UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE QUÍMICA Programa de Pós-Graduação em Química

GUSTAVO CERVI

Desenvolvimento e validação da espectroscopia vibracional de íons em fase gasosa

Versão corrigida da Dissertação de mestrado

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

15/04/2019

GUSTAVO CERVI

Desenvolvimento e validação da espectroscopia vibracional de íons em fase gasosa

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Thiago Carita Correra

São Paulo 2019 Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletronico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

> Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação: Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

```
Cervi, Gustavo
Desenvolvimento e validação da espectroscopia
vibracional de ions em fase gasosa / Gustavo Cervi.
- São Paulo, 2019.
146 p.
Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de Química
Fundamental.
Orientador: Correra, Thiago Carita
1. Espectrometria de massas. 2. Espectroscopia
Infravermelha. 3. Desenvolvimento de Instrumentação.
4. Bases nitrogenadas. I. T. II. Correra, Thiago
Carita, orientador.
```



GUSTAVO CERVI

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau Mestre em Ciências – no Programa de Química

Aprovado por:

Prof. Dr. Thiago Carita Correra (Orientador e Presidente)

Prof. Dr. Giuseppe Palmisano ICB – USP

Prof. Dr. Cláudio Francisco Tormena

IQ – UNICAMP

SÃO PAULO

07 de junho de 2019

.

AGRADECIMENTOS

À Fapesp, primeiramente pela bolsa projeto 2016/19698-6 e também pelos projetos EMU 2015/08539-1 e JP 2014/15962-5, e por último e não menos importante à CAPES pelos projetos 23038.006960/2014-65 e 001.

Aos colegas que me aturaram e ao meu orientador que soube o quanto poderia exigir de mim.

"Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, eles são a abertura para achar as que estão certas". Carl Sagan

RESUMO

Cervi, Gustavo. **Desenvolvimento e validação da espectroscopia vibracional de íons em fase gasosa**. 2019. 145p. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Este trabalho conta com um apanhado geral da técnica de espectrometria de massas acoplada a espectroscopia vibracional de íons, suas aplicações, limitações, desenvolvimento e embasamento teórico. Para tal é apresentado um resumo da teoria quântica aplicada à espectroscopia vibracional, natureza da luz, eletromagnetismo e ótica de sistemas de OPO/OPA, laser de gás e de estado sólido. A seção experimental é dividida em duas. A primeira apresenta o acoplamento físico do espectrômetro de massas às fontes de radiação laser, juntamente com os softwares para permitir comunicação entre esses módulos. Na segunda parte, são apresentados espectros IRMPD de amostras padrão para comparação e validação com a literatura bem como espectros inéditos para exemplificar o uso da técnica de espectroscopia de íons em sistemas de interesse biológico, como as bases nitrogenadas do DNA

Palavras-chave: Espectroscopia de íons; dissociação multifotônica no infravermelho; IRMPD; espectrometria de massas; espectroscopia vibracional.

ABSTRACT

Cervi, Gustavo. **Development and validation of gas-phase ion spectroscopy** 2019. 145p. Masters Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

This Master Thesis presents a general overview of the mass spectrometry technique coupled to vibrational ion spectroscopy, its applications, limitations, development and theoretical basis. For that, a summary of the quantum theory applied to vibrational spectroscopy, the nature of light, electromagnetism and optics of OPO / OPA, gas discharge and solid-state laser systems is shown. The experimental section is divided in two, the first presents the physical coupling of the mass spectrometer to the laser sources, along with softwares which allows the communication between these modules. In the second part, some IRMPD spectra of standard samples are presented for comparison and validation with the literature as well as unpublished spectra to exemplify the use of the ion spectroscopy technique in systems of biological interest, such as the DNA bases

Keywords: Ion Spectroscopy; InfraRed MultiPhoton Dissociation; Mass Spectrometry; Vibrational Spectroscopy

LISTA DE ACRÔNIMOS

BIRD	Dissociação por radiação de corpo negro
CID	Dissociação induzida por colisão
DFT	Teoria do funcional da densidade
ESI	Fonte de ionização por eletrospray
FEL	Laser de elétrons livres
FTIR	Espectroscopia vibracional no infravermelho por transformada de Fourier
Ноо	Hoogstein
IRMPD	Dissociação por múltiplos fótons no infravermelho
ICR	Ressonância ciclotrônica de íons
IVR	Redistribuição vibracional intramolecular
MP2	Teoria de perturbação de Møller-Plesset de segunda ordem
MS	Espectrometria (ou espectrômetro) de massas
MS ⁿ	Espectrometria de massas sequencial
NBO	Orbital natural de ligação
Nd:YAG	Granada de ítrio e alumínio dopada com neodímio
ОРО	Oscilador paramétrico ótico
OPA	Amplificador paramétrico ótico
rf	Radiofrequência
RMN	Espectroscopia por ressonância magnética nuclear
Тгр	Triptofano
W&C	Watson e Crick

LISTA DE SÍMBOLOS

m/z	Relação massa/carga
Da	Unidade de massa molecular, Dalton
Th	Unidade de massa/carga, Thompson
a	Aceleração
Ē	Vetor campo elétrico
\overrightarrow{B}	Vetor campo magnético
с	Velocidade da luz no vácuo
h	Constante de Planck
ħ	Constante de Planck dividida por 2π
V	Frequência de uma radiação eletromagnética e frequência de oscilação molecular
p	Momento linear
λ	Comprimento de onda

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: montagem e funcionamento da espectrometria de massas sequencial
Figura 2: ion trap 3D
Figura 3: principais interações eletrônicas da luz com a matéria
Figura 4: Curva de energia potencial para moléculas diatômicas ⁴⁵
Figura 5: Representação da energia potencial pela distância internuclear para o modelo
do oscilador harmônico e anarmônico. ⁴⁵
Figura 6: espectro vibracional calculado e modos vibracionais da água 50
Figura 7: representação intuitiva do modelo de redistribuição vibracional interna. ⁴⁷ 51
Figura 8: Representação da espectroscopia IRMPD 52
Figura 9: Representação esquemática do mecanismo de fragmentação por IVR. ⁷ 53
Figura 10: componentes essenciais de um laser 61
Figura 11: sistemas emissores de radiação laser de 2, 3 e 4 níveis populacionais
relativos. ⁴⁵
Figura 12: transferência de energia em um laser de CO ₂ . ⁵⁸
Figura 13: Níveis de energia relevantes para as principais absorções e emissões do laser
de Nd:YAG. ⁵⁹
Figura 14: modelo de OPO/OPA e fenômeno de adição e subtração de frequência,
respectivamente
Figura 15: intensidade do primeiro harmônico para ∆k=0 e ∆k≠0 70
Figura 16: Montagem do sistema instrumental e inserção de fábrica dos espelhos E7 e
E8
Figura 17: especificações da janela de CaF ₂ (superior) e a Janela de ZnSe (inferior). ⁷³ 81
Figura 18: sistema óptico do OPO/OPA
Figura 19: Interface do SpectraScan
Figura 20: estágios de isolamento e fragmentação
Figura 21: tempo de fragmentação por estágio
Figura 22: sistema de pulsos e obturadores
Figura 23: interface dos programas
Figura 24: Mecanismo de fragmentação do triptofano protonado. (adaptado) ⁷⁵
Figura 25: espectro de massas e fotofragmentação do TrpH ⁺ em 3533 cm ⁻¹ 92
Figura 26: Reprodução dos espectros do triptofano e seus fragmentos

Figura 27: ortogonalidade entre o espectro de massas e espectros IRMPD do Trp+ H^+ e
seus fragmentos
Figura 28: Comparação do espectro do triptofano com a literatura. ⁷⁵
Figura 29: mudança da calibração do sistema
Figura 30: espectros IRMPD da Guanina[H] ⁺ e Citosina[H] ⁺ obtidos com diferentes
tempos de Irradiação 101
Figura 31: Espectro IRMPD Adenina[H]+ e da Timina[H]+ em diferentes tempos de
irradiação 102
Figura 32: espectro IRMPD triptofano feito com 500ms de irradiação em diferentes
calibrações; (em destaque) curva de energia do OPO/OPA dependente do número de
onda e otimização 104
Figura 33: Espectro IRMPD da o-fosfotirosina com diferentes números de médias
acumuladas na aquisição do espectro 106
Figura 34: diferença no valor da resolução no intervalo de 4100 a 2800cm ⁻¹ com
resolução de 0.2nm
Figura 35: espectros da fosfotirosina em diferentes resoluções 108
Figura 36: Comparação entre fragmentação por colisão, UV e IR (adaptado). ^{91-93,94} . 110
Figura 37: Espectro IRMPD do dímero protonado da fosfotirosina 111
Figura 38: Estrutura básica das purinas e pirimidinas113
Figura 39: Estrutura das bases nitrogenadas do DNA 113
Figura 40: possíveis estruturas para o par de bases C-G (adaptado). ⁹⁸ 114
Figura 41: fotofragmentação CitosinaH ⁺ por 1000ms de irradiação ou 10 pulsos 119
Figura 42: espectro de massas da fotofragmentação da TiminaH ⁺ 119
Figura 43: mecanismo de fragmentação por CID da uracila protonada em diferentes
formas tautoméricas. ¹⁰²
Figura 44: atribuição dos íons encontrados na fragmentação da guanina protonada
(adaptado). ¹¹⁰
Figura 45: fotofragmentação Guanina+H ⁺ por 2020ms de irradiação 121
Figura 46: Espectro de massas da fotofragmentação da [Adenina+H] ⁺ 122
Figura 47: atribuição proposta dos íons encontrados na fragmentação da adenina
protonada 122
Figura 48: comparação dos espectros teóricos com experimental (identificado as
estruturas por pontos de protonação)124
Figura 49: Espectro IRMPD da CitosinaH+ 125

Figura 50: espectro IRMPD da AdeninaH ⁺	126
Figura 51: espectro IRMPD da Timina+H ⁺	127
Figura 52: fotofragmentação do par citosina e guanina	128
Figura 53: fragmentação do par adenina e timina	129
Figura 54: Espectro vibracional IRMPD do agregado [C-G+H]+ obtido	1000ms de
irradiação e seus espectros teóricos nas conformações WC, HooN7 e HooN3	130
Figura 55: espectro IRMPD do agregado TA(H+) obtido com 5 pulsos (ou	1 500ms de
irradiação)	

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO
2 ESPECTROMETRIA DE MASSAS
3 NATUREZA DA LUZ, TEORIA QUÂNTICA E INTERAÇÃO ENTRE LUZ E
MATÉRIA
3.1 Formas de interação da luz com a matéria 44
3.2 Espectroscopia vibracional
3.2.1 IRMPD e a Espectroscopia de ação
3.2.2 Espectroscopia de duas (ou mais) cores
3.3 Fontes de radiação
Teoria dos lasers
3.3.1 Laser de gás
3.3.2 Laser de estado sólido
3.3.3 OPO/OPA
4 CÁLCULOS TEÓRICOS
5 PARTE EXPERIMENTAL
5.1 Instrumentação e Acoplamento
5.1.1 Software de aquisição de dados
5.1.2 5.sincronização de pulsos e obturadores
5.2 Resultados
5.2.1 Validação da instrumentação
5.2.2 Aplicações da Espectroscopia IRMPD 112
6 Conclusão
7 Referências

Capítulo 1 Introdução

1. INTRODUÇÃO

Por muitos anos a Química e a Física andaram separadas como ciências muito distintas. Os primeiros químicos a publicarem suas ideias com um olhar mais físico ou eram criticados ou não tinham suas ideias reconhecidas pelos seus contemporâneos, sendo John Dalton um bom exemplo pela sua teoria atômica em seu livro "*Um novo sistema de Filosofia Química*" em 1808 e muito criticado na época.¹

Porém, desde o Nobel ganhado por van't Hoff em 1901, o primeiro químico teórico a ser laureado, a sinergia entre a Física e a Química tem crescido e cada vez mais a explicação de fenômenos da natureza são buscados em nível atômico-molecular. Com o advento da Quântica, da Mecânica e da Termodinâmica Estatística e do aumento da capacidade de computação, esta sinergia avançou ainda mais.²

