método seja aplicado a uma gama maior de problemas, inclusive quando as derivadas são singulares. No caso do método Z, apesar de, a princípio, as derivadas da função R com respeito às abundâncias isotópicas atômicas serem bem comportadas, o cálculo destas é trabalhoso, o que justifica a aplicação do simplex “morro abaixo”.

O método simplex “morro abaixo” foi implementado em linguagem C, em uma biblioteca cujo código fonte não foi incluído nesta tese. Entretanto, as chamadas à rotina principal de minimização desta biblioteca encontram-se na função `metodoz5_adjust`, no apêndice C, página 150.

Estimativas iniciais Para minimizar uma função de n parâmetros, o método simplex “morro abaixo” realiza uma série de operações geométricas em um sólido convexo de $n + 1$ vértices em um espaço n -dimensional. Conseqüentemente, é necessário construir um primeiro simplex com $n + 1$ conjuntos iniciais de parâmetros, assim como avaliar a função em todos esses vértices. No caso do método Z, são usados como vértices iniciais os seguintes vetores de parâmetros:

1. Estimativa inicial fornecida pelo usuário, normalmente composta pelas abundâncias isotópicas naturais tabeladas dos elementos em questão
2. Os outros n vértices restantes são cópias do primeiro, porém com uma das abundâncias isotópicas atômicas deslocada em $+0, 1$.

A geração do simplex inicial encontra-se na função `create_simplex`, apêndice C, página 146. Na verdade, o algoritmo descrito acima está implementado na função utilitária `simplex_build_initial`, que faz parte da biblioteca onde foi implementado o método simplex “morro abaixo”, e que não foi incluída neste texto.

Critério de convergência O critério utilizado para interromper a busca pelo mínimo é um de tamanho. Quando a distância euclidiana entre os vértices correspondentes aos valores máximo e mínimo

da função torna-se sistematicamente menor que um certo limiar, interrompe-se o algoritmo. Utiliza-se um limiar igual a 10^{-8} na implementação do método Z.

Normalização dos padrões isotópicos As somas dos picos de cada padrão isotópico atômico deve ser igual a 1. Esta condição impõe um vínculo linear sobre cada um dos conjuntos de abundâncias isotópicas de cada um dos elementos. No método Z, esta condição é garantida simplesmente fazendo com que uma abundância do padrão isotópico de cada átomo seja, por definição, igual a 1 menos a soma das demais. A decisão sobre quais abundâncias serão determinadas pela condição de normalização é tomada na rotina `create_map`, (C, página 145), que mapeia as abundâncias isotópicas sobre as variáveis de regressão. Mais tarde, quando os valores das abundâncias forem necessários, a rotina `get_abundance` (C, página 146) será usada. Esta última utiliza o mapa criado pela rotina anterior para retornar o valor correto.

Naturalmente, abundâncias isotópicas negativas não têm significado físico. Mesmo assim, optou-se por não impor nenhuma restrição de positividade às abundâncias ajustadas pelo método Z. A ausência desta restrição dá uma maior robustez numérica/estatística ao método. Isto acontece, pois algumas imperfeições experimentais podem deformar o espectro a ponto de fazer com que ele só possa ser reproduzido atribuindo valores negativos a algumas abundâncias. Por exemplo, quando os dados experimentais são sujeitos a ruído, isto é, os espectros são variáveis aleatórias amostradas de uma certa distribuição, algumas realizações individuais do espectro podem exibir este tipo de deformação. Entretanto, se o método Z for aplicado a todos os espectros de uma sequência longa amostrada e os seus resultados forem consolidados, esses casos “patológicos” serão cancelados por outros espectros da série e, em geral, será obtido um padrão isotópico médio sem abundâncias negativas. Por outro lado, se alguma restrição no sentido de forçar as abundâncias individuais a valores positivos fosse imposta, isso poderia introduzir um erro sistemático no resultado final.

2.6 Implementação

O método Z foi implementado em C na forma de uma biblioteca para ser utilizada em outros programas. Esta biblioteca foi utilizada em dois programas feitos para este trabalho: (1) um módulo de análise para um programa gráfico de manipulação de dados de espectrometria de massas desenvolvido

como parte deste trabalho e (2) uma interface que permite que a rotina do método Z seja executada a partir de um pacote genérico de manipulação numérica chamado *Octave*³.

O programa de manipulação de espectros de massas, chamado *LAIALynx*, foi escrito para facilitar o acesso aos dados adquiridos com o espectrômetro de massas do grupo em que este trabalho foi desenvolvido: um espectrômetro de massas com ionização electrospray modelo *Platform II* produzido pela empresa *Micromass* (Inglaterra). Este programa possui, além da capacidade de ler os dados armazenados pelo sistema de aquisição de dados do espectrômetro de massas, uma série de “módulos de análise”, que podem ser usados para realizar uma série de operações sobre estes dados, tais como obtenção de espectros médios e medianos, compensação de linha base, etc. A parte relacionada ao método Z deste programa é apenas um módulo de análise que pode ser executado pelo usuário para aplicá-lo a um ou mais espectros que estejam sendo manipulados. As figuras 2.2 e 2.3 contêm cópias de algumas janelas deste programa⁴.

O apêndice C contém a listagem completa em C da biblioteca do método Z, porém o código fonte do *LAIALynx* e o da interface para o *Octave* não foram incluídos. O primeiro é muito extenso (mais de 20000 linhas de código fonte original, fora algumas bibliotecas de terceiros) e razoavelmente complexo, mas isto se deve principalmente a detalhes de implementação da interface gráfica, que são totalmente irrelevantes para esta tese. O segundo é razoavelmente trivial e também não traz nenhuma contribuição para uma melhor compreensão do método Z, que é o objeto de estudo desta tese.

2.7 Propagação de erros

Dados experimentais reais são afetados por um grande número de pequenos fatores fora do controle do experimentalista, que se manifestam sob a forma de erros aleatórios, ou ruído. É essencial saber como o ruído experimental afeta os resultados do método Z, para que se possam tirar conclusões com base nestes números. No caso do método Z, não é possível escrever analiticamente uma função que relacione as abundâncias isotópicas ajustadas aos dados experimentais, de modo que o método

³(John W. Eaton, <http://www.octave.org/>)

⁴O *LAIALynx* foi escrito em C e compilado com o compilador de C do projeto GNU (<http://www.gnu.org/software/gcc/>) e a sua interface gráfica foi construída com a biblioteca GTK+ (<http://www.gtk.org>). O código fonte completo deste programa, assim como versões pré-compiladas para os sistemas operacionais *Linux* e *Windows 98* podem ser obtidas entrando em contato com o autor deste trabalho ou com o seu orientador. A interface para o *Octave* foi escrita em C++ e compilada também com o GCC.

Figura 2.2: Cópias das janelas do programa com interface gráfica desenvolvido para a manipulação de espectros de massas.

Figura 2.3: Cópias das janelas do módulo para a aplicação do método Z escrito para o *LAIALynx*

tradicional de propagação de desvios, baseado nas derivadas dessa função, não pode ser aplicado. Assim, decidiu-se usar as seguintes estratégias para a propagação de erros:

- Quando se dispõe de informações a respeito da distribuição de probabilidades dos dados experimentais, geram-se dados sintéticos pseudo-aleatórios com esta distribuição e aplica-se o método Z a eles, consolidando adequadamente os resultados no final.
- Quando se dispõe de medidas repetidas do espectro de massas, aplica-se o método Z a cada uma delas e consolidam-se os resultados adequadamente ao final. Esta estratégia foi aplicada na parte experimental deste trabalho e detalhes do método de consolidação dos resultados são dados na seção 4.3.1, página 114.

2.8 Exemplo de aplicação a dados de espectrometria de massas com ionização electrospray

Antes de passar à exploração sistemática das características do método Z através de espectros de massas simulados, serão apresentados alguns resultados da sua aplicação a espectros experimentais obtidos através da técnica de espectrometria de massas com ionização electrospray. Uma descrição mais completa desta técnica encontra-se na seção 4.2 (página 105). Por ora, basta dizer que esta é uma técnica de ionização que, dentre várias outras classes de espécies químicas, permite também transferir complexos organometálicos de soluções aquosas para a fase gasosa.

As figuras 2.4 e 2.5 contêm espectros de massas dos íons AuCl_4^- e CdCl_3^- obtidos submetendo soluções 100 μM destes íons em metanol/água 99:1 (v/v). Os detalhes desses experimentos podem ser encontrados em [88]. O gráfico pequeno da figura 2.4 contém os padrões isotópicos natural e ajustado do cloro, sendo este último obtido aplicando o método Z ao espectro do AuCl_4^- . A figura 2.6 contém a mesma informação, porém também para o cádmio, e aplicando o método Z ao espectro do CdCl_3^- . Nestas regressões, as abundâncias dos isótopos ^{36}Cl , ^{107}Cd , ^{109}Cd e ^{115}Cd foram mantidas fixas e iguais a zero.

No caso do AuCl_4^- , como o ouro possui apenas um isótopo estável (197 u), o padrão isotopomérico observado é o de quatro átomos de cloro. Já o caso do CdCl_3^- fornece um exemplo mais dramático da ação do método Z, pois tanto o cádmio quanto o cloro são poli-isotópicos e o cádmio, em particular, possui um padrão isotópico bastante complexo, abrangendo 11 unidades de massa atômica.

Naturalmente, nestes dois exemplos, somente uma concordância semi-quantitativa entre os padrões isotópicos naturais e os ajustados é observada. Na verdade, não faz sentido esperar mais do que isso destas aplicações, pois, nem foram tomadas medidas para compensar erros sistemáticos tais como discriminação instrumental de massas, nem foram usadas amostras isotopicamente certificadas. Nas próximas seções, estudos mais rigorosos a respeito do desempenho do método Z em uma ampla variedade de situações são apresentados.

Figura 2.4: Espectro de massas do íon AuCl_4^- e padrões isotópicos natural (hachurado) e ajustado (sólido) do cloro.

Figura 2.5: Espectro de massas do íon CdCl_3^- .

Figura 2.6: Padrões isotópicos natural (hachurrados) e ajustado (sólidos) do cloro (superior) e cádmio (inferior).

Capítulo 3

Caracterização do método Z

Os estudos a seguir foram realizados com o objetivo de verificar qual era o efeito de algumas não-idealidades comumente encontradas em espectrometria de massas sobre os resultados fornecidos pelo método Z. A idéia era verificar quais eram as vantagens e desvantagens *a priori* de se realizarem análises isotópicas através de íons moleculares contendo múltiplas instâncias do elemento de interesse e/ou outros elementos poli-isotópicos.

Nestes estudos, trabalhou-se com espectros de massas simulados de íons moleculares cujas composições e padrões isotópicos de elementos componentes eram conhecidos. Estes espectros perfeitos foram perturbados segundo alguns modelos assumidos para não-idealidades experimentais comuns de espectrometria de massas e o método Z foi aplicado a eles. As fórmulas desses íons moleculares, assim como os padrões isotópicos dos seus átomos componentes foram variados mantendo constantes os parâmetros dos modelos das não-idealidades, de modo a obter as discrepâncias entre os resultados do método Z e as abundâncias isotópicas esperadas em função das fórmulas e das próprias abundâncias verdadeiras.

Foram estudadas não-idealidades determinísticas e aleatórias. As primeiras introduzem erros sistemáticos nos resultados do método Z, enquanto as últimas introduzem erros aleatórios. Para comparar os resultados do método Z obtidos com os diferentes espectros simulados quando estes eram afetados por erros sistemáticos, foi utilizado o erro relativo (por mil) da razão¹ isotópica calculada do elemento

¹Lembrar que os resultados diretamente tirados do método Z são as abundâncias isotópicas, mas foram utilizadas as discrepâncias das **razões** calculadas em relação às esperadas para comparar o desempenho do método nas diferentes situações. A justificativa para isso é que as pessoas que trabalham na área costumam reportar os seus resultados em termos de razões isotópicas e não abundâncias isotópicas.

de interesse em relação à esperada:

$$\delta r = 1000 \frac{r - r_0}{r_0} \quad (3.1)$$

onde r é a razão isotópica ajustada e r_0 é a razão isotópica esperada.

Já no caso dos erros aleatórios, o parâmetro calculado para os resultados do método Z nas diferentes situações foi o desvio padrão relativo (por mil) da razão isotópica ajustada em relação à razão esperada:

$$\sigma_r^{\text{rel}} = 1000 \frac{(\langle r^2 \rangle_{\text{MC}} - \langle r \rangle_{\text{MC}}^2)^{1/2}}{r_0} \sqrt{\frac{n}{n_0}} \quad (3.2)$$

onde n e n_0 são os números de picos do espectro sendo considerado e de um outro espectro qualquer tomado como referência para todas as fórmulas. Os valores esperados $\langle \rangle_{\text{MC}}$ são estimados via simulação de Monte Carlo.

O fator de $(n/n_0)^{1/2}$ no lado direito da equação 3.2 foi introduzido para dar um pouco mais de realismo aos estudos envolvendo erros aleatórios. Ele serve para levar em consideração que o tempo disponível para a aquisição dos espectros de massas é finito e que, portanto, quanto maior o número de picos em um espectro, menor é o número de aquisições do espectro inteiro que podem ser feitas em um mesmo tempo total de aquisição. Para uma justificativa mais formal para este fator, veja o apêndice B.

Para que os resultados obtidos com fórmulas e padrões isotópicos atômicos diferentes pudessem ser comparados uns com os outros, os espectros simulados, que foram dados como entrada para o método Z, têm que sofrer alguma normalização. Nestes estudos, os espectros simulados foram normalizados de modo que as intensidades dos seus respectivos picos mais altos (picos base) fossem iguais. Outros esquemas de normalização poderiam ser propostos, mas, na verdade, esta é uma questão puramente teórica. Na prática, a natureza das espécies químicas à disposição do analista, assim como as intensidades com que elas poderão ser efetivamente observadas em um espectro de massas são governadas por fatores experimentais que estão completamente fora do escopo destes estudos. De qualquer forma, alguma normalização dos espectros é necessária para que se possa, pelo menos, colocar os resultados obtidos com espécies simuladas diferentes em um mesmo gráfico. Neste trabalho, escolheu-se a normalização através do pico base, isto é, os resultados obtidos com diferentes fórmulas e padrões isotópicos atômicos foram comparados assumindo-se que os picos bases dos diferentes espectros tinham intensidade igual a 1.

3.1 Características experimentais estudadas e modelos utilizados

Ruído Para o caso do ruído, foram estudados três tipos de distribuições de probabilidade para os dados espectrais: (1) dados normais homoscedásticos, (2) dados normais heteroscedásticos e (3) distribuição de Poisson.

No caso dos dados homoscedásticos, considerou-se que os picos dos espectros de massas simulados são amostrados de distribuições normais de probabilidades independentes que possuem variâncias iguais e cujas médias são iguais às intensidades nominais dos picos do espectro. Para os dados heteroscedásticos, foram simulados espectros amostrando os seus picos também de distribuições de probabilidades normais independentes cujas médias são iguais as intensidades nominais, porém o desvio padrão de cada uma destas distribuições é igual a uma fração da intensidade nominal do pico em questão. Ou seja, o desvio padrão **relativo** é igual para todos os picos.

Os casos de dados com distribuição de Poisson e distribuições normais homo e heteroscedástica são relevantes do ponto de vista prático. O primeiro tipo de estatística é observado quando se trabalha com o detector do espectrômetro de massas no modo digital, isto é, no modo de contagem de eventos. Já o segundo tipo de estatística surge quando se opera com o detector no modo de medida de corrente contínua, isto é, analógico, e o ruído do sinal de saída é principalmente devido ao sistema eletrônico de amplificação. O terceiro tipo surge quando o ruído é dominado por oscilações na fonte de íons e é amplificado como um todo pela eletrônica.

No caso da distribuição normal homoscedástica, a variância é independente do valor esperado da intensidade ($\sigma^2 \propto I^0$). Para a distribuição de Poisson, a variância é diretamente proporcional à intensidade esperada ($\sigma^2 \propto I^1$). Já no caso dos dados heteroscedásticos, a variância é proporcional ao quadrado da intensidade esperada ($\sigma^2 \propto I^2$). Este último caso também foi estudado por completitude, pois corresponde a um terceiro passo nesta progressão de comportamentos da variância com respeito à intensidade esperada.

Os estudos foram realizados através de simulações de Monte Carlo. O ruído, simulado por números pseudo-aleatórios amostrados da distribuição de probabilidades adequada, foi somado ao espectro esperado. O método Z foi aplicado a cada espectro simulado e os resultados consolidados ao final.

Os números pseudo-aleatórios com distribuição normal de probabilidades foram obtidos pela função geradora de números pseudo-aleatórios do pacote de manipulação numérica *octave*, que

foi usado para facilitar a realização destes estudos. O gerador de números pseudo-aleatórios com distribuição de Poisson utilizado pertence à biblioteca *GNU Scientific Library (GSL)*: <http://www.gnu.org/software/gsl>). Foi escrito apenas um *driver* para que esta função da biblioteca pudesse ser chamada de dentro do *octave*.

Discriminação instrumental de massas São chamados genericamente de “discriminação instrumental de massas” uma miríade de fenômenos cuja manifestação prática é uma variação da sensibilidade do espectrômetro de massas em função da relação m/z sintonizada. Este problema pode estar relacionado com imperfeições nas diversas partes do aparelho. Por exemplo, quadrupolos são notórios “discriminadores” instrumentais de massas. Se as magnitudes dos potenciais AC e DC não forem cuidadosamente controladas, haverá diferença na transmitância para diferentes m/z .

Também há fenômenos que se manifestam no espectro como uma discriminação instrumental de massas, mas que, na verdade, estão relacionados com fracionamento isotópico na fonte de íons, ou até mesmo na coleta e preparação da amostra. Uma fonte muito conhecida de fracionamento isotópico, e até mesmo explorada para o enriquecimento isotópico artificial de amostras, é o processo de efusão de gases por orifícios entre regiões de pressões diferentes. Qualquer espectrômetro de massas possui pelo menos uma interface entre regiões de pressões diferentes, afinal de contas, o interior do aparelho está sob alto vácuo, enquanto o exterior encontra-se sob pressão atmosférica².

Reações químicas incompletas podem ser também fontes de discriminação de massa, como foi demonstrado por Moraes e colaboradores [89] com a conversão de ácido bórico a tetrafluoroborato para análise isotópica por espectrometria de massas com ionização electrospray. Nem mesmo a técnica de ionização térmica, a mais amplamente aceita para análises isotópicas, está livre desse tipo de problema. A liberação dos íons pelo filamento aquecido é uma fonte de fracionamento isotópico [90].

É muito difícil mapear e modelar todas as fontes possíveis de discriminação instrumental de massas ou fracionamento isotópico em um determinado método de análise isotópica com uma determinada instrumentação. Não obstante, análises isotópicas rigorosas são efetuadas utilizando modelos empíricos que permitem que se compense a discriminação instrumental de massas do processo de análise como um todo por calibração com padrões isotópicos certificados. Os modelos empíricos normalmente utilizados são classificados de acordo com a dependência funcional da sensibilidade instrumental com

²Exceto talvez os mandados para o espaço, como na sonda Viking, ou no caso de *TIMS*, em que a amostra condensada é colocada sob vácuo para ionização.

relação à razão m/z . São eles o linear, exponencial e o “de potências” [91]. Neste trabalho, optou-se pelo modelo exponencial de discriminação instrumental de massas.

A intensidade medida de um certo pico do espectro de massas é dada em função da intensidade verdadeira e da sua relação m/z por:

$$I_m = \widetilde{I}_m \cdot e^{\alpha(m-m_0)} \quad (3.3)$$

onde $\widetilde{I}_m$ é a intensidade verdadeira do pico em $m/z = m$, m_0 é uma relação m/z tomada como referência e α é uma constante de discriminação instrumental de massa.

Não-linearidade do sistema de detecção Entende-se por não-linearidade do sistema de detecção o fato de a resposta amplificada do detector não variar linearmente com a taxa de chegada de íons a ele. Existem inúmeras causas para este tipo de problema, e a sua manifestação pode ter muitas formas funcionais. Por exemplo, a saturação da multiplicadora de elétrons pode levar ao registro de intensidades menores que as verdadeiras.

Neste estudo, trabalhou-se com um tipo de não-linearidade de detecção que se caracteriza pela saturação do sinal quando adquirem-se dados no modo de contagem de íons de feixes de altas intensidades. Esta saturação está relacionada com o fato de que a eletrônica de contagem não consegue distinguir eventos de chegada de íons muito próximos uns dos outros. Diz-se que detector fica insensível por um pequeno intervalo de tempo (tempo morto) imediatamente após a chegada de um íon, resultando em uma intensidade de feixe registrada menor que a verdadeira. Esta redução de intensidade pode ser modelada por:

$$I_m = \frac{\widetilde{I}_m}{1 + \tau \widetilde{I}_m} \quad (3.4)$$

onde τ é o tempo morto do detector, e assume-se que as intensidades medidas têm unidades de frequência [92]. Os tempos mortos dos detectores normalmente utilizados em espectrometria de massas são da ordem de dezenas de nanossegundos, o que faz com que este efeito seja pronunciado para intensidades maiores que 1 MHz.

Erro de atribuição de linha base Em uma situação ideal, o sinal registrado pelo sistema de aquisição do espectrômetro de massas deveria ser igual a zero quando não houvesse íons chegando ao

detector, porém isto nem sempre é conseguido. Detectores reais podem produzir pulsos espúrios devido a oscilações aleatórias do próprio detector e das condições do ambiente em que ele está imerso. Estes pulsos podem ser reconhecidos pela eletrônica de contagem como eventos legítimos, o que faz com que seja registrado um sinal residual, mesmo na ausência de íons. Já no modo analógico de medida de corrente, onde o sinal registrado é simplesmente a saída de algum tipo de circuito de conversão corrente-tensão, o zero de sinal é simplesmente um valor de tensão sem nenhum significado especial³. De um jeito ou de outro, este sinal residual deve ser subtraído cuidadosamente das intensidades medidas para que se obtenha o sinal verdadeiro, e as razões isotópicas medidas não sejam deturpadas.

Neste estudo, verificou-se qual é o efeito sobre os resultados do método Z de um erro de atribuição de linha base, isto é, da adição de uma constante a todos os picos de um *cluster* espectral.

Falta de resolução Para o método Z, os espectros de massas são simples listas de intensidades medidas em canais de massa adequados para os isotopômeros do íon molecular em questão. A forma dos picos do espectro de massas não é relevante, contanto que os canais monitorados não sofram interferência significativa das caudas dos picos vizinhos, isto é, que a resolução do espectrômetro de massas seja suficiente para separar completamente os diferentes isotopômeros do íon de interesse.

Neste estudo, verificou-se qual é o efeito sobre os resultados do método Z da falta de resolução espectral. Para tanto, assumiu-se que os picos do espectro de massas são gaussianas centradas nas massas nominais dos mesmos e que o sinal registrado é uma combinação linear dessas gaussianas ponderada pelas intensidades nominais dos picos.

$$I(m) = \sum_i \tilde{I}_i e^{-\frac{(m-m_i)^2}{2\sigma^2}} \quad (3.5)$$

onde $\tilde{I}_i$ é a intensidade verdadeira do pico de índice i e m_i é a sua massa. Os números fornecidos como espectro ao método Z são obtidos integrando numericamente esta função em janelas de uma largura δm centradas nas massas nominais dos picos:

$$I_i = \int_{m_i-\delta m/2}^{m_i+\delta m/2} I(m) dm = \sqrt{\frac{\pi}{2}} \sigma \sum_j \tilde{I}_j \left\{ \operatorname{erf} \left[\frac{m_i - m_j + \frac{\delta m}{2}}{\sqrt{2}\sigma} \right] - \operatorname{erf} \left[\frac{m_i - m_j - \frac{\delta m}{2}}{\sqrt{2}\sigma} \right] \right\} \quad (3.6)$$

³Em particular, nos espectrômetros de massas mais antigos havia alguma liberdade para alteração deste valor pelo usuário.

onde o índice j corre sobre todos os picos do espectro e $\text{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-u^2} du$.

3.2 Fórmulas contendo apenas o elemento de interesse

Os estudos nesta parte envolvem íons moleculares hipotéticos de fórmula geral A_p , isto é, contendo apenas o elemento de interesse A. Por sua vez, o elemento A modelado possui apenas dois isótopos separados por uma unidade de massa: ${}^m\text{A}$ e ${}^{m+1}\text{A}$. Do ponto de vista do padrão isotopomérico, esta classe de íons moleculares engloba, não apenas aqueles contendo somente o elemento de interesse, mas também aqueles que possuem outros elementos mono-isotópicos além do de interesse.

O único parâmetro ajustado pelo método Z em todas as regressões realizadas nestes estudos foi a abundância do isótopo mais leve (${}^m\text{A}$) do elemento A. A abundância do isótopo ${}^{m+1}\text{A}$ é dada pela condição de normalização do padrão isotópico. Entretanto, para a geração dos gráficos, foi utilizada a razão entre as abundâncias dos isótopos ${}^m\text{A}$ e ${}^{m+1}\text{A}$, isto é, a razão isotópica do elemento A, pois esta grandeza é a mais comumente determinada em análises isotópicas.

Ruído As figuras 3.1, 3.2 e 3.3 contêm o desvio padrão relativo da razão isotópica ajustada do elemento A em função da abundância verdadeira do isótopo ${}^m\text{A}$ para moléculas de fórmula A_p com p igual a 1, 2, 4 e 8. Cada ponto dos gráficos foi calculado através da equação 3.2 utilizando séries de Monte Carlo de 1000 pontos cada.

Nas figuras 3.1 e 3.2, o ruído simulado foi amostrado de uma distribuição normal de probabilidades. A diferença entre elas é que, enquanto na figura 3.1 (dados homoscedásticos) o ruído de todos os picos foi amostrado de uma mesma distribuição com desvio padrão igual a 0,001, na figura 3.2 o ruído de cada pico foi amostrado de uma distribuição diferente, com desvio padrão igual a 0,1% da intensidade do pico. Em ambos os casos, para todos os números de fórmula e abundâncias verdadeiras, os espectros verdadeiros (aqueles aos quais foi adicionado o ruído para as simulações de Monte Carlo) foram normalizados de modo que os seus picos base tivessem intensidades iguais a 1.

Quando os dados são homoscedásticos (figura 3.1), observa-se que as medidas de razões isotópicas são tanto menos precisas, quanto próxima dos extremos (1 e 0) é a abundância verdadeira do isótopo ${}^m\text{A}$, isto é, quando o elemento A é quase mono-isotópico. Para o caso $p = 1$ (íon elementar), isto

pode ser entendido facilmente. Neste caso, a razão isotópica é simplesmente a razão entre as intensidades registradas nos canais correspondentes aos isótopos ${}^m\text{A}$ e ${}^{m+1}\text{A}$, aqui chamados de I_m e I_{m+1} respectivamente. Considerando-se que os ruídos de ambas essas intensidades são amostrados de uma distribuição normal de média zero e desvio padrão σ , pode-se calcular analiticamente uma estimativa para o desvio padrão da razão isotópica:

$$\sigma_r = \sigma \left[\left(\frac{\partial r}{\partial I_m} \right)^2 + \left(\frac{\partial r}{\partial I_{m+1}} \right)^2 \right]^{1/2} = \sigma \left[\frac{1}{I_{m+1}^2} + \frac{I_m^2}{I_{m+1}^4} \right]^{1/2}$$

Portanto, o desvio padrão relativo da razão isotópica é:

$$\sigma_r^{\text{rel}} = \frac{\sigma_r}{r} = \sigma \left(\frac{1}{I_m^2} + \frac{1}{I_{m+1}^2} \right)$$

Ou seja, para dados homoscedásticos, o desvio padrão relativo da razão isotópica vai a infinito à medida que o elemento torna-se mono-isotópico, sendo mínimo quando seu padrão isotópico é 1:1. O mesmo comportamento é observado na figura 3.1 para números de fórmula maiores que 1, entretanto, observa-se que as razões obtidas são sistematicamente tanto mais precisas, quanto maior for o número de instâncias do elemento de interesse no íon molecular analisado. Isto, apesar do fator de $\sqrt{\frac{n}{n_0}}$ multiplicado aos desvios padrões estimados para simular um tempo finito de aquisição⁴.

No caso dos dados heteroscedásticos (figura 3.2), para íons elementares ($p = 1$), observa-se que o desvio padrão relativo da razão isotópica calculada é independente da abundância verdadeira do isótopo ${}^m\text{A}$ (abscissas do gráfico). Aplicando raciocínio semelhante ao usado na interpretação do comportamento dos dados homoscedásticos, conclui-se que o desvio padrão relativo da razão isotópica ajustada deve ser igual a $\sqrt{2}\sigma^{\text{rel}}$, onde σ^{rel} é o desvio padrão relativo das intensidades. Já quando $p > 1$, observam-se desvios padrões relativos maiores que os obtidos com $p = 1$ nas extremidades, porém menores no centro. Observando cuidadosamente os valores para os quais os desvios padrões relativos obtidos com $p > 1$ tendem nos dois extremos do gráfico, percebe-se que eles são aproximadamente iguais ao obtido com $p = 1$ multiplicados por $\sqrt{(p+1)/2}$, isto é, o fator de $\sqrt{n/n_0}$ usado para considerar o tempo finito de medida. Por outro lado, na região central do gráfico observa-se um ganho de precisão quando íons poli-atômicos são usados, apesar do mesmo fator ainda estar sendo multiplicado.

⁴Vide seção 3, página 39 e o apêndice B para maiores detalhes sobre este fator.

Na figura 3.3, foram plotados também desvios padrões relativos por mil da razão isotópica ajustada, calculados através da equação 3.2 sobre séries de Monte Carlo de 1000 pontos. Entretanto, a intensidade de cada pico simulado é amostrada de uma distribuição de Poisson cuja média é igual a 10^6 vezes a intensidade nominal do mesmo⁵. Neste caso, observa-se um comportamento parecido com o obtido no caso dos dados normais homoscedásticos. De fato, seria de se esperar que os resultados obtidos com dados com estatística de Poisson fossem intermediários aos normais homo e heteroscedásticos.

A conclusão que os estudos acima sugerem é que as análises isotópicas através de íons moleculares contendo múltiplas instâncias do elemento de interesse não podem ser consideradas desvantajosas em relação às tradicionais *a priori*. Na verdade, em muitos casos, ao contrário do que o senso comum possa sugerir, observa-se um ganho de precisão quando se trabalha com íons mais complexos, apesar de o número de picos que têm de ser monitorados ser tanto maior quanto maior for o número de fórmula do elemento de interesse.

Discriminação instrumental de massas Os efeitos da discriminação instrumental de massas sobre os resultados do método Z foram estudados transformando cada pico de cada espectro através da equação 3.3 (página 42). A constante α utilizada neste modelo exponencial de discriminação foi $9,95 \cdot 10^{-3}$, o que corresponde a um aumento de sensibilidade do espectrômetro de massas de aproximadamente 1% por unidade de m/z . O valor m_0 tomado como referência para todos os espectros foi a massa do isotopômero mais leve da molécula⁶.

Foi obtido um δr (equação 3.1, página 39) igual a $-9,901$ por mil para todos os números de fórmula e para todas as abundâncias verdadeiras. Para o caso $p = 1$, pode-se calcular analiticamente o valor de δr esperado isto é feito transformando as intensidades I_m e I_{m+1} , correspondentes aos isótopos ^mA e ^{m+1}A respectivamente, através da equação 3.3, que descreve o modelo de discriminação instrumental de massa:

$$\delta r = \frac{\frac{I_m e^{\alpha(m-m_0)}}{I_{m+1} e^{\alpha(m+1-m_0)}} - r_0}{r_0} = \frac{r_0 e^{-\alpha} - r_0}{r_0} = -9,901 \cdot 10^{-3} \quad (3.7)$$

⁵No caso dos sinais amostrados de distribuições normais, a média (intensidade nominal) e o desvio padrão (ruído) podem ser determinados independentemente, de modo que, uma vez escolhida a faixa de intensidade do sinal (no nosso caso, ela é dada pela normalização para pico base igual a 1), escolhe-se um desvio padrão adequado para se obter uma certa relação sinal/ruído, que é o que vai afetar a precisão dos resultados. No caso da distribuição de Poisson, a relação sinal/ruído é determinada pelo seu único parâmetro: a média. Desse modo, para que a relação sinal/ruído dos dados simulados com estatística de Poisson assumisse um valor comparável aos que são normalmente encontrados em experimentos reais, foram passadas como médias para o gerador de números pseudo-aleatórios as intensidades nominais multiplicadas por 10^6 . Por este motivo, os desvios plotados na figura 3.3 são tão diferentes dos plotados nas figuras 3.1 e 3.2.

⁶ $m \cdot p$, onde m é a massa do isótopo mais leve do elemento A e p é o número de fórmula. Vide página 44.

Figura 3.1: Desvio padrão relativo (por mil) da razão isotópica ajustada como função da abundância verdadeira do isótopo $^m A$ para moléculas de fórmula A_p , com diferentes valores de p . Dados homoscedásticos.

Cada ponto foi calculado a partir de 1000 espectros simulados considerando que cada intensidade de pico foi amostrada de uma distribuição normal independente com desvio padrão igual a 0,1% da intensidade do pico-base do espectro.

Figura 3.2: Desvio padrão relativo (por mil) da razão isotópica ajustada como função da abundância verdadeira do isótopo $^m A$ para moléculas de fórmula A_p , com diferentes valores de p . Dados heteroscedásticos.

Cada ponto foi calculado a partir de 1000 espectros simulados considerando que cada intensidade de pico foi amostrada de uma distribuição normal independente com desvio padrão igual a 0,1% da intensidade nominal do próprio pico.

Figura 3.3: Desvio padrão relativo (por mil) da razão isotópica ajustada como função da abundância verdadeira do isótopo $^m A$ para moléculas de fórmula A_p , com diferentes valores de p . Dados com distribuição de Poisson.

Cada ponto foi calculado a partir de 1000 espectros simulados considerando que cada intensidade de pico foi amostrada de uma distribuição de Poisson de média igual a $1,0 \cdot 10^6$ vezes a intensidade nominal do próprio pico.

O curioso é observar que o efeito da discriminação instrumental de massas sobre a exatidão do resultado é independente, tanto da fórmula, quanto do padrão isotópico verdadeiro. Intuitivamente, talvez o contrário fosse esperado: pelo fato de os espectros das moléculas maiores abrangerem faixas de m/z maiores, talvez fosse de se esperar que eles também fossem mais afetados pela discriminação instrumental de massas.

Na verdade, esta observação sugere que, do ponto de vista da discriminação de massas, há vantagens em se trabalhar com íons poli-atômicos. Isto deve-se ao fato de que, se por um lado o efeito da deformação por discriminação de massas sobre os resultados do método Z é independente da fórmula, por outro lado, estudos experimentais mostram que a discriminação de massas tende a diminuir com o aumento da massa dos íons [92].

Não-linearidade de detecção Semelhantemente ao que foi feito no estudo sobre os efeitos da discriminação instrumental de massas sobre os resultados do método Z, para a caracterização do comportamento dos mesmos em relação à não-linearidade de detecção, os espectros perfeitos simulados foram deformados segundo a equação 3.4 (página 42). Desta vez, entretanto, a alteração sofrida por cada pico não é função da sua massa, mas da sua intensidade. Dentro da normalização de intensidades unitárias para os picos base dos espectros, utilizou-se um tempo morto $\tau = 0,03$ [tempo]⁷.

Observa-se que os desvios da razão obtida em relação à esperada são, em valores absolutos, máximos quando o elemento A é quase mono-isotópico. No caso de $p = 1$, este comportamento é razoavelmente intuitivo: como a modificação sofrida por cada pico é função apenas da sua intensidade, quanto mais uniformes as intensidades dos picos do espectro, menor é a deformação global sofrida por ele. Quando os dois picos são iguais (razão esperada igual a 1), ambos são modificados na mesma extensão e, conseqüentemente, não há deformação alguma. Para $p = 1$, é fácil deduzir a expressão analítica para o desvio da razão isotópica em função da abundância verdadeira, mas isto não trará grandes contribuições.

Entretanto, examinando as curvas para $p > 1$, observa-se um comportamento que não é tão intuitivo assim: quanto maior o valor de p , mais largo é o patamar onde o desvio é próximo de zero. Ou seja, quanto maior for p , menos sensíveis aos efeitos do tempo morto são as razões isotópicas obtidas. Intuitivamente, alguém poderia pensar que, como a complexidade do espectro aumenta com p , também

⁷Isto equivale a, por exemplo, um tempo morto de 30 ns quando a intensidade do pico base é 1 MHz. Na verdade, o que importa é o produto $\tau \cdot I_{\text{pico base}}$.

Figura 3.4: Efeito do tempo morto do detector sobre a razão isotópica ajustada para fórmulas A_p . Espectros normalizados para intensidade de pico-base igual a 1 e $\tau = 0,03$ [unidade de tempo].

aumentaria a deformação global sofrida por ele em virtude da não linearidade e, conseqüentemente, também aumentaria o erro da razão isotópica ajustada. Na prática, observa-se exatamente o contrário.

Má compensação de linha base Na figura 3.5 estão plotados os desvios da razão isotópica ajustada em função da abundância verdadeira do isótopo $^m A$ e do número de fórmula p . Dentro da normalização de intensidade de pico base igual a 1, foi somada a cada pico de cada espectro simulado uma constante de valor igual a 0,01, isto é, 1% da intensidade do pico base.

Nos extremos do gráfico, isto é, quando o elemento A é aproximadamente mono-isotópico observa-se, em valor absoluto, um maior efeito do deslocamento de linha base sobre a razão isotópica ajustada. Na região central, os efeitos do erro de atribuição de linha base sobre a razão isotópica são menores. Para o caso $p = 1$, a explicação é simples: como trata-se de um efeito dependente da intensidade, quanto mais homogêneas forem as intensidades do espectro, menor será a deformação sofrida por ele. Aqui, isto não é tão evidente quanto no caso da não-linearidade de detecção, mas também é observado: os desvios das razões isotópicas ajustadas em relação às esperadas são, em valores absolutos, tanto

Figura 3.5: Efeito do erro de atribuição de linha base sobre a razão isotópica ajustada para fórmulas A_p . Espectros normalizados para intensidade de pico-base igual a 1 e *offset* de linha base igual a 0,01.

menores quanto maior é o número de fórmula. A conclusão a que se chega é que o aumento do número de fórmula do elemento de interesse aumenta a robustez da determinação de razão isotópica a erros de atribuição de linha base.

Falta de resolução A figura 3.6 contém os desvios relativos da razão isotópica ajustada em relação aos valores esperados para diferentes abundâncias verdadeiras do isótopo $^m A$ e diferentes números de fórmula p quando os espectros fornecidos como entrada para o método Z são afetados por falta de resolução de m/z . Isto foi simulado dando aos picos espectrais formas de gaussianas centradas nas suas respectivas massas nominais e cujas alturas são iguais às suas respectivas intensidades nominais (equação 3.5, página 43). O desvio padrão usado para as gaussianas é igual a 0,25 e a largura da janela de integração usada na equação 3.6 é $\delta m = 0,2$. A figura 3.6 mostra também um exemplo de espectro contínuo com esta forma de pico.

O resultado obtido neste caso é semelhante aos obtidos nos casos da não-linearidade de detecção e do erro de compensação de linha base. Novamente, nas situações em que o elemento A é quase

Figura 3.6: Efeito da falta de resolução sobre a razão isotópica ajustada para fórmulas A_p . O gráfico menor mostra o espectro simulado para a fórmula A_5 e abundância de ${}^m A$ igual a 0,8.

mono-isotópico observa-se um maior efeito da falta de resolução sobre as razões isotópicas obtidas. Na região central do gráfico, onde a abundância relativa do isótopo ${}^m A$ é aproximadamente igual a 0,5, observa-se um menor efeito da não-idealidade sobre a razão isotópica. A explicação para este comportamento no caso $p = 1$ é igual à dada quando se estava avaliando os efeitos da não-linearidade e da linha base.

Novamente, observa-se um sutil aumento de robustez das razões isotópicas ajustadas perante a falta de resolução com o aumento do número de fórmula, o que sugere que, também tendo em vista esta fonte de erro sistemático, pode ser vantajoso trabalhar com íons moleculares contendo um número maior de instâncias do elemento de interesse.

3.3 Fórmulas contendo o elemento de interesse e um outro

Nesta parte, foram realizados estudos semelhantes aos apresentados na parte anterior, porém utilizando íons moleculares de fórmula geral A_pX_q , onde A é o elemento de interesse e X é um outro elemento poli-isotópico. Desta vez, no entanto, o elemento A possui dois isótopos separados por duas unidades de massa (^mA e ^{m+2}A), e é o elemento X que tem dois isótopos separados por apenas uma unidade de massa ($^{m'}\text{X}$ e $^{m'+1}\text{X}$). Este tipo de molécula tem uma importância prática um pouco maior do que as apresentadas na seção anterior. Nestes exemplos, é possível pensar no elemento X como um tipo de “cola” entre múltiplas instâncias do elemento de interesse. Por exemplo, não é possível obter íons moleculares de fórmula Cl_n . Entretanto, é possível obter espectros de massas de hidrocarbonetos policlorados, onde o carbono e o hidrogênio fariam o papel do elemento X.

Foram simulados espectros de íons de fórmulas AX , AX_5 , A_5X e A_5X_5 com diferentes abundâncias verdadeiras para os isótopos ^mA e $^{m'}\text{X}$. Estes espectros foram deformados segundo os modelos assumidos para as diferentes não idealidades experimentais consideradas e o método Z foi aplicado a eles. Ambos os padrões isotópicos (dos elementos A e X) foram ajustados simultaneamente em cada regressão. No caso das não idealidades determinísticas, foram calculados os desvios dos resultados obtidos em relação aos esperados na forma de δr por mil, de acordo com a equação 3.1 (página 39). No caso dos erros aleatórios, foram calculados desvios padrões relativos por mil das razões isotópicas através do método de Monte Carlo, de acordo com a equação 3.2 (página 39)⁸.

Ruído A figura 3.7 contém os desvios padrões relativos (por mil) da razão isotópica ajustada para o elemento A calculados com base em corridas de Monte Carlo de 1000 pontos através da equação 3.2 (página 39). Nesta figura, foram considerados dados homoscedásticos, isto é, o ruído aplicado a cada pico de cada espectro foi amostrado de uma distribuição normal de probabilidades de média 0 e desvio padrão 0,001⁹.

Nos casos em que o número de fórmula do elemento X (q) é igual a 1 (AX e A_5X), o resultado é muito parecido com o obtido no caso em que só havia o elemento A (figura 3.1, página 47). Na verdade, se se caminhar sobre esses dois mapas em uma linha horizontal, isto é, mantendo a abundância verdadeira

⁸Neste caso, o valor de n_0 no fator que leva em conta o tempo fi nito de aquisição de dados é igual a 2, assim como no caso mono-elementar. Da mesma forma que lá, o elemento A sozinho é tomado como referência.

⁹Lembrar que cada espectro não perturbado é normalizado para que a intensidade do seu pico base seja igual a 1, o que faz com que o ruído seja igual a 1% do seu pico base.

do isótopo ${}^{m'}X$ constante, obtém-se um perfil semelhante ao observado no caso mono-elementar. Comparando estes dois casos, observa-se que a “planície” do mapa de A_5X é mais ampla do que a do mapa de AX , o que mostra que, assim como no caso mono-elementar, o aumento do número de instâncias do elemento de interesse no íon molecular analisado melhora a precisão dos resultados quando os dados são homoscedásticos.

Por outro lado, observando os resultados obtidos com íons de fórmulas AX_5 e A_5X_5 , percebe-se que a presença de múltiplas instâncias do elemento X degrada os resultados quando o mesmo é isotopicamente complexo ($0,2 \leq {}^{m'}X \leq 0,8$). Quando o elemento X é quase mono-isotópico, perfis semelhantes aos observados no caso mono-elementar (figura 3.1, página 47) são obtidos. É interessante notar que as regiões de baixo erro nas partes superior e inferior desses mapas são mais amplas no caso AX_5 do que no caso A_5X_5 , o que mostra que o aumento do número de fórmula do elemento de interesse é vantajoso também neste caso.

Os resultados apresentados na figura 3.8 foram obtidos da mesma maneira que os da figura 3.7, porém com dados heteroscedásticos, isto é, os erros aplicados a cada pico foram amostrados de distribuições normais diferentes, com média zero e desvio padrão igual a 0,1% da intensidade nominal do pico em questão. As observações feitas para os dados homoscedásticos também se aplicam aqui: quando o elemento X é quase mono-isotópico, reproduzem-se os perfis observados no caso mono-elementar (figura 3.2, página 48); mesmo para o caso A_5X_5 , com X isotopicamente não muito complexo (${}^{m'}X < 0,2$ ou ${}^{m'}X > 0,8$), os perfis obtidos são semelhantes aos do caso mono-elementar com $p > 1$. A presença de múltiplas instâncias do elemento X quando este é isotopicamente complexo ($0,2 \leq {}^{m'}X \leq 0,8$) degrada os resultados (região central dos mapas).

Na figura 3.9, estão os desvios padrões relativos por mil das razões isotópicas ajustadas quando os picos dos espectros simulados são amostrados de distribuições de Poisson cujos valores esperados são as intensidades nominais dos respectivos picos multiplicadas por 10^6 ¹⁰. Assim como fora observado na seção anterior, em relação à forma, os resultados obtidos com dados com estatística de Poisson são intermediários aos obtidos com dados normais homo e heteroscedásticos. As mesmas observações que foram feitas nos parágrafos acima são válidas aqui.

As conclusões a que esses estudos permitem chegar são: (1) os resultados tendem a melhorar com o aumento de p – número de fórmula de A , elemento de interesse; (2) a presença de múltiplas ins-

¹⁰Veja a nota de rodapé 5 (página 46) para uma justificativa para este número.

tâncias do elemento X, quando este é isotopicamente rico ($0,2 \leq {}^{m'}X \leq 0,8$), pode ser degenerativa. Entretanto, quando este último é quase mono-isotópico, a sua presença não traz prejuízos à precisão da razão isotópica ajustada.

Discriminação instrumental de massas A discriminação instrumental de massas foi simulada deformando os espectros verdadeiros através da equação 3.3 (página 42), utilizando uma constante de discriminação de massas $\alpha = 9,95 \cdot 10^{-3}$, a mesma utilizada no caso dos íons mono-elementares.

O desvio relativo da razão isotópica do elemento A ajustada em relação à esperada foi igual a $-19,704$ por mil para todas as abundâncias esperadas dos isótopos ${}^m A$ e ${}^{m'} X$ e para todas as fórmulas consideradas. Este resultado é equivalente ao obtido nos estudos com íons mono-elementares. O fato do desvio da razão isotópica do elemento A ser maior (em valor absoluto) aqui do que no caso mono-elementar é devido ao fato de os dois isótopos do mesmo serem separados por duas unidades de massa. Este é o mesmo valor de δr que seria obtido no caso de uma determinação da razão isotópica do elemento A através do seu íon elementar nessas condições de discriminação instrumental de massa¹¹. Para a razão isotópica do elemento X, cujos isótopos são separados por apenas uma unidade de massa, obteve-se um desvio igual a $-9,901$, igual ao obtido no caso mono-elementar para o elemento A.

Estes estudos mostram que, mesmo no caso em que há mais de um elemento poli-isotópico na fórmula do íon molecular de interesse, a sensibilidade da determinação da razão isotópica à discriminação instrumental de massas é independente dos números de fórmula e dos padrões isotópicos dos componentes, dependendo apenas da diferença das massas dos isótopos do elemento de interesse.

Não-linearidade de detecção Da mesma forma que no caso mono-elementar, os espectros simulados foram normalizados para que as intensidades dos seus picos base fossem iguais a 1 e o tempo morto do detector utilizado na equação 3.4 (página 42) foi igual a 0,03 [tempo]. A figura 3.10 mostra na forma de mapas de contornos os valores absolutos dos desvios relativos por mil da razão isotópica calculada em relação à esperada para diferentes abundâncias verdadeiras dos isótopos ${}^m A$ (eixo x) e ${}^{m'} X$ (eixo y).

¹¹Isto pode ser facilmente verificado adaptando a equação 3.7 (página 46) para o caso de um elemento cujos isótopos são separados por duas unidades de massa.

Figura 3.7: Desvio padrão relativo (por mil) da razão isotópica ajustada como função das abundâncias verdadeiras dos isótopos ^mA e $^{m'}\text{X}$ para moléculas de fórmula A_pX_q . Dados homoscedásticos. Cada ponto foi calculado a partir de 1000 espectros simulados considerando que cada intensidade de pico foi amostrada de uma distribuição normal independente com desvio padrão igual a 0,1% da intensidade do pico-base do espectro.

Figura 3.8: Desvio padrão relativo (por mil) da razão isotópica ajustada como função das abundâncias verdadeiras dos isótopos ^mA e $^{m'}\text{X}$ para moléculas de fórmula A_pX_q . Dados heteroscedásticos. Cada ponto foi calculado a partir de 1000 espectros simulados considerando que cada intensidade de pico foi amostrada de uma distribuição normal independente com desvio padrão igual a 0,1% da intensidade nominal do próprio pico.

Figura 3.9: Desvio padrão relativo (por mil) da razão isotópica ajustada como função das abundâncias verdadeiras dos isótopos ^mA e $^{m'}\text{X}$ para moléculas de fórmula A_pX_q . Dados com distribuição de Poisson.

Cada ponto foi calculado a partir de 1000 espectros simulados considerando que cada intensidade de pico foi amostrada de uma distribuição de Poisson de média igual a $1,0 \cdot 10^6$ vezes a intensidade nominal do próprio pico.

Em todos os mapas, nas situações em que o elemento X é quase mono-isotópico (partes superior e inferior dos mapas), o perfil horizontal aproxima-se continuamente do obtido no caso mono-elementar (figura 3.4, página 51). Em particular, observa-se o mesmo tipo de dependência em relação ao número de fórmula do elemento A, isto é, um alargamento da faixa de abundâncias verdadeiras do isótopo ${}^m\text{A}$ onde o efeito da não linearidade de detecção sobre a razão isotópica obtida é pequeno. Por outro lado, o aumento do número de fórmula do elemento X degrada os resultados significativamente apenas quando este é isotopicamente rico ($0,2 \leq {}^{m'}\text{X} \leq 0,8$).

Má compensação de linha base A figura 3.11 contém mapas de contornos dos valores absolutos dos desvios relativos por mil das razões isotópicas ajustadas para o elemento A em relação aos seus valores esperados quando os espectros são afetados por um erro de atribuição da linha base. Os espectros foram normalizados para que os seus picos base tivessem intensidades iguais a 1 e a constante somada a cada pico foi igual a 0,01, isto é, 1% da intensidade do pico base. Os eixos x e y contêm as abundâncias verdadeiras dos isótopos ${}^m\text{A}$ e ${}^{m'}\text{X}$ respectivamente.

Novamente, quando o elemento X tende a ser mono-isotópico, os perfis observados caminhando na direção horizontal nos mapas aproximam-se daqueles encontrados no caso mono-isotópico (figura 3.5, página 52), o que atesta a consistência destes estudos. O aumento do número de fórmula do elemento X aumenta o erro sistemático da razão isotópica ajustada quando ele é isotopicamente rico ($0,2 \leq {}^{m'}\text{X} \leq 0,8$), o que pode ser observado pelas regiões centrais dos mapas obtidos com as fórmulas AX_5 e A_5X_5 . Por outro lado, o aumento do número de fórmula do elemento A aumenta a área da região de abundâncias isotópicas onde o erro da razão ajustada é baixo¹².

Falta de resolução A figura 3.12 contém mapas de contornos dos valores absolutos dos desvios relativos por mil das razões isotópicas ajustadas em relação aos seus valores esperados quando os espectros são afetados por falta de resolução. A função de forma de pico utilizada foi a mesma dos estudos com espécies mono-elementares (equação 3.5, página 43), com $\sigma = 0,25$ e uma janela de integração com largura $\delta m = 0,2$.

As observações que podem ser feitas neste caso são essencialmente as mesmas que foram feitas na interpretação dos desvios observados na presença de não-linearidade do sistema de detecção e erro de

¹²Toda a faixa central dos mapas das fórmulas AX e A_5X e as regiões onde ${}^{m'}\text{X} < 0,2$ ou ${}^{m'}\text{X} > 0,8$ dos mapas das fórmulas AX_5 e A_5X_5 .

Figura 3.11: Efeito erro de atribuição de linha base sobre a razão isotópica ajustada para fórmulas A_pX_q . Espectros normalizados para intensidade de pico-base igual a 1 e *offset* de linha base igual a 0,01.

As curvas de nível indicam os valores de δr calculados (vide equação 3.1, página 39).

atribuição de linha base: (1) quando o elemento X é aproximadamente mono-isotópico, obtêm-se perfis horizontais semelhantes aos obtidos no caso mono-elementar; (2) o aumento do número de fórmula do elemento X deteriora os resultados somente quando este é isotopicamente rico ($0,2 \leq {}^m\text{X} \leq 0,8$); (3) o aumento do número de fórmula do elemento A amplia a gama de abundâncias isotópicas verdadeiras para as quais o erro introduzido na razão ajustada pela falta de resolução é pequeno.

Figura 3.12: Efeito da falta de resolução sobre a razão isotópica ajustada para fórmulas A_pX_q . Picos gaussianos com $\sigma = 0,25$ u e $\delta m = 0,1$ u (vide equação 3.6, página 43). As curvas de nível indicam os valores de δr calculados (vide equação 3.1, página 39).

3.4 Estudo de caso: C₆₀

Conforme já fora citado previamente (página 28), não é necessário o espectro de massas completo do íon para que o método Z possa ser aplicado. A implementação permite que se faça a regressão utilizando apenas um subconjunto dos picos do espectro, desde que estes sejam corretamente localizados. Nos estudos experimentais do capítulo 4, este recurso foi usado intensamente.

Nesta seção são apresentados alguns resultados da aplicação do método Z a espectros simulados de um caso extremo: um íon composto por 60 átomos de carbono. O espectro completo de um C₆₀ tem 61 picos, mas nem todos são necessários para a regressão. Os efeitos do tamanho do subconjunto dos picos usado na regressão sobre os resultados e as suas figuras de mérito perante imperfeições experimentais foram explorados. Para efeito de comparação, as mesmas figuras de mérito previstas para o caso em que a razão ¹²C/¹³C é obtida através de um íon elementar de C também são apresentados.

Os cenários de aplicação do método Z considerados são: (1) todos os picos são usados na regressão, (2) apenas os 8 primeiros picos são usados na regressão e (3) apenas os dois primeiros picos são usados na regressão. A tabela 3.1 contém os resultados destes estudos. Os números lá apresentados são desvios padrões relativos por mil para as não-idealidades aleatórias e desvios relativos por mil em relação ao valor esperado para as razões isotópicas ¹²C/¹³C ajustadas.

As não-idealidades consideradas foram ruído (normal, com dados homo e heteroscedásticos), discriminação instrumental de massas, não-linearidade de detecção, má compensação de linha base e falta de resolução. Os modelos assumidos para estas não-idealidades são discutidos na seção 3.1 (página 40). Os parâmetros utilizados nestes modelos são:

Ruído normal (dados homoscedásticos): desvio padrão uniforme e igual a 0,1% da intensidade do pico base de cada espectro.

Ruído normal (dados heteroscedásticos): desvio padrão de cada pico igual a 0,1% da intensidade do mesmo

Discriminação instrumental de massas: $\alpha = 9,95 \cdot 10^{-3}$ na equação 3.3 (página 42).