Uma das formas experimentais de medir parâmetros físicos em espécies químicas é pela espectroscopia, campo que estuda a interação de átomos, moléculas e íons com radiações eletromagnéticas. Essa interação fornece assinaturas precisas de propriedades eletrônicas, vibracionais, nucleares e rotacionais, oferecendo, assim, dados valiosos das propriedades dessas substâncias. Dessa forma, a espectroscopia é capaz de permitir a diferenciação e quantificação de espécies de interesse biológico, químico, industrial e muitos outros que são necessários para a manutenção e melhora da qualidade de vida no mundo.^{3–5}

Nesse contexto, a técnica de espectroscopia IRMPD (do inglês, *infrared multiple photon dissociation*)^{*} surge da união da espectrometria de massas e a espectroscopia vibracional por absorção no infravermelho. Essa técnica usa o poder de separação e detecção de espécies químicas na forma de íons apresentada pela

^{*} Anteriormente a palavra *Multi* era utilizada no lugar de *Multiple*. Tal alteração foi feita para deixar mais claro que o processo ocorre de forma multifotônica em eventos subsequentes e não por uma absorção de múltiplos fótons simultaneamente.

espectrometria de massas, com o poder de diferenciação desses íons pela espectroscopia vibracional, que está intrinsicamente ligada a seus grupos funcionais e conformações .⁶

Ainda, o espectro vibracional oferece informações valiosas do íon, como localização de cargas e sítios de protonação e desprotonação, presença de grupos funcionais, sua simetria, interações intra e intermoleculares, interações de Hidrogênio e muitas características estruturais difíceis de serem obtidas por outras técnicas.⁷ Ademais, a junção da técnica a cálculos computacionais e de estrutura eletrônica aumenta ainda mais o poder de predição estrutural da espectroscopia vibracional de íons.^{2,6,8–10}

Um dos grandes usos dessa técnica é a diferenciação de íons com a mesma relação massa/carga (m/z), como confôrmeros, isômeros ou rotâmeros, obtidos pela espectrometria de massa, através de diferentes assinaturas espectroscópicas que esses íons podem ter. Um uso mais específico é a detecção de intermediários de reação através de técnicas de injeção em tempo real e sua elucidação estrutural aliando o cálculo teórico de espectros vibracionais de possíveis candidatos com a comparação com o espectro experimental obtido.^{11,12,13}

O principal desafio para medir espectros vibracionais de espécies em fase gasosa é a baixa densidade no interior do espectrômetro de massas, dificultando a realização direta de medição de absorção da radiação irradiada.^{7,14} Por esse motivo, é necessário avaliar a ação dessa radiação nas espécies pelo espectrômetro de massa, que, além de fornecer íons de m/z conhecida, possui sensibilidade suficiente para a detecção quando essa espécie absorve a radiação e se fragmenta.

Uma outra dificuldade para a realização desses experimentos é a disponibilidade de fonte de radiação de alta potência que seja sintonizável – ou seja, que consiga emitir em frequências específicas em um intervalo do espectro desejado – além de toda a questão de alinhamento e sincronia entre essa fonte e o espectrômetro de massas, que são independentes.

O objetivo desse trabalho é, então, descrever o desenvolvimento de instrumentação capaz de realizar espectroscopia vibracional de íons em fase gasosa. Para tanto, alguns pontos devem ser abordados para permitir o entendimento dessa técnica.

O segundo capítulo traz um breve histórico do desenvolvimento e teoria de espectrômetros de massa, mostrando a influência das fontes de ionização e detecção de íons, tais como setor magnético e armadilhas de íons, como *ion trap*, filtros quadrupolares e outros.

O terceiro capítulo é dedicado para a descrição da parte ótica do sistema, seja na teoria quântica e natureza da luz como também na teoria de fontes óticas, tais como lasers de estado sólido, gasoso, oscilador paramétrico ótico (OPO) e lasers de elétrons livre utilizados para a realização de espectrometria IRMPD. Ademais, este capítulo traz um apanhando de como a luz interage com a matéria e como isso é aplicado nas diferentes formas de espectroscopia, visando principalmente a técnica de espectroscopia vibracional de ação por absorção multifotônica no infravermelho, também chamada de espectroscopia IRMPD.

O quarto capítulo traz uma breve abordagem dos fundamentos da química teórica e como ele pode auxiliar na atribuição e confirmação de dados experimentais

O quinto capítulo traz os resultados obtidos e se divide em duas seções. Na seção 5.1. o é discutido a parte prática e experimental de como acoplar a espectroscopia vibracional à espectrometria de massas, quais os desafios práticos e dificuldades encontradas bem como peculiaridades da montagem feita em nosso laboratório, como desenvolvimento de *software* para aquisição, controle e tratamento dos dados.

Por sua vez, a seção 5.2 traz espectros obtidos em nosso equipamento, para validação e verificação dos parâmetros e também traz resultados da aplicação da técnica para sistemas de interesse biológico, como bases nitrogenadas do DNA.

Capítulo 2

Espectrometria de Massas

2 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Espectrômetros de massa são equipamentos de elevada sensibilidade e poder de detecção e por isso têm se mostrado capazes de fornecer importantes informações para a detecção analítica de espécies químicas e também para estudos físico-químicos, como propriedades em fase gasosa e elucidação de mecanismos de reação.^{12,15–17} Essa habilidade do espectrômetro de massas, em um visão simplista, se dá por ele ser capaz de promover a formação de íons da amostra e a separação estes íons de acordo com a sua relação massa/carga (m/z), seja por meio de campos magnéticos e elétricos constantes ou variáveis.¹¹

O primeiro espectrômetro de massas foi construído em 1913 como parte de um programa de estudo de um novo gás com m/z 22 Th[†] observado no aparato de raios catódicos do Sir J. J. Thompson.¹⁸ Em 1920, descobriu-se que esse gás de m/z 22 era na verdade um isótopo de Neônio e, a partir de então, diversas adaptações nos aparatos experimentais surgiram para que tal técnica pudesse ser aplicada em cenários mais variados, como na caracterização de hidrocarbonetos e outras matrizes de interesse científico e industrial, como também na separação de isótopos para fins energéticos e bélicos.¹⁹

Os primeiros espectrômetros de massa aplicados a caracterização química eram semelhantes desenvolvido por Thompson. Neste equipamento, a amostra precisava ser volatilizada ou já estar em fase gasosa para ser inserida na câmara de ionização. Lá, um filamento de tungstênio era submetido a uma diferença de potencial que propicia a ejeção de elétrons que ao interagir com as moléculas do gás, dependendo da energia de colisão utilizada, poderá formar cátions ou ânions.¹⁸

[†] Note que a unidade correta para massa/carga é Thompson (Th) e não Dalton (Da) como é comumente expressado na literatura. entretanto a unidade Th é raramente utilizada, e por este motivo deixaremos esta unidade implícita neste texto.

De forma semelhante, desenvolveram-se os filtros quadrupolares e outras variações de ordem maior, culminando no uso do sistema de 22 polos.²⁰ Nesses sistemas cada par de hastes é conectada eletricamente e uma radiofrequência que faz a direção e a intensidade desses campos elétricos variarem periodicamente, fazendo com que os íons sejam conduzidos ao longo das hastes e permaneçam presos nas direções radiais ao feixe de íons.

A geometria desse filtro, em conjunto com parâmetros da radiofrequência aplicada, pode ser projetada de tal forma que apenas um intervalo de m/z tenha trajetória estável e chegue ao final do dispositivo. Demais íons serão ejetados e, portanto, não detectados ao atingirem o final do dispositivo como ilustrado na Figura 1.



Figura 1: montagem e funcionamento da espectrometria de massas sequencial

Pode-se, ainda, acoplar diversos desses filtros possibilitando o isolamento de íons específicos bem como reações ou ativação das espécies selecionadas pelo primeiro filtro no que é chamado de espectrometria de massas *tandem* ou sequencial (MSⁿ), Figura 1.¹¹

De Maneira semelhante, desenvolveram-se os *ion trap*. Os *ion trap* lineares são visualmente semelhantes aos filtros quadrupolares por serem feitos de quatro hastes paralelas, porém no caso do *ion trap* linear as hastes tem formato hiperbólico que os são

mais eficientes no transporte e armazenamento de íons. Há equipamentos inclusive que acoplam um *ion trap* linear que continua a receber os íons da fonte enquanto um *ion trap* 3D (ou outros analisadores de massa) fazem a varredura. Há ainda modelos de *ion trap* linear que são segmentados em várias seções que operam independentemente exercendo inúmeras funções.^{21,22}

No *ion trap* 3D, também chamado de ion trap de Paul, a espectrometria de massas sequencial não ocorre espacialmente pelo acoplamento de diversas armadilhas, mas sim temporalmente em um único dispositivo, e é dividida em quatro etapas distintas: acumulação dos íons, isolamento do íon de interesse, dissociação do mesmo e ejeção sequencial dos fragmentos para o detector. A etapa final de detecção pode ser adiada e novas etapas de isolamento e fragmentação também são possíveis.^{23,24}

O aprisionamento, ejeção e seleção dos íons no *ion trap* se dá através de uma radiofrequência (*rf*) oscilante que propicia forças atrativas e repulsivas o suficiente para manter uma trajetória estável do íon dentro da armadilha. Variações são feitas nessa *rf* a fim de ejetar íons para fora da armadilha ou para mandá-los ao detector. Na Figura 2 é apresentado um modelo de *ion trap* onde as radiofrequências são geradas através das tenções de armadilhamento e suplementar.²⁴ . Esta figura apresenta os parâmetros z_0 e r_0 que são nada mais que dimensões físicas *do ion trap*, sendo z_0 a distância entre o centro do anel até a entrada para o detector e r_0 é o próprio raio interno do eletrodo anel.



Figura 2: ion trap 3D

Yuichiro et al. também demonstram como os parâmetros z_0 e r_0 são importantes para os íons sejam armadilhadas e ejetados. De forma resumida, os íons são excitados nos eixos z e r simultaneamente, e assim há uma região de congruência entre ambas excitações que permite que os íons de determinada m/z (chamado parâmetro q) tenham trajetórias estáveis e não sejam ejetados da armadilha. Tal curva é uma derivatização das equações de Mathieu^{25–27}. A definição do parâmetro q segue na Eq 2.1.

$$q_u = q_z = -2q_r = \frac{8eU}{m\Omega^2(r_0^2 + 2z_0^2)}.$$
 2.1

Para que esses espectrômetros de massas possam analisar as mais diversas amostras e matrizes, permitindo diversos estudos, diversas fontes de íons foram desenvolvidas, assim como variados métodos de ativação e fragmentação, conforme será descrito na próxima seção. Dessa forma, espectrômetros de massa se mostram
ideais para estudo de reações, devida a sua capacidade de extração e isolamento de intermediários reativos produzidos ou não em solução.¹¹⁻¹³

No primeiro espectrômetro de massas destinado à caracterização química, a amostra precisava estar em fase gasosa para entrar na câmara de ionização. Porém outras técnicas já foram desenvolvidas, como o eletrospray, ionização por laser, dessorção em superfície, entre outras.²⁸

Das técnicas de ionização, a ionização eletrônica é comumente usada para amostras voláteis e é capaz de fornecer informações estruturais devido à alta energia empregada no processo e que resulta em grande fragmentação dos analitos. Tal padrão de fragmentação, junto com informações do íon molecular, servem como peças de um quebra-cabeças para a elucidação da estrutura do próprio íon molecular e propicia a criação bibliotecas usadas para comparação em análises futuras, como é o caso do banco de dados NIST.²⁹

Outras técnicas são ditas mais brandas por fragmentarem muito pouco os íons presentes na amostra ou a espécie a ser ionizada.^{30,31} No eletrospray a amostra é extraída de uma solução pela formação de um spray e os íons são então guiados para dentro do espectrômetro através de uma diferença de potencial aplicada entre a fonte e a entrada do espectrômetro de massas.