Não-linearidade de detecção: $\tau = 0,03$ [tempo] na equação 3.4 (página 42) com os espectros normalizados para que a intensidade de cada pico base fosse igual a 1.

Má compensação de linha base: Constante somada a todos os picos de todos os espectros igual a 0,1% da intensidade do pico base.

Falta de resolução: equação $\sigma = 0,25$ u e uma janela de integração com largura $\delta m = 0,2$ u na equação 3.5 (página 43).

No caso da determinação da razão isotópica com base no espectro do íon elementar de C, no caso do ruído, calculou-se o desvio padrão da razão utilizando através de propagação convencional de erros, segundo a equação:

$$\sigma_{\text{razão}} = \left(\frac{\sigma_{12}^2}{I_{13}^2} + \frac{I_{12}^2 \sigma_{13}^2}{I_{13}^4} \right)^{1/2}$$

onde I_{12} e I_{13} são as intensidades nos canais de m/z iguais a 12 e 13 u, e σ_{12} e σ_{13} são os seus desvios padrões.

A tabela 3.1 contém os resultados de todos estes estudos. Quando as abordagens baseadas no C_{60} são comparadas entre si, observa-se que o caso 3 (apenas os dois primeiros picos usados na regressão) nunca tem um desempenho pior que os outros dois. A discriminação instrumental de massas tem o mesmo efeito sobre todos os casos. Por outro lado, comparando a abordagem baseada no C elementar com as que usam o C_{60} observa-se que estas últimas têm desempenho melhor que a primeira nos quesitos ruído (dados homoscedásticos), não-linearidade, linha base e resolução. Nota-se ainda que o caso 3 nunca é pior que o do carbono elementar.

Naturalmente, não se está sugerindo que análises isotópicas de C sejam feitas através da síntese de fulereno. Vários problemas práticos indo desde o procedimento de síntese até o método de ionização teriam que ser considerados em uma aplicação real. Nosso objetivo era apenas exemplificar o tipo de possibilidade aberta pelo método Z e mostrar que ele não tem nenhuma desvantagem intrínseca em relação aos métodos convencionais.

3.5 Fixando os padrões isotópicos dos átomos acompanhantes

Um cenário de aplicação bastante comum do método Z é na obtenção do padrão isotópico de um elemento de interesse a partir do espectro de massas de um íon molecular contendo múltiplos elementos poli-isotópicos, porém assumindo-se conhecidos os padrões isotópicos destes últimos. Este tipo de

Tabela 3.1: Erros aleatórios e sistemáticos afetando a razão $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ obtida do espectro de massas de uma espécie hipotética C_{60} e de um íon elementar de C

Não-idealidades	Carbono Elementar	C_{60} (completo)	C_{60} (8 primeiros)	C_{60} (2 primeiros)
Ruído (homoscedástico)	17	1,5	0,53	0,32
Ruído (heteroscedástico)	0,26	1,0	0,37	0,26
Discriminação de massas	-9,9	-9,9	-9,9	-9,9
Não-linearidade	-29	-10	-10	-9,7
linha base	-467	-12	-12	-4,9
Falta de resolução	-42	-0,60	-0,60	-0,58

correção é freqüentemente empregado manualmente na obtenção de razões isotópicas de B através dos Cs_2BO_2^+ com ionização térmica, por exemplo, ou na determinação de razões isotópicas $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ através do íon CO_2^+ . A diferença é que, através do método Z, a compensação pode ser feita de uma maneira totalmente genérica para qualquer fórmula elementar.

Nesta seção, são reportados estudos semelhantes aos apresentados na seção 3.3 (páginas 54 a 65). São simulados os espectros de íons moleculares de fórmulas A_pX_q onde A é o elemento de interesse e X é um outro elemento poli-isotópico. O elemento A possui dois isótopos separados por duas unidades de massa (^mA e ^{m+2}A), e o elemento X tem dois isótopos separados por apenas uma unidade de massa ($^{m'}\text{X}$ e $^{m'+1}\text{X}$). Nestes estudos, porém, o padrão isotópico do elemento X é mantido fixo na regressão.

Foram simulados espectros de íons de fórmulas AX , AX_5 , A_5X e A_5X_5 com diferentes abundâncias verdadeiras para os isótopos ^mA e $^{m'}\text{X}$. Estes espectros foram deformados segundo os modelos assumidos para as diferentes não idealidades experimentais consideradas e o método Z foi aplicado a eles para ajustar o padrão isotópico do elemento A. No caso das não idealidades determinísticas, foram calculados os desvios dos resultados obtidos em relação aos esperados na forma de δr por mil, de acordo com a equação 3.1 (página 39). No caso dos erros aleatórios, foram calculados desvios padrões relativos por mil das razões isotópicas através do método de Monte Carlo, de acordo com a equação 3.2 (página 39).

Ruído A figura 3.13 contém os desvios padrões relativos (por mil) da razão isotópica ajustada para o elemento A calculados com base em corridas de Monte Carlo de 1000 pontos através da equação 3.2 (página 39). Nesta figura, foram considerados dados homoscedásticos, isto é, o ruído aplicado a cada pico de cada espectro foi amostrado de uma distribuição normal de probabilidades de média 0 e desvio padrão 0,001. Nestas regressões, o padrão isotópico do elemento X foi mantido fixo.

Nos casos AX e A_5X , os resultados são similares aos obtidos quando o padrão isotópico do elemento X também é variado (figura 3.7, página 57). Da mesma maneira que naquele caso, caminhando sobre uma linha horizontal do mapa obtêm-se perfis de desvios padrões semelhantes ao obtido com moléculas de fórmula A_p (figura 3.1, página 47) e, também aqui, o aumento do número de fórmula do elemento A tende a aumentar a planície central onde o desvio padrão da razão isotópica ajustada é baixo.

A diferença em relação ao caso em que os padrões isotópicos de ambos os elementos são ajustados é observada nos mapas para as moléculas de fórmula AX_5 e A_5X_5 . Ao contrário do que se observa na figura 3.7 (página 57), neste caso, o aumento do número de fórmula do elemento X não faz surgir no centro do mapa uma região de altos desvios padrões da razão isotópica ajustada. Isto sugere que, quando os padrões isotópicos dos elementos acompanhantes são assumidos constantes, ainda que estes elementos sejam isotopicamente complexos isto não afeta significativamente a qualidade dos resultados do método Z na presença de ruído homoscedástico.

Os resultados apresentados na figura 3.14 foram obtidos da mesma maneira que os da figura 3.13, porém com dados heteroscedásticos, isto é, os erros aplicados a cada pico foram amostrados de distribuições normais diferentes, com média zero e desvio padrão igual a 0,1% da intensidade nominal do pico em questão. As observações que podem ser feitas sobre estes resultados são semelhantes às feitas para o caso dos dados homoscedásticos: (1) para $q = 1$ (AX e A_5X), os resultados são semelhantes aos obtidos ajustando os padrões isotópicos de ambos os átomos (figura 3.8, página 58); (2) ao contrário do que se observou quando ambos os padrões isotópicos foram ajustados, aqui, para $q = 5$ (AX_5 e A_5X_5), não há uma região central de altos desvios padrões nos mapas. Isto mostra que, também na presença de ruído heteroscedástico, quando os padrões isotópicos dos átomos acompanhantes são mantidos fixos, os resultados não são prejudicados pelo aumento do número de instâncias destes elementos, mesmo quando estes são isotopicamente complexos.

Os dados com distribuição de Poisson foram simulados amostrando para cada pico de cada espectro números pseudo-aleatórios de uma distribuição de Poisson cuja média é igual à intensidade nominal do pico vezes 10^6 ¹³. As mesmas observações feitas a respeito dos casos dos dados normais homo e heteroscedásticos valem neste caso, inclusive com respeito à ausência das regiões centrais de altos desvios padrões para as fórmulas AX_5 e A_5X_5 .

¹³Veja a nota de rodapé 5 (página 46) para uma justificativa para este número.

A conclusão a que estes estudos permitem chegar é que, independentemente da complexidade isotópica do elemento acompanhante, quando o seu padrão isotópico é mantido fixo na regressão, a sensibilidade dos resultados do método Z ao ruído não é pesadamente alterada pelo aumento do seu número de fórmula. Este resultado é importante, pois este cenário de aplicação do método Z, em que os padrões isotópicos dos elementos acompanhantes não são ajustados, é um dos mais comuns na prática.

Discriminação instrumental de massas Deformando os espectros calculados através do modelo de discriminação instrumental de massas utilizado (equação 3.3, página 42) com constante $\alpha = 9,95 \cdot 10^{-3}$, obtêm-se resultados um pouco diferentes dos obtidos quando os padrões isotópicos de ambos os elementos foram liberados para variar. Para as fórmulas AX e A_5X , para todas as abundâncias verdadeiras dos isótopos $^m A$ e $^{m'} X$, obtêm-se desvios relativos por mil da razão isotópica calculada em relação ao seu valor esperado iguais a $-19,704$ por mil com pequenas variações da ordem de 10^{-5} em torno deste valor. Na verdade, era esperado que a quebra de simetria causada pelo fato de o padrão isotópico do elemento X ter sido mantido fixo fizesse com que o desvio relativo da razão isotópica ajustada para o elemento A se tornasse dependente das abundâncias verdadeiras. Entretanto, apenas uma instância do elemento X na fórmula não foi suficiente para tornar este efeito muito visível.

No caso das fórmulas AX_5 e A_5X_5 , observa-se uma variação significativa do desvio relativo da razão isotópica calculada para o elemento A com as abundâncias isotópicas verdadeiras. A figura 3.16 contém os mapas de curvas de nível dos valores absolutos destes desvios para as duas fórmulas. Observa-se que, na região em que $0,2 \leq ^{m'} X \leq 0,8$, os desvios relativos são, não apenas os maiores, mas também maximamente dependentes da abundância do isótopo $^m A$ (eixo x). Fora dessa região, o desvio relativo tende a se equilibrar próximo de 20 por mil, valor obtido nos estudos logo acima, com $q = 1$ e também quando se variavam ambos os padrões isotópicos (seção 3.3). Por outro lado, comparando os dois mapas da figura 3.16, observa-se que, quando o número de fórmula do elemento A é aumentado, os desvios diminuem em valor absoluto.

Não-linearidade de detecção A figura 3.17 contém mapas de contornos dos valores absolutos dos desvios relativos por mil da razão isotópica calculada em relação à esperada para diferentes abundâncias verdadeiras dos isótopos $^m A$ (eixo x) e $^{m'} X$ (eixo y). Os espectros simulados foram deformados

Figura 3.13: Desvio padrão relativo (por mil) da razão isotópica ajustada como função das abundâncias verdadeiras dos isótopos ${}^m\text{A}$ e ${}^{m'}\text{X}$ para moléculas de fórmula A_pX_q quando o padrão isotópico do elemento X é mantido fixo na regressão. Dados homoscedásticos.

Cada ponto foi calculado a partir de 1000 espectros simulados considerando que cada intensidade de pico foi amostrada de uma distribuição normal independente com desvio padrão igual a 0,1% da intensidade do pico-base do espectro.

Figura 3.14: Desvio padrão relativo (por mil) da razão isotópica ajustada como função das abundâncias verdadeiras dos isótopos ^mA e $^{m'}\text{X}$ para moléculas de fórmula A_pX_q quando o padrão isotópico do elemento X é mantido fixo na regressão. Dados heteroscedásticos.

Cada ponto foi calculado a partir de 1000 espectros simulados considerando que cada intensidade de pico foi amostrada de uma distribuição normal independente com desvio padrão igual a 0,1% da intensidade nominal do próprio pico.

Figura 3.15: Desvio padrão relativo (por mil) da razão isotópica ajustada como função das abundâncias verdadeiras dos isótopos ^mA e $^{m'}\text{X}$ para moléculas de fórmula A_pX_q quando o padrão isotópico do elemento X é mantido fixo na regressão. Dados com distribuição de Poisson.

Cada ponto foi calculado a partir de 1000 espectros simulados considerando que cada intensidade de pico foi amostrada de uma distribuição de Poisson de média igual a $1,0 \cdot 10^6$ vezes a intensidade nominal do próprio pico.

Figura 3.16: Efeito da discriminação instrumental de massas sobre a razão isotópica ajustada para fórmulas A_pX_q quando o padrão isotópico do elemento X é mantido fixo na regressão. As curvas de nível indicam os valores de δr calculados (vide equação 3.1, página 39).

segundo o modelo assumido para o efeito do tempo morto do detector (equação 3.4, página 42) com $\tau = 0,03$ [tempo].

Os mapas da primeira coluna (AX e A_5X) são muito parecidos com os correspondentes obtidos variando todos os padrões isotópicos (figura 3.10, página 61). Já quando o número de instâncias do elemento X na fórmula é maior, observam-se uma diferença entre os mapas mostrados aqui e os da seção 3.3: assim como no caso dos ruídos, não se observa a característica região central de grandes desvios observada quando todos os padrões isotópicos eram variados. Em particular, os dois mapas da segunda linha ($p = 5$) são muito parecidos um com o outro. No caso da primeira linha ($p = 1$), observa-se um aumento dos desvios próximo às bordas direita e esquerda na região central do eixo y. Isso é compatível com a observação que vem sendo feita de maneira geral para estes estudos com moléculas de fórmulas A_pX_q de que os resultados tendem a ser tanto melhores quanto maior for a relação p/q .

Má compensação de linha base Os mapas de contornos da figura 3.18 foram obtidos submetendo os espectros simulados das moléculas de fórmulas A_pX_q a um erro de compensação de linha base, isto é, foi somada uma constante igual a 1% da intensidade do seu pico base a cada espectro. As observações que podem ser feitas com base nestes resultados são semelhantes às que foram nos estudos anteriores em que o padrão isotópico do elemento X foi mantido fixo durante as regressões: (1) os resultados para as fórmulas AX e A_5X são semelhantes aos obtidos quando o padrão isotópico do elemento X também foi ajustado (figura 3.11, página 62); (2) para as fórmulas AX_5 e A_5X_5 , ao contrário do que tinha sido observado na seção 3.3, neste caso, não se observa a região central característica de altos desvios relativos. Na verdade, observando-se atentamente os mapas da figura 3.18, nota-se que o incremento do número de fórmula do elemento X induz apenas um leve aumento na curvatura das superfícies.

Falta de resolução A figura 3.19 contém mapas de contornos dos valores absolutos dos desvios relativos por mil das razões isotópicas ajustadas em relação aos seus valores esperados quando os espectros são afetados por falta de resolução. A função de forma de pico utilizada é dada pela equação 3.5 (página 43), com $\sigma = 0,25$ e uma janela de integração com largura $\delta m = 0,2$. Novamente, no caso dos dados afetados por falta de resolução, a principal diferença observada entre os resultados obtidos variando (figura 3.12, página 64) ou não o padrão isotópico do elemento X na regressão está

Figura 3.17: Efeito do tempo morto do detector sobre a razão isotópica ajustada para fórmulas A_pX_q quando o padrão isotópico do elemento X é mantido fixo na regressão. Espectros normalizados para intensidade de pico-base igual a 1 e $\tau = 0,03$ [unidade de tempo].

As curvas de nível indicam os valores de δr calculados (vide equação 3.1, página 39).

Figura 3.18: Efeito do erro de atribuição de linha base sobre a razão isotópica ajustada para fórmulas A_pX_q quando o padrão isotópico do elemento X é mantido fixo na regressão. Espectros normalizados para intensidade de pico-base igual a 1 e *offset* de linha base igual a 0,01.

As curvas de nível indicam os valores de δr calculados (vide equação 3.1, página 39).

nos mapas para as fórmulas AX_5 e A_5X_5 : quando o padrão isotópico é mantido fixo, a região central de grandes desvios relativos desaparece.

Estes estudos podem ser consolidados em uma conclusão geral: quando o padrão isotópico do elemento X é mantido fixo na regressão, o efeito do seu número de fórmula sobre os resultados do método Z é atenuado e fica mais ou menos independente da sua complexidade isotópica. Este resultado é muito importante, pois, conforme já fora dito, a situação em que os padrões isotópicos dos elementos acompanhantes são mantidos fixos corresponde ao principal cenário de aplicações possíveis do método Z.

3.6 Inversão da atribuição dos padrões isotópicos de A e X¹⁴

O método Z pode apresentar alguns problemas quando um ou mais padrões isotópicos sendo ajustados possuem o mesmo formato, isto é, o mesmo número de isótopos com os mesmos espaçamentos de massa e os seus elementos correspondentes possuem os mesmos números de fórmula. Este problema é devido à comutatividade da operação de convolução dos padrões isotópicos (equação 2.3) e manifesta-se pela existência de múltiplas soluções que diferem apenas pela permutação dos padrões isotópicos entre os elementos compatíveis. Por exemplo, a molécula de fórmula $X_\nu Y_\nu$, cujos elementos X e Y possuem os padrões isotópicos $(x, 1 - x)$ e $(y, 1 - y)$ respectivamente, apresenta o problema citado para qualquer valor de $\nu > 0$.

Quando este problema existe, a solução para onde o sistema converge depende apenas da estimativa inicial fornecida para o método de minimização, uma vez que, do ponto de vista deste último, todas as soluções possíveis são igualmente boas. A figura 3.20 contém mapas do espaço de estimativas iniciais para a fórmula X_5Y_5 com alguns valores de x e y ao longo da reta $y = 1 - x$. Observa-se que, quanto mais próxima da diagonal principal encontra-se a solução verdadeira, isto é, quanto mais parecidos são os padrões isotópicos de A e B, mais confuso fica o mapa do espaço de estimativas iniciais.

A associação dos padrões isotópicos e isotopoméricos com polinômios (seção 1.3, página 19, ou seção 2.2, página 26) é útil para analisar este tipo de problema. O caso $X_\nu Y_\nu$ acima é, na verdade, um dos

¹⁴Do jargão do truço, “cachorros loucos”.

Figura 3.19: Efeito da falta de resolução sobre a razão isotópica ajustada para fórmulas A_pX_q quando o padrão isotópico do elemento X é mantido fixo na regressão.

Picos gaussianos com $\sigma = 0,25$ u e $\delta m = 0,1$ u (vide equação 3.6, página 43). As curvas de nível indicam os valores de δr calculados (vide equação 3.1, página 39).

Figura 3.20: Mapas do espaço de estimativas iniciais do método Z quando aplicado a fórmulas X_5Y_5 com X e Y tendo dois isótopos separados por uma unidade de massa.

Os eixos x e y indicam as estimativas iniciais para as abundâncias dos isótopos mais leves de X e Y respectivamente. Os pontos brancos representam convergência para a solução verdadeira e, os pretos, para a solução invertida. (A) $X=(0,95, 0,05)$ e $Y=(0,05, 0,95)$; (B) $X=(0,6, 0,4)$ e $Y=(0,4, 0,6)$; (C) $X=(0,55, 0,45)$ e $Y=(0,45, 0,45)$; (D) $X=(0,501, 0,499)$ e $Y=(0,499, 0,501)$

mais simples. Quando se trabalha com padrões isotópicos de mais de dois picos, podem-se fatorar os polinômios associados a eles como produtos de polinômios de primeiro grau, sendo um para cada raiz do polinômio maior. Nestes casos, podem acontecer permutações desses sub-padrões isotópicos entre os padrões isotópicos maiores¹⁵, o que é ainda mais difícil de identificar do que no caso $X_\nu Y_\nu$ acima.

O problema das permutações de padrões isotópicos e fragmentos é grave quando os espectros fornecidos ao método Z são perfeitos. Na presença de deformações por não-idealidades experimentais o quadro fica ainda mais complicado. Nesta seção é apresentada mais uma série de estudos semelhantes aos realizados nas seções 3.3 e 3.5, porém utilizando dois elementos A e X com padrões isotópicos confundíveis, isto é, ambos os elementos possuem dois isótopos separados por uma unidade de massa (^mA , ^{m+1}A , $^{m'}\text{X}$ e $^{m'+1}\text{X}$). Nos estudos a seguir, os padrões isotópicos de ambos os elementos foram ajustados simultaneamente, ou eles seriam quase que uma repetição dos reportados na seção 3.5.

Ruído As figuras 3.21, 3.22 e 3.23 contêm os desvios padrões relativos por mil das razões isotópicas ajustadas quando os dados são homoscedásticos, heteroscedásticos e amostrados de uma distribuição de Poisson respectivamente¹⁶. Apesar dos mapas serem diferentes uns dos outros, as suas características de relevância para estes estudos essencialmente são as mesmas, portanto eles serão discutidos conjuntamente.

A característica principal que se observa em todos os gráficos é um aumento muito pronunciado dos desvios padrões nas vizinhanças da diagonal principal. Na verdade, uma inspeção mais atenta da região próxima à diagonal principal dos gráficos mostra uma estrutura fina: há um vale estreito bem no centro da região de altos desvios padrões relativos. A interpretação dessas observações é bastante direta: à medida que os padrões isotópicos dos elementos A e X se aproximam, eles vão ficando “confundíveis” e começam a acontecer permutações entre eles ao longo da série de Monte Carlo. Isto faz com que o desvio cresça nas proximidades da diagonal principal. Por outro lado, quando os dois padrões são muito próximos, o efeito da permutação sobre o resultado acaba ficando mascarado pela falta de contraste. Isto faz com que os desvios voltem a cair ao se aproximar ainda mais da diagonal

¹⁵Este tipo de problema já tinha sido notado pelos autores do método M – nH [51, 52]. Para o paralelo entre o método Z e o método M – nH, veja a seção 3.10, página 96.

¹⁶Detalhes a respeito da simulação dos erros aleatórios e da consolidação dos dados obtidos via Monte Carlo encontram-se na seção 3.1 (página 40). Veja também as seções 3.3 e 3.5 (páginas 54 e 66 respectivamente) para as intensidades exatas dos ruídos, que são as mesmas usadas aqui.

principal.

O que não é muito fácil de explicar é o fato de se observarem comportamentos semelhantes com as fórmulas assimétricas AX_5 e A_5X , quando, em princípio, não deveria haver confusão entre os padrões isotópicos dos elementos A e X. Na verdade, a explicação para isto está no fato de que, apesar de a função R (equação 2.4, página 28) não ser ambígua em relação à troca dos padrões isotópicos dos átomos A e X, ela apresenta um ponto de mínimo local além do mínimo global desejado. É o que se observa na figura 3.24, que contém um mapa de curvas de nível de da função R quando o espectro verdadeiro é obtido envolvendo os padrões isotópicos $A=(0,6, 0,4)$ e $X=(0,4, 0,6)$ segundo a fórmula AX_5 . Observam-se dois pontos de mínimo: um na posição $(x=0,6, y=0,4)$, correspondente à solução verdadeira, e outro nas proximidades de $(x=0,3, y=0,48)$. Este segundo é o mínimo local, que não corresponde a nenhum conjunto muito lógico de padrões isotópicos. Os mínimos global e local da função valem $8,0 \cdot 10^{-7}$ e $1,9 \cdot 10^{-6}$ respectivamente.

Para as não-idealidades determinísticas, nos casos AX e A_5X_5 , em geral, o erro introduzido pela permutação nos resultados é tão grande que pode ser facilmente detectado. Nestes casos, ele também pode ser corrigido destrocando os padrões isotópicos dos átomos A e X. Na construção dos mapas mostrando o efeito da não-linearidade de detecção, erro de compensação de linha base e falta de resolução, sempre que o padrão isotópico ajustado para o elemento A estava mais próximo do esperado para o elemento X do que do para o A, o mesmo era substituído pelo padrão ajustado para o elemento X. Naturalmente, este procedimento falha na região central próxima à diagonal principal, quando os padrões isotópicos esperados de A e X são muito parecidos. Entretanto, como já foi observado no caso do ruído e será apontado nos estudos a seguir, o efeito das trocas na região muito próxima à diagonal principal é atenuado devido justamente ao baixo contraste entre os padrões isotópicos.

Este procedimento de correção não pode ser aplicado aos mapas obtidos com as fórmulas assimétricas AX_5 e A_5X , porém isto não é tão necessário quanto no caso anterior, pois a taxa de convergência para o mínimo local de R é menor nesses casos.

Discriminação instrumental de massas Quando os espectros simulados são deformados por discriminação instrumental de massas segundo a equação 3.3 (página 42) com constante $\alpha = 9,95 \cdot 10^{-3}$, obtêm-se desvios relativos da razão isotópica ajustada do elemento A em relação ao seu valor esperado iguais a $-9,901$ por mil, independentemente da fórmula ou dos padrões isotópicos verdadeiros

Figura 3.21: Desvio padrão relativo (por mil) da razão isotópica ajustada como função das abundâncias verdadeiras dos isótopos ^mA e $^{m'}\text{X}$ para moléculas de fórmula A_pX_q quando os padrões isotópicos dos elementos A e X possuem os mesmos formatos. Dados homoscedásticos.

Cada ponto foi calculado a partir de 1000 espectros simulados considerando que cada intensidade de pico foi amostrada de uma distribuição normal independente com desvio padrão igual a 0,1% da intensidade do pico-base do espectro.

Figura 3.22: Desvio padrão relativo (por mil) da razão isotópica ajustada como função das abundâncias verdadeiras dos isótopos ^mA e $^{m'}\text{X}$ para moléculas de fórmula A_pX_q quando os padrões isotópicos dos elementos A e X possuem os mesmos formatos. Dados heteroscedásticos.

Cada ponto foi calculado a partir de 1000 espectros simulados considerando que cada intensidade de pico foi amostrada de uma distribuição normal independente com desvio padrão igual a 0,1% da intensidade nominal do próprio pico.

Figura 3.23: Desvio padrão relativo (por mil) da razão isotópica ajustada como função das abundâncias verdadeiras dos isótopos ^mA e $^{m'}\text{X}$ para moléculas de fórmula A_pX_q quando os padrões isotópicos dos elementos A e X possuem os mesmos formatos. Dados com distribuição de Poisson.

Cada ponto foi calculado a partir de 1000 espectros simulados considerando que cada intensidade de pico foi amostrada de uma distribuição de Poisson de média igual a $1,0 \cdot 10^6$ vezes a intensidade nominal do próprio pico.

Figura 3.24: Mapa de curvas de nível da função $R(x, y)$ (equação 2.4, página 28). Os eixos x e y indicam as abundâncias dos isótopos ${}^m\text{A}$ e ${}^{m'}\text{X}$ respectivamente. O espectro verdadeiro foi obtido convolvendo os padrões isotópicos $\text{A}=(0,6, 0,4)$ e $\text{X}=(0,4, 0,6)$ segundo a fórmula AX_5 .

dos elementos A e X. Este resultado é igual ao que tinha sido obtido na seção 3.2 (página 46), quando se trabalhou apenas com o elemento A contendo dois isótopos separados por uma unidade de massa.

Na verdade, observam-se pequenas oscilações erráticas em torno deste valor na região da diagonal principal em todos os mapas. Isto é provavelmente um artefato do procedimento de correção descrito acima. A conclusão importante que se pode tirar destes resultados é que a possibilidade de permutação de padrões isotópicos não influencia a sensibilidade dos resultados à discriminação instrumental de massas. Isto é, naturalmente, contanto que seja possível identificar e corrigir estas permutações.

Não-linearidade de detecção Quando os espectros simulados são submetidos ao efeito do tempo morto do detector segundo a equação 3.4, página 42 com $\tau = 0,03$ [tempo], são obtidos os mapas de curvas de nível mostrados na figura 3.25 para o valor absoluto do desvio relativo por mil da razão isotópica do elemento A em relação ao seu valor esperado. Para as fórmulas AX, A_5X e A_5X_5 , são observadas superfícies com algumas características em comum, porém bastante diferentes das que vinham sendo obtidas até então nos outros estudos com não-linearidade de detecção. Nos três mapas, à medida que se vai aproximando da diagonal principal, os desvios crescem em valor absoluto. A redução dos desvios observada quando se aproxima ainda mais da diagonal principal deve-se a uma inversão do sinal dos mesmos exatamente sobre ela. Outro detalhe observado aqui, diferente do que vinha se obtendo até então é que, comparando tanto os mapas das fórmulas AX e A_5X , quanto os das A_5X e A_5X_5 , é que o incremento do número de fórmula do elemento A aumenta significativamente os valores absolutos dos desvios. O comportamento observado com a fórmula A_5X é um mistério completo.

Má compensação de linha base e falta de resolução As figuras 3.26 e 3.27 contêm os mapas de curvas de nível do valor absoluto do desvio relativo da razão isotópica do elemento A em relação ao seu valor esperado quando os espectros simulados são submetidos a um erro de atribuição de linha base e falta de resolução respectivamente. No caso da linha base, a constante somada a cada intensidade espectral é igual a 1% do pico base. No caso da falta de resolução, a função de forma de pico utilizada é dada pela equação 3.5 (página 43), com $\sigma = 0,25$ e uma janela de integração com largura $\delta m = 0,2$.

As superfícies observadas nestes casos possuem as mesmas características gerais das apresentadas na

Figura 3.25: Efeito do tempo morto do detector sobre a razão isotópica ajustada para fórmulas A_pX_q quando os padrões isotópicos dos elementos A e X possuem os mesmos formatos. Espectros normalizados para intensidade de pico-base igual a 1 e $\tau = 0,03$ [unidade de tempo]. As curvas de nível indicam os valores de δr calculados (vide equação 3.1, página 39).

figura 3.25, onde os espectros são deformados por não-linearidade de detecção. Nas figuras 3.26 e 3.27, também observa-se que o desvio aumenta pronunciadamente em valor absoluto à medida que se vai aproximando da diagonal principal e, sobre a mesma, também há uma inversão de sinal. Além disso, aqui também observa-se um aumento em valor absoluto dos desvios com o incremento do número de fórmula do elemento A, ao contrário do que fora apresentado nas seções 3.3 e 3.5.

3.7 Sobre a escolha dos picos utilizados na regressão

A implementação atual do método Z permite que o usuário escolha quais picos do espectro vão ser efetivamente usados na regressão e quais vão ser ignorados. As principais vantagens de se trabalhar com um subconjunto dos picos do espectro são:

1. Como nem todos os picos são necessários, pode-se restringir a aquisição apenas aos picos desejados, o que permite que se obtenha um número maior de espectros e, conseqüentemente, uma precisão melhor dos resultados. Isto foi exemplificado na seção 3.4, onde foi estudado o caso da análise de razão isotópica $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ através de um íon contendo 60 átomos de carbono.
2. Quando um ou mais picos do espectro são afetados por interferências isobáricas, pode ser possível esquivar delas escolhendo um subconjunto dos picos que não seja afetado, ou que seja menos afetado.

Entretanto, é importante que a escolha dos picos seja feita com algum critério para que esta não afete os resultados. Naturalmente, quando o espectro experimental não é afetado por nenhum tipo de imperfeição, qualquer que seja a escolha dos picos, o método Z convergirá para a solução correta sem maiores problemas¹⁷. Entretanto, se o espectro experimental for deformado por não-idealidades, então o resultado fornecido pelo método Z variará em função da escolha dos picos usados na regressão.

A figura 3.28 contém os resultados de um estudo semelhante ao que foi feito na seção 3.2 para verificar o efeito do tempo morto do detector sobre os resultados fornecidos pelo método Z para moléculas de fórmula A_p com diferentes valores de p e diferentes abundâncias esperadas do isótopo ^mA . Aqui porém, usou-se apenas o número de fórmula $p = 8$ e o padrão isotópico $(0, 8, 0, 2)$ para o elemento

¹⁷Exceto, naturalmente, nos casos em que há mais de uma solução, como nos casos exemplificados na seção 3.6.

Figura 3.26: Efeito erro de atribuição de linha base sobre a razão isotópica ajustada para fórmulas A_pX_q quando os padrões isotópicos dos elementos A e X são trocáveis.

Espectros normalizados para intensidade de pico-base igual a 1 e *offset* de linha base igual a 0,01. As curvas de nível indicam os valores de δr calculados (vide equação 3.1, página 39).

Figura 3.27: Efeito da falta de resolução sobre a razão isotópica ajustada para fórmulas A_pX_q quando os padrões isotópicos dos elementos A e X são trocáveis.

Picos gaussianos com $\sigma = 0,25$ u e $\delta m = 0,1$ u (vide equação 3.6, página 43). As curvas de nível indicam os valores de δr calculados (vide equação 3.1, página 39).

A e variou-se o parâmetro τ do modelo de não-linearidade de detecção (equação 3.4, página 42). Observa-se que para $\tau = 0$, isto é, detecção perfeitamente linear, o método Z converge para o valor esperado independentemente da escolha dos picos. Entretanto, à medida que o tempo morto do detector vai aumentando, vão surgindo discrepâncias entre os resultados da aplicação do método Z para diferentes subconjuntos dos picos.

Por exemplo, quando se trabalha apenas com os quatro primeiros picos do espectro, os resultados obtidos são até melhores do que quando se usa o espectro inteiro. Por outro lado, se apenas os três primeiros picos do espectro são usados, a tendência de variação dos resultados com o parâmetro da não-linearidade de detecção é invertida e aumenta em valor absoluto. Quando o terceiro, quarto, quinto e sexto picos são usados, a sensibilidade do resultado ao efeito do tempo morto do detector aumenta ainda mais.

Esses resultados sugerem uma regra prática para a escolha dos picos para a regressão: o conjunto deve incluir os picos mais intensos do espectro e ser o mais simétrico possível em torno do centróide da distribuição isotopomérica. Nas aplicações do método Z reportadas na seção 4, procurou-se respeitar esta regra na escolha dos picos.

3.8 Ajustando também a linha base

Na seção 2.4, mais especificamente, nas equações 2.4 e 2.5 (página 28) definiu-se o critério usado para comparar um padrão isotopomérico e um espectro de massas. Multiplica-se o padrão isotopomérico por um fator de escala k , que tem a dimensão da intensidade do espectro. O valor de k dado pela equação 2.5 é aquele que minimiza R , dado pela equação 2.4, para um padrão isotopomérico fixo. Este procedimento é apenas uma regressão linear forçando o coeficiente linear a ser igual a zero.

Uma outra maneira de comparar os espectros de massas e os padrões isotopoméricos é através de:

$$R = \sum_i [I_i - (b - kY_i)]^2 \quad (3.8)$$

onde I_i é a intensidade do i -ésimo pico do espectro e Y_i é a abundância do i -ésimo isotopômero. k ainda é um fator de escala e b é uma estimativa da linha base espectral. A determinação dos valores de b e k que minimizam R para um certo padrão isotopomérico ainda é uma regressão linear, porém,

Figura 3.28: Desvios relativos por mil da razão isotópica ajustada para o elemento A em relação ao seu valor esperado em função do tempo morto do detector, utilizando diferentes conjuntos de picos na regressão.

O gráfico menor contém o espectro não deformado.

agora, o coeficiente linear não é necessariamente zero. Os valores de b e k que minimizam R são:

$$k = \frac{N \cdot \sum_i (Y_i I_i - I_i)}{N \cdot \sum_i Y_i^2 - 1}$$

$$b = \frac{(\sum_i Y_i^2) (\sum_i I_i) - \sum_i Y_i I_i}{N \cdot \sum_i Y_i^2 - 1}$$

onde N é o número de picos sendo considerados na regressão. A implementação deste esquema encontra-se na página 147 do apêndice C (rotina `chi2`).

Não se observou vantagem em trabalhar-se com este esquema de comparação ao invés do descrito na seção 2.4. A motivação para implementar este sistema era que, ao adicionar-se o parâmetro b , estaria sendo dada liberdade ao sistema para auto-ajustar-se à linha base espectral, conferindo-lhe maior robustez a erros de compensação desta última, porém isto não foi observado. Na prática, o que se observou foi que em alguns casos, o ajuste da linha base introduzia uma certa ambigüidade na função R , ao permitir que alguns padrões isotopoméricos inadequados se tornassem mais adequados pela escolha de valores absurdos de b . Concluiu-se, portanto, que o melhor é minimizar R dado pela equação 2.4 e compensar a linha base espectral baseado-se em informação privilegiada, obtida da aquisições de canais “brancos” de m/z .

3.9 Implementações alternativas do método Z

A formulação do método Z descrita neste capítulo não foi a primeira a ser desenvolvida. Outros dois métodos de se fazer a regressão foram testados antes que se chegasse à versão final. Nesta seção são comentadas as duas primeiras implementações do método Z.

Na primeira versão do método Z o padrão isotopomérico também era calculado através de expansão polinomial, porém a regressão era feita através do método de Levenberg-Marquadt. A representação polinomial dos padrões isotópicos e isotopoméricos era usada explicitamente, sendo o polinômio associado a um padrão isotópico ou isotopomérico dado por:

$$P(\mathbf{y}; x) = \sum_{i=1}^{N_y} y_i \cdot x^{i-1}$$

onde $\mathbf{y}$ é o padrão isotópico ou isotopomérico em questão e x é a variável do polinômio. A função

minimizada era:

$$R = \sum_{i=0}^{N_{\text{exp}}} \left(P_{\mathbf{y}}^{(i)} - I_i \right)^2 \quad (3.9)$$

onde assume-se que o espectro experimental já está normalizado para soma igual a 1 e a notação $P_{\mathbf{y}}^{(i)}$ representa o coeficiente do termo em x^i do polinômio $P(\mathbf{y}, x)$.

As derivadas de primeira e segunda ordens de R com respeito às abundâncias isotópicas são dadas por:

$$\frac{\partial R}{\partial a_{jk}} = 2 \cdot \sum_{i=0}^{N_{\text{exp}}} \left(P_{\mathbf{y}}^{(i)} - I_i \right) \frac{\partial P_{\mathbf{y}}^{(i)}}{\partial a_{jk}} \quad (3.10)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial^2 R}{\partial a_{jk} \partial a_{lm}} &= 2 \cdot \sum_{i=0}^{N_{\text{exp}}} \left\{ \frac{\partial P_{\mathbf{y}}^{(i)}}{\partial a_{jk}} \cdot \frac{\partial P_{\mathbf{y}}^{(i)}}{\partial a_{lm}} + \left(P_{\mathbf{y}}^{(i)} - I_i \right) \frac{\partial^2 P_{\mathbf{y}}^{(i)}}{\partial a_{jk} \partial a_{lm}} \right\} \cong \\ &\cong 2 \cdot \sum_{i=0}^{N_{\text{exp}}} \frac{\partial P_{\mathbf{y}}^{(i)}}{\partial a_{jk}} \cdot \frac{\partial P_{\mathbf{y}}^{(i)}}{\partial a_{lm}} \end{aligned} \quad (3.11)$$

onde a_{ij} é a abundância do j -ésimo isótopo do i -ésimo elemento. Além disso, é fácil verificar que vale a igualdade:

$$\frac{\partial P_{\mathbf{y}}^{(i)}}{\partial a_{jk}} = \left[\frac{\partial P(\mathbf{y}; x)}{\partial a_{jk}} \right]^{(i)}$$

O polinômio $P(\mathbf{y}; x)$, associado ao padrão isotopomérico, é dado em função dos associados aos padrões isotópicos por:

$$P(\mathbf{y}; x) = \prod_{i=1}^n P^{\nu_i}(\mathbf{a}_i; x) \quad (3.12)$$

onde os $P(\mathbf{a}_i; x)$ são os polinômios associados aos padrões isotópicos atômicos e ν_i é o número de fórmula do elemento correspondente. E as suas derivadas com respeito às abundâncias isotópicas atômicas são:

$$\frac{\partial P(\mathbf{y}; x)}{\partial a_{jk}} = \frac{\partial P^{\nu_j}(\mathbf{a}_j; x)}{\partial a_{jk}} \cdot \prod_{i \neq j} P^{\nu_i}(\mathbf{a}_i; x) \quad (3.13)$$

Os polinômios $P^{\nu_j}(\mathbf{a}_j; x)$ e suas derivadas com respeito às abundâncias isotópicas a_{jk} eram calculados através da aplicação recursiva da fórmula do binômio de Newton:

$$[P^{\nu_j}(\mathbf{a}_j; x)]^{(i)} = \sum_{\nu_j \geq \alpha_1 \geq \alpha_2 \geq \dots \geq \alpha_{N_j-1} \geq 0 \text{ e } \sum \alpha = i} B(\nu_j, \alpha) A(\mathbf{a}_j, \nu_j, \alpha) \quad (3.14)$$

onde N_j é o número de isótopos do elemento j e o vetor de índices α contém $N_j - 1$ elementos.

$$B(\nu_j, \alpha) = \begin{pmatrix} \alpha_1 \\ \nu_j \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \alpha_2 \\ \alpha_1 \end{pmatrix} \cdots \begin{pmatrix} \alpha_{N_j-2} \\ \alpha_{N_j-1} \end{pmatrix}$$

$$A(\mathbf{a}_j, \nu_j, \alpha) = a_{j1}^{\nu_j - \alpha_1} \cdot a_{j2}^{\alpha_1 - \alpha_2} \cdots a_{j, N_j-1}^{\alpha_{N_j-1} - \alpha_{N_j-2}} \cdot a_{j, N_j}^{\alpha_{N_j-1}}$$

Da mesma forma, os coeficientes de $\frac{\partial P^{\nu_j}(\mathbf{a}_j; x)}{\partial a_{jk}}$ podem ser obtidos diferenciando a equação 3.14 termo a termo com respeito à abundância a_{jk} .

Neste ponto, dispõem-se dos polinômios associados aos padrões isotópicos elevados aos seus respectivos números de fórmula assim como das suas derivadas com respeito às abundâncias isotópicas atômicas. Estes podem ser convolvidos de acordo com as equações 3.12 e 3.13, de modo a obter o padrão isotopomérico e as suas derivadas com respeito às abundâncias isotópicas atômicas. Destes últimos calcula-se R (equação 3.9) e suas derivadas de primeira e segunda ordens (equações 3.10 e 3.11 respectivamente), que são então usados no algoritmo de Levenberg-Marquadt.

Esta formulação funciona razoavelmente bem para moléculas pequenas e cujos átomos não têm muitos isótopos. Entretanto, para números de fórmula da ordem de 20, mesmo para átomos com apenas dois isótopos, começam a surgir erros numéricos significativos. A origem desses erros não foi investigada a fundo, mas acredita-se que eles estejam relacionados com imprecisão nos valores das derivadas devido ao número excessivo de operações matemáticas necessárias. Somente a título de curiosidade: esta formulação também exhibe os mesmos problemas de permutação dos padrões isotópicos explorados na seção 3.6, porém os mapas do espaço de estimativas iniciais (figura 3.20, página 79), devido ao algoritmo de Levenberg-Marquadt, apresentavam formas bem mais arredondadas e bonitas que as observadas com o simplex.

A segunda tentativa de implementação do método Z usava uma estratégia parcialmente inspirada no trabalho de Rockwood e colaboradores [78]. Representavam-se os padrões isotópicos e isotopoméricos, não como polinômios, mas como combinações lineares de funções delta:

$$y(\mathbf{y}; m) = \sum_{i=1}^{N_y} y_i \delta(m - i + 1)$$

cujas transformadas de Fourier é:

$$Y(\mathbf{y}; \omega) = \sum_{i=1}^{N_y} y_i e^{i\omega(i-1)}$$

O teorema da convolução para as transformadas de Fourier diz que a transformada de Fourier do padrão isotopomérico é igual ao produto das transformadas de Fourier dos padrões isotópicos elevados aos seus respectivos números de fórmula. Isso quer dizer que a transformada de Fourier do padrão isotopomérico pode ser calculada em um conjunto de valores de ω simplesmente multiplicando as dos padrões isotópicos amostradas nos mesmos valores de ω . A idéia é então minimizar a soma dos quadrados dos valores absolutos das diferenças entre as transformadas de Fourier do espectro e do padrão isotopomérico em um certo número de valores de ω . Podem-se obter facilmente derivadas de primeira e segunda ordens dessa função com respeito aos parâmetros variacionais e o método de Levenberg-Marquadt pode ser aplicado tranqüilamente.

Esta segunda implementação resolveu os problemas apresentados pela anterior com fórmulas complexas. O problema dela, no entanto, é a escolha dos valores de ω em que as funções são amostradas. Quando o espectro é perfeito, não há problemas; a regressão sobre qualquer conjunto de valores de ω fornece o resultado correto. Porém, quando os espectros são afetados por imperfeições, os resultados passam a depender do conjunto de valores de ω . Como essa escolha é um pouco arbitrária e difícil de justificar, decidiu-se abandonar esta estratégia e passou-se a utilizar a metodologia descrita no capítulo anterior.

3.10 Efeitos colaterais

O escopo de aplicação das metodologias desenvolvidas para o método Z não é restrito à deconvolução de padrões isotopoméricos moleculares para a obtenção de padrões isotópicos atômicos. Algumas outras possibilidades de aplicação destes métodos foram estudadas no período deste trabalho.

Um dos problemas que pode ser resolvido pela aplicação do método Z sem nenhum tipo de modificação é o da interferência isobárica de íons que diferem uns dos outros por apenas alguns átomos de hidrogênios, ou íons $M \pm nH$, aqui chamados genericamente de íons $M - nH$. Conforme já fora dito na introdução (página 17), esse tipo de interferência é extremamente comum em espectrometria de massas com ionização por elétrons, mas também é observado em outras modalidades de ionização, como,

por exemplo, electrospray. Moraes e colaboradores [51, 52] propuseram uma estratégia para eliminar matematicamente este tipo de interferência, permitindo que se obtenha o padrão isotopomérico do íon $M - nH$ mais leve e as abundâncias relativas dos demais íons.

Os autores do trabalho em questão¹⁸ constataam que o espectro medido é, na verdade, uma combinação linear dos padrões isotopoméricos dos diversos fragmentos $M - nH$ e fazem a aproximação de que todos esses padrões isotopoméricos são versões deslocadas sobre o eixo x de um único padrão, isto é, desprezam a influência dos átomos de hidrogênio a mais ou a menos na forma do padrão isotopomérico. Dentro desta aproximação e usando a notação do artigo, pode-se calcular o espectro através do esquema mostrado na figura 3.29, ou, em uma notação mais compacta:

$$c_j = \sum_{i=\max(1, j-p+1)}^{\min(j, g)} y_i b_{j-i+1} \text{ para } i = 1..n \quad (3.15)$$

onde b_i , y_i e c_i são o i -ésimo pico do padrão isotopomérico, a intensidade do i -ésimo fragmento $M - nH$ e do i -ésimo pico experimental respectivamente e g , p e n são os números de fragmentos $M - nH$, picos no padrão isotopomérico e no espectro respectivamente.

A equação 3.15 (uma para cada pico do espectro) associada à condição de normalização do padrão isotopomérico fornece um sistema de equações não lineares, que é resolvido numericamente para que se obtenha o padrão isotopomérico e as abundâncias dos íons $M - nH$.

Os limites da somatória da equação 3.15 impõem simplesmente que os índices dos vetores façam sentido dados os tamanhos destes últimos. Não é difícil comparar a somatória da equação 3.15 com a da equação 2.1 (página 25) e concluir que o que se está fazendo aqui é a convolução dos vetores b e y . Isso mostra que o efeito da interferência de íons $M - nH$ sobre o padrão isotopomérico de um íon molecular pode ser modelado pela inclusão na formula deste íon de um elemento fictício cujo isótopo mais leve tem massa zero¹⁹ e cujo padrão isotópico contém as abundâncias relativas das diferentes

¹⁸Um dos quais, não por acaso, também é o autor desta tese.

¹⁹A ordem e estilo da exposição das idéias neste texto podem sugerir que o método Z tenha sido desenvolvido primeiro e, somente mais tarde, a equivalência com o problema do método $M - nH$ tenha sido constatada. Na prática, as coisas aconteceram na ordem inversa. O método $M - nH$ foi o objeto de estudo da dissertação de mestrado da, então srta., Carolina Moraes, aluna do prof. Claudimir Lago por volta de 1997, época em que o autor deste trabalho era um aluno de iniciação científica do mesmo orientador. Dizer exatamente como e quando a idéia do método Z e da sua aplicação especificamente para análises isotópicas surgiu é difícil. Muito da minha concepção do problema e das possíveis maneiras de implementar a sua solução foram formadas na época, estudando os casos em que o método $M - nH$ fornecia múltiplas respostas.

O primeiro a perceber que o problema dos íons $M - nH$ podia ser modelado pela inclusão de um elemento fictício de

Figura 3.29: Modelagem da interferência por íons $M - nH$ proposta por Moraes e colaboradores [51, 52].

b_i , y_i e c_i são o i -ésimo pico do padrão isotopomérico, a intensidade do i -ésimo fragmento $M - nH$ e do i -ésimo pico experimental respectivamente.

espécies químicas. Fazendo isso, pode-se aplicar diretamente o método Z para fazer o mesmo cálculo proposto no artigo.

Reaproveitando alguns componentes desenvolvidos para o método Z e para o *LAIALynx*, foi desenvolvido um programa para auxiliar na interpretação de espectros obtidos com ionização electrospray. Uma introdução mais completa à espectrometria de massas com ionização electrospray encontra-se na seção 4.2 (página 105), porém, aqui, basta dizer que trata-se de uma técnica que não favorece a fragmentação dos íons em fase gasosa. A grande maioria dos íons observados no espectro são combinações de espécies iônicas e/ou neutras já presentes na solução submetida ao electrospray. Isto permite uma modalidade de interpretação espectral bastante simples, porém trabalhosa, em que o analista tenta atribuir combinações das espécies que ele supõe estarem presentes na solução aos blocos de picos observados no espectro.

Para facilitar este tipo de análise, foi feito um programa que lê um espectro de massas e, baseado em uma lista de espécies químicas iônicas ou neutras fornecidas pelo usuário, gera todas as combinações possíveis delas que levam a íons com a carga desejada e que possuam relação m/z dentro de um intervalo fornecido. O programa verifica então por um critério estatístico quais das combinações têm probabilidade significativa de estarem presentes e permite que o usuário veja os padrões isotopoméricos das mesmas sobrepostos ao espectro.

A figura 3.30 mostra a janela principal do programa com o espectro experimental do íon CdCl_3^- em azul e, sobreposto a ele em vermelho, o padrão isotopomérico calculado deste íon. As espécies químicas a serem combinadas são digitadas na janela exibida também na figura 3.30.

Este programa foi chamado de CAESCA_n (*Computer Assisted ElectroSpray Cluster Analysis*) e apresentado em um congresso internacional de espectrometria de massas no ano 2000 [93].

massa zero na fórmula da espécie mais leve foi o Claudimir. As ricas discussões que então se sucederam no antigo bar da Faculdade de Farmácia, motivadas pelo consumo de álcool e inspiradas na descoberta do zêrônio, foram fundamentais para a criação do método Z. O “Z” é uma pequena homenagem que nós decidimos prestar à teoria do zêrônio, reconhecendo a importância que ela teve na fase germinal deste trabalho.

Figura 3.30: Cópias das janelas do programa *CAESCAN*

3.11 Conclusões

Foi desenvolvido e caracterizado um método genérico de deconvolução de padrões isotopoméricos. As figuras de mérito de determinações isotópicas baseadas neste método foram avaliadas em algumas situações modelo. As conclusões que podem ser tiradas destes estudos podem ser resumidas por:

1. O aumento do número de fórmula do elemento de interesse (elemento A) tende a melhorar os resultados obtidos, tanto perante erros sistemáticos, quanto perante erros aleatórios nos espectros. No caso das moléculas de fórmula A_pX_q , observou-se que, quanto maior for a relação p/q , melhores tendem a ser os resultados.
2. A presença do elemento acompanhante (X) na fórmula pode ser deletéria se ele for isotopicamente complexo. Porém, ele pode servir de “cola”, permitindo que se obtenham espécies químicas com múltiplas instâncias do elemento A, o que é desejável.
3. No caso de elementos cujos padrões isotópicos podem ser confundidos, ou quando pode haver permutação de componentes entre diferentes padrões isotópicos (seção 3.6), e os padrões isotópicos de todos os elementos vão ser ajustados, observou-se que a função R (equação 2.4, página 28) pode ter mais de um ponto de mínimo. Esses casos exigem mais cuidado por parte do analista.

O objetivo destes estudos não era demonstrar que a análise isotópica baseada em espécies poli-atômicas é a melhor em qualquer solução. Isso não é verdadeiro, de qualquer forma. O nosso objetivo simplesmente mostrar que o oposto também não pode ser dito *a priori*, como parece indicar o senso

comum dos pesquisadores da área. Na verdade, os nossos resultados mostram que, em muitos casos, a abordagem baseada em espécies poli-atômicas e no método Z pode fornecer resultados até melhores que os obtidos através da abordagem convencional, tanto do ponto de vista da precisão, quanto do da exatidão. A verdadeira contribuição deste trabalho é a ampliação das possibilidades de criação de métodos de análises isotópicas. No final, a decisão a respeito de que método deverá ser usado para uma determinada análise isotópica deve ser baseada nas figuras de mérito do processo analítico como um todo e não em preconceitos infundados.

Capítulo 4

Análise da razão hidrogênio/deutério através de polióis

4.1 Introdução e objetivos

Antes que a sua razão isotópica possa ser analisada, o hidrogênio ou o oxigênio contidos em uma amostra aquosa precisam ser incorporados a alguma espécie química que possa ser transferida para a fase gasosa para espectrometria de massas. Com a maioria dos elementos, em geral, procura-se convertê-los quantitativamente em uma espécie química apropriada antes da análise. Entretanto, com o hidrogênio e o oxigênio presentes em amostras aquosas, em particular, pelo fato de eles serem componentes majoritários, pode-se trabalhar também com métodos de equilíbrio. Nesses métodos, mistura-se com a amostra uma pequena quantidade de uma substância que deve ter duas propriedades essenciais: (1) ser analisável por uma modalidade escolhida de espectrometria de massas e (2) ser capaz de trocar os seus átomos de hidrogênio ou oxigênio com os da água. Após a adição, espera-se um tempo suficiente para que as reações de troca atinjam o equilíbrio e analisa-se a molécula sonda por espectrometria de massas na esperança de que o padrão isotópico do hidrogênio ou oxigênio ligado a ela seja representativo do mesmo na amostra. A figura 4.1 contém um esquema desse processo de análise.

Existem várias metodologias de análise baseadas nessas idéias sendo usadas rotineiramente. Por exemplo, para a análise da razão isotópica $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ em amostras aquosas, a sonda normalmente em-

Figura 4.1: Esquema didático da amostragem de um elemento majoritário por uma sonda para fins de análise isotópica.

Assume-se que a sonda está presente em uma quantidade baixa o suficiente para não perturbar significativamente a composição isotópica da amostra.

pregada é o CO_2 . Coloca-se uma quantidade de gás carbônico em contato com a amostra em sistema fechado e, após vários ciclos de aquecimento e resfriamento sob agitação ao longo de horas, o CO_2 é amostrado e ionizado por elétrons para análise da razão $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ [94, 95]. O ponto fraco desses métodos é justamente o estabelecimento do equilíbrio da reação de troca, que envolve uma etapa lenta de transferência de material entre as fases líquida e gasosa.

No caso da amostragem do hidrogênio, em que normalmente usa-se H_2 como sonda, os problemas relacionados com a tempo de equilibração são ainda piores. Isso deve-se ao fato de a ligação H–H ser pouco lábil e de o gás H_2 , ao contrário do CO_2 , ser muito pouco solúvel em água. Vários trabalhos foram publicados descrevendo maneiras de tentar contornar os problemas relacionados com a obtenção do equilíbrio nesses métodos e torná-los mais reprodutíveis. Um exemplo é o uso de catalisadores de platina ancorada em diferentes materiais para tentar acelerar a troca [96, 97, 98]¹. Um deles – composto por platina suportada em um polímero poroso hidrofóbico – pode ser encontrado comercialmente com o nome de *Hokko Beads* (*Shoko Co. Ltd* - Japão).