Se a espécie não for intrinsicamente um íon, a fonte os ioniza através de protonação, desprotonação ou por coordenação com alguma espécie carregada, supostamente alterando minimamente a estrutura da espécie de estudo. Tais fontes de íons podem ainda, em determinadas condições, formar agregados combinando um ou mais espécies do analito entre si e também com moléculas de solvente. ³²

Para saber, então, mais características desses íons, é possível fragmentá-los por outras técnicas de espectrometria de massa sequencial (MSⁿ), seja por fragmentação por

colisão (CID), fotofragmentação multifotônica no infravermelho por lasers (IRMPD) ou por radiação de corpo negro (BIRD), entre outras, o que permite obter mais informações estruturais sobre as espécies. Tais formas de fragmentação tem, por exemplo, substituído de forma muito mais precisa e simples a técnica de *Edman* de fragmentação de peptídeos em solução, que consiste na extração seletivas de aminoácidos ciclizados por fenilisotiocianatos.³¹

A fragmentação por colisão é obtida pela promoção da aceleração dos íons e subsequente ativação dos íons por colisão com espécies neutras no interior do espectrômetro. No caso do *ion trap*, os íons ativados colidem com átomos de Hélio utilizados como gás de amortecimento. Embora seja uma opção barata e de fácil implementação, os produtos gerados por CID em um *ion trap* apenas são detectados se tiverem m/z superior a aproximadamente um quarto da m/z do íon precursor. Esse valor de m/z, chamado de *cutoff*, existe devido ao compromisso que deve existir entre os campos elétricos necessários para isolamento, aceleração e detecção no mesmo aparato. Em alguns casos é possível ir abaixo desse valor mínimo, mas a qualidade do espectro de massas obtido é comprometida.²⁴

A fragmentação multifotônica no infravermelho (IRMPD) não é afetada por esse *cutoff* pois a energia interna adicionada ao íon não depende de sua energia cinética, uma vez que esse aumento se dá pela absorção de fótons ressonantes com vibrações moleculares e consequente redistribuição dessa energia para outros osciladores (IVR). ^{24,34} Tal fenômeno de IVR também será melhor discutido mais adiante na seção 3.2.

Para muitas biomoléculas, a radiação gerada por um laser de CO_2 funciona muito bem para promover essa fragmentação pois a maioria dos peptídeos e seus fragmentos possuem atividade, mesmo que mínima, no infravermelho, principalmente devido a estiramentos C-O e C-N.³³ Esta técnica também pode fornecer ainda mais informações caso a fonte de radiação seja sintonizável, tornando possível a avaliar a eficiência de fragmentação do íon armadilhado em função do número de ondas, como será descrito mais adiante.

Outra vantagem do uso de IRMPD em relação à CID é a capacidade de fragmentar íons em baixas pressões, como no caso do espectrômetro por ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier (FT-ICR) que opera a pressões abaixo de 10⁻⁸ torr onde não ocorreria colisões suficientes para fragmentação por CID, o que explica a existência de espectrômetros FT-ICR híbridos. IRMPD, entretanto, não é efetivo a pressões superiores a 10⁻³ Torr, pois muita da energia interna armazenada seria perdida por colisões.²⁴

Tais técnicas de fragmentação são complementares, pois podem fornecer informações diferenciadas, podendo ser usadas em conjunto.^{24,33}

CAPÍTULO 3 NATUREZA DA LUZ, TEORIA QUÂNTICA E INTERAÇÃO ENTRE LUZ E MATÉRIA

3 NATUREZA DA LUZ, TEORIA QUÂNTICA E INTERAÇÃO ENTRE LUZ E MATÉRIA

Uma boa forma de começar este capítulo é se perguntando o que é a luz. Para quem estudou a partir do século XX essa pergunta não deve parecer difícil, mas pense o quão capcioso foi esse assunto até início do século XIX. Tal discussão ganhou palco no século XVII quando Newton e Huygens propuseram teorias concorrentes para a luz.³⁵

Enquanto Newton achava que a luz poderia ser explicada se ela fosse construída por corpúsculos, Huygens acreditava que a luz surgia por oscilações ondulatórias do éter.^{35,36,37} O conceito de éter em si já é muito abstrato, como muito bem descrito no livro "Teorias do Éter e Eletricidade" de Whittaker publicado em 1910, e que retrata muito as descobertas, teorias e implicações na ciência desde Descartes até o início do século XX.³⁷

Nele, o éter é descrito como um meio onde a luz deveria se propagar dado que todas as ondas conhecidas até o presente momento necessitavam de algum meio para tal, como ondas sonoras se propagam pela matéria. Anos mais a frente, vários experimentos provaram o caráter ondulatório da luz, como a difração e refração. Thomas Young - que traduziu a Pedra de Roseta, Fresnel e Malus, na década de 1800, provaram o comportamento ondulatório da luz através de experimentos de polarização, tornando a teoria de Newton um pouco esquecida.

Em paralelo, experimentos de eletromagnetismo executados por Gustav Kirchhoff, em 1857, confirmaram que sinais em fios condutores se moviam na mesma velocidade que a luz no vácuo^{38,39}. Kirchhoff também foi essencial no desenvolvimento da teoria quântica pois, em conjunto com Bunsen, conseguiu determinar a composição das estrelas através da espectroscopia e descobrir novos elementos químicos.³⁸ Kirchhoff também foi o autor do nome "radiação de corpo negro", fenômeno que mais para frente contribuiu para a demonstrar a necessidade da ideia de quantização da energia demonstrando que a mecânica clássica já não respondia à todos os fenômenos.^{36,38}

Em 1861, James Clerk Maxwell, ao estudar as linhas de força propostas por Faraday, construiu um modelo que as descrevia como se fossem parte material do éter e parte matéria. Assim, foi possível retomar seus resultado às equações de velocidade do som descritas por Newton, obtendo então um valor da velocidade da luz, *c*, próxima aos medidos por Fizeau.^{37,40}

Tal descoberta permitiu concluir que a luz consistia em ondulações de mesma origem dos efeitos tanto elétricos quanto magnéticos e, assim, no dia primeiro de Janeiro de 1865, Maxwell publicou o artigo que unia a luz ao eletromagnetismo classificando a luz como uma onda eletromagnética.⁴¹

Mesmo tendo um formalismo impecável, tal teoria ainda se baseava na existência do meio imaterial Éter. Em 1864, Michaelson e Morley provaram a não existência desse meio,³⁶ apesar da teoria vigente seguir explicando diversos fenômenos da ótica,³⁵ até que a teoria de Maxwell foi comprovada experimentalmente por Hertz em 1887.^{35,37,40}

Outro nome importante para ser citado é Max Planck, dada sua enorme contribuição na interpretação da quantização da luz. Planck percebeu, em 1901, que para modelar e o fenômeno da radiação de corpo negro - aquele batizado por Kirchhoff - a energia das radiações emitidas por um corpo aquecido deveria ser discreta, ou seja, de forma não contínua, mas sim separada em pacotes. Tais pacotes seriam múltiplos de uma constante obtida experimentalmente, a qual foi batizada posteriormente de constante de Planck e representada pela letra h.^{36,42} Na época, o valor obtido para a constante era de 6,55x10⁻³⁴ m².kg.s⁻¹ e o aceito atualmente pelo *Bureau International*

des Poids ets Mesures é 6,626 069 79(30)x10⁻³⁴ m².kg.s⁻¹, mostrando que mesmo com ferramentas hoje ditas precárias e erros sistemáticos, muita ciência de qualidade pôde ser realizada.

Um outro grande descobrimento de relevância para o assunto, e também digno de Nobel, foi o efeito fotoelétrico proposto por Albert Einstein em 1905, no seu famoso artigo "Quanto ao ponto de vista heurístico para a emissão e transformação da luz.", em tradução livre.⁴³ Tal efeito provou a dualidade onda-corpúsculo da luz, reunindo os conceitos das teorias de Newton e Huygens.

Nesse artigo, Einstein demonstra que a partir de determinado comprimento de onda, uma radiação incidente em placas metálicas é capaz de ejetar elétrons da mesma, e o mais interessante é que cada metal possui um limiar de comprimento de onda diferente. Ou seja, radiações com comprimento de onda superior a esse não resultarão no efeito fotoelétrico, não importa qual seja a intensidade. Tal efeito já era conhecido e havia sido demonstrado por Hertz. A grandeza de Einstein foi ter usado a constante de Planck para interpretar e dar significado aos resultados.^{36,37,43}

Einstein atribuiu que a luz deveria ter massa e, portanto, momento. Dessa forma, ao colidir com elétrons da chapa metálica, esse momento seria transferido, resultando na ejeção de elétrons. Unindo então as ideias de Plank e Einstein, a luz teria tanto uma frequência definida (v), por ser uma onda, e massa (m) e momento (p), por ser um corpúsculo.

Matematicamente, a energia de um fóton hv é igual ao momento mc^2 , ou pc, e sabendo que uma radiação de frequência v tem comprimento de onda (λ) igual a c/v, tem-se que:

$$p = \frac{h}{\lambda}.$$
 3.1

Tal equação introduziu matematicamente o conceito de dualidade da luz conciliando as ideias de Planck, Newton e Maxwell.³⁶

Acelerando um pouco a história e saltando para 1912, Bohr, um jovem físico teórico, entrou para o grupo de pesquisa de Rutherford do qual veio a sair em 1913.³⁶ Nesse período, Bohr estava encarregado de estudar a desaceleração de partículas alfa (He²⁺) e beta (e⁻) ao colidirem com a nuvem eletrônica do átomo de Rutherford. Em seus estudos, Bohr percebeu que necessitava adicionar a constante de Planck alterando assim as leis de eletrodinâmica clássica.

Em 1913, já na Dinamarca, Bohr obteve seu primeiro sucesso modelando o átomo de Hidrogênio e propondo órbitas eletrônicas quantizadas em relação a constante de Planck reduzida \hbar ($\hbar=h/2\pi$). Nascia aí o modelo atômico de Bohr.

Esse modelo ainda mostrou que elétrons poderiam transitar entre diferentes níveis caso recebessem um determinado número de quanta e, ao retornarem ao seu estado fundamental, liberariam novamente a mesma energia absorvida, mas na forma de luz. Com esse modelo, foi possível finalmente interpretar as linhas de emissão de elementos químicos que já eram usadas para determinação da composição de estrelas como Kirchhoff fizera. Assim, a espectroscopia, que é a assinatura de alguma espécie perante interação com uma faixa do espectro eletromagnético, ganhou corpo e pode ser usada para entender o cerne das interações eletrônicas de um átomo.

Ainda em 1925, de Broglie propôs sua teoria³⁵ explicando a estabilidade dos níveis energéticos do átomo de Bohr se o raio da órbita do elétron multiplicado por 2π fosse igual a múltiplos de λ , outra forma de explicitar a quantização proposta por Bohr. Intuitivamente essa descrição faz sentido, pois tendo o elétron caráter ondulatório, ele não poderia dar uma volta não terminada. Ou seja, sua órbita representada pela onda estacionária deveria ter um número inteiro de ondulações.

Mais adiante, Schrödinger, percebeu que de Broglie havia simplificado demais a quantização e tentou diversas soluções tratando as ondas mais rigorosamente, entretanto ainda sem considerar boa parte da teoria da relatividade – o que foi posteriormente resolvido por Paul Dirac⁴⁴ – e assim surgiu a mecânica quântica na forma de mecânica ondulatória. É importante também deixar claro que uma outra formulação para a mecânica quântica já havia sido proposta por Heisenberg, porém a sua teoria foi apresentada na forma matricial e não havia ganhado popularidade. Somente anos depois, percebeu-se que as duas teorias eram equivalentes.³⁶

3.1 Formas de interação da luz com a matéria

Como mencionado, a luz – e também as radiações eletromagnéticas como um todo – interagem com a matéria, e essa interação pode ser dividida em três: absorção induzida, emissão espontânea e emissão induzida.⁴⁵ Há ainda outras formas de interação como espalhamento, reflexão, transmissão mas que não seriam discutidas no escopo deste trabalho.

Na absorção espontânea, temos uma espécie atômica ou molecular M absorvendo uma certa radiação *hv* e sendo promovida para um estado excitado M*.

Já a emissão espontânea consiste em uma espécie de alguma forma excitada M* espontaneamente emitindo uma radiação *hv* e decaindo para um estado de menor energia, M.

A emissão induzida ou estimulada, por sua vez, ocorre quando uma espécie excitada M* interage com uma radiação também *hv*, emitindo então outro fóton de mesma frequência e polarização, resultando também num decaimento dessa espécie para um estado de menor energia, M. Uma forma mais clara demonstrando tais interações eletrônicas se encontra na Figura 3.



Figura 3: principais interações eletrônicas da luz com a matéria

Desde a espectroscopia desenvolvida por Bohr e Bunsen, outras formas de espectroscopia se desenvolveram, seja a de emissão, diretamente ligada ao modelo de Bohr, que fornece informações sobre níveis energéticos eletrônicos e se relaciona ao espectro visível e ultravioleta.

As principais formas de espectroscopias se baseiam nos três fenômenos descritos no início do capítulo. A espectroscopia UV-Visível se dá pela absorção de parte de um feixe de luz monocromática que passa pela amostra. Pode-se também fazer uma varredura no espectro e assim obter o espectro UV-visível dessa amostra. Há também a espectroscopia Raman que usa os fenômenos de espalhamento da luz para obter informações semelhantes à espectroscopia vibracional no infravermelho. Sua maior vantagem é a não necessidade de um feixe de luz incidente que tenha frequência variável.

Espectrômetros de emissão, sejam espectrômetros de emissão ótica por plasma indutivamente acoplado, por sua vez, excitam átomos termicamente e analisam a radiação policromática de forma semelhante aos experimentos de Bohr, analisando a luz em linhas de emissão e assim descobrindo quais os possíveis elementos que emitiriam tais frequências.

Há também a espectroscopia rotacional, que se dá pela interação da molécula com radiação na região de micro-ondas, muito utilizada para determinação da geometria molecular e que sofre uma verdadeira revolução atualmente com o desenvolvimento de espectrômetros de micro-ondas por transformada de Fourier. A espectroscopia vibracional, por sua vez, se origina na ressonância entre a frequência associada com um dos modos normais de uma espécie com a radiação da região do infravermelho, conforme será detalhado a seguir.

3.2 Espectroscopia vibracional

Na espectroscopia vibracional no infravermelho, podemos tratar de forma simplificada um par de átomos ligados como um sistema massa mola, cuja diferença de dois níveis vibracionais (ou frequência de oscilação) está na mesma ordem de grandeza que a frequência infravermelha.

Num caso simples, esse oscilador é considerado harmônico, como mostrado na Figura 4. De maneira mais aprofundada, a curva de energia potencial pode ser descrita como uma expansão de série de Taylor, porém na região de mínimo, essa expansão pode ser truncada num termo quadrático, tornando a visualização e cálculo mais fáceis como mostrado na Equação 3.2.1, onde k é a constate restituição de ou rigidez oscilador.





Figura 4: Curva de energia potencial para moléculas diatômicas⁴⁵

A resolução da equação de Schrödinger para o oscilador harmônico, resulta em uma energia dependente da frequência de oscilação (ν) e do número quântico vibracional (n),

$$\mathbf{E} = h\nu \left(\mathbf{n} + \frac{1}{2}\right). \tag{3.2.2}$$

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \left(\frac{k}{\mu}\right)^{\frac{1}{2}} .$$
 3.2.3

onde k é a constate restituição de ou rigidez oscilador e μ a massa reduzida do sistema.

Ainda, para que uma transição possa de fato ocorrer, a oscilação deve promover uma variação o momento de dipolo da molécula (μ) deve não nula, e é representado pela Equação 3.2.4.

$$R = \int \psi'^* \mu \, \psi'' dx. \tag{3.2.4}$$

Pode-se ainda expandir μ em uma série de Taylor, sendo e se referindo à condição de equilíbrio.

$$\mu = \mu_e + \left(\frac{d\mu}{dx}\right)_e \frac{x}{1!} + \left(\frac{d^2\mu}{dx^2}\right)_e \frac{x^2}{2!} + \left(\frac{d^3\mu}{dx^3}\right)_e \frac{x^3}{3!} + \cdots .$$
 3.2.5

Juntando as duas equações 3,2,4 e 3.2.5, temos a Equação 3.2.6 que deixa evidente a necessidade da variação do μ não ser nula para que haja atividade no infravermelho.

$$R = \left(\frac{d\mu}{dx}\right)_e \int \psi'^* x \,\psi'' dx + \cdots.$$
 3.2.6

Em casos mais complexos, entretanto, há a necessidade de tratar esse oscilador como anarmônico. A principal diferença - além da forma - é a não igualdade entre as energias entre dois níveis vibracionais subsequentes, conforme mostrado na Figura 5.



Figura 5: Representação da energia potencial pela distância internuclear para o modelo do oscilador harmônico e anarmônico.⁴⁵

Bons exemplos práticos onde a anarmonicidade deve ser considerada são encontrados em moléculas que realizam ligação de Hidrogênio, como em sistemas de pares de bases nitrogenadas onde mais de um átomo forma um oscilador com o H em questão.

Ainda no caso anarmônico, os níveis vibracionais não são igualmente espaçados e diminuem seguindo um valor - chamado de constante de anarmonicidade - até que atingem uma região contínua que se caracteriza pela dissociação da ligação. Em outras palavras, se um oscilador é altamente excitado, ele chegará num momento onde o estiramento será tão grande e que não haverá mais forças atrativas para restituir a ligação.⁴⁶

Se um sistema apresenta N átomos, cada átomo possui 3 graus de liberdade referentes a cada um dos eixos x, y e z. Caso todos os átomos sigam para a mesma direção e sentido chamamos esse movimento de translação. Raciocínio semelhante pode ocorrer para a rotação. Deve-se, então, subtrair os graus de liberdade de translação e rotação dos graus de liberdade total da molécula, restando 3N-5 graus de liberdade de

vibrações, ou coordenadas normais, para moléculas lineares e 3N-6 para as demais. Cada uma dessas coordenadas normais pode, então, ser representada por um ou mais osciladores.

Podemos classificar esses modos vibracionais em estiramento (simétrico e assimétrico), deformação no plano (tesoura e rotação), deformação fora do plano (torção e balanço). Um bom exemplo para ilustrar é o espectro vibracional da água, onde seus três modos vibracionais são identificados, pois as deformações fora do plano e rotação não alteram o momento de dipolo da substância, conforme ilustra a Figura 6.



Figura 6: espectro vibracional calculado e modos vibracionais da água

Como um laser no infravermelho pode emitir radiação de frequência ressonante com vibrações moleculares, acreditava-se que este poderia ser usado para excitar tais vibrações específicas de tal forma a quebrar ligações específicas. Entretanto, hoje sabese que mesmo ocorrendo a absorção de múltiplos fótons há a redistribuição intramolecular desta energia para outros osciladores (IVR) e assim molécula poderá fragmentar em na ligação mais lábil e não necessariamente naquela excitada inicialmente. Em outras palavras, uma molécula tenderá a fragmentar sempre na mesma ligação independente de qual a frequência que seja nela irradiada.⁴⁷

Uma forma de visualizar esse fenômeno é pensar num sistema clássico de três massas separadas por molas. Tais massas não estão em repouso, mas se movem levemente em torno da sua posição de equilíbrio. Uma leve alteração na posição dessas massas influenciará o sistema como um todo a fim de minimizar a tensão resultante do sistema.



Figura 7: representação intuitiva do modelo de redistribuição vibracional interna.⁴⁷

A Figura 7 à esquerda mostra um conjunto de oscilador submetido a uma excitação, representada pela mudança da posição do corpo cinza. A figura da direita mostra que a posição do corpo do meio reage, assim como o corpo mais à direita, modificando a natureza de todos os osciladores envolvidos.

3.2.1 IRMPD e a Espectroscopia de ação

Assim como os espectros vibracionais em solução, os espectros de íons em fase gasosa permitem elucidar a estrutura e equilíbrio conformacional na fase gasosa,⁷ com a vantagem de serem prontamente comparados com cálculos de estrutura eletrônica que são feitos considerando a espécie no vácuo.^{48,49} Tal técnica se realiza pela chamada

espectroscopia de ação ou consequência pois a intensidade da radiação detectada após passar pelos analitos é muito próxima da intensidade da radiação incidente, tornando impossível a medição da quantidade absorvida em termos de transmitância.⁷

É nesta etapa que o uso de um espectrômetro de massas se torna essencial, pois a quantidade de radiação absorvida está diretamente ligada à extensão de fragmentação dos íons. Tal fragmentação é contabilizada pela mudança de intensidade do íon pai cuja m/z é conhecida e se modifica apresentando íons de m/z menores, como mostrado na Figura 8. Em outras palavras, a radiação absorvida é medida indiretamente pelo número de íons fragmentados em determinado comprimento de onda, se não houver fragmentação (seja por baixa intensidade o absortividade ou ainda falta de ressonância) a intensidade cai a zero, como no caso do primeiro ponto da Figura 8.



Figura 8: Representação da espectroscopia IRMPD

De forma mais aprofundada, o fenômeno de IRMPD ocorre quando um fóton infravermelho é absorvido elevando o íon para o primeiro estado vibracional. Essa energia é então redistribuindo via IVR na forma de energia interna levando o íon de volta ao seu estado inicial, porém com um acréscimo na sua energia interna. Esse processo de absorção e redistribuição se repete até que a energia interna do íon seja equivalente ao limiar de dissociação da ligação mais lábil, resultando então na quebra dessa ligação via reação unimolecular, ^{7,50,51} como representado na Figura 9.



Figura 9: Representação esquemática do mecanismo de fragmentação por IVR.⁷

Segundo a teoria RRKM, mesmo que o íon tenha energia para fragmentar, essa energia está distribuída em todos os modos de movimento deste íon, e somente fragmentará quando essa energia se concentrar em um oscilador lábil, ou seja, com a menor energia de fragmentação e que esteja cineticamente acessível.¹ Esse processo pode ser representado pelas equações 3.2.1.1-4.

$$A + hv \rightleftharpoons A^* \qquad \qquad 3.2.1.1$$

$$A^* \to A^{\pm}$$
 3.2.1.2

$$A^{\pm} \rightarrow B + C + \dots \qquad \qquad 3.2.1.3$$

$$A + hv \rightarrow B + C + \dots \qquad 3.2.1.4$$

As espécies $A^* e A^{\pm}$ diferem, sendo A^* a espécie já com energia suficiente para fragmentação e A^{\pm} o complexo ativado que possui conformação específica diferente da apresentada por A, assim, como A^{\pm} apresenta energia localizada na coordenada de reação, a formação de B e C é possível

Porém, fazendo a aproximação da morte súbita para a ativação do íon, ou seja, que a constante de velocidade para as equações 3.2.1.2 e 3.2.1.3 é infinita e que o íon

ativado dissocia em produtos imediatamente, a reação de fragmentação pode ser aproximada à primeira ordem como representado em 3.2.1.4.

No caso específico do IRMPD as concentrações das espécies podem ser substituídas pela intensidade de sinal no espectrômetro de massas, dado que a intensidade é proporcional ao número de íons armadilhados.

Sendo assim, a partir da equação 3.2.1.4, é possível escrever a lei de velocidades e a eficiência de fragmentação (Eff) como representado nas equação 3.2.1.5, sendo I_A a intensidade do íon percursor e I_{frags} a intensidade dos fragmentos.

$$Eff = -\ln(\frac{I_A}{I_A + \sum I_{frags}})$$
 3.2.1.5

Outro fator de importância é a dependência do espectro em função da potência do laser, pois, em qualquer que seja a fonte de radiação, dificilmente se obtém uma resposta linear desta maneira, a fim de permitir a reprodutibilidade de experimentos por outros grupos de pesquisa, é interessante ou corrigir o espectro pela curva de potência ou então fornecer a própria curva de potência.⁷

3.2.2 Espectroscopia de duas (ou mais) cores

Espectroscopia de duas cores é o nome muito abrangente e que englobam experimentos que utilizam mais de um fóton com energias diferentes. E pode ser realizada de diversas formas e ter propósitos diferentes. Dentre as mais comuns, no contexto desse trabalho, estão a i) UV-IR, ii) CO_2 -IR e iii) IR-IR ou ainda UV-IR-IR.