No caso do hidrogênio, as dificuldades não estão relacionadas apenas com a amostragem. O H_2 é analisado por espectrometria de massas com ionização por elétrons através do íon H_2^+ , cuja massa, muito baixa, maximiza os problemas com discriminação instrumental de massas. Além disso, ele também sofre interferência isobárica do íon H_3^+ , o que exige uma compensação empírica, que é mais uma fonte de erros sistemáticos e aleatórios para o resultado da análise [96].

A proposta deste trabalho é utilizar polióis (moléculas contendo múltiplas hidroxilas) como sondas para a razão isotópica de hidrogênio em amostras aquosas. Do ponto de vista do tempo de equilibração, esta idéia é muito vantajosa, pois a sonda pode ser dissolvida diretamente na amostra e a cinética de troca do hidrogênio ligado à hidroxila é muito rápida, o que torna o processo de equilibração praticamente instantâneo. Do ponto de vista da espectrometria de massas, o método também pode ser vantajoso, pois são obtidos íons com massas razoavelmente grandes (150 a 200 u), o que reduz os problemas de discriminação instrumental de massas. Por outro lado, talvez a técnica mais adequada para transferência dessas espécies da fase aquosa para a fase gasosa seja a ionização electrospray, que ainda não é amplamente aceita como uma técnica boa para análises isotópicas rigorosas, apesar de já haver trabalhos publicados na literatura nesse sentido [51, 53].

¹Para exemplos de sistema automatizados de tratamento de amostra para análise de razões isotópicas H/D veja, por exemplo, [99, 100]. Uma outra abordagem utilizada é a geração de H_2 por redução da água sobre Zn aquecido a 450°C [101]

Figura 4.2: Concepção artística de uma fonte electrospray típica.

A figura não mostra o tubo concêntrico ao capilar que normalmente é usado para injetar nitrogênio como gás de arraste, nem o contra-eletródo, que fica na frente do capilar.

4.2 Espectrometria de massas com ionização electrospray

O electrospray foi proposto como método de ionização para espectrometria de massas por Yamashita e Fenn em meados da década de 1980 [19, 20, 21]². Em poucas palavras, o princípio desta técnica é promover a separação eletroforética de cargas positivas e negativas em uma solução eletrolítica através da aplicação de um campo elétrico intenso com o objetivo de destacar gotículas com excesso de carga da solução. A figura 4.2 contém a implementação típica deste princípio: um tubo capilar metálico por onde a solução é bombeada é mantido a um potencial de alguns milhares de volts em relação a um contra eletródo imediatamente à sua frente. Nesta montagem, dependendo da polaridade do potencial aplicado, há acúmulo de cátions ou ânions na ponta do capilar. A solução nesta região se deforma sob o efeito da força exercida sobre os íons pelo campo elétrico, assumindo a forma de um cone, chamado de cone de Taylor. Da ponta deste cone é que são destacadas gotículas com excesso de carga. Normalmente, empregam-se misturas de água com solventes orgânicos de baixa tensão superficial para facilitar o destacamento das gotículas. Também usa-se um fluxo de gás paralelo ao capilar para auxiliar na liberação e na secagem das gotas.

O segundo passo da ionização electrospray é a dessolvatação das gotículas, com a produção de íons na fase gasosa. Num primeiro momento, as gotículas recém destacadas perdem solvente rapidamente

²Na verdade, as primeiras tentativas de utilizar o electrospray como fonte de íons para espectrometria de massas foram publicadas no final da década de 1960 por Dole e colaboradores [102]. Entretanto, estes pesquisadores estavam tentando trabalhar com moléculas de poli-estireno, que não possui carga normalmente em solução, e não obtiveram muito sucesso. Mais tarde, concluiu-se que o electrospray não é propriamente um método de ionização, pois ele não gera carga nas moléculas, mas apenas transfere os íons da fase aquosa para a gasosa.

por evaporação, tendo assim os seus raios diminuídos. À medida que as gotículas vão ficando menores devido à evaporação do solvente, a repulsão elétrica entre as cargas em excesso, acumuladas na superfície, vai aumentando, até um momento em que a tensão superficial do solvente torna-se insuficiente para resistir a esta repulsão. Neste momento, a gotícula explode, emitindo num jato uma nova geração de gotículas filhas que levam embora a maior parte da carga em excesso da gota mãe, mas apenas uma pequena fração da sua massa.

Este processo recursivo de evaporação seguida de fissão continua até que as gotículas tornem-se pequenas o suficiente para que comece a produção dos íons propriamente ditos na fase gasosa. Sobre o processo de evaporação e fissão das gotículas macroscópicas, isto é, os primeiros aproximadamente 500 microssegundos do electrospray, há até mesmo registros fotográficos, de modo que não há muito o que discutir a respeito desta etapa. Por outro lado, não foram feitas observações diretas do processo de geração final de íons a partir das gotículas pequenas no final do electrospray. Dois mecanismos foram propostos para explicar esta etapa: o modelo do resíduo carregado, de Dole e colaboradores [102], e o modelo de evaporação iônica, de Iribarne e Thomson [103].

O modelo do resíduo carregado propõe que as gotículas evaporem até a secagem completa, sobrando apenas os íons. A observação de agregados de fórmulas $(\text{NaCl})_n\text{Na}^+$, por exemplo, obtidos através do electrospray de soluções de NaCl, é considerada evidência em prol do modelo do resíduo carregado. Por outro lado, o modelo de evaporação iônica prevê que, para gotas com raios da ordem de dezenas de nanômetros, o processo de expulsão de íons para a fase gasosa (evaporação iônica) torna-se competitivo com o processo de fissão. Este modelo é físico-quimicamente melhor articulado que o do resíduo carregado e cálculos feitos para situações idealizadas mostram que a hipótese de que a evaporação seja competitiva para gotas de raios pequenos pode ser verdadeira [18]. Na prática, provavelmente, ambos os mecanismos acontecem³.

A montagem esquematizada na figura 4.2 não é a única possível, e nem foi a utilizada neste trabalho. O capilar metálico, por exemplo, é dispensável. Na verdade, para aplicações analíticas, ele nem mesmo é desejável. Como ele funciona como um dos eletrodos da cela eletroquímica do electrospray, pode haver deposição de material sobre a sua superfície e uma eventual contaminação entre amostras, ou efeito de memória. No sistema de geração de electrospray utilizado neste trabalho, utilizou-se um capilar de sílica de 75 μm de diâmetro interno no lugar do de inox. A figura 4.3 contém um esquema

³Para mais detalhes a respeito deste assunto, a sugestão é o primeiro capítulo da referência [18].

Figura 4.3: Fonte electrospray utilizando capilar de sílica fundida.

(A) Esquema didático; (B) Visão global do injetor; (C) Recipiente de amostra; (D) Conexões de alta tensão e hélio para pressurização; (E) Ponta do injetor com o capilar de sílica saindo de dentro do tubo de inox por onde sai o gás de arraste

Mais detalhes desse sistema podem ser encontrados na tese de doutorado de uma outra aluna do mesmo orientador [104].

didático e fotos do sistema de injeção de amostras utilizado.

Sistemas miniaturizados para a geração do electrospray também podem ser concebidos. Paralelamente ao trabalho relatado nesta tese, chegou-se a explorar a possibilidade de usar microestruturas descartáveis de poliéster (PET: Poli-tereftalato de etileno glicol) para a geração do electrospray e introdução de amostras no espectrômetro de massas. Estas microestruturas são compostas por dois filmes de PET colados por uma camada de *toner* de impressora laser, sendo que este último é usado também para traçar microcanais para o escoamento de fluidos entre os dois filmes⁴. Essas microestruturas possuem um recipiente para uma gota de solução, onde a alta tensão é aplicada através de um eletrodo. A solução escôa por um microcanal através da estrutura e o electrospray é gerado através de um pequeno orifício de saída neste microcanal. A figura 4.4 contém um esquema didático das microestruturas e uma foto do cone de Taylor nas redondezas do orifício de saída quando a alta tensão

⁴O processo de fabricação dessas microestruturas de baixo custo foi desenvolvido por um outro aluno de doutorado do Prof. Claudimir Lago e é objeto de um processo de patente em andamento (ref: Claudimir L. Lago - *Processo de Microfabricação Utilizando Toner como Material Estrutural* — Processo FAPESP 2001/00881-0. Programa de Apoio à Propriedade Intelectual - NUPLITEC. Início: 01/06/2001).

Figura 4.4: Electro spray em microestruturas de poliéster descartáveis.

(A) Região do orifício da microestruturas antes da aplicação do potencial e (B) após a aplicação, com a formação do cone de Taylor; abaixo: esquema da montagem experimental. A região redonda da microestrutura é um buraco em um dos filmes de poliéster, que serve de recipiente para uma gota de solução, onde a alta tensão é aplicada.

é aplicada. Chegaram a ser obtidos alguns espectros com estas microestruturas e outras de diferentes desenhos, mas estes estudos estão fora do escopo desta tese.

A figura 4.5 contém um diagrama de blocos da fonte electro spray e do espectrômetro de massas modelo *Platform II* (Micromass, Inglaterra), usado neste trabalho. A peça metálica que se encontra logo à frente do capilar, é o contra-eletrodo, em relação ao qual o capilar é mantido a uma diferença de potencial de alguns milhares de volts. Neste trabalho, o contra eletrodo original do aparelho foi substituído por um outro cujo desenho encontra-se na figura 4.6. Isto foi feito para reduzir a quantidade de material que se deposita na interface pressão atmosférica – vácuo, minimizando problemas com efeito de memória⁵.

A última parte a ser comentada aqui da fonte electro spray é o cone de amostragem: a peça que serve de interface entre a região da fonte, que opera a pressão atmosférica, e o espectrômetro de massas. A tensão aplicada a este eletrodo em relação às lentes eletrostáticas mais internas (lente do *skimmer* e

⁵Estas modificações são discutidas mais profundamente em [104].

Figura 4.5: Diagrama de blocos do espectrômetro de massas *Platform II*.

Figura 4.6: Desenho do contra-eletrodo com fluxo cruzado utilizado neste trabalho. O aerossol vem do lado esquerdo e é obrigado a percorrer o caminho por dentro do eletrodo até chegar ao lado direito, onde fica o cone de amostragem.

skimmer na figura) controla a aceleração sofrida pelos íons em uma região onde ainda há uma pressão residual significativa. Conseqüentemente, o cone de amostragem permite que se exerça um controle grosseiro sobre a dinâmica de dissociação induzida por colisão (*CID: Collision Induced Dissociation*) dos íons que são amostrados para o espectrômetro de massas. Este recurso foi usado neste e em outro trabalho [88] para conseguir alguma informação qualitativa sobre a natureza dos processos levando à observação de determinadas características no espectro de massas.

4.3 Materiais e métodos

As substâncias testadas como sondas para a razão isotópica $^1\text{H}/^2\text{H}$ neste trabalho foram o manitol, o ácido glucônico, a glucosamina e a N-metilglucamina, sendo que esta última foi utilizada através do seu complexo com o borato. A figura 4.7 contém as fórmulas estruturais dessas substâncias. Os reagentes utilizados foram:

- manitol sólido P.A. (Sigma-Aldrich)
- cloridratos de glucosamina e N-metilglucamina P.A. (Sigma-Aldrich)
- solução aquosa 50% em massa de ácido glucônico (Sigma)
- água deionizada (NANOPure-UV)
- água deuterada 99,9% em deutério (fração molar) Sigma-Aldrich
- ácido bórico sólido P.A. (Sigma-Aldrich)
- acetonitrila grau HPLC (Omnisolv)

As soluções para os testes dos diferentes polióis como sondas para a razão isotópica H/D de amostras aquosas foram todas preparadas de maneiras semelhantes. Em uma balança analítica (Sartorius), quantidades medidas de água deionizada, água deuterada, poliol e acetonitrila foram misturadas em um frasco plástico, o sistema foi homogeneizado e as soluções injetadas no espectrômetro de massas para análise. As exceções a esta regra são as soluções preparadas para os testes com o ácido glucônico e com o ácido bórico e a N-metilglucamina. No primeiro caso, como não havia reagente sólido,

Figura 4.7: Fórmulas estruturais dos polióis usados como sondas para a razão isotópica H/D (A) manitol; (B) ácido glucônico; (C) glucosamina; (D) N-metilglucamina

adicionou-se diretamente à solução sendo preparada um pequeno volume de uma solução estoque aquosa 5 mM de ácido glucônico. No segundo caso, a N-metilglucamina foi adicionada diretamente às soluções em preparo, porém o ácido bórico foi previamente dissolvido na acetonitrila pura produzindo uma solução 600 μ M em ácido bórico, que foi então adicionada às soluções sendo preparadas na balança.

Para calcular as razões isotópicas H/D esperadas com base nas massas de reagentes utilizados calculam-se primeiro os números de mols de hidrogênio e deutério lábeis no sistema em função dessas massas:

$$n_{\text{H}} = \sum_i \frac{\nu_i p_{\text{H}}^i m_i}{M_i} \quad (4.1)$$

onde o índice i refere-se ao reagente sendo considerado (água deionizada, água deuterada, acetonitrila, etc), ν_i é o número de fórmula do hidrogênio lábil no reagente, p_{H}^i é a abundância isotópica relativa de ^1H no reagente, m_i é a massa de reagente utilizada e M_i é a massa molar do mesmo. Da mesma forma, o número de mols de deutério lábil no sistema é dado por:

$$n_{\text{D}} = \sum_i \frac{\nu_i (1 - p_{\text{H}}^i) m_i}{M_i} \quad (4.2)$$

Tabela 4.1: Abundâncias isotópicas de hidrogênio e massas molares dos reagentes utilizados no preparo das soluções

Reagente(<i>i</i>)	p_{H}^i	$M_i / \text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$
Água deonizada	0,99985	18,0003
Água deuterada	0,001	19,998
Ácido glucônico 5 mM	0,99985	18,0003

A razão isotópica esperada é calculada simplesmente dividindo a equação 4.1 pela 4.2:

$$r = \frac{\sum_i \frac{\nu_i p_{\text{H}}^i m_i}{M_i}}{\sum_i \frac{\nu_i (1-p_{\text{H}}^i) m_i}{M_i}} \quad (4.3)$$

No caso das soluções preparadas para os estudos com manitol, glucosamina e N-metilglucamina, assume-se que as únicas fontes de hidrogênio lábil para o sistema são a água natural e a deuterada, isto é, o índice *i* nas somatórias da equação 4.3 refere-se apenas a estes dois reagentes. No caso dos testes com o ácido glucônico, é necessário considerar também a quantidade de água introduzida no sistema pelo veículo do ácido glucônico, isto é, o índice *i* itera também sobre este último reagente. A tabela 4.1 contém os valores de p_{H}^i e M_i considerados para os diferentes reagentes.

Os espectros de massas de todas as soluções foram tirados em dois modos de aquisição. Em um experimento preliminar, um espectro de varredura da região do íon de interesse e imediações foi tirado para que os picos desejados pudessem ser localizados. De posse dessa informação, foi montada uma programação para aquisição no modo de monitoramento de íons selecionados (*SIR*), onde monitoraram-se canais de m/z centrados nos pontos de máximo dos picos de interesse de largura 0,05. O tempo gasto monitorando cada canal em cada espectro adquirido (*dwell time*) foi 50 ms. Além disso, alguns canais localizados entre os picos também foram monitorados para que se pudesse estimar a linha base espectral para posterior compensação. As aquisições no modo *SIR* foram feitas continuamente durante 5 a 10 minutos, gerando tipicamente algumas centenas de espectros por experimento. A figura 4.8 contém um esquema gráfico desta configuração de canais de aquisição de dados no modo *SIR*.

O método Z foi aplicado a todos os espectros ajustando apenas o padrão isotópico do elemento de interesse, isto é, os hidrogênios lábeis. Os padrões isotópicos dos outros elementos presentes nas fórmulas, inclusive os dos átomos de hidrogênio não lábeis, foram mantidos fixos e iguais aos naturais

Figura 4.8: Esquema da configuração de canais de aquisição de dados no modo *SIR*.
(A) Espectro contínuo; (B) Canais de aquisição de picos; (C) Canal de aquisição de linha base.

tabelados durante as regressões. Por exemplo, a fórmula elementar do gluconato, que é obtido pela ionização electrospray da solução de ácido glucônico, é $C_6H_{11}O_7$, sendo que, destes 11 átomos de hidrogênio apenas 5 são lábeis. Para o método Z, trabalhou-se com uma fórmula igual a $C_6H_6O_7H_5^*$, onde H^* representa o hidrogênio lábil, isto é, o único elemento cujo padrão isotópico é ajustado.

Nem todos os picos adquiridos foram utilizados na regressão do método Z. A regra prática utilizada para selecionar os canais utilizados na regressão foi garantir que o ponto de máximo do padrão isotopomérico estava sempre entre eles. Quando o espectro não era monótono, procurava-se utilizar na regressão picos tanto à direita, quanto à esquerda do pico base, de acordo com a regra prática proposta na seção 3.7. No caso de espectros monótonos, utilizou-se o pico base e mais alguns picos em massas mais altas.

4.3.1 Tratamento robusto dos dados

O método Z foi aplicado a cada um dos espectros das séries adquiridas nos experimentos, gerando seqüências de centenas de abundâncias isotópicas ajustadas. As medianas destas seqüências foram tomadas como estimativas das abundâncias isotópicas verdadeiras. Usou-se a mediana, e não a média, como estimador da tendência central das séries de abundâncias pelo fato de a primeira ser robusta a *outliers*, isto é, abundâncias claramente não pertencentes à distribuição normal de que se assume que os dados estão sendo amostrados. É necessário utilizar o estimador robusto, pois a fonte electrospray é sujeita a descargas elétricas transientes, também chamadas de descargas corona. Durante estas descargas, a natureza do processo levando à produção de íons muda radicalmente, alterando completamente o espectro observado e introduzindo *outliers* na série de abundâncias ajustadas.

Assim como é necessário usar um estimador robusto para a abundância verdadeira, também é necessário utilizar um estimador robusto para a dispersão das abundâncias ao redor do valor médio. A estatística utilizada é chamada de MAD: a mediana dos desvios absolutos em relação à mediana. Em notação algébrica:

$$MAD_N = MAD(X_1, X_2, \dots, X_N) = \text{med}(|X_1 - \text{med}(\mathbf{X})|, \dots, |X_N - \text{med}(\mathbf{X})|) \quad (4.4)$$

onde $\text{med}(\mathbf{X})$ é a mediana das N observações: $X_1, X_2, \dots, X_N$.

Entretanto, o valor esperado da estatística MAD de N amostras tiradas de uma distribuição normal

não é igual ao desvio padrão da distribuição. Para tornar o MAD consistente com o desvio padrão, é necessário multiplicá-lo por um fator de correção:

$$s_N = \frac{1}{\Phi^{-1}\left(\frac{3}{4}\right)} \text{MAD}_N \cong 1,483 \cdot \text{MAD}_N \quad (4.5)$$

onde Φ^{-1} é a inversa da função de probabilidade acumulada da distribuição normal de média zero e desvio padrão 1, isto é, $\Phi^{-1}\left(\frac{3}{4}\right)$ é o quantil de probabilidade 3/4 da distribuição $N(0, 1)$ ⁶.

De posse de estimativas da abundância verdadeira e do seu desvio padrão pode-se calcular o desvio padrão amostral da estatística utilizada para estimar a abundância verdadeira, isto é, a mediana de N amostras. Esta estatística poderá ser usada em última instância para obter intervalos de confiança para os resultados. O desvio padrão da estatística “mediana de N amostras” tiradas de uma distribuição normal é:

$$\sigma_{\text{med}_N} = \left(\frac{\pi}{2N}\right)^{1/2} \sigma \quad (4.6)$$

onde σ é o desvio padrão da distribuição normal de que os dados foram amostrados⁷.

Substituindo σ na equação 4.6 por s_N , a sua estimativa obtida com base no MAD_N segundo a equação 4.5 obtém-se a estimativa do desvio padrão da abundância mediana, usada na hora de reportar os resultados:

$$s_{\text{med}_N} = \left(\frac{\pi}{2N}\right)^{1/2} \cdot \frac{1}{\Phi^{-1}\left(\frac{3}{4}\right)} \cdot \text{MAD}_N \cong \frac{1,8582}{\sqrt{N}} \text{MAD}_N \quad (4.7)$$

Na equação 4.7, utilizou-se diretamente a estimativa do desvio padrão através do MAD de N amostras no lugar de σ sem maiores considerações, porque N é da ordem de centenas no nosso caso. Caso N fosse pequeno, certamente seria necessário levar em consideração explicitamente que o s_N fornecido pela equação 4.5 é apenas uma estimativa de σ , algo semelhante ao que é feito quando se trabalha com a média e o desvio padrão da amostra e usa-se a distribuição t de Student para obter intervalos de confiança para a média. Na seção 4.4.1, onde são fornecidos os resultados dos experimentos com

⁶Esse número é obtido calculando o valor esperado do MAD_N aplicado a amostras tiradas de uma distribuição normal e verificando que ele realmente é diferente do desvio padrão. Detalhes desse cálculo podem ser encontrados em [105]. Para mais informações a respeito da aplicação de estatísticas robustas em química, a sugestão é o tutorial de Rosseeuw [105] e também o artigo de Lago e colaboradores sobre o filtro de mediana móvel [106].

⁷ $\left(\frac{\pi}{2}\right)^{1/2} \cong 1,2533$, isto é, o desvio padrão da mediana de N amostras tiradas de uma distribuição normal é aproximadamente 25% maior que o desvio padrão da média das mesmas N amostras. Isso reflete o fato de que, se, por um lado, a mediana é robusta a outliers, por outro, ela é menos eficiente que a média na filtragem do ruído branco. Uma justificativa mais formal para este número encontra-se em [107].

o manitol, é feito um estudo de caso mais completo sobre a consistência deste método de tratamento dos dados.

Os resultados colocados em praticamente todas as tabelas da seção de 4.4 são razões isotópicas e δr , e não as abundâncias diretamente. Os desvios padrões das razões são calculados com base nos das abundâncias através da equação tradicional de propagação de desvios:

$$\sigma_r = \frac{\sigma_p}{(1 - p)^2} \quad (4.8)$$

onde p e σ_p são a abundância isotópica mediana e o seu desvio padrão (dado pela equação 4.7) respectivamente. No caso dos δr , que dependem linearmente dos r , a propagação de desvio é trivial.

4.4 Resultados e discussão

4.4.1 Manitol

O primeiro polioliol a ser testado como sonda para a razão isotópica H/D de amostras aquosas foi o manitol⁸. Quando submetido ao electrospray no modo de ânions, soluções contendo o manitol produzem na fase gasosa o íon manitolato, (fórmula elementar $C_6H_8O_6H_5^+$), correspondente ao manitol menos um próton. Este íon possui cinco hidrogênios lábeis, cujos padrões isotópicos podem ser ajustados para inferir a razão H/D do meio. A tabela 4.2 contém os dados de soluções preparadas misturando quantidades medidas de água, água deuterada, acetonitrila e manitol sólido.

A figura 4.9 contém os espectros de varredura na região de m/z igual a 180 obtidos com as soluções de (A) a (E)⁹. Observa-se claramente o deslocamento do centróide do padrão isotopomérico para a direita à medida que a abundância do deutério no meio vai aumentando. Na solução (A), a razão isotópica H/D é a natural. Na solução (E), utilizou-se apenas água deuterada, e observa-se no seu espectro que os picos do manitolato estão deslocados 5 u no sentido das massas mais altas, correspondendo à substituição de seus 5 átomos de hidrogênio lábeis por deutério.

⁸As razões para esta escolha foram de ordem meramente prática: havia disponibilidade desta substância no laboratório na época e uma pós-graduanda do grupo já vinha obtendo espectros de ESMS dos complexos formados entre o borato e o manitol, de modo que o seu conhecimento a respeito desses sistemas pôde ser utilizado.

⁹As tensões utilizadas na fonte electrospray foram: -2, 5 kV no capilar, -300 V no contra eletrodo e -50 V no cone de amostragem.

A tabela 4.3 contém os resultados da aplicação do método Z a espectros adquiridos no modo *SIR* dessas mesmas soluções, assim como os picos dos espectros que foram efetivamente utilizados nas regressões. Cada experimento gerou, na verdade, uma grande sequência de espectros, e o método Z foi aplicado a cada um deles para que os resultados fossem consolidados no final do processo.

Como este é o primeiro conjunto de experimentos a ser relatado, uma análise um pouco mais aprofundada da consistência do método de consolidação dos resultados experimentais vai ser feita. As figuras 4.10 e 4.11 contêm as correntes iônicas totais e as abundâncias isotópicas ajustadas em função do tempo de aquisição para os experimentos com manitol. As correntes iônicas totais, que refletem a produção total de íons na fonte em função do tempo, apresentam um comportamento visivelmente não estacionário. Por outro lado, as séries temporais das abundâncias ajustadas a estes mesmos dados, aparentam ser estacionárias. A figura 4.12 apresenta gráficos dos coeficientes de auto-correlação das séries temporais da figura 4.11. Observa-se que não há correlações de tempos longos nessas séries, ou seja, as determinações consecutivas das razões isotópicas H/D são essencialmente independentes. Isto permite que se use o fator de $N^{-1/2}$ na equação 4.7, dando a atenuação do desvio padrão da abundância mediana com o número de espectros. A figura 4.13 contém os histogramas das abundâncias isotópicas ajustadas nos diferentes experimentos da tabela 4.2, assim como as densidades de probabilidade das distribuições normais cujos parâmetros são as respectivas abundâncias medianas e os desvios padrões das abundâncias¹⁰. Pelo fato de as abundâncias isotópicas ajustadas terem sido liberadas para assumirem valores negativos, não se observam grandes desvios da normalidade nesses histogramas.

Para tentar verificar a validade da equação 4.7 para o desvio padrão amostral da abundância mediana, recorreu-se a uma outra metodologia de estimação de distribuições amostrais de estatísticas genéricas chamada de *bootstrap*¹¹. A tabela 4.4 contém os desvios padrões das abundâncias medianas calculados segundo a equação 4.7 e através de *bootstrap* de 10000 pontos da série temporal de abundâncias ajustadas. A figura 4.14 contém os histogramas das amostras geradas via *bootstrap* para cada experimento superpostos às densidades de probabilidade das distribuições normais cujos parâmetros são

¹⁰Da série temporal, dado pela equação 4.5, não o da mediana, dado pela equação 4.7.

¹¹O método *bootstrap*, proposto por Efron [108], baseia-se na geração de conjuntos de dados sintéticos aleatórios a partir das N amostras originais sorteando-as N a N com reposição. Para cada conjunto sintético, calcula-se a estatística de interesse e consolidam-se os resultados no final, na esperança de que este processo reproduza a distribuição de probabilidade dos dados originais e permita inferir a distribuição amostral da estatística de interesse. Há aplicações em química ambiental deste método na estimação de distribuições amostrais de algumas estatísticas calculadas sobre dados de interesse ambiental [109, 110, 111].

Tabela 4.2: Soluções preparadas para o teste do manitol como sonda para a razão H/D de uma amostra aquosa

	$m_{\text{H}_2\text{O}}$ (g)	$m_{\text{D}_2\text{O}}$ (g)	m_{MetCN} (g)	p_{H} esperada	$r_{\text{H/D}}$ esperada
(A)	0,99232	—	0,75617	0,99985	$6,666 \cdot 10^3$
(B)	0,74279	0,28849	0,77203	0,74111	2,863
(C)	0,50044	0,56150	0,78635	0,49796	$9,919 \cdot 10^{-1}$
(D)	0,25406	0,83296	0,75950	0,25380	$3,4001 \cdot 10^{-1}$
(E)	—	1,10185	0,78880	0,001	$1,001 \cdot 10^{-3}$

Tabela 4.3: Resultados fornecidos pelo método Z quando aplicado às soluções descritas na tabela 4.2

	picos	p_{H} ajustada	$r_{\text{H/D}}$	δr (por mil)
(A)	181-3	$0,99891 \pm 0,00014$	$(9,2 \pm 1,2) \cdot 10^2$	-862 ± 17
(B)	181-4	$0,7038 \pm 0,0005$	$2,376 \pm 0,006$	-170 ± 2
(C)	182-6	$0,4653 \pm 0,0007$	$0,870 \pm 0,003$	-123 ± 3
(D)	183-6	$0,2471 \pm 0,0006$	$0,3282 \pm 0,0011$	-35 ± 3
(E)	185-7	$0,0380 \pm 0,0003$	$0,0395 \pm 0,0003$	$+(3,85 \pm 3) \cdot 10^4$

as abundâncias medianas e os desvios padrões das abundâncias medianas (equação 4.7). Os desvios estimados através da equação 4.7 e os estimados via *bootstrap* são compatíveis, o que mostra que não há nada de fundamentalmente errado com a equação 4.7.

Examinando os resultados transcritos na tabela 4.3, saltam à vista duas características principais: (1) para a solução preparada utilizando apenas água deuterada, observa-se um grande desvio positivo da razão ajustada em relação ao seu valor esperado e (2) para as soluções de razões H/D intermediárias (B, C e D), observam-se desvios negativos sistemáticos. Observa-se ainda que o δr diminui em valor absoluto à medida que a proporção sintética de deutério vai aumentando. Para verificar se este efeito era observado apenas com o manitol, experimentos semelhantes foram realizados utilizando outros polióis como sondas e – para a nossa surpresa e, de certa forma, decepção – desvios semelhantes foram sistematicamente observados. Nas seções a seguir, estes estudos serão descritos e discutidos.

4.4.2 Ácido Glucônico

Em uma segunda série de experimentos, testou-se o ácido glucônico como sonda para a razão H/D em amostras aquosas. Em relação ao manitol, o ácido glucônico tem a vantagem de ter uma carboxila, mais ácida que as hidroxilas do manitol, gerando assim ânions gluconato (fórmula elementar

Figura 4.9: Espectros de ESMS de varredura do íon manitolato.

Figura 4.10: Correntes iônicas totais dos espectros *SIR* do íon manitolato.

Figura 4.11: Abundâncias de H ajustadas pelo método Z aos espectros *SIR* do íon manitolato.

Figura 4.12: Coeficientes de auto-correlação das abundâncias de H ajustadas aos espectros *SIR* do íon manitolato.

Figura 4.13: Histogramas das abundâncias isotópicas ajustadas para as séries de espectros do íon manitolato

Tabela 4.4: Resultados de *bootstrap* de 10000 pontos das séries de abundâncias isotópicas de H ajustadas aos espectros do íon manitolato.

	p_H (equação 4.7)	p_H (<i>bootstrap</i>)
(A)	$0,99891 \pm 0,00014$	$0,99890 \pm 0,00013$
(B)	$0,7038 \pm 0,0005$	$0,7038 \pm 0,0005$
(C)	$0,4653 \pm 0,0007$	$0,4655 \pm 0,0007$
(D)	$0,2471 \pm 0,0006$	$0,2471 \pm 0,0005$
(E)	$0,0380 \pm 0,0003$	$0,0380 \pm 0,0003$

Figura 4.14: Histogramas das medianas das amostras geradas por *bootstrap* a partir das séries de abundâncias isotópicas ajustadas pelo método Z.

As curvas são as densidades de probabilidade das distribuições normais definidas pelos resultados expostos na tabela 4.3.

$C_6H_6O_7H_5^*$) mais abundantemente na fase gasosa via electrospray. Por outro lado, o estoque de ácido glucônico utilizado foi uma solução aquosa 50% em massa. Isso quer dizer que a quantidade de água adicionada ao sistema junto com o ácido glucônico tem que ser levada em conta no cálculo da razão H/D esperada.

A tabela 4.5 contém os dados das soluções de ácido glucônico com razões H/D sintéticas preparadas para os testes. A figura 4.15 contém espectros de varredura na região do ânion gluconato obtidos com essas soluções¹². A tabela 4.6 contém os resultados fornecidos pelo método Z quando aplicado aos espectros *SIR* obtidos com as soluções descritas na tabela 4.5. Assim como no caso do manitol, desvios sistemáticos semelhantes das razões isotópicas ajustadas em relação aos valores esperados foram observados: (1) para a solução preparada utilizando apenas água deuterada, observa-se um grande desvio positivo da razão ajustada em relação ao seu valor esperado e (2) para as soluções de razões H/D intermediárias (B, C e D), observam-se desvios negativos, com tendência de redução em valor absoluto à medida que a abundância sintética de deutério aumenta.

Uma hipótese que se considerou ao observarem-se estes desvios foi a de que talvez estivesse havendo

¹²As tensões utilizadas na fonte electrospray foram: -2, 5 kV no capilar, -300 V no contra eletrodo e -35 V no cone de amostragem.

uma troca progressiva dos hidrogênios ligados aos átomos de carbono ainda na fase aquosa. Para testá-la, as soluções utilizadas para obter os resultados mostrados na tabela 4.6 foram guardadas por três dias e novos espectros *SIR* adquiridos. A tabela 4.7 contém os resultados obtidos aplicando o método Z a esses espectros. Os mesmos erros sistemáticos observados com as soluções frescas são observados também com as soluções “envelhecidas”, o que exclui a hipótese investigada. Na verdade, uma variação dos δr é visível. No caso das soluções (B), (C) e (D), os δr diminuíram em módulo, enquanto observa-se um aumento do δr para a solução (E). Essas observações não são incompatíveis com uma hipótese de absorção de umidade pelas soluções guardadas.

Uma coisa que pode ser observada nos espectros de varredura da figura 4.15, em particular nos quadros (A) e (E), é a presença de um íon de massa mais baixa que o gluconato. Apesar de os desvios observados não poderem ser explicados pela presença desta espécie¹³, uma pequena reflexão sobre a sua natureza química é interessante. A figura 4.16 contém espectros de varredura de soluções de gluconato utilizando diferentes solventes orgânicos para condicionar o meio para o electrospray. Todas as soluções foram preparadas através de diluições de uma solução estoque $5,0 \cdot 10^{-3}$ mol/L de ácido glucônico. A diferença entre as curvas está no tempo de envelhecimento dessa solução estoque. A correlação entre a intensidade relativa do íon de m/z igual a 193 u e o tempo de envelhecimento da solução estoque é clara. Além disso, observa-se que, uma vez que o solvente orgânico é adicionado, o crescimento do pico em 193 u com o tempo pára. Isso sugere que o interferente de massa mais baixa seja um produto de oxidação, provavelmente biológica, do ácido glucônico, isto é, um ácido cetoglucônico, o que não é discordante com a informação de m/z ¹⁴.

¹³A hipótese de que a interferência desse íon explique os desvios observados com as soluções (B), (C) e (D) pode ser descartada imediatamente. O interferente tem massa mais baixa que o gluconato, e os desvios observados nas razões isotópicas são negativos, isto é, a abundância ajustada do deutério é maior que a esperada, ou seja, os picos em m/z mais altos é que estão superestimados. Por outro lado, no caso da solução (E), o erro observado na razão isotópica é grande demais para ser explicado apenas por esse interferente. Os picos que são considerados na regressão são os em 199, 200 e 201, e, levando em conta que o pico mais intenso do interferente está em m/z igual a 197, pode-se dizer que o isotopômero M+2 dele é o que tem a maior influência sobre a regressão. Tendo em vista ainda as intensidades relativas dos dois íons, conclui-se que somente o interferente não é suficiente para explicar o desvio observado.

¹⁴Na verdade, uma análise um pouco mais cuidadosa das curvas da figura 4.16 mostra que a intensidade relativa do interferente para soluções preparadas com acetonitrila 80% volume/volume é ligeiramente mais alta que com os outros solventes. Em outro experimento, cujo espectro não foi incluído neste texto, observou-se que na presença de acetonitrila pura, o ácido glucônico converte-se rápida e quantitativamente ao ácido cetoglucônico, o que sugere que talvez não seja interessante trabalhar com proporções tão altas de acetonitrila. Estas observações motivaram a redução da proporção de acetonitrila para 20% nos experimentos subsequentes.

Tabela 4.5: Soluções preparadas para o teste do ácido glucônico como sonda para a razão H/D de uma amostra aquosa

	$m_{\text{H}_2\text{O}}$ (g)	$m_{\text{D}_2\text{O}}$ (g)	m_{gluc} (mg)	m_{MetCN} (g)	p_{H} esperada	$r_{\text{H/D}}$ esperada
(A)	0,97888	—	0,77103	0,03974	0,99985	$6,666 \cdot 10^3$
(B)	0,74201	0,29551	0,7657	0,03708	0,74563	2,931
(C)	0,50695	0,56503	0,75385	0,03979	0,51848	1,077
(D)	0,25582	0,82599	0,77772	0,0377	0,28372	$3,961 \cdot 10^{-1}$
(E)	—	1,10872	0,7653	0,0397	0,03776	$3,924 \cdot 10^{-2}$

Figura 4.15: Espectros de ESMS de varredura do íon gluconato. Obtidos com as soluções descritas na tabela 4.5.

Tabela 4.6: Resultados fornecidos pelo método Z quando aplicado às soluções descritas na tabela 4.5

	picos	p_{H} ajustada	$r_{\text{H/D}}$ ajustada	δr (por mil)
(A)	195-7	$0,99958 \pm 0,00003$	$(2,39 \pm 0,19) \cdot 10^3$	$(-6,4 \pm 0,3) \cdot 10^2$
(B)	195-8	$0,6682 \pm 0,0004$	$2,014 \pm 0,003$	$-312,9 \pm 1,2$
(C)	196-00	$0,4331 \pm 0,0004$	$0,7640 \pm 0,0011$	$-290,6 \pm 1,0$
(D)	197-01	$0,2308 \pm 0,0004$	$0,3001 \pm 0,0007$	-242 ± 2
(E)	199-01	$0,0527 \pm 0,0002$	$0,0557 \pm 0,0003$	$+419 \pm 7$

Tabela 4.7: Resultados fornecidos pelo método Z quando aplicado às soluções descritas na tabela 4.5 após três dias do preparo

	picos	p_H ajustada	$r_{H/D}$ ajustada	δr (por mil)
(A)	195-7	$0,99885 \pm 0,00011$	$(8,7 \pm 0,8) \cdot 10^2$	-869 ± 12
(B)	195-8	$0,6777 \pm 0,0002$	$2,1026 \pm 0,0019$	$-282,6 \pm 0,7$
(C)	196-00	$0,4398 \pm 0,0003$	$0,7851 \pm 0,0010$	$-271,0 \pm 0,9$
(D)	197-01	$0,2439 \pm 0,0002$	$0,3227 \pm 0,0004$	$-185,4 \pm 0,9$
(E)	199-01	$0,05896 \pm 0,00014$	$0,06266 \pm 0,00016$	$+597 \pm 4$

Figura 4.16: Espectros de varredura obtidos com soluções $100 \mu\text{M}$ de gluconato em solventes de diferentes composições. Normalização feita de modo que o pico em 195 u tenha intensidade 1. Verificação do efeito do envelhecimento da solução estoque de gluconato.

4.4.3 Glucosamina

O terceiro poliol a ser considerado foi a glucosamina. Do ponto de vista de preparo das soluções, a glucosamina tem a mesma vantagem do manitol, isto é, estar disponível na forma sólida e seca (cloridrato), podendo ser dissolvida diretamente na amostra. Do ponto de vista da espectrometria de massas e da aplicação do método Z, a glucosamina é mais interessante que ambos, manitol e o ácido glucônico. Isto deve-se ao fato de o íon gerado a partir da glucosamina via electrospray ser um cátion (glucosamônio: $C_6H_7O_5NH_7^+$), formado pela incorporação de um hidrogênio lábil ao grupo amina da molécula. As intensidades espectrais obtidas no modo de cátions são, em geral, maiores que no modo de ânions e, para o método Z, quanto maior for o número de instâncias do elemento de interesse no íon sendo analisado, melhor.

A tabela 4.8 contém os dados de soluções de glucosamina em água de diferentes composições isotópicas sintéticas e a figura 4.17 contém os espectros de varredura destas soluções¹⁵. Na tabela 4.9 estão os δr ajustados com os espectros *SIR* dessas soluções em diferentes tensões do cone de amostragem do espectrômetro de massas. A razão para se verificar a influência da tensão do cone de amostragem sobre os resultados é o fato de esta lente eletrostática controlar a energia cinética fornecida aos íons na interface entre a fonte electrospray, que opera a pressão atmosférica, e a região dos quadrupolos, que encontra-se sob alto vácuo, sendo assim uma região de pressão intermediária onde os íons ainda têm a chance de colidirem com um gás residual. É notório que a tensão aplicada ao cone de amostragem – pelo menos no espectrômetro de massas usado neste trabalho – determina a taxa de dissociação induzida por colisão sofrida pelos íons [88]. Uma variação significativa dos resultados com a tensão do cone seria uma evidência forte de que o processo que leva ao enriquecimento em deutério é uma troca dos hidrogênios não lábeis na fase gasosa. Entretanto, nos resultados mostrados na tabela 4.9, não é possível observar variação significativa dos resultados com a tensão do cone.

Além destas, outras duas séries de soluções com glucosamina foram preparadas para testes (tabelas 4.10 e 4.11). A tensão do cone de amostragem foi mantida igual a 20 V, porém a tensão do capilar foi variada para 2, 0 e 2, 5 kV respectivamente, contra os 3, 0 kV que tinham sido usados nos experimentos cujos resultados estão na tabela 4.9. A tabela 4.12 mostra os desvios observados com estas séries de experimentos, assim como os resultados já mostrados na terceira coluna da tabela 4.9. Observam-se

¹⁵As tensões utilizadas na fonte electrospray foram: +3, 0 kV no capilar, +300 V no contra eletrodo e +20 V no cone de amostragem.

Tabela 4.8: Soluções preparadas para o teste da glucosamina como sonda para a razão H/D de uma amostra aquosa

	$m_{\text{H}_2\text{O}}$ (g)	$m_{\text{D}_2\text{O}}$ (g)	m_{gluc} (mg)	m_{MetCN} (g)	p_{H} esperada	$r_{\text{H/D}}$ esperada
(A)	0,96646	—	0,18	0,149	0,99985	$6,666 \cdot 10^3$
(B)	0,74488	0,29058	0,17	0,152	0,74027	2,850
(C)	0,50070	0,55747	0,12	0,151	0,49989	$9,996 \cdot 10^{-1}$
(D)	0,26113	0,81919	0,55	0,156	0,26222	$3,554 \cdot 10^{-1}$
(E)	—	0,94597	0,2	0,158	0,001	$1,001 \cdot 10^3$

as seguintes características, deixando de lado, por ora, as soluções tipo (A):

1. Para as soluções (B), (C) e (D), não há variação significativa do δr ajustado quando a tensão do capilar é variada de 2,5 kV para 3,0 kV. Por outro lado, quando a tensão do capilar vai de 2,0 kV para 3,0 kV, parece haver variações negativas significativas no δr ajustado para todas as soluções¹⁶.
2. Para as soluções do tipo (E), as preparadas apenas com água deuterada, observa-se variação positiva significativa do δr tanto quando a tensão do capilar vai de 2,0 para 2,5 kV, quanto quando ela vai de 2,5 para 3,0 kV.
3. Para as mesmas tensões de capilar, o δr torna-se menos negativo à medida que a proporção sintética de deutério aumenta. Este comportamento também foi observado para o manitol e o ácido glucônico.

A observação 3 indica que o tipo de fenômeno que leva aos desvios sistemáticos observados com a glucosamina é o mesmo que no caso do manitol e do ácido glucônico. Além disso, se, por um lado, não foram observadas variações nos δr com a tensão do cone, por outro, há variação dos resultados com a alta tensão do capilar. No caso das soluções (B), (C) e (D) é um pouco difícil afirmar que há uma tendência sistemática nítida nas variações. Entretanto, no caso da solução (E) ela existe e é bastante clara. Exatamente qual é a natureza do fenômeno e qual é a influência da tensão do capilar sobre ele – se é que é este mesmo o parâmetro determinante – é uma questão que vai ficar em aberto neste trabalho.

¹⁶O resultado obtido com a solução (B) e $V_{\text{cap}} = 2,5 \text{ kV}$ ($\delta r = +120 \pm 8$ por mil) deve ser desconsiderado, pois trata-se provavelmente de um erro de pesagem.

Figura 4.17: Espectros de ESMS de varredura do íon glucosamônio. Obtidos com as soluções descritas na tabela 4.8.

Tabela 4.9: Resultados fornecidos pelo método Z quando aplicado às soluções descritas na tabela 4.8

	picos	δr ($V_{\text{cone}} = 20 \text{ V}$)	δr ($V_{\text{cone}} = 40 \text{ V}$)	δr ($V_{\text{cone}} = 80 \text{ V}$)
(A)	180-2	$-(8,4 \pm 0,4) \cdot 10^2$	$(0 \pm 1) \cdot 10^3$	-902 ± 9
(B)	180-4	-129 ± 8	-127 ± 9	-125 ± 8
(C)	182-6	-100 ± 6	-110 ± 4	-103 ± 5
(D)	184-7	-24 ± 11	-34 ± 8	-28 ± 10
(E)	186-8	$(2,60 \pm 0,06) \cdot 10^4$	$(2,47 \pm 0,04) \cdot 10^4$	$(2,95 \pm 0,04) \cdot 10^4$

Tabela 4.10: Soluções preparadas para o teste da glucosamina como sonda para a razão H/D de uma amostra aquosa

	$m_{\text{H}_2\text{O}}$ (g)	$m_{\text{D}_2\text{O}}$ (g)	m_{gluc} (mg)	m_{MetCN} (g)	p_{H} esperada	$r_{\text{H/D}}$ esperada
(A)	1	—	3,25	?	0,99985	$6,666 \cdot 10^3$
(B)	0,75536	0,31636	4,10	0,2389	0,72639	2,655
(C)	0,50574	0,55743	5,04	0,16362	0,50241	1,001
(D)	0,25931	0,81420	3,65	0,16305	0,26205	$3,551 \cdot 10^{-1}$
(E)	—	1,10411	3,91	0,157	0,001	$1,001 \cdot 10^{-3}$

Tabela 4.11: Soluções preparadas para o teste da glucosamina como sonda para a razão H/D de uma amostra aquosa

	$m_{\text{H}_2\text{O}}$ (g)	$m_{\text{D}_2\text{O}}$ (g)	m_{gluc} (mg)	m_{MetCN} (g)	p_{H} esperada	$r_{\text{H/D}}$ esperada
(A)	1	—	?	0,16170	0,99985	$6,666 \cdot 10^3$
(B)	0,75380	0,28840	0,97	0,21153	0,74398	2,906
(C)	0,50335	0,53456	1,19	0,16349	0,51168	1,048
(D)	0,26215	0,81125	0,98	0,16161	0,26846	$3,670 \cdot 10^{-1}$
(E)	—	1,11326	?	0,15317	0,001	$1,001 \cdot 10^{-3}$

Tabela 4.12: Resultados fornecidos pelo método Z quando aplicado às soluções descritas nas tabelas , 4.10, 4.11 e 4.8 (colunas 3, 4 e 5 respectivamente)

	picos	δr ($V_{\text{cap}} = 2,0 \text{ kV}$)	δr ($V_{\text{cap}} = 2,5 \text{ kV}$)	δr ($V_{\text{cap}} = 3,0 \text{ kV}$)
(A)	180-2	$+(1,4 \pm 0,9) \cdot 10^3$	$-(5,8 \pm 1,9) \cdot 10^2$	$-(8,4 \pm 0,4) \cdot 10^2$
(B)	180-4	$-106,3 \pm 0,6$	$+120 \pm 8$	-129 ± 8
(C)	182-6	$2,0 \pm 0,6$	-84 ± 5	-100 ± 6
(D)	184-7	$+12,9 \pm 1,0$	-51 ± 6	-24 ± 11
(E)	186-8	$+4577 \pm 14$	$+(7,41 \pm 0,11) \cdot 10^3$	$(2,60 \pm 0,06) \cdot 10^4$

4.4.4 Borato + N-metilglucamina

A última sonda a ser testada foi o complexo formado entre o borato e a N-metilglucamina. Este complexo possui carga +1 e a fórmula elementar $\text{BC}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_5\text{N}_2\text{H}_{10}^*$, tendo uma alta relação m/z (398) e um sedutor número de átomos de hidrogênio lábeis (10). O objetivo com estes estudos era, por um lado, por à prova a onipresença dos desvios observados e, por outro, verificar se o fenômeno que os causa é, de alguma forma, impedido pelo fato de a molécula ficar restrita a uma conformação fixa no complexo.

A tabela 4.13 contém os dados das soluções preparadas para estes testes. A figura 4.18 contém os seus espectros de varredura e a tabela 4.14 os resultados fornecidos pelo método Z quando aplicado aos espectros *SIR* das mesmas¹⁷.

Novamente, desvios equivalentes aos observados em quase todos os experimentos reportados nas seções anteriores são observados. Da mesma maneira que fora observado nos casos anteriores, também observa-se uma tendência do δr tornar-se menos negativo à medida que a proporção sintética de deutério aumenta. Isto sugere que algo semelhante ao que fora observado com o manitol, ácido glucônico e glucosamina também acontece aqui e ilustra a ampla gama de moléculas para as quais estes desvios

¹⁷As tensões utilizadas na fonte electrospray foram: +3,0 kV no capilar, +300 V no contra eletrodo e +40 V no cone de amostragem.

Tabela 4.13: Soluções preparadas para o teste da N-metilglucamina como sonda para a razão H/D de uma amostra aquosa através do seu complexo com o borato

	$m_{\text{H}_2\text{O}}$ (g)	$m_{\text{D}_2\text{O}}$ (g)	$m_{\text{N-met}}$ (mg)	m_{MetCN} (g)	p_{H} esperada	$r_{\text{H/D}}$ esperada
(A)	0,98070	—	0,149	0,36	0,99985	$6,666 \cdot 10^3$
(B)	0,75010	0,29019	0,151	0,18	0,74186	2,874
(C)	0,50143	0,56213	0,156	0,18	0,49817	$9,927 \cdot 10^{-1}$
(D)	0,26304	0,83331	0,267	0,43	0,26034	$3,520 \cdot 10^{-1}$
(E)	—	1,09460	0,162	?	0,001	$1,001 \cdot 10^{-3}$

Figura 4.18: Espectros de ESMS de varredura do complexo do borato com a N-metilglucamina. Obtidos com as soluções descritas na tabela 4.13.

são observados.

4.5 Discussão geral dos desvios observados

Vamos discutir os desvios sistemáticos observados nos resultados do método Z apresentados nas seções anteriores dividindo-os em três grupos: soluções preparadas utilizando apenas água isotopicamente natural (soluções tipo A), soluções com abundâncias intermediárias de deutério (soluções tipos B, C e D) e soluções preparadas usando apenas água deuterada (soluções tipo E).

Tabela 4.14: Resultados fornecidos pelo método Z quando aplicado às soluções descritas na tabela 4.13

	picos	p_H ajustada	$r_{H/D}$ ajustada	δr (por mil)
(A)	398-02	$0,9989 \pm 0,0003$	$(9 \pm 2) \cdot 10^2$	$-(8,6 \pm 0,3) \cdot 10^2$
(B)	401-5	$0,7064 \pm 0,0006$	$2,406 \pm 0,007$	-163 ± 2
(C)	403-7	$0,4661 \pm 0,0008$	$0,873 \pm 0,003$	-120 ± 3
(D)	405-9	$0,2457 \pm 0,0006$	$0,3257 \pm 0,0010$	-75 ± 3
(E)	407-10	$0,0226 \pm 0,0014$	$0,0231 \pm 0,0004$	$+(2,21 \pm 0,04) \cdot 10^4$

Primeiro grupo: soluções (A) Com relação ao primeiro grupo, pouca coisa pode ser dita com base nestes estudos preliminares. O fato de abundância de deutério ser muito baixa dificulta em muito a determinação da razão isotópica com boa precisão, conforme pôde ser observado nos resultados apresentados. Uma análise mais rigorosa desses dados exigiria: (1) tempos maiores de aquisição de dados, para a obtenção de razões mais precisas e (2) comparação com padrões isotópicos certificados para a verificação e compensação de erros sistemáticos relacionados com o espectrômetro de massas.

Segundo grupo: soluções (B), (C) e (D) Para o segundo grupo, uma discussão mais aprofundada é possível. Foram observadas tanto abundâncias inferiores, quanto superiores às esperadas. Entretanto, observou-se uma tendência geral de os δr tornarem-se mais positivos à medida que a proporção sintética de deutério era aumentada. Isto é, quando se ia das soluções tipo (B) para as tipo (D) passando pelas tipo (C). Algumas das hipóteses que podem ser propostas para explicar estes desvios são:

1. Interferências isobáricas. Na verdade, havia realmente interferência isobárica no caso do ácido glucônico. Entretanto, este interferente possuía relação m/z menor que o analito, de modo que o seu efeito deveria ser de deslocar a razão H/D sempre para valores mais **altos**. Além disso, procurou-se esquivar-se deste interferente através de uma escolha adequada dos picos para a regressão. Por outro lado, no caso da glucosamina, os espectros de varredura (figura 4.17, página 128) mostram claramente a ausência de interferentes em toda a região de interesse e, não obstante, desvios sistemático de mesmo sentido na abundância ajustada são observados.
2. Contaminação entre amostras, ou efeito de memória. Esta hipótese também não explica os resultados obtidos, pois as soluções foram injetadas em ordens aleatórias no espectrômetro de massas. Além disso, o tempo de equilíbrio do poliol com o seu meio aquoso é muito curto, de modo que o material ressuspendido do contra eletrodo tende a assumir o padrão isotópico da

água que está sendo injetada, o que minimiza os efeitos de intercontaminação.

3. Discriminação instrumental de massas. Esta hipótese não pode ser rejeitada. Entretanto, os desvios observados parecem grandes demais para serem explicados apenas por este efeito. Na modelagem da resposta do método Z à discriminação instrumental de massas feitas nas seções 3.2, 3.3, 3.5 e 3.6, considerou-se um aumento de 1% por unidade de m/z na sensibilidade do aparelho, e não foram observados δr tão grandes. Além disso, caso os desvios fossem devidos somente a discriminação instrumental de massas, estes deveriam ter um único sentido, mas isto não foi observado.
4. Troca de hidrogênios ligados aos átomos de carbono. A última hipótese é também a mais polêmica de todas.

Foram investigados dois momentos do processo de análise em que esta troca pudesse estar acontecendo: (1) ainda na fase aquosa e (2) na transferência dos íons da região de pressão atmosférica da fonte electrospray para o alto vácuo do quadrupolo. A primeira possibilidade foi rejeitada nos estudos com o ácido glucônico, quando então as soluções preparadas foram guardadas por três dias e reanalisadas, não se observando variações nas razões isotópicas que corroborassem a hipótese de troca progressiva dos hidrogênios não lábeis. A segunda possibilidade foi rejeitada nos estudos com a glucosamina, quando variou-se a tensão do cone de amostragem do espectrômetro de massas e não se observou variação significativa das razões isotópicas ajustadas. Por outro lado, quando a tensão do capilar foi variada nos experimentos com a glucosamina, foram observadas variações dos δr . No caso das soluções (B), (C) e (D), este efeito não é muito nítido, mas com as soluções tipo (E), ele é gritante.