As técnicas que utilizam UV servem para promover excitações eletrônicas fragmentando toda a população de íons através de um laser de alta potência. Nesta técnica, um laser no ultravioleta de comprimento de onda fixo promove a fragmentação

induzida pela excitação eletrônica do íon de forma continua. Dispara-se, então, um laser de infravermelho com frequência variada em toda a faixa espectral de interesse. Se um fóton infravermelho for absorvido por ressonância vibracional, este íon terá uma população menor no seu estado fundamental, assim, a transição eletrônica que propiciou a absorção e consequente fragmentação por UV que parte desse nível vibracional fundamental estará menos disponível e a fragmentação induzida pelo laser de UV não será observada enquanto ela ainda estiver excitada vibracionalmente pelo IR.^{7,52}

A espectroscopia utilizando laser de CO_2 serve para casos onde há pouca fragmentação do íon, tal fato pode ter origem na baixa densidade de fótons da fonte de radiação IR, na baixa absortividade ou outros fatores. Tal forma de espectroscopia será descrita mais aprofundadamente na seção 5.2.1.6.

Ainda, há as técnicas IR-IR, também conhecidas como "*hole burning*". Nestas há sempre duas fontes de radiação infravermelha, uma fixa e outra variante. O objetivo dela é extinguir uma determinada população dos íons armadilhados, mas para que isso seja possível, deve haver uma linha frequência que apenas uma das populações absorva e assim seja fragmenta, e a linha fixa então será ressonante com essa frequência.⁵²

3.2.3 Vantagens e desvantagens da espectroscopia IRMPD na elucidação estrutural

A grande vantagem da implementação da espectroscopia IRMPD é sem dúvida a elucidação estrutural pois fornece uma nova dimensão á MS, entretanto, há diversas outras técnicas de elucidação estrutural já bem desenvolvidas e disponíveis em equipamentos comercias como a espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN), cristalografia por difração de raios-X, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier. Cada uma dessas técnicas possuirá vantagens e desvantagens e

esta seção apresenta uma leve síntese desses fatos e quais as vantagens que justificam o desenvolvimento de uma nova instrumentação capaz de realizar ensaios de espectroscopia IRMPD.

Como já citado, a espectrometria de massas pura ou sequencial por muito tempo serviu como ferramenta chave na elucidação estrutural de moléculas pequenas. A MS também revolucionou a elucidação de peptídeos como também mencionado no capítulo 3. Porém a MS falha na diferenciação de espécies com a mesma relação de m/z. Algumas diferenciações de isômeros são possíveis quando seus produtos de fragmentação forem diferenciáveis. No entanto isso não ocorre em tautômeros, isômeros geométricos, isômeros óticos, substituintes *orto, meta* e *para* em anéis aromáticos, por exemplo. A MS também não fornece nenhuma informação sobre equilíbrios conformacionais. A diferenciação deste tipo de isômeros pode ser realizada se outra técnica de separação for acoplada ao MS, como cromatografia com coluna quiral ou a mobilidade iônica com modificadores quirais no gás de arraste.

No que se refere às vantagens da escolha da espectroscopia IRMPD à espectroscopia por RMN, além do valor dos equipamentos, se destaca principalmente a quantidade de amostra necessária e não necessidade de purificação da amostra. Estudos de RMN necessitam ao menos 2mg de amostra e esta precisa estar o mais pura possível, pois o espectro será feito de toda a parcela de amostra alocada no equipamento. Na espectroscopia IRMPD há a separação dos íons injetados no equipamento, assim retirase o espectro apenas do íon de interesse isolado pelo MS, eliminando a maior parte dos contaminantes da matriz, entretanto, há a necessidade do processo de ionização da espécie, ou seja, a substancia de interesse deve ser iônica ou ter facilidade em ionizar-se e também de permanecer estável e sem muitas mudanças estruturais, ainda, os íons devem ser facilmente fragmentados, espécies muito rígidas apresentação baixa

intensidade de fragmentação e assim algumas bandas podem não ser encontradas no espectro vibracional.

No RMN, qualquer tipo de amostra pode ser analisado. A espectroscopia RMN também pode ser utilizada na elucidação estrutural de isômeros geométricos e óticos, enquanto que a IRMPD sozinha não nos dá essas informações, sendo necessário então o acoplamento de outras etapas de separação de íons como mobilidade iônica ou separações cromatográficas.

A cristalografia de raios-X apresenta as mesmas desvantagens que a espectroscopia RMN no que se refere à quantidade de amostra, porém este tipo de análise requere ainda a obtenção de monocristais e esta tarefa pode ser muito difícil principalmente quando se fala de biomoléculas que não tendem a cristalizar facilmente. Os dados obtidos por cristalografia também requerem que um especialista os interprete. Há a ainda a questão da difícil detecção de átomos de hidrogênio nas espécies e também a mudança de conformação entre os estados condensados entre si e também com a fase gasosa.

Resta agora a comparação entre espectros vibracionais obtidos por FTIR e IRMPD. Novamente entra a questão de quantidade, isolamento e pureza da amostra. Análises por FTIR necessitam de amostras puras e em quantidades suficientes para que haja absorção do feixe de radiação que possa ser mensurado. Análises de sólidos e líquidos podem ser realizados através de reflectância ou através do preparo de pastilhas de KBr, e em ambos os casos ocorre a interação entre os íons ou moléculas presentes entre si e também com o próprio KBr e com uma possível umidade, gerando assim um alargamento de banda.

No que se refere à elucidação estrutural, geralmente análises vibracionais servem para evidenciar possíveis grupos funcionais, muitas vezes não sendo possível obter informações acerca da sua posição na molécula analisada, sendo necessário assim o confronto com cálculos computacionais de possíveis candidatos.

Em suma, e elucidação estrutural por espectroscopia IRMPD apresenta inúmeras vantagens principalmente no que se refere à quantidade e pureza da amostra e na facilidade de interpretação os resultados. Suas desvantagens residem no tipo de amostra (devem ser facilmente ionizadas e encontradas no espectro de MS e apresentar boa fragmentação) e na incapacidade da diferenciação de isômeros óticos e também na necessidade de cálculos teóricos para confronto e explicação dos resultados.

3.3 Fontes de radiação

Espectros IRMPD só foram possíveis quando lasers sintonizáveis de CO_2 foram inicialmente acoplados a armadilha de íons de *Penning* de um FT-ICR na década de 70.⁷ Entretanto, apenas linhas específicas em uma parte estreita do espectro podia ser usada (9.2 a 10.8 µm, ou 943 a 1087 cm⁻¹). Outras fontes de radiação, como a radiação de corpo negro, também eram muito utilizadas para fragmentação de íons, mas impossibilitava a realização de espectroscopia por não permitir o controle da frequência emitida.⁷

Outras regiões foram acessadas com o uso de osciladores/amplificadores óticos paramétricos (OPO/OPA) alimentados por lasers de estado sólido, como o de granada de alumínio e ítrio dopados com neodímio (Nd:YAG). Essas fontes, porém, apresentam baixo rendimento energético, permitindo apenas induzir fragmentação na faixa de 2200 a 4000 cm⁻¹.

Não obstante os baixos valores de potência, novas técnicas de espectroscopia foram desenvolvidas a fim de driblar esse obstáculo. Uma delas foi no uso de espécies "mensageiras" como gases inertes que em baixa temperatura se acoplam à espécie de interesse formando agregados, seja pelo uso de armadilhas de íons criogênicas, seja pelo uso de expansões supersônicas.⁵³

Tais agregados possuem baixas energias de ligação e são quebrados na presença de um único fóton, energia muito menor do que a necessária para quebrar ligações covalentes.^{7,54,55} Isso tornou possível a espectroscopia de ação utilizando OPO/OPA na faixa complementar do *fingerprint* de 600 a 2000 cm⁻¹.

Outra opção para realizar IRMPD é o uso de lasers de CO_2 junto com o OPO/OPA a fim de facilitar a fragmentação aumentando a energia do íon até próximo ao limiar de dissociação para que o feixe do OPO/OPA proporcione a dissociação com pulso de menor energia. Essa técnica ganhou o nome de *espectroscopia de duas cores*, por utilizar dois comprimentos de onda. Uma desvantagem dessa técnica é que, devido à grande potência do CO_2 em comparação ao OPO, o íon pode ser aquecido demasiadamente, acessando assim outras populações conformacionais. Pode-se, ainda, usar esse fato para extinguir uma das populações e então realizar espectroscopia da população restante, como já descrito na seção 3.2.2.

Mas a *Renascença* da espectroscopia IRMPD se deu no início do século quando lasers de elétrons livre (FEL) foram acoplados a espectrômetros de massa. O principal fator para que aparatos de espectroscopia IRMPD ainda não sejam comerciais, é a necessidade dessas fontes óticas, em especial lasers de FEL, devido ao grande tamanho e complexidade de um acelerador que possibilite a liberação da radiação desejada. Inclusive, há um interesse na miniaturização desses lasers para fins bélicos, em especial a destruição e redirecionamento de mísseis inimigos, que pode no futuro impulsionar o desenvolvimento de FELs de bancada.⁵⁶ Porém, para quem deseja realizar experimentos na região de *fingerprint*, até hoje, há duas instituições fazem rotineiramente tais análises, uma situada nos Países Baixos (FELIX, do inglês *Free Electron Laser for Infrared eXperiments*), e outra na França (CLIO, do francês *Centre Infrarouge Laser D'Orsay*). Há também um novo laser de elétrons livres do Instituto Fritz-Haber na Alemanha, FHI-FEL, porém este não está aberto à comunidade externa.⁵⁷

Um resumo das diferentes fontes óticas usadas para espectroscopia IRMPD se encontra na Tabela 1. Tendo em vista a importância que tais fontes óticas possuem e suas diferentes aplicações, elas serão mais descritas nos subtópicos adiante.

Tabela 1: diferentes características dos lasers utilizados para espectroscopia IRMPD.⁷

Sistema	tipo	intervalo /cm	potência	comprimento de pulso	energia por pulso	enrgia por segundo /J
CO ₂	discarga de gás	925-1085	5-15 W	onda contínua	N/A	5-15
CO	discarga de gás	1600-1900	1-10 MW	onda contínua	N/A	1-10
FELIX	laser de eletrons livre	500-4000	10 MW	sequência micropulsos em (ps) GHz com 5µs	Micropulso: 2-12 μJ Macrpulso: 10-60 mJ	0,1-0,6 (10 Hz)
CLIO	laser de eletrons livre	600-2500	20 MW	25 MHz de sequencia de micropulsos de 8µs	Micropulso: ≤25 µJ Macrpulso: ≤40 mJ	≤0,6 (25Hz)
ΟΡΟ/ΟΡΑ	ótica não linear	2500-4000	0,5-2 MW	4-10 ns	6-10 mJ	0,06-0,1 (10 Hz)
OPO/OPA	ótica não linear	2500-4000	50-100 mW	onda contínua	N/A	0,05-0,1

3.3.1 Teoria dos lasers

A palavra laser vem de um acrônimo de *light amplification through stimulated emission radiation*, que em inglês significa *amplificação de luz através de emissão estimulada de radiação*, como descrito no item 3.1 desta dissertação.

Basicamente, uma espécie M é excitada à M* que interage com uma radiação também *hv*, emitindo então outro fóton de mesma frequência e polarização, porém dentro do que se chama cavidade ótica, um espaço entre dois espelhos onde a luz produzida entre os mesmos é continuamente refletida e permanece oscilando. Um dos espelhos possui um pequeno percentual de transparência por onde irá passar parte da radiação que e o feixe de laser, como mostra a Figura 10. Desta forma, consegue-se criar uma radiação de alta intensidade, comprimento de onda único de mesma fase e polarização. Isto dá ao laser a sua coerência característica.^{14,45}



Figura 10: componentes essenciais de um laser

A cavidade ressonante do laser deve ter dimensões que sejam múltiplos da metade do comprimento de onda, do contrário ocorrerá ressonância e a diferença de fase ocasionará interferência destrutiva diminuindo a intensidade do laser.

Mas para que o laser funcione, é necessário que muitas espécies estejam na forma excitada e possam decair para níveis inferiores não populados, ou seja, é necessário que haja uma inversão de população dentre os níveis de menor e maior energia. Muitos artifícios são feitos para que exista essa inversão, sendo a principal delas o uso de sistemas com vários níveis de energia, como mostrado na

Figura 11.



Figura 11: sistemas emissores de radiação laser de 2, 3 e 4 níveis populacionais relativos.⁴⁵

Em sistemas de apenas 2 níveis a inversão de população é raramente obtida, impedindo que esses sistemas sejam usados para fins de laser, salve em lasers de exímero. No entanto, em sistemas de 3 ou 4 a inversão é facilmente obtida, sendo o sistema de 4 níveis o mais eficiente.¹⁴

3.3.2 Laser de gás

Lasers de gás contemplam todos os lasers que apresentam um gás como meio ativo. Suas transições de estado que geram lasers ocorrem geralmente entre níveis discretos de energia vibracional, eletrônica ou rotacional. Dentre essa classe de laser, se destacam principalmente os lasers de CO, CO_2 e excímeros, que contemplam regiões do infravermelho próximo, médio e UV no caso dos excímeros.^{7,14,58} Para o fim desta dissertação, apenas o laser de CO₂ será discutido.

O laser de descarga CO_2 tem esse nome na origem do seu processo de excitação, que se dá na descarga elétrica entre um cátodo e um ânodo dentro de um tubo preenchido com gás nitrogênio, dióxido de carbono e hélio. Comercialmente, o teor de CO_2 varia de 4 a 6 % em volume, N_2 de 10 a 55%, He de 40 a 80%, podendo haver

também outros elementos como Xenônio e Oxigênio na faixa de 4% e o Hidrogênio não ultrapassando 1%.

A descarga gerada excita a molécula de N_2 para o seu primeiro estado vibracional que irá perder essa energia por colisões com moléculas de CO₂ que, por sua vez, serão promovidas para seu primeiro estado excitado do estiramento assimétrico (001), que possui energia próxima ao estado excitado do N_2 .^{3,58} Ocorre então a emissão espontânea e a molécula é levado para o estado excitado do estiramento simétrico (100) bem como para o modo duplamente excitado de flexão (020).⁵⁸ Esses dois modos são depopulados por colisão com He para o modo 010. Um resumo desse esquema de transferência de energia se encontra na Figura 12. Tais colisões ocorrem muito rapidamente e assim a inversão de população se mantém. Além de ser essencial para o decaimento rápido dos estados 100 e 020, o He também mantém a descarga elétrica ativa no meio.



Figura 12: transferência de energia em um laser de CO₂.⁵⁸

3.3.3 Laser de estado sólido

Lasers de estado sólido possuem como meio ativo um vidro ou cristal dopado com um íon ativo. As transições que darão origem ao laser ocorrem na nuvem eletrônica interna deste íon. A blindagem dos elétrons de valência permite que este íon se comporte em parte como se estivesse em fase gasosa, porém ainda sentindo efeitos de repartição de *Stark* e *Fônons*.¹⁴

O laser de Nd:YAG é constituído de um cristal de granada (óxido de ítrio e alumínio, $Y_3Al_5O_{12}$) dopado com neodímio, Nd^{3+} . Esse cristal é opticamente isotrópico, duro e estável, possuindo também alta resistência e condutividade térmica que permitem altos ganhos em amplificação.^{14,59}

Geralmente, usam-se lasers de diodo ou lâmpadas de criptônio ou xenônio como bomba para criar a excitação inicial e assim propiciar a inversão de população.

Ainda, por ser um laser de 4 níveis, o laser de Nd:YAG apresenta eficiência acima de 50%, tendo principal emissão em 1064 nm dentre mais de 35 transições possíveis, como 946, 1120, 1320, e 1440 nm. Um esquema das transições possíveis se encontra na Figura 13.¹⁴



Figura 13: Níveis de energia relevantes para as principais absorções e emissões do laser de Nd:YAG.⁵⁹

A primeira transição leisante ocorre na separação entre níveis divididos no estado ${}^{4}F_{3/2}$ para o estado ${}^{4}I_{11/2}$ do Nd³⁺, vibrações na treliça da granada facilitam o despovoamento do estado ${}^{4}I_{11/2}$ para o estado ${}^{4}I_{9/2}$.¹⁴

A depopulação desses níveis abaixo do nível de onde partem as emissões ocorre pela dissipação através de fônons presentes no material pelo fato do mesmo estar em estado condensado, mesmo fenômeno que também é responsável pelo alargamento da banda de bombeamento.

Esse tipo de laser também pode operar de maneira contínua ou pulsada, sendo que a pulsada opera através de um dispositivo chamado Q-switch, que pode impedir que o laser se forme ou aumentar sua potência modulando a extensão da inversão de população. Repentinamente, quando a extensão da inversão de população é aumentada, o laser irá apresentar ganho superior e a energia armazenada será então liberada na forma de um pulso de radiação intensa, favorecendo assim processos multifotônicos que não seriam possíveis com lasers contínuos de mesma potência.⁵⁹

3.3.4 OPO/OPA

A necessidade de fontes de radiação de comprimento de onda ajustável na região do infravermelho foi suprida com o surgimento de osciladores paramétricos óticos (OPO) e amplificadores paramétricos óticos (OPA), que modificam um comprimento de onda de um laser de alta intensidade através de efeitos de ótica não linear. Mesmo que OPO tenha vários aspectos em comum com lasers, ele não é um laser, mas sim um aparato ótico.⁶⁰

A primeira diferença emerge da necessidade de um laser como bomba de alimentação, e nesse caso, a bomba precisa ser relativamente mais coerente que lasers tradicionais, optando-se geralmente em lasers de estado sólido operando com diodos.⁶¹ OPOs também não precisam de sistema de resfriamento, como lasers tradicionais, e também oferecem uma gama maior na escolha do comprimento de onda e de forma contínua, indo do visível ao infravermelho médio, competindo assim com lasers do infravermelho cujas emissões são discretas.

OPOs também geram, além do sinal, um feixe ocioso de menor intensidade, que caso necessite, pode ser amplificado em um OPA.⁶² Resumidamente, a luz, ao se propagar num meio qualquer (e seguindo a Eq 3.3.1), faz seu campo elétrico interagir com os elétrons de valência do meio, criando uma perturbação que resulta em um momento de dipolo dependente da intensidade e do comprimento de onda incidente. Caso essa fonte de radiação tenha alta intensidade, os termos de susceptibilidade (χ) de ordem superior a 1 da equação de polarização (Eq 3.3.2) passam a ter relevância.

$$\nabla^2 \vec{E} - \frac{n^2}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \vec{E} = 0.$$
 3.3.1

$$\vec{P}(t) = \epsilon_0 \left(\chi_1 \vec{E}(t) + \chi_2 \vec{E}^2(t) + \chi_3 \vec{E}^3(t) + \cdots \right).$$
3.3.2

Assim, a função de onda que descreve o movimento do fóton se modifica como mostrado na Eq. 3.3.3. Em outras palavras, um campo elétrico irá induzir uma polarização que excitará o meio criando então um novo campo elétrico oscilante.

$$\nabla^2 \vec{E} - \frac{n^2}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \vec{E} = \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \vec{P}.$$
3.3.3

Vale ressaltar também que o índice de cada termo da Eq 3.3.2 irá determinar a ordem do sistema ótico, ele também determinará quantos fótons estarão interagindo. No sistema de ótica de primeira ordem, tem-se que um fóton incidente de frequência ω 1 será igual à frequência que passará pelo meio, ω 1. Num sistema de ordem dois, tem-se que um fóton de frequência ω 1 irá ser aniquilado gerando dois fótons cuja soma de suas frequências ω 2 + ω 3 será igual à frequência incidente e assim por diante respeitando assim a lei de conservação de energia.

Ao resolver emtão a equação diferencial Eq 3.3.3 para o termo de segunda ordem, obtém-se uma nova equação de polarização, cujo campo elétrico resultante será o novo 'laser' formado pela interação da radiação incidente com o meio, mostrado na Eq. 3.3.4. Uma representação simples se encontra na Figura 14.

$$\vec{E}(t) = \vec{E}_1 e^{-\omega_1 t} + \vec{E}_2 e^{-\omega_2 t} + \vec{E}_1^* e^{-\omega_1 t} + \vec{E}_2^* e^{-\omega_2 t}$$
3.3.4

Aplicando novamente esse termo na equação geral de polarização, tem-se então a Eq 3.3.5 para o termo de segunda ordem:

$$\vec{P}(t,x) = \epsilon_0 \chi_2(\vec{E}_1 e^{-i2\omega_1 t - 2k_1 x} + \vec{E}_2 e^{-i2\omega_2 t - 2k_2 x} + 2\vec{E}_1 \vec{E}_2 e^{-i(\omega_1 + \omega_2) t - 2k_{1-2} x} + 2\vec{E}_1 \vec{E}_2 e^{-i(\omega_1 - \omega_2) t - 2k_{1-2} x} + cc) + 2 \epsilon_0 \chi_2(\vec{E}_1 \vec{E}_1^* + \vec{E}_2 \vec{E}_2^*).$$
3.3.5

O interessante dessa equação são os termos das exponenciais (2 ω , ' $\omega_1 + \omega_2$ ' e ' $\omega_1 - \omega_2$ ') que ditam quais efeitos de interação de fótons que são possíveis. O termo ' ω_1 + ω_2 ' indica que dois novos fótons serão produzidos e a soma de suas frequências será a própria frequência incidente, este é o principal efeito esperado na cavidade do OPO. O termo 2 ω é um caso especial chamado de dobramento do feixe, que na verdade também é um caso de soma onde os dois novos fótons gerados têm a mesma frequência, ou seja, há a produção de um harmônico. O terceiro caso é o que ocorre no OPA, onde a diferença dos novos fótons é igual ao fóton incidente, este fenômeno é utilizado na amplificação de um sinal. Experimentalmente, a amplificação ocorre quando junto com o feixe incidente da bomba, também se incide um feixe vindo do OPO, como mostrado na Figura 14. Esta figura também mostra de forma geral o modelo de OPO/OPA usado em nosso laboratório.

Mesmo que pela Eq. 3.3.5 os três termos de geração de frequência apareçam simultaneamente, apenas um deles de fato irá ocorrer, e isso dependerá da ocorrência ou não da combinação de fases do *sinal* e do *ocioso* no meio dispersivo dos cristais. Tal fenômeno é revelado pelo termo -2k, que dará, além da fase, o momento da mesma no meio na direção de propagação e a fase na forma de um vetor de onda.



Figura 14: modelo de OPO/OPA e fenômeno de adição e subtração de frequência, respectivamente.