Na verdade, no ano passado, Reed e colaboradores [112] observaram a troca na fase gasosa de átomos de hidrogênio a princípio não lábeis, como, por exemplo:

- Hidrogênio ligado ao anel aromático entre as duas carboxilas do ácido isoftálico
- Dois hidrogênios em α em relação ao grupo ceto no ácido 2-oxoglutárico
- Três hidrogênios da metila ligada ao anel aromático entre as duas carboxilas do ácido 2-metilisoftálico

Isto mostra que não é absurda a hipótese de que os desvios sejam devidos a uma troca hidrogênio-deutério ocorrendo em maior extensão que a prevista, em virtude de algum processo ocorrendo durante a transferência dos íons para a fase gasosa. Uma maneira de se verificar se os hidrogênios não lábeis estão relacionados com os desvios observados seria usar moléculas que têm **apenas** hidrogênios trocáveis, como, por exemplo, a guanidina, aminoguanidina, oxalato de hidrazina, N-N'-diaminoguanidina ou tetraminopirimidina. Os átomos de hidrogênio dessas moléculas estão todos ligados a átomos de nitrogênio, sendo assim lábeis. Esta possibilidade fica em aberto para atividades futuras.

Terceiro grupo: soluções (E) Para o terceiro grupo, o das soluções maximamente deuteradas, esperava-se que a razão isotópica medida fosse igual a $1,001 \cdot 10^{-3}$, isto é, a razão fornecida pelo fabricante da água deuterada¹⁸. Na prática, foram obtidas sistematicamente razões H/D menores que as esperadas. Em princípio, este fato poderia ser explicado pela presença de água na acetonitrila, ou então pela presença de um teor de hidrogênio maior que o reportado pelo fabricante na água deuterada. Para testar esta hipótese, vamos formular um pequeno modelo que nos permita calcular a quantidade de água que deveria estar presente na acetonitrila, ou na água deuterada, para que os desvios observados fossem explicados. Para tanto, basta que se considere explicitamente na equação 4.3 (página 112) a contribuição da água presente na acetonitrila para a razão H/D do sistema:

$$r = \frac{\sum_i \frac{\nu_i p_H^i m_i}{M_i} + \frac{2x_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{MetCN}} m_{\text{MetCN}} p_H^{\text{natural}}}{M_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{natural}}}}{\sum_i \frac{\nu_i (1-p_H^i) m_i}{M_i} + \frac{2x_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{MetCN}} m_{\text{MetCN}} (1-p_H^{\text{natural}})}{M_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{natural}}}} \quad (4.9)$$

onde $x_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{MetCN}}$ é o número de mols de água por grama de acetonitrila, m_{MetCN} é a massa de acetonitrila utilizada e p_H^{natural} e $M_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{natural}}$ são a abundância relativa de H natural e a massa molar da água isotopicamente natural, pois assume-se que a água vinda da acetonitrila não tem nenhum enriquecimento isotópico particular. O produto $x_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{MetCN}} m_{\text{MetCN}}$ é simplesmente o número de mols de água vindos da acetonitrila.

Apesar da sua aparência pouco amigável, a equação 4.9 pode ser usada de duas maneiras bastante simples: quando assumem-se conhecidas todas as massas, p_H^i e massas molares, ela se transforma em

¹⁸Exceto para o caso do ácido glucônico, quando foi necessário adicionar água ao sistema. Lembrar, no entanto, que, mesmo nesse caso, as razões H/D foram menores que as esperadas.

uma equação de primeiro grau para a concentração de água na acetonitrila dada uma certa razão observada. Por outro lado, quando se assume conhecida a concentração de água na acetonitrila, a equação 4.9 pode ser usada como uma equação de primeiro grau para a abundância isotópica do hidrogênio na água deuterada. A tabela 4.15 contém as concentrações de água na acetonitrila e as abundâncias de H na água deuterada que explicariam as razões isotópicas ajustadas para os experimentos realizados com as soluções (E), reportados nas seções anteriores.

Considerando que o teor máximo de hidrogênio fornecido pelo fabricante da água deuterada (Sigma-Aldrich) está correto, observa-se que o menor dos teores de água na acetonitrila que explicam os resultados é $1,94 \cdot 10^{-2}$ mol/g. Entretanto, determinou-se por titulação de Karl-Fisher que a concentração de água na acetonitrila utilizada é menor que $4,5 \cdot 10^{-5}$ mol/g, isto é, quase três ordens de grandeza menor que o necessário.

Por outro lado, assumindo que a concentração de água na acetonitrila é $4,5 \cdot 10^{-5}$ mol/g, obtêm-se algumas abundâncias de hidrogênio mínimas na água deuterada que são apenas 5 ou 8 vezes maiores que o valor fornecido pelo fabricante do reagente, o que não é muito difícil de imaginar nesses níveis de enriquecimento isotópico. Adicionar a isso a informação, ainda inédita nesta tese, de que os testes com glucosamina reportados nas linhas 3, 4 e 5 da tabela 4.15 foram realizados, na verdade, na ordem cronológica 4, 5 e 3, seria suficiente para levar um leitor mais persuasível a enxergar uma correlação entre o tempo e o valor de $p_{\text{H}}^{\text{D}_2\text{O}}$ e a abraçar a hipótese de que os desvios observados com essas soluções sejam devidos à contaminação progressiva da água deuterada por umidade. Um leitor mais atento, no entanto, não vai ter esquecido da informação dada na página 116, onde foi dito que a primeira molécula a ser testada como sonda tinha sido o manitol. Além disso, o ácido glucônico também foi utilizado antes da glucosamina, e o lacre da amostra de água deuterada foi aberto no momento da preparação da primeira solução de manitol. Conclui-se, portanto, que não é possível explicar o observado simplesmente pela contaminação da água deuterada por água natural.

Ainda que correndo o risco de ser severamente criticado, o autor vai se permitir um pequeno momento de especulação. Talvez seja possível explicar os desvios observados com as soluções (E) assumindo que os próprios átomos de hidrogênio da metila da acetonitrila tornem-se razoavelmente lábeis em algum instante durante o fenômeno de electrospray. Obviamente, nada na literatura de físico-química de fases líquida ou gasosa corrobora esta hipótese. Entretanto, é importante ressaltar que o electrospray é uma situação de transição com características bastante diferentes das das fases líquida e gasosa.

Tabela 4.15: Concentrações de água na acetonitrila, ou abundâncias de H na água deuterada necessários para explicar os desvios observados

Poliol (tabela)	$r_{H/D}$	$x_{H_2O}^{MetCN} (mol/g)$	$p_H^{D_2O}$
Manitol (4.2)	$0,0395 \pm 0,0002$	$4,48 \cdot 10^{-2}$	0,0380
Ácido glucônico (4.5)	$0,0557 \pm 0,0002$	$1,94 \cdot 10^{-2}$	0,0151
Glucosamina (4.8)	$(2,70 \pm 0,05) \cdot 10^{-2}$	$1,40 \cdot 10^{-1}$	0,0263
Glucosamina (4.10)	$(5,583 \pm 0,0012) \cdot 10^{-3}$	$2,90 \cdot 10^{-2}$	0,00554
Glucosamina (4.11)	$(8,41 \pm 0,09) \cdot 10^{-3}$	$4,85 \cdot 10^{-2}$	0,00833
N-metilglucamina (4.13)	$(2,31 \pm 0,03) \cdot 10^{-2}$	$1,34 \cdot 10^{-1}$	0,0226

Infelizmente, esta questão não poderá ser respondida neste trabalho, ficando em aberto para investigações futuras por outros estudantes do grupo, ou de outros laboratórios, que, porventura, venham a se interessar por estas observações.

Capítulo 5

Conclusões e perspectivas

Demonstrou-se que é possível determinar padrões isotópicos elementares a partir de espectros de massas de íons contendo múltiplos elementos poli-isotópicos com o auxílio de um método matemático. O método desenvolvido – chamado de método Z – foi caracterizado aplicando-o a um grande número de espectros simulados com o objetivo de modelar não-idealidades experimentais comumente encontradas em espectrometria de massas. Os dados obtidos mostraram que – ao contrário do que o senso comum dos pesquisadores da área tende a sugerir – análises isotópica baseadas em espécies contendo múltiplos elementos poli-isotópicos podem, em muitos casos, fornecer resultados mais exatos e precisos que os obtidos através a abordagem convencional.

Como um exemplo mais vivo do seu funcionamento, o método Z foi aplicado a uma série de experimentos realizados com o objetivo de estudar a possibilidade de se usarem polióis como sondas para razões isotópicas hidrogênio/deutério com amostragem por equilíbrio e análise por espectrometria de massas com ionização electrospray. Através do método Z, foi possível observar erros sistemáticos nas razões isotópicas hidrogênio/deutério ajustadas que sugerem que haja uma troca parcial dos hidrogênios não lábeis dos polióis, possivelmente durante o electrospray. Esta hipótese é concordante com resultados publicados recentemente na literatura [112] para outras classes de moléculas. Os estudos experimentais realizados não foram nem de longe exaustivos. Muitas questões a respeito da natureza do fenômeno levando à troca dos hidrogênios não lábeis ficam em aberto para pessoas que porventura venham a se interessar pelo assunto. Do ponto de vista da química analítica, fica a sugestão de tentar utilizar, não os polióis, mas bases nitrogenadas contendo apenas hidrogênios lábeis como sondas.

A principal contribuição deste trabalho é a ampliação da quantidade de espécies químicas e modali-

dades de espectrometria de massas aceitáveis para análises isotópicas. Aqui, optou-se por dar ênfase à compreensão teórica das virtudes e defeitos das novas abordagens analíticas possíveis, levantando informações que possam servir de guia mais tarde para a implementação de métodos específicos de análise. Espera-se que as consequências destes estudos para a área surjam com a proposição por outras pessoas de novos métodos de análises isotópicas baseados nestas idéias.

Apêndice A

Sobre dimensões de massas atômicas e moleculares e as abscissas dos espectros de massas

O objetivo deste apêndice é comentar as notações utilizadas para massas atômicas e moleculares e relações massa/carga dos íons, freqüentemente usadas neste trabalho. A notação utilizada baseia-se na recomendação da IUPAC publicada em 1991 no periódico *Pure and Applied Chemistry* [113].

A unidade de massa atômica e molecular é, por definição, 1/12 da massa do isótopo 12 do carbono. Para quase todos os isótopos de todos os elementos, a massa expressa nessa unidade não é um número inteiro. Entretanto, a parte inteira desse número é sempre igual ao “número de massa” m do núcleo em questão, isto é, a soma do número de prótons e nêutrons. A IUPAC recomenda que os íons sejam identificados pelos seus números de massas, e esses últimos sejam tratados como adimensionais.

Da mesma forma, a IUPAC recomenda que a carga do íon seja reportada apenas na forma de um “número de carga” z , isto é, o número de cargas elementares do íon, também tratado como adimensional.

Por fim, a IUPAC recomenda que as relações massa/carga dos íons sejam expressas na forma de razões entre “número de massa” e “número de carga” (m/z), considerados adimensionais, de modo que esta última também fica adimensional.

Apêndice B

Levando em conta a limitação de tempo de aquisição de dados nos estudos com não-idealidades aleatórias

A equação 3.2 (página 39), usada para consolidar os resultados das simulações de Monte Carlo nos estudos sobre a resposta do método Z ao ruído, possui um fator de $\sqrt{\frac{n}{n_0}}$ no seu lado direito. Conforme já foi citado, este fator serve para aumentar o realismo da comparação entre os resultados obtidos com diferentes fórmulas ao se levar em conta a limitação no tempo disponível para a aquisição dos dados.

A lógica por trás desse fator é que, quanto maior for o número de picos a serem monitorados no espectro experimental, maior será o tempo necessário para varrer o espectro inteiro. Conseqüentemente, se o tempo disponível para que as medidas sejam realizadas for limitado, quanto maior o número de picos a serem monitorados, menor será o número de espectros completos que poderão ser adquiridos. Ou seja, o número de espectros disponíveis para a aplicação do método Z será menor e isso se manifestará na forma de uma menor precisão dos resultados.

Se o espectro de um certo íon tem n_0 picos, então o número de espectros que podem ser tirados desse íon em um intervalo de tempo total T , será:

$$N_0 = \frac{T}{n_0 t}$$

onde t é o tempo necessário para adquirir um pico. O desvio padrão da média da série de resultados

do método Z calculados para estes espectros será:

$$\sigma_{N_0} = \frac{\sigma}{\sqrt{N_0}} = \sigma \sqrt{\frac{n_0 t}{T}}$$

onde σ é o desvio padrão da população de onde a amostra de resultados do método Z foi tirada.

Da mesma forma, para um segundo espectro com n picos, o desvio padrão da média dos resultados do método Z calculados para uma série de espectros desse íon tirados em um mesmo tempo T e com o mesmo tempo t de monitoramento de cada pico será:

$$\sigma_N = \frac{\sigma}{\sqrt{N}} = \sigma \sqrt{\frac{nt}{T}}$$

A razão entre os desvios padrões das duas médias é:

$$\frac{\sigma_N}{\sigma_{N_0}} = \sqrt{\frac{n}{n_0}}$$

quando as duas séries de resultados do método Z foram amostrados de distribuições com a mesma variância, isto é, as determinações isotópicas baseadas nos dois íons possuem a mesma precisão “intrínseca”.

Por este motivo, os desvios padrões estimados para as razões isotópicas ajustadas nas diferentes situações foram multiplicados por $\sqrt{\frac{n}{n_0}}$ antes de serem comparadas. O valor de n_0 utilizado é totalmente arbitrário, contanto que seja o mesmo para todas as fórmulas.

Apêndice C

Listagem da Biblioteca do Método Z

metodoz5.h

```
#ifndef __METODOZ5_H
#define __METODOZ5_H

#include <glib.h>

#ifdef __cplusplus
extern "C" {
#endif

typedef struct _TMetodoZ5 TMetodoZ5;

/*
  Callback function used during regression. Receives the number of
  iterations performed, a pointer to a TMetodoZ5 structure and an
  arbitrary cookie. Returns TRUE to continue adjustment and FALSE to
  stop it.
*/
typedef gboolean (* TMetodoZ5Callback) (gint,
                                         TMetodoZ5 *,
                                         gpointer);

/*
  Structure representing a molecule whose component atoms' isotope
  patterns are going to be determined by the Z method.

  (1) - number of elements
  (2) - formula numbers
  (3) - number of columns of the next three matrices, i.e., the maximum
        number of isotopes of the elements.
  (4) - First estimates for the isotope patterns. (nel,nc) matrix in
        row-major order. Each row contains one element.
  (5) - Regression mask: 0=vary, -1=keep fixed. (nel,nc) matrix in
        row-major order. */
struct _TMetodoZ5 {
  gint nel;          /* 1 */
  gint *nu;          /* 2 */
};
```

```

    gint nc;          /* 3 */
    gdouble *a;       /* 4 */
    gint *mask;       /* 5 */
};

/*
  Purpose: create a TMetodoZ5 structure
  Arguments: nel: number of elements
             nc: maximum number of isotopes
  Returns: pointer to the newly created structure
*/
TMetodoZ5 *
metodoz5_create (gint nel,
                gint nc);

/*
  Purpose: destroy a TMetodoZ5 structure
  Arguments: metz: pointer to the structure
  Returns: nothing
*/
void
metodoz5_destroy (TMetodoZ5 *metz);

/*
  Purpose: perform a Z method regression
  Arguments: metz: pointer to a TMetodoZ5 structure
             spec: low-resolution mass spectrum or isotopomeric pattern.
             spec_mask: mask indicating which peaks of the spectrum should
                       be regarded in the regression
             cb: iteration callback (optional)
             cb_data: cookie for the iteration callback
  Returns: number of iterations or -1 if minimization fails.
  Remarks: In this regression, it is assumed that the isotopomeric pattern
           starts at mass zero and that the lightest isotope of every element
           also has zero mass. There is no loss of generality due to this
           assumption in the infinite resolution model used here.
*/

gint
metodoz5_adjust (TMetodoZ5 *metz,
                gint l_spec,
                gdouble *spec,
                gint *spec_mask,
                TMetodoZ5Callback cb,
                gpointer cb_data);

#ifdef __cplusplus
}
#endif

#endif /* __METODOZ5_H */

```

metodoz5.c

```

#include <stdlib.h>
#include <math.h>
#include <string.h>

#include "metodoz5.h"
#include "simplex.h"

#define MAGIC 0xfe45221a

/* Address the element (i,j) of a matrix (a) containing (n) columns. The
   matrix is a block of memory organized in row-major order. */
#define MTELM(a,n,i,j) (a)[(i)*(n)+(j)]

typedef struct _TMetodoZ5Private TMetodoZ5Private;
typedef struct _TCBStubData TCBStubData;

struct _TCBStubData {
    gint n_iter;
    TMetodoZ5Private *private;
    TMetodoZ5Callback cb;
    gpointer data;
};

struct _TMetodoZ5Private {
    TMetodoZ5 public;

    gint *mask;
    gint *map;

    gint n_var;
    gdouble *simplex;
    gdouble *optimum;

    gdouble *p;
    gint Rl_pattern;
    gint l_pattern;
    gdouble *pattern;
    gdouble *temp_pattern;
    gint l_elm;
    gdouble *element;
    gdouble *norm;

    gint l_spec;
    gdouble *spec;
    gint *spec_mask;
    gdouble spec_base_peak;

    gint32 magic;
};
/*
Remarks on the private fields:

mask: initially, contains a copy of public.mask. During regression,
contains 0 for the abundances to be actively varied, -1 for the ones
to be held fixed, and 1 for the ones determined by the normalization
condition.

```


map: maps from the abundance matrix to the simplex parameter array. Contains the indexes of the abundances to be varied in the array and zero everywhere else. private->mask must always be checked before using this matrix to index the parameter array.

n_var: real number of variables

simplex: vertices of the optimization simplex

optimum: point of minimum

p: Not dynamically allocated. Used by the calculation routines to store a pointer to the current set of abundances.

l_pattern: Real length of the isotopomeric pattern vector

l_pattern: length of the instantaneous isotopomeric pattern.

pattern: Used by the calculation routines to store the isotopomeric instantaneous pattern.

norm: used by the chi2 calculation routines to store the abundances determined by normalization.

l_spec: length of the spectrum

spec: spectrum

*/

/*****

* Prototypes *

*****/

static gboolean

mask_changed (TMetodoZ5Private *private);

static void

create_map (TMetodoZ5Private *private);

static void

create_simplex (TMetodoZ5Private *private);

static gdouble

get_abundance (TMetodoZ5Private *private,

gint l,

gint c);

static void

calc_norm (TMetodoZ5Private *private);

static gdouble

chi2 (gint n_var,

gdouble *p,

gpointer data);

static void

poly_expand (TMetodoZ5Private *private);

static gint

convolve (gint l_p1,

gdouble *p1,

gint l_p2,

gdouble *p2,

gint l_d,

gdouble *d);

static gboolean

cb_stub (gint n_eval,

gint n_var,

gdouble *simplex,

```

        gdouble *y,
        gpointer data);

/*****
 * Private Functions *
 *****/

/*
 Purpose: check if the map was changed between two calls to metodoz5_adjust
 */
static gboolean
mask_changed (TMetodoZ5Private *private) {
    TMetodoZ5 *metz = (TMetodoZ5 *)private;
    gint ind1;
    gboolean changed=FALSE;

    if (! private->mask) changed = TRUE;
    else {
        for (ind1=0; ind1<metz->nel*metz->nc; ind1++)
            if (((metz->mask[ind1] == 0) && (private->mask[ind1] == -1)) ||
                ((metz->mask[ind1] == -1) && (private->mask[ind1] != -1)))
                changed = TRUE;
    }
    if (changed) {
        if (private->mask) g_free (private->mask);
        private->mask = g_memdup (metz->mask, metz->nel*metz->nc*sizeof(gint));
        return TRUE;
    }
    else return FALSE;
}

/*
 Purpose: recreate the map and simplex matrices and the optimum array in
 case the mask was changed between two calls to metodoz5_adjust.
 */

static void
create_map (TMetodoZ5Private *private) {
    TMetodoZ5 *metz = (TMetodoZ5 *)private;
    gint ind1, ind2, n_var;
    gboolean first;

    if (private->map) g_free (private->map);
    if (private->optimum) g_free (private->optimum);

    /* Recreate the map */
    private->map = g_new0 (gint, metz->nel*metz->nc);
    n_var = 0;
    for (ind1=0; ind1<metz->nel; ind1++) {
        first = TRUE;
        for (ind2=0; ind2<metz->nc; ind2++) {
            if (MTELM(private->mask, metz->nc, ind1, ind2) == 0) {
                if (first) {
                    first = FALSE;
                    MTELM(private->mask, metz->nc, ind1, ind2) = 1;
                }
            }
            else {
                MTELM(private->map, metz->nc, ind1, ind2) = n_var;
                n_var++;
            }
        }
    }
}

```

```

    }
    }
}

/* Create the optimum vector */
private->n_var = n_var;
private->optimum = g_new0 (gdouble, n_var);
}

/* Purpose: create the initial simplex */

static void
create_simplex (TMetodoZ5Private *private) {
    TMetodoZ5 *metz = (TMetodoZ5 *)private;
    gint ind1, ind2;
    gdouble *l = g_new0 (gdouble, private->n_var);

    if (private->simplex) g_free (private->simplex);

    for (ind1=0; ind1<metz->nel; ind1++)
        for (ind2=0; ind2<metz->nc; ind2++)
            if (MTELM(private->mask, metz->nc, ind1, ind2) == 0)
                private->optimum[MTELM(private->map, metz->nc, ind1, ind2)] =
                    MTELM(metz->a, metz->nc, ind1, ind2);
    for (ind1=0; ind1<private->n_var; ind1++) l[ind1] = 0.1;
    private->simplex = simplex_build_initial (private->n_var,
                                             private->optimum, l);
    g_free (l);
}

static gdouble
get_abundance (TMetodoZ5Private *private,
               gint l,
               gint c) {
    TMetodoZ5 *metz = (TMetodoZ5 *)private;

    if (MTELM(private->mask, metz->nc, l, c) == -1)
        return MTELM(metz->a, metz->nc, l, c);
    if (MTELM(private->mask, metz->nc, l, c) == 0)
        return private->p[MTELM(private->map, metz->nc, l, c)];

    return private->norm[l];
}

static void
calc_norm (TMetodoZ5Private *private) {
    TMetodoZ5 *metz = (TMetodoZ5 *)private;
    gint ind1, ind2;

    for (ind1=0; ind1<metz->nel; ind1++) {
        private->norm[ind1] = 0;
        for (ind2=0; ind2<metz->nc; ind2++)
            if (MTELM(private->mask, metz->nc, ind1, ind2) != 1)
                private->norm[ind1] += get_abundance (private, ind1, ind2);
    }
}

```

```

    private->norm[ind1] = 1.0 - private->norm[ind1];
}
}

static gdouble
chi2 (gint n_var,
      gdouble *p,
      gpointer data) {
    TMetodoZ5Private *private = (TMetodoZ5Private *)data;
    gdouble chi2 = 0;
    gdouble I, b;
    gint ind1;

    private->p = p;
    calc_norm (private);

    /* Calculate the instantaneous isotopomeric pattern */
    poly_expand (private);

    /* Calculate the optimum isotopomeric pattern multiplier and base
       line */
    {
        gdouble SY2 = 0.0, SYI=0.0, SI=0.0, N=0.0;
        gdouble den = 0.0;

        for (ind1=0; ind1<private->l_pattern; ind1++) {
            if ((ind1<private->l_spec) &&
                ((! private->spec_mask) || (private->spec_mask[ind1] > 0))) {
                SY2 += private->pattern[ind1]*private->pattern[ind1];
                SYI += private->pattern[ind1]*private->spec[ind1];
                SI += private->spec[ind1];
                ++N;
            }
        }

#ifdef __WITH_BASE_LINE
        den = (N*SY2-1.0);
        I = (N*SYI-SI)/den;
        b = (SY2*SI - SYI)/den;
#else
        I = SYI/SY2;
        b = 0.0;
#endif
    }

    /* Calculate chi squared */
    for (ind1=0; ind1<private->l_spec; ind1++)
        if ((ind1 < private->l_pattern) &&
            ((! private->spec_mask) ||
             (private->spec_mask[ind1] > 0))) {
            chi2 += (b + I*private->pattern[ind1] - private->spec[ind1]) *
                (b + I*private->pattern[ind1] - private->spec[ind1]);
        }

    return chi2;
}

```

```

static void
poly_expand (TMetodoZ5Private *private) {
    TMetodoZ5 *metz = (TMetodoZ5 *)private;
    gint ind1, ind2;

    memset (private->pattern, 0, sizeof(gdouble)*private->Rl_pattern);
    private->pattern[0] = 1.0;
    private->l_pattern = 1;

    for (ind1=0; ind1<metz->nel; ind1++) {
        gint nu = metz->nu[ind1];

        /* Copy the element's isotopic pattern to private->element */
        memset (private->element, 0, private->Rl_pattern*sizeof(gdouble));
        private->l_elm = metz->nc;
        for (ind2=0; ind2<metz->nc; ind2++)
            private->element[ind2] = get_abundance (private, ind1, ind2);

        while (nu > 0) {
            if (nu % 2 != 0) {
                /* Convolve the current power of the element's isotopic
                pattern with the isotopomeric pattern. */
                private->l_pattern = convolve (private->l_pattern,
                                                private->pattern,
                                                private->l_elm,
                                                private->element,
                                                private->Rl_pattern,
                                                private->temp_pattern);
                memcpy (private->pattern, private->temp_pattern,
                        private->Rl_pattern*sizeof(gdouble));
            }

            nu /= 2;
            if (nu > 0) {
                /* Calculate the next power of the elements isotopic pattern */
                private->l_elm = convolve (private->l_elm,
                                            private->element,
                                            private->l_elm,
                                            private->element,
                                            private->Rl_pattern,
                                            private->temp_pattern);
                memcpy (private->element, private->temp_pattern,
                        private->Rl_pattern*sizeof(gdouble));
            }
        }
    }
}

```

```

static gint
convolve (gint l_p1,
          gdouble *p1,
          gint l_p2,
          gdouble *p2,
          gint l_d,
          gdouble *d) {
    gint ind1, ind2;

    memset (d, 0, l_d*sizeof(gdouble));

```

```

    for (ind1=0; ind1<l_p1; ind1++)
        if (p1[ind1] != 0.0)
            for (ind2=0; ind2<l_p2; ind2++)
                if (p2[ind2] != 0.0)
                    d[ind1+ind2] += p1[ind1]*p2[ind2];
    for (ind1=l_d-1; (ind1>=0) && (d[ind1] == 0.0); ind1--);
    return ind1+1;
}

static gboolean
cb_stub (gint n_eval,
         gint n_var,
         gdouble *simplex,
         gdouble *y,
         gpointer data) {
    TCBStubData *stub_data = (TCBStubData *)data;

    stub_data->n_iter ++;
    if (stub_data->cb)
        return (*(stub_data->cb))(stub_data->n_iter,
                                   (TMetodoZ5 *) (stub_data->private),
                                   stub_data->data);

    return TRUE;
}

/*****
 * Public Functions *
 *****/

TMetodoZ5 *
metodoz5_create (gint nel,
                 gint nc) {
    TMetodoZ5Private *private;
    TMetodoZ5 *public;

    g_return_val_if_fail (nel > 0, NULL);
    g_return_val_if_fail (nc > 0, NULL);

    private = g_new0 (TMetodoZ5Private, 1);
    private->magic = MAGIC;
    public = (TMetodoZ5 *)private;

    public->nel = nel;
    public->nc = nc;
    public->nu = g_new0 (gint, nel);
    public->a = g_new0 (gdouble, nel*nc);
    public->mask = g_new0 (gint, nel*nc);

    return public;
}

void
metodoz5_destroy (TMetodoZ5 *metz) {
    TMetodoZ5Private *private = (TMetodoZ5Private *)metz;

    g_return_if_fail (metz != NULL);