Por conservação de momento, tem-se que a soma do momento da bomba deve ser igual ao momento do sinal somado ao momento do ocioso. Caso essa igualdade seja verdadeira, o produto do índice de refração e da frequência da bomba deverá ser igual à soma dos produtos do índice de refração com a sua determinada frequência (sinal e ocioso), como mostrado na Eq. 4.2.3.6. Caso contrário, a intensidade da radiação não será inferior devido à interferência destrutiva, como mostrado na Figura 15.



$$\mathbf{n}_{\mathrm{b}}\boldsymbol{\omega}_{\mathrm{b}} = \mathbf{n}_{\mathrm{s}}\boldsymbol{\omega}_{\mathrm{s}} + \mathbf{n}_{\mathrm{o}}\boldsymbol{\omega}_{\mathrm{o}} \tag{4.2.3.6}$$

Figura 15: intensidade do primeiro harmônico para $\Delta k=0$ e $\Delta k\neq 0$
Capítulo 4 Cálculos Teóricos

4 CÁLCULOS TEÓRICOS

Conforme dito nos capítulos anteriores, os dados experimentais obtidos nesse projeto dependem de cálculos teóricos para auxiliar na atribuição dos espectros experimentais, bem como para a avaliação das populações de confôrmeros e isômeros mais favoráveis, não só em fase gasosa, mas também em solução.

Muitas propriedades moleculares podem ser calculadas, incluindo: (i) Energias de ligação, energias de estruturas em estado fundamental, excitadas e também estados de transição. (ii) Cargas atômicas e potenciais eletrostáticos, momento de dipolo, polarizabilidade. (iii) Frequências vibracionais (infravermelha e Raman). (iv) Energias de transição e intensidades de espectros de UV e IR. (v) Mecanismos e caminhos de reação.

Juntamente com a escolha do que se quer calcular, deve-se levar em conta qual o nível de teoria será utilizado. Segundo o fluxograma do manual do software *Gaussian* 09 (Erro! Fonte de referência não encontrada.), deve-se escolher o nível de teoria de cordo com o tamanho do sistema a ser estudado, da acurácia esperada, do tempo e poder de computação disponível.

O nível de teoria mais primordial relacionado à química computacional é com certeza a mecânica molecular que utiliza de métodos de física clássica para modelar propriedades químicas baseadas na conformação de moléculas.

Tais propriedades como densidade eletrônica, carga parcial, afinidade protônica, energia de reações, são derivadas levando em conta características intrínsecas de cada átomo e elemento (como a eletronegatividade) e a conformação estrutural da molécula analisada, como comprimento de ligação, ângulo de ligação, diedros, e interações não ligadas como energia eletrostática e ligação de Hidrogênio, criando-se assim uma superfície de potencial de cada confôrmero analisado relativo a uma geometria de referência.

Esse conjunto de equações que modelam essa curva potencial são chamados de campos de força e é importante ressaltar que eles não são universais, mas sim parametrizados para uma série de classes de compostos químicos, como por exemplo hidrocarbonetos, compostos orgânicos oxigenados, ácidos nucleicos e DNA, proteínas, e etc. Cada campo de força é pensado e parametrizado para ter melhor custo/benefício entre tempo de computação e precisão para os sistemas analisados.

Cálculos de distribuição conformacional, minimização de energia estrutural e simulação de espectros vibracionais estão entre as tarefas mais comuns para uso da espectroscopia IRMPD, e as metodologias mais citadas incluem desde *ab initio* como perturbação de segunda ordem do tipo MP2,⁶³⁻⁴³ DFTs como B3LYP^{67,68} e a recente família de funcionais M06, sobretudo a versão M06-2X^{69,70}, além de métodos semi-empíricos. Comparação entre funcionais em cálculos de frequência vibracional já foram realizados em relação a espectros IRMPD e constatou-se que ambos os funcionais citados servem e há pouca diferença entre si.⁷¹

Esses métodos da DFT são fundamentais para a condução do presente projeto, dado que serão tratados sistemas com número elevado de átomos e consomem elevado tempo de cálculo. Os métodos semi-empíricos aqui são dedicados a busca conformacional das substâncias de interesse. É necessário ainda fazer avaliação mais aprofundada da origem da estabilização de alguns confôrmeros em relação a outros através da avaliação dos orbitais naturais de ligação (NBO).^{64–66}

O Método de MP2 nesse contexto será realizado a fim de uso comparativo para alguns sistemas simples, mostrando que muitos sistemas não necessitam de tanto formalismo e processamento para serem obtidos e mesmo assim apresentar precisão suficiente, como já publicado por nosso grupo de pesquisa.⁷²

Assim, através da modelagem teórica aqui descrita é possível que propriedades físicas e a reatividade dos sistemas estudados sejam caracterizadas a nível molecular, de forma que não pode ser realizada somente com os dados experimentais, além de permitirem a elucidação do equilíbrio conformacional dos intermediários de reação por comparação com os dados experimentais.

Capítulo 5 Parte Experimental

5 PARTE EXPERIMENTAL

Este capítulo será dividido em dois: A seção 5.1 traz o acoplamento físico, hardware e software permitindo a comunicação e intercomunicação entre o espectrômetro de massas, fontes de laser e computador. (ii) seção 5.2 traz espectros obtidos nesse novo aparato a fim de demonstrar a sua utilidade em diversas áreas da química, como catálise, química sintética, cinética.

5.1 Instrumentação e Acoplamento

A primeira etapa do projeto foi o acoplamento físico do sistema de lasers ao espectrômetro de massas, e para isso foi necessário a inserção de duas janelas para entrada dos Lasers do OPO/PA e CO₂, conforme indicado por J1 e J2 na Figura 16. Essa modificação mais brusca foi feita pelo Fabricante (Brucker) em um espectrômetro modelo *AmaZon SL Dual Funnel Ion Trap Mass Spectrometer*. Tal modelo apresenta precisão de massa de +/- 0.15 e resolução FWHM de 0.6 no modo *UltraScan* e 0.35 no modo *Enhanced Resolution*, podendo detectar m/z na faixa de 70-2200 Th. Também foi necessário a inserção de dois espelhos (E7 e E8), bem como dois orifícios de 3mm no eletrodo anel da armadilha de íons, localizado logo abaixo da J1. A da janela J1 e lentes L1 e L2 são feitas de fluoreto de cálcio e diferem apenas na espessura e distâncias focais, sendo que J1 tem espessura de 5 mm, L1 tem distancia focal de 14cm enquanto a L2 tem distância focal de 184 cm. Os espelhos E3-8 são recobertos em ouro apresentando reflexão de 97%. As íris I4, I5 e I6 estão ali dispostas apenas para facilitar alinhamento.



Figura 16: Montagem do sistema instrumental e inserção de fábrica dos espelhos E7 e E8

A J2, no entanto, é constituída de seleneto de zinco e espessura de 2,5cm e a transmitância para o CO_2 é próxima a 100%, como mostrado na Figura 17. A J1 permite passagem entre 70% e 100% para o OPO e aproximadamente 7% de passagem pra os 10.6µm de comprimento de onda da linha de CO_2 , como também mostrado na Figura

17, tal fato previne que qualquer feixe de CO_2 entre dentro da cavidade óptica do OPO/OPA e cause algum dano ao mesmo.



Figura 17: especificações da janela de CaF₂ (superior) e a Janela de ZnSe (inferior).⁷³

Os obturadores utilizados funcionam em tempo mínimo de 3 ms por ciclo e o O2 possui superfície espelhada a fim de refletir parte da radiação incidente e evitar superaquecimento.

O OPO/OPA é alimentado por um laser pulsado *Continuum Surelite II* de Nd:YAG com potência de 5 W na frequência de 10 Hz, largura de 10 ns e operando com Q-switch de 189 μ s. O Laser de CO₂ utilizado é da marca Universal Laser System, modelo ULR e possuí potência variável com seu máximo em 50W e opera na linha de 10.6 μ m. Ambos os lasers estão afixados em mesa óptica.

A luz emitida pelo Nd:YAG é admitida na caixa do sistema ótico do OPO/OPA. No interior do sistema OPO/OPA o feixe de 1064 nm incidente será divido em dois por um divisor de feixe (*beamspliter*) como mostrado na Figura 18. Parte do feixe (33%) passa por um cristal chamado de dobrador de feixe que através de efeitos de ótica não linear (como abordado na seção 3.3.4) converte o 1064 nm em seu primeiro harmônico (532 nm). Esse feixe verde, então, atinge os cristais de KTP do OPO em um ângulo que irá aniquilará esses fótons produzindo outros dois, sendo um na região do infravermelho próximo (0,75-1,4 μ m) e outro na região do infravermelho intermediário (1,4 -3 μ m). O comprimento de onda será determinado pelo ângulo de incidência no primeiro cristal, e tais ângulos são controlados através de um computador próprio em um software fornecido pelo fabricante do OPO.

Logo em seguida, a radiação produzida no OPO (infravermelho intermediário) juntamente com os 66% restantes do feixe de 1064 nm são combinadas nos cristais de KTA e assim produzem mais um fóton no infravermelho intermediário e um infravermelho médio (3-8 μ m) e assim finalmente o laser pode ser guiado para dentro do espectrômetro de massas. Tais cristais são anisotrópicos e através do controle do ângulo de incidência pode-se varrer parte do espectro infravermelho (2300 – 4000 cm⁻¹).

Através da lei de conservação de energia, pode-se escrever uma relação entre os três fenômenos de ótica não lineares que ocorrem nesse sistema que são i) 2 ω_1 : 1064nm formando 532 nm; ii) $\omega_1 + \omega_2$: 532 nm gerando infravermelho próximo (880 a 710nm) e médio; iii) $\omega_1 - \omega_2$: infravermelho intermediário com o 1064 nm gerando o infravermelho intermediário (1965 a 4686cm⁻¹), como representado na Eq 5.1.1.



$$\omega (1965 \ a \ 4686 \ cm^{-1})^{\text{Figura}} \stackrel{\text{18: sistema}}{=} (\frac{18: \text{ sistema}}{880 \ a \ 710 \ nm} - \frac{\text{optico}_{10} \text{do} \ \Theta \text{PO}/\text{OPA}}{1064 \ nm}) x \ 10^{7}.$$
 5.1.1

5.1.1 Software de aquisição de dados

A comunicação do computador com o OPO/OPA ocorre através de um computador secundário que manda comandos para os 6 motores do OPO através do software *MotorControl*, fornecido pelo fabricante do sistema e o software *SpectraScan* também foi programado para enviar comandos para o MotorControl e, assim, é possível manipular o OPO/OPA escolhendo o comprimento de onda inicial e final da análise juntamente como o número de pontos intermediários entre esses limites (*steps*) na interface do *SpectraScan* (Figura 19). Isso permite uma maior resolução pois qual maior o número de pontos, mais contínuo será o espectro e assim bandas muito próximas podem ser diferenciadas.

Pode-se também manipular o tempo de irradiação que dos íons e em qual estágio de MSⁿ que ocorrerá a IRMPD, como mostrado nas Figura 20 e Figura 21. Quanto maior a exposição maior a fragmentação pois maior será o número de fótons absorvido pelos íons armadilhados. No que se refere à instrumentação, essa etapa é feita de utilizando a ferramenta que comanda os parâmetros de CID. Especificamente alteramos o tempo em que o íon é submetido à colisão, entretanto com intensidade nula da radiofrequência de excitação, assim o íon é centralizado no *trap* porém sem energia para colidir. Nesse momento o laser, que ali está alinhado, é disparado promovendo a dissociação.

Basicamente o que o *SpectraScan* faz (além de controlar o OPO) é criar um *script xml* e salvar numa pasta em que o *Ion trap Control* (programa fornecido pela *Bruker* que controla o espectrômetro de massas) está programado para acessar, reconhecer e obedecer aos comandos lá escritos, tais como na escolha de qual íon que será armadilhado, tempo de irradiação e também qual o tempo de atraso que será utilizado, entre outros. Ainda, o Spectra Scan salva o comprimento de onda atual nos dados salvos pelo MS na forma de uma variável de controle do usuário bem como a potência do laser na saída do sistema.

O Tempo de atraso (timeout) é necessário pois o *SpectraScan* manda os comandos para o MS, porém o *SpectraScan* não recebe um retorno notificando se o MS já realizou tais comandos. Por exemplo, podemos mandar que o MS mantenha um íon sob irradiação por 750 ms no estágio 1 e irradiar um dos fragmentos formados por mais 750 ms no próximo estágio, no entanto o número de vezes que ele executará essa rotina para cada ponto (ou seja, quantas médias ele irá adquirir) não lhe é informado, assim, o tempo de atraso deve ser ajustado manualmente para que seja possível para o MS realizar todas as operações antes que o *SpectraScan* avance um passo na varredura do espectro.