```

```

g_return_if_fail (private->magic == MAGIC);

if (metz->nu) g_free (metz->nu);
if (metz->a) g_free (metz->a);
if (metz->mask) g_free (metz->mask);

if (private->mask) g_free (private->mask);
if (private->map) g_free (private->map);
if (private->simplex) g_free (private->simplex);
if (private->optimum) g_free (private->optimum);
if (private->pattern) g_free (private->pattern);
if (private->temp_pattern) g_free (private->temp_pattern);
if (private->element) g_free (private->element);
if (private->norm) g_free (private->norm);

g_free (private);
}

gint
metodoz5_adjust (TMetodoZ5 *metz,
                gint l_spec,
                gdouble *spec,
                gint *spec_mask,
                TMetodoZ5Callback cb,
                gpointer cb_data) {
    TMetodoZ5Private *private = (TMetodoZ5Private *)metz;
    TCStubData stub_data;
    gint ind1, ind2;
    gboolean ok=FALSE;

    g_return_val_if_fail (metz != NULL, -1);
    g_return_val_if_fail (private->magic == MAGIC, -1);

    /* Check if the mask changed between calls */
    if (mask_changed(private))
        create_map (private);

    /* Create the initial simplex */
    create_simplex (private);

    /* Check the norm vector */
    if (! private->norm) private->norm = g_new0 (gdouble, metz->nel);

    /* Check the isotopomeric pattern buffer */
    {
        gint Rl_pattern = 0;
        for (ind1=0; ind1<metz->nel; ind1++)
            Rl_pattern += metz->nu[ind1];
        Rl_pattern = Rl_pattern*metz->nc + 1;

        if ((! private->pattern) ||
            (private->Rl_pattern != Rl_pattern)) {
            if (private->pattern) g_free (private->pattern);
            if (private->temp_pattern) g_free (private->temp_pattern);
            if (private->element) g_free (private->element);
            private->Rl_pattern = Rl_pattern;
            private->pattern = g_new0 (gdouble, Rl_pattern);
            private->temp_pattern = g_new0 (gdouble, Rl_pattern);
        }
    }
}

```

```

    private->element = g_new0 (gdouble, Rl_pattern);
}
}

/* Copy the spectrum pointer to the private structure */
private->l_spec = l_spec;
private->spec = spec;
private->spec_mask = spec_mask;

/* Calculate the spectrum base peak */
private->spec_base_peak = spec[0];
for (ind1=1; ind1<l_spec; ind1++)
    if (private->spec_base_peak < spec[ind1])
        private->spec_base_peak = spec[ind1];

/* Set the callback stub data */
stub_data.private = private;
stub_data.cb = cb;
stub_data.data = cb_data;
stub_data.n_iter = 0;

/* First Optimization */
if (simplex_minimize (chi2,
                    private,
                    private->n_var,
                    private->simplex,
                    private->optimum,
                    cb_stub,
                    &stub_data,
                    simplex_convergence_size,
                    1.0E-8,
                    NULL) > 0) {
    /* Recreate the simplex */
    create_simplex (private);

    /* Second optimization */
    if (simplex_minimize (chi2,
                        private,
                        private->n_var,
                        private->simplex,
                        private->optimum,
                        cb_stub,
                        &stub_data,
                        simplex_convergence_size,
                        1.0E-8,
                        NULL) > 0) {

        /* Copy the results to metz->a */
        private->p = private->optimum;
        calc_norm (private);
        for (ind1=0; ind1<metz->nel; ind1++)
            for (ind2=0; ind2<metz->nc; ind2++)
                if (MTELM(private->mask, metz->nc, ind1, ind2) != -1)
                    MTELM(metz->a, metz->nc, ind1, ind2) =
                        get_abundance (private, ind1, ind2);
        ok = TRUE;
    }
}

if (ok) return stub_data.n_iter;

```



```
    else return -1;  
}
```

Referências Bibliográficas

- [1] McLafferty, F. W., Turecek, F., *Interpretation of mass spectra*. 4^a ed., University Science Books, 1993.
- [2] Sonoda, A., Makita, Y., Ooi, K., Hirotsu, T. Boron isotope ratio measurements by negative thermal ionization mass spectrometry method using boron-free seawater. *Journal of Nuclear Science and technology*, v. 39, n. 4, p. 295–302, abr. 2002.
- [3] Ayoub, A. S., McGaw, B. A., Midwood, A. J. Determination of Cd and Zn by isotope dilution-thermal ionisation mass spectrometry using a sequential analysis procedure. *Talanta*, v. 57, n. 2, p. 405–413, maio 2002.
- [4] Numata, M., Nakamura, N., Koshikawa, H., Terashima, Y. Chlorine stable isotope measurements of chlorinated aliphatic hydrocarbons by thermal ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 455, n. 1, p. 1–9, mar. 2002.
- [5] Paces, J. B., Ludwig, K. R., Peterman, Z. E., Neymark, L. A. U-234/U-238 evidence for local recharge and patterns of ground-water flow in the vicinity of Yucca Mountain, Nevada, USA. *Applied Geochemistry*, v. 17, n. 6, p. 751–779, jun. 2002.
- [6] H. E. Gäbler, A. B. Boron isotope ratio measurements with a double-focusing magnetic sector IPC-MS mass spectrometer for tracing anthropogenic input into surface and ground water. *Chemical Geology*, v. 156, n. 1-4, p. 323–330, abr. 1999.
- [7] Segal, I., Halicz, L., Platzner, I. T. Isotope ratio measurements of dysprosium by multiple collection inductively coupled plasma mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, v. 216, n. 2, p. 177–184, maio 2002.

- [8] Boulyga, S. F., Becker, J. S. ICP-MS with hexapole collision cell for isotope ratio measurements of Ca, Fe, and Se. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, v. 370, n. 5, p. 618–623, jul. 2001.
- [9] Walczyk, T., Davidsson, L., Zavaleta, N., Hurrell, R. F. Stable isotope labels as a tool to determine the iron absorption by peruvian school children from a breakfast meal. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, v. 359, n. 4-5, p. 455–499, out. 1997.
- [10] Chabala, J. M., Soni, K. K., Li, J., Gavrilov, K. L., Levi-Setti, R. High-resolution chemical imaging with scanning ion probe SIMS. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, v. 143, p. 191–212, 1995.
- [11] Degrevé, F., Thorne, N. A., Lang, J. M. Metallurgical applications of secondary ion mass spectrometry (SIMS). *Journal of Materials Science*, v. 23, p. 4181–4208, 1988.
- [12] Blackwood, D. J., Peter, L. M., Bishop, H. E., Chalker, P. R., Williams, D. E. A SIMS investigation of hydrogen penetration of titanium electrodes. *Electrochimica Acta*, v. 34, n. 10, p. 1401–1403, 1989.
- [13] Jr, J. A. G., Pireaux, J.-J. Analysis of polymer surfaces using electron and ion beams. *Analytical Chemistry*, v. 62, n. 11, p. 645A–661A, jun. 1990.
- [14] Zhao, C. L., Dobler, F., Pith, T., Holl, Y., Labla, M. Surface composition of coalesced acrylic latex films studied by XPS and SIMS. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 128, n. 2, p. 437–449, mar. 1989.
- [15] Noble, C. A., Prather, K. A. Real-time single particle mass spectrometry: A historical review of a quarter century of the chemical analysis of aerosols. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 19, n. 4, p. 248–274, jul. 2000.
- [16] Boesl, U. Special feature: Tutorial - laser mass spectrometry for environmental and industrial chemical trace analysis. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 35, n. 3, p. 289–304, mar. 2000.
- [17] Yates, J. R. Mass spectrometry and the age of the proteome. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 33, n. 1, p. 1–19, jan. 1998.
- [18] Cole, R. B. (ed.), *Electrospray ionization mass spectrometry*. John Wiley & Sons, Inc., 1997.

- [19] Yamashita, M., Fenn, J. B. Electrospray ion-source - another variation on the free-jet theme. *Journal of Physical Chemistry*, v. 88, n. 20, p. 4451–4459, 1984.
- [20] Yamashita, M., Fenn, J. B. Negative-ion production with the electrospray ion-source. *Journal of Physical Chemistry*, v. 88, n. 20, p. 4671–4675, 1984.
- [21] Whitehouse, C. M., Dreyer, R. N., Yamashita, M., Fenn, J. B. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Analytical Chemistry*, v. 57, n. 3, p. 675–679, 1985.
- [22] Steel, C., Henchman, M. Understanding the quadrupole mass filter through computer simulation. *Journal of Chemical Education*, v. 75, n. 8, p. 1049–1054, ago. 1998.
- [23] Juliano, V. F., Gozzo, F. C., Eberlin, M. N., Kascheres, C., Lago, C. L. Fast multidimensional (3D and 4D) MS(2) and MS(3) scans in a high-transmission pentaquadrupole mass spectrometer. *Analytical Chemistry*, v. 68, n. 8, p. 1328–1334, abr. 1996.
- [24] Amster, I. J. Fourier transform mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 31, p. 1325–1337, 1996.
- [25] Bergmann, T., Martin, T. P., Schaber, H. High-resolution time-of-flight mass spectrometers .2. reflector design. *Review of Scientific Instruments*, v. 61, n. 10, p. 2592–2600, out. 1990.
- [26] Guilhaus, M., Selby, D., Mlynski, V. Orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 19, n. 2, p. 65–107, mar. 2000.
- [27] Coles, J., Guilhaus, M. Orthogonal acceleration - a new direction for time-of-flight mass-spectrometry - fast, sensitive mass analysis for continuous ion sources. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, v. 12, n. 5, p. 203–213, maio 1993.
- [28] Wiley, W. C., McLaren, I. H. Time-of-flight mass spectrometer with improved resolution. *Review of Scientific Instruments*, v. 26, n. 12, p. 1150–1157, 1955.
- [29] Brand, W. A. High precision isotope ratio monitoring techniques in mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 31, p. 225, 1996.
- [30] Sanyal, A., Hemming, N. G., Hanson, G. N., Broecker, W. S. Evidence for a higher pH in the glacial ocean from boron isotopes in foraminifera. *Nature*, v. 373, p. 234–236, 1995.

- [31] Holt, B. D., Sturchio, N. C., Abrajano, T. A., Heraty, L. J. Conversion of chlorinated volatile organic compounds to carbon dioxide and methyl chloride for isotopic analysis of carbon and chlorine. *Analytical Chemistry*, v. 69, n. 14, p. 2727–2733, jul. 1997.
- [32] Taylor, P. D. P., Valkyres, S. L. S., Bievre, P. D., and U. Flegel, O. S., Kruck, T. Microscale synthesis of $\text{Fe}(\text{PF}_3)(5)$ for gas source mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, v. 70, n. 5, p. 1033–1035, 1998.
- [33] Morrison, R. T., Boyd, R. N., *Organic chemistry*. 6^a ed., New Jersey: Prentice-Hall International, 1992.
- [34] Lindsay, R. K., Buchanan, B. G., Feigenbaum, E. A., Lederberg, J. Dendral - a casa study of the first expert-system for scientific hypothesis formation. *Artificial Intelligence*, v. 61, n. 2, p. 209–261, jun. 1992.
- [35] Blackburn, J. A. Computer program for multicomponent spectrum analysis using least-squares method. *Analytical Chemistry*, v. 37, n. 8, p. 1000, 1965.
- [36] Carrick, A., Glockling, F. Mass and abundance data for polyisotopic elements. *Journal of the Chemical Society A*, p. 40, 1967.
- [37] Lago, C. L., Kascheres, C. New method of isotope pattern analysis. *Computers and Chemistry*, v. 15, n. 2, p. 149–155, 1991.
- [38] Blom, K. F. Elemental composition from moment analyses of the low-resolution isotope pattern. *Organic Mass Spectrometry*, v. 23, n. 3, p. 194–203, mar. 1988.
- [39] Lago, C. L., Análise de padrões isotópicos de espectros de massas de baixa resolução por análise de momentos e estatística bayesiana. In: *Livro de resumos do 8o Encontro Nacional de Química Analítica*, Belo Horizonte, set. 1995.
- [40] Brauman, J. I. Least-squares analysis and simplification of multi-isotope mass spectra. *Analytical Chemistry*, v. 38, n. 4, p. 697, 1966.
- [41] Crawford, L. R. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*, v. 10, n. 3, p. 279, 1972-1973.

- [42] McLaughlin, E., Ong, T. E., Rozett, R. W. Monoisotopic mass spectra of boranes. *Journal of Physical Chemistry*, v. 75, n. 20, p. 3106, 1971.
- [43] McLaughlin, E., Hall, L. H., Rozett, R. W. Monoisotopic mass spectra of some boranes and borane derivatives. *Journal of Physical Chemistry*, v. 77, n. 25, p. 2984, 1973.
- [44] Sukharev, Y. N., Nekrasov, Y. S. Computer-processing and interpretation of mass-spectral information .1. reduction of mass-spectra to monoisotopic form. *Organic Mass Spectrometry*, v. 11, n. 12, p. 1232, 1976.
- [45] Benz, W. Accuracy of isotopic label calculations for spectra with a (molecular ion hydrogen) peak. *Analytical Chemistry*, v. 52, n. 2, p. 248, 1980.
- [46] Karjalainen, E. J. The spectrum reconstruction problem - use of alternating regression for unexpected spectral components in 2-dimensional spectroscopies. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 7, n. 1-2, p. 31, 1989.
- [47] Bauerschmidt, S., Hanebeck, W., Shulz, K. P., Gasteiger, J. Elucidation of reactions in the mass-spectrometer. *Analytica Chimica Acta*, v. 265, n. 2, p. 169–182, 1992.
- [48] Gasteiger, J., Li, X., Simon, V., Novic, M., Zupan, J. Neural nets for mass and vibrational-spectra. *Journal of Molecular Structure*, v. 292, p. 141–159, mar. 1993.
- [49] Wilkins, M. R., Lindskog, I., Gasteiger, E., bairoch, A., Sanchez, J. C., Hochstrasser, D. F., Appel, R. D. Detailed peptide characterization using peptidemass - a world-wide-web-accessible tool. *Electrophoresis*, v. 18, n. 3-4, p. 403–408, mar. 1997.
- [50] Binz, P. A., Muller, M., Walther, D., Bienvenut, W. V., Gras, R., Hoogland, C., Bouchet, G., Gasteiger, E., Fabbretti, R., Gay, S., Palagi, P., Wilkins, M. R., Rouge, V., Tonella, L., Paesano, S., Rossellat, G., Karmine, A., Bairoch, A., Sanchez, J. C., Appel, R. D., Hochstrasser, D. F. A molecular scanner to automate proteomic research and to display proteome images. *Analytical Chemistry*, v. 71, n. 21, p. 4981–4988, nov. 1999.
- [51] Moraes, M. C. B., Brito, Neto, J. G. A., do Lago, C. L. Eliminating the interference of M-nH ions in isotope patterns from low-resolution mass spectra. *International Journal of Mass Spectrometry*, v. 178, n. 3, p. 129–141, nov. 1998.

- [52] Moraes, M. C. B., *Eliminação da interferência de íons M-nH sobre padrões isotópicos obtidos em espectrômetros de massas de baixa resolução com ionização por impacto de elétrons*. Tese de Mestrado, Universidade de São Paulo - Instituto de Química, São Paulo - Brasil, ago. 1997.
- [53] Ketterer, M. E., Guzowski, J. P. Isotope ratio measurements with elemental-mode electrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, v. 68, n. 5, p. 883–887, mar. 1996.
- [54] Mass, M., Meng, C. K., Fenn, J. B. Interpreting the mass spectra of multiply charged ions. *Analytical Chemistry*, v. 61, n. 15, p. 1702–1708, 1989.
- [55] Zhang, Z. Q., Marshall, A. G. A universal algorithm for fast and automated charge state deconvolution of electrospray mass-to-charge ratio spectra. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, v. 9, n. 3, p. 225–233, 1998.
- [56] Almudaris, A., Ashton, D. S., Beddell, C. R., Cooper, D. J., Craig, S. J., Oliver, R. W. A. The assignment of charge states in complex electrospray mass spectra. *European Mass Spectrometry*, v. 2, n. 1, p. 57–67, 1996.
- [57] Senko, M. W., Beu, S. C., McLafferty, F. W. Automated assignment of charge states from resolved isotopic peaks for multiply-charged ions. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, v. 6, n. 1, p. 52–56, 1995.
- [58] Ferrige, A. G., Seddon, M. J., Green, B. N., Jarvis, S. A., Skilling, J. Disentangling electrospray spectra with maximum entropy. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 6, n. 11, p. 707–711, 1992.
- [59] Ferrige, A. G., Seddon, M. J., Skilling, J., Ordsmith, N. The application of maxent to high-resolution mass-spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 6, n. 12, p. 765–770, 1992.
- [60] Ferrige, A. G., Seddon, M. J., Jarvis, S. A. Maximum-entropy deconvolution in electrospray mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 5, p. 374–379, 1991.
- [61] Reinhold, B. B., Reinhold, V. N. Electrospray ionization mass-spectrometry - deconvolution by an entropy-based algorithm. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, v. 3, n. 3, p. 207–215, 1992.

- [62] Senko, M. W., Beu, S. C., McLafferty, F. W. Determination of monoisotopic masses and ion populations for large biomolecules from resolved isotopic distributions. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, v. 6, n. 4, p. 229–233, 1995.
- [63] Hagen, J. J., Monnig, C. A. Method for estimating molecular-mass from electrospray mass spectra. *Analytical Chemistry*, v. 66, n. 11, p. 1877–1883, 1994.
- [64] Ashton, D. S., Beddell, C. R., Green, B. N., Oliver, R. W. A. Rapid validation of molecular-structures of biological samples by electrospray mass-spectrometry. *FEBS Letters*, v. 342, n. 1, p. 1–6, 1994.
- [65] Yates, J. R., Speicher, S., Griffin, P. R., Hunkapiller, T. Peptide mass maps - a highly informative approach to protein identification. *Analytical Biochemistry*, v. 214, n. 2, p. 397–408, 1993.
- [66] Horn, D. M., Zubarev, R. A., McLafferty, F. W. Automated reduction and interpretation of high resolution electrospray mass spectra of large molecules. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, v. 11, n. 4, p. 320–332, 2000.
- [67] McLafferty, F. W. Tandem mass spectrometric analysis of complex biological mixtures. *International Journal of Mass Spectrometry*, v. 212, n. 1-3, p. 81–87, dez. 2001.
- [68] Brownawell, M. L., Jr, J. S. F. *Journal of Chemical Education*, v. 59, n. 8, p. 663, 1982.
- [69] Dombek, D. B., Lowther, J., Carberry, E. *Journal of Chemical Education*, v. 48, n. 11, p. 729, 1971.
- [70] Hsu, C. S. Diophantine approach to isotopic abundance calculations. *Analytical Chemistry*, v. 56, n. 8, p. 1356, 1984.
- [71] Hugentobler, E., Lölliger, J. General approach to calculating isotope abundance ratios in mass spectroscopy. *Journal of Chemical Education*, v. 49, n. 9, p. 610, 1972.
- [72] Lee, J. D. Interpretation of mass-spectra. *Talanta*, v. 20, p. 1029, 1973.
- [73] Margrave, J. C., Polansky, R. B. *Journal of Chemical Education*, v. 39, n. 7, p. 225, 1962.

- [74] Sukharev, Y. N., Sizoi, V. F., Nekrasov, Y. S. Computer-processing and interpretation of mass-spectral information .6. computing the isotopic spectrum of assumed composition. *Organic Mass Spectrometry*, v. 16, n. 1, p. 23, 1981.
- [75] Yergey, J. A. A general-approach to calculationg isotope distributions for mass-spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*, v. 52, n. 2-3, p. 337, 1983.
- [76] Kubinyi, H. Calculation of isotope distributions in mass-spectrometry - a trivial solution for a nontrivial problem. *Analytica Chimica Acta*, v. 247, n. 1, p. 107–119, jun. 1991.
- [77] Rockwood, A. L., van Orden, S. L., Smith, R. D. Rapid calculation of isotope distributions. *Analytical Chemistry*, v. 67, n. 15, p. 2699–2704, ago. 1995.
- [78] Rockwood, A. L., van Orden, S. L. Ultrahigh-speed calculation of isotope distributions. *Analytical Chemistry*, v. 68, n. 13, p. 2027–2030, jul. 1996.
- [79] Rockwood, A. L., van Orden, S. L., Smith, R. D. Ultrahigh resolution isotope distribution calculations. *Rapid Communications is Mass Spectrometry*, v. 10, n. 1, p. 54–59, 1996.
- [80] Genty, C. Application of a statistical method to isotopic analysis - general principles. *Analytical Chemistry*, v. 45, n. 3, p. 505–511, 1973.
- [81] Datta, B. P., Khodade, P. S., Parab, A. R., Goyal, A. H., Chitambar, S. A., Jain, H. C. Thermal-ionization mass-spectrometry of Li_2BO_2^+ ions - determination of the isotopic abundance ratio of lithium. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, v. 116, n. 2, p. 87–114, jul. 1992.
- [82] Datta, B. P., Parab, A. R., Khodade, P. S., Chitambar, S. A., Jain, H. C. Molecular ion-beam method of isotopic analysis - effect of error propagation, a case study with Li_2BO_2^+ . *Rapid Communications is Mass Spectrometry*, v. 7, n. 7, p. 581–586, jul. 1993.
- [83] Datta, B. P., Parab, A. R., Khodade, P. S., Chitambar, S. A., Jain, H. C. Isotopic analysis of a Li-6 enriched lithium sample employing the Li_2BO_2^+ ion-beam method - verification of the theoretical accuracy. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, v. 142, n. 1-2, p. 69–81, mar. 1995.

- [84] Datta, B. P. Error-systematics of determining elemental isotopic abundance ratios by the molecular ion-beam method: a case study for the simultaneous isotopic analysis of lithium and boron as Li_2BO_2^+ . *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 14, n. 8, p. 696–705, 2000.
- [85] Hellerstein, M. K., Nesse, R. A. Mass isotopomer distribution analysis: a technique for measuring biosynthesis and turnover of polymers. *American Journal of Physiology*, v. 263, n. 5, p. E988–E1001, nov. 1992.
- [86] Brito-Neto, J. G. A., do Lago, C. L. Determination of atomic isotope patterns from mass spectra of molecular ions containing multiple polyisotopic elements. *International Journal of Mass Spectrometry*, v. 216, n. 1, p. 95–113, abr. 2002.
- [87] Press, W. H., Teukolsky, S. A., Vetterling, W. T., Flannery, B. P., *Numerical recipes in C - the art of scientific computing*. 2^a ed., Cambridge University Press, 1996.
- [88] Moraes, M. C. B., Brito, Neto, J. G. A., do Lago, C. L. The analytical applicability of transition metals and boron anionic complexes formed with iodide, chloride, cyanide, and fluoride in electrospray mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, v. 198, n. 1-2, p. 121–132, abr. 2000.
- [89] Moraes, M. C. B., Brito, Neto, J. G. A., do Lago, C. L. Boron isotopic ratio by electrospray mass spectra of tetrafluoroborate. *Journal of Analytical Atomic Spectroscopy*, v. 16, p. 1259–1265, 2001.
- [90] Habfast, K. Fractionation in the thermal ionization source. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, v. 51, n. 2-3, p. 165–189, 1983.
- [91] Hart, S. R., Zindler, A. Isotope fractionation laws - a test using calcium. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, v. 89, n. 2-3, p. 287–301, maio 1989.
- [92] Held, A., Taylor, P. D. P. A calculation method based on isotope ratios for the determination of dead time and its uncertainty in IPC-MS and application of the method to investigating some features of a continuous dynode multiplier. *Journal of Analytical Atomic Spectroscopy*, v. 14, n. 7, p. 1075–1079, jul. 1999.

- [93] Brito, Neto, J. G. A., do Lago, C. L., CAESCAN: a computational tool for analyzing electrospray mass spectra. In: *Proceedings of the 15th international symposium on mass spectrometry*, International Mass Spectrometry Society, Barcelona: John Wiley and Sons Inc., ago. 2000.
- [94] McConville, C., Kalin, R. M., Flood, D. Direct equilibration of soil water for delta O-18 analysis and its application to tracer studies. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 13, n. 13, p. 1339–1345, 1999.
- [95] Scrimgeour, C. M. Measurement of plant and soil water composition by direct equilibration methods. *Journal of Hydrology*, v. 172, n. 1-4, p. 261–274, 1995.
- [96] Coplen, T. B., Wildman, J. D., Chen, J. Improvements in the gaseous-hydrogen water equilibration technique for hydrogen isotope ratio analysis. *Analytical Chemistry*, v. 63, n. 9, p. 910–912, 1991.
- [97] Scrimgeour, C. M., Rollo, M. M., Mudambo, S. M. K. T., Handley, L. L., Prosser, S. J. A simplified method for deuterium hydrogen isotope ratio measurements on water samples of biological origin. *Biological Mass Spectrometry*, v. 22, n. 7, p. 383–387, 1993.
- [98] Horita, J., Ueda, A., Mizukami, K., Takatori, I. Automatic delta-D and delta-O-18 analyses of multi-water samples using H₂-water and CO₂-water equilibration methods with a common equilibration set-up. *Applied Radiation and Isotopes*, v. 40, n. 9, p. 801–805, 1989.
- [99] Thielecke, F., Brand, W., Noack, R. Hydrogen isotope determination for small-size water samples using an equilibration technique. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 33, n. 4, p. 342–345, 1998.
- [100] Brand, W. A., Avak, H., Seedorf, R., Hofmann, D., Conradi, T. New methods for automated isotope ratio determination from hydrogen at the natural abundance level. *Isotopes in Environmental and Health Studies*, v. 32, n. 2-3, p. 263–273, 1996.
- [101] Kendall, C., Coplen, T. B. Multisample conversion of water to hydrogen by zinc for stable isotope determination. *Analytical Chemistry*, v. 57, n. 7, p. 1437–1440, jun. 1985.
- [102] Dole, M., Mack, L. L., Hines, R. L., Mobley, R. C., Ferguson, L. D., Alice, M. B. Molecular beams of macroions. *Journal of Chemical Physics*, v. 49, n. 5, p. 2240, 1968.

- [103] Iribarne, J. V., Thomson, B. A. Evaporation of small ions from charged droplets. *Journal of Chemical Physics*, v. 64, n. 6, p. 2287–2294, 1976.
- [104] Moraes, M. C. B., *Introdução da técnica de espectrometria de massas com ionização electrospray para determinação da razão isotópica baseada em complexos de carga simples com ligantes monoisotópicos. Uma nova alternativa para o boro e metais de transição*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo - Instituto de Química, São Paulo - Brasil, ago. 2001.
- [105] Rousseeuw, P. J. Tutorial to robust statistics. *Journal of Chemometrics*, v. 5, p. 1–20, 1992.
- [106] Lago, C. L., Juliano, V. F., Kascheres, C. Applying the moving median digital filter to mass spectrometry and potentiometric titration. *Analytica Chimica Acta*, v. 310, p. 281–288, 1995.
- [107] Davies, E. R. The relative effects of median and mean filters on noisy signals. *Journal of Modern Optics*, v. 39, n. 1, p. 103–113, 1992.
- [108] Efron, B., Tibshirani, R. Statistical data analysis in the computer age. *Science*, v. 253, p. 390–395, jul. 1991.
- [109] Gatz, D. F., Smith, L. The standard error of a weighted mean concentration - i. bootstrapping vs other methods. *Atmospheric Environment*, v. 29, n. 11, p. 1185–1193, 1995.
- [110] Gatz, D. F., Smith, L. The standard error of a weighted mean concentration - ii. estimating confidence intervals. *Atmospheric Environment*, v. 29, n. 11, p. 1195–1200, 1995.
- [111] Fornaro, A., Neto, J. G. A. B., Lago, C. L., Gutz, I. G. R., Intervalos de confiança para estatísticas sobre concentrações iônicas em amostras de águas de chuva. In: *Livro de resumos do 11o Encontro Nacional de Química Analítica*, Campinas, set. 2001.
- [112] Reed, D. R., Kaas, S. R. Hydrogen-deuterium exchange at non-labile sites: a new reaction facet with broad implications for structural and dynamic determinations. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, v. 12, p. 1163–1168, 2001.
- [113] Todd, J. F. Recommendations for nomenclature and symbolism for mass spectroscopy. *Pure and Applied Chemistry*, v. 63, n. 10, p. 1541–1566, 1991.