170317_TrapAccessExample.vi	
File Edit View Project Operate Tools Window Help	
	<u> </u>
Chromatogram Definition Ext. Trigger Conf.	
Laser Trig & Single Averaged Spectrum Helium Controller Frag. Times Control Values	Scan Loop Ion Guide
Ion Guide Element Ion Guide Phase	
Scan Ion System Irap Drive Positive Po	rity, Pass 🗢
Wait Setting	
Start Wavelength Wavenumber Select Laservison COM 869 2108.98 V COM1 Vait Mo	e
Wait	Fixed Time 🗸
Wavenumber 2 Current Wavelength Hold off 840 2506 27 840	ms)
# Steps Current Step Wavenumber 3	
400 400 2506.27 500	(ms)
Wait/Ti	eOut (ms)
Boolean 2 Frogress 6000	
Start Loop	ollect Chrom Data
Chrom Data	
1-	
0.8 -	
0.6 -	
0.4 -	
<u>س</u> 0.2-	
₹ -0.2-	
- h /	÷

Figura 19: Interface do SpectraScan

Laser Trig & Single Averaged Spectrum	Helium Controller	Frag. Ti	mes 🛛 (Control Valu	ues Scan Loop	Ion Guide
Chromatogram Definition Ext. Trigger Conf.						
External Trigger Configurat	ion					_
Trigger Level	Scan Type		MS/MS E	ent	-	
Active High Active Low	✓ MS ✓ MS(n) (n>=2)		Stage 1	Isolation	Fragmentation	
	Max. Res. Scan)		2			
	<u> </u>		4			
	Scan Event		5			
	Clear Trap		6			
	Lens Pass		7			
	Scan Burst		8			
	Lens Pass (ETD)		9			
	Scan		10			
	🗖 Accu Time		ETD			
	Accu Time (ETI))	PTR			

Figura 20: estágios de isolamento e fragmentação

Chromatogram Definition		Ext. Trigge	r Conf.		
Laser Trig & Single Averaged Spectrum	lelium Controller	Frag. Times	Control Values	Scan Loop	Ion Guide
FragTimeMax (us) 3000000	min: 0 max: 400000 default: 300000	00000 (4000s) 000 (30s)			
FragTimePerStag	je Enabled?				
Frag TimePerStag	ge (us)				
820000 40000 40000 40000 40000 40000 40000	Set to -1	(or <0) to omit	this stage		
40000					

Figura 21: tempo de fragmentação por estágio

Ademais, adicionou-se medidores de potência na janela de saída do laser que monitoram e salvam a potência do laser juntamente ao cromatograma, e, assim, é possível obter uma curva de potência para cada comprimento de onda varrido. Esta etapa foi feita utilizando a porta de entrada de sinal de um analisador analógico UV que já estava disponível no próprio espectrômetro de massas. Esta adaptação é de suma importância pois a potência do OPO/OPA varia muito com o comprimento de onda e por isso várias otimizações das posições dos cristais foram feitas e, portanto, é comum rodar parte de um espectro em uma calibração e parte em outra. No fim das contas, normaliza-se o espectro pela potência do laser naquela região e pelo número de pulsos a qual a nuvem de íons foi submetida.

5.1.2 Sincronização de pulsos e obturadores

Outra parte importante envolvendo a comunicação entre os lasers e o espectrômetro de massas é a parte de obturadores, pois eles que vão permitir a entrada controlada da radiação dentro do espectrômetro de massas.

Primeiramente, o espectrômetro recebe um sinal para isolar determinado íon em um determinado estágio por um determinado tempo de fragmentação. Após esse período, o MS leva certo tempo para gerar e armazenar o espectro obtido.

Dentro desse período, o laser de Nd:YAG que já está sendo disparado na frequência de 10 Hz, tem seu obturador aberto. Após o obturador ser fechado, o OPO/OPA modificará as posições dos cristais para o próximo comprimento de onda. A comunicação entre o MS e os obturadores se dá através de pulsos de 5V e são mandados diretamente pelo próprio espectrômetro, lembrando que é necessário aguardar o *timeout* pois o espectrômetro deve fazer a aquisição dos espectros de massas nesse tempo antes que o próximo comprimento de onda seja imposto.

Entretanto, em muitos casos, apenas o uso da radiação do OPO/PA não é suficiente, necessitando de outras fontes, como o laser de CO_2 . O momento que ele deve atingir a nuvem de íons dentro da armadilha se dá 40ns após o disparo do OPO, logo deve haver um leve atraso entre o pulso do Nd:YAG com o Pulso do CO_2 .

A Figura 22 mostra então a sincronização os pulsos dos lasers e obturadores. Vale a pena ressaltar que toda essa rotina de pulsos de obturadores tanto do laser de CO₂ quanto do OPO/OPA estão inseridos dentro intervalo dos pulsos destinados à etapa da CID, que isola o íon e o mantém no centro da armadilha. No fim dessa rotina, os íons são ejetados seletivamente para o detector e assim avaliar a fragmentação.



Figura 22: sistema de pulsos e obturadores

No momento da operação, então, o usuário terá que estar alerta ao software de controle do MS e ao SpectranScan. Já os softwares de controle do laser de Nd e o vBean são necessários principalmente no início da rotina de análises. Uma imagem geral da interface destes três últimos softwares citados se encontra na Figura 23.



Figura 23: interface dos programas

5.2 Resultados

O objetivo desta dissertação é a montagem e validação de uma instrumentação capaz de realizar espectroscopia vibracional em fase gasosa de íons identificados por espectrometria de massas através da técnica de dissociação multifotônica no infravermelho (IRMPD). Como a descrição da aparelhagem de hardware e software já foram apresentadas na seção 5.1, resta mostrar os espectros vibracionais realizados e a sua comparação com espectros obtidos através de cálculo teórico e também com espectros já publicados na literatura para a validação do sistema. Dentre os sistemas utilizados para a verificação de desempenho do instrumento estão o triptofano (Trp) e a o-fosfotirosina protonada.

Além desses sistemas algumas bases nitrogenadas como a citosina, guanina, adenina e timina, que já foram anteriormente estudas por técnicas espectroscópicas variadas para estudos de sítio de protonação e tautomerismo, assim como o estudo da geometria de seus pares conjugados (adenina-timina e citosina-guanina) foram revisitados por nosso grupo, fornecendo resultados interessantes.

5.2.1 Validação da instrumentação

A validação do funcionamento das técnicas desenvolvidas durante esse projeto foi feita pela comparação de espectros obtidos na literatura com espectros realizados pelo nosso equipamento. O primeiro sistema a ser avaliado foi o triptofano (Trp) protonado e seus fragmentos, conforme relatado por Mino *et al* e o segundo foi a forma protonada da o-fosfotirosina.⁷⁴ Tais sistemas foram escolhidos pois possuem baixo custo, facilidade de dissociação em produtos facilmente detectáveis e bandas bem finas e definidas cobrindo boa parte da região de estiramento de hidrogênio e, em especial nas regiões dos estiramentos de N-H e O-H. Tais estiramentos estão presente em uma infinidade de moléculas de interesse,^{49,75} que constituem nas assinatura vibracionais mais relevantes do intervalo de operação do nosso instrumento (2300 a 4000cm⁻¹). O espectro do Trp+H⁺ também apresenta bandas mais largas oriundas de interação intramolecular com o anel aromático, fazendo com que esse sistema englobe diversas situações encontradas na espectroscopia IRMPD.

O triptofano pode ser entendido como um padrão para a realização de espectroscopia IRMPD dado que diversos grupos de pesquisa que o utilizaram para esse fim e publicaram seu espectro IRMPD ou de espécies semelhantes.^{3,6,80,52,54,72,75–79}



Figura 24: Mecanismo de fragmentação do triptofano protonado. (adaptado)⁷⁵

A Figura 24 apresenta três possíveis caminhos de fragmentação, cada um representando um ataque no carbono α do aminoácido, e cada ataque resultará em um fragmento diferente. Tais rotas estão de acordo com os estudos de fragmentação por CID da literatura.^{3,77,78,80}

Das três rotas propostas, a rota promovida pelo ataque do carbono 3 (C3) passa por um ciclo de três membros que intuitivamente não era considerado favorável. Entretanto, ao comparar o espectro vibracional experimental com os espectros teóricos de todos os candidatos. A estrutura que apresenta maior concordância entre os resultados teóricos e experimentais é o produto da rota C3 representada na cor verde. É importante ressaltar, ainda, que a espécie formada por esta rota também é a que apresentou menor energia no nível de teoria B3LYP/6-31+G* dentre os possíveis produtos de fragmentação apresentados.

Neste sistema, os espectros teóricos ajudaram a descobrir que diversas conformações são plausíveis e que pequenas variações conformacionais e, consequentemente, energéticas, podem causar variações no espectro vibracional, mostrando que certas variações na comparação de cálculos com espectros experimentais podem ser aceitas. Ainda, os autores mostram que vibrações relacionadas a interações intramoleculares, como é o caso do triptofano na região 2500 a 3200 cm⁻¹, são de difícil predição teórica e consequentemente o espetro calculado terá divergências na comparação.⁷¹ Estes resultados também foram replicados por nosso grupo e publicados apresentando também cálculos com diversos níveis de teoria.⁸¹

Um estudo mais aprofundado realizado por Pereverzev *et al.*,⁵² utilizando a técnica da espectroscopia de duas cores UV, separa a região de 2800 a 3200 cm⁻¹ em interações intramoleculares de dois tipos. A de menor energia refere-se a interações entre o grupo amino e a aromaticidade do anel indólico e, a de maior energia, à interação entre o grupo amino e, a carbonila do grupo ácido. Dado que a técnica utilizada por Pereverzev consegue maior resolução nessa região, é possível e identificar dois principais confôrmeros distintos, a explicação desta forma de espectroscopia se encontra na seção 3.2.2, mas resumidamente, necessita-se um laser em uma frequência fixa e ressonante com apenas uma das populações presentes, fragmentando-as completamente e assim permitindo realizar espectroscopia da população restante.

Dado que o sistema Trip+H⁺ fora detalhadamente estudado e avaliado, conforme descrito anteriormente, passamos a realizar a validação dos resultados obtidos

em nosso equipamento. Para tanto, reproduzimos as análises de fragmentação do triptofano e realizamos espectros IRMPD das espécies percursoras e fragmentos obtidos.

O espectro de massas do TrpH⁺ e o espectro contendo a fragmentação induzida por radiação em 3533 cm⁻¹, que está à 22cm⁻¹ do máximo de absorção da banda de estiramento OH, encontram-se na Figura 25.



Figura 25: espectro de massas e fotofragmentação do TrpH⁺ em 3533 cm⁻¹

Nela, nota-se que nesse número de onda ocorre não somente a fragmentação do $TrpH^+$, mas também da espécie $TrpH^+$ -NH₃ (m/z =188), que coincidentemente também absorve na mesma região e fragmenta produzindo o íon de m/z=146, como já reportado por Martens, *et al.*⁵⁴ Tais íons também são observados no espectro de massas do $Trp+H^+$ antes do isolamento e têm origem na sua fragmentação durante o processo de ionização,

As Figura 26 e Figura 27, apresentam os espectros vibracionais dests íons encontrados. A comparação dos espectros do obtidos com literatura se encontram na

Tabela 2 e Figura 28. O centro das bandas relatados foram obtidos através da aplicação da primeira derivada nos dados já alisados através do método Savitzky-Golay que é amplamente utilizado na espectroscopia FTIR e Raman.⁸²

Cabe ressaltar que os dados experimentais de fragmentação reportados (pontos) foram tratadas por um polinômio de ordem 2 e uma janela de suavização 11 pontos, resultando no espectro tratado.

Tabela 2: dados de comparação com as bandas da literatura e da reprodução do

estudo

Oscilador	literatura	experimental
σ N–H··· π	3044 ^a	3059
σ N–H···O	3123 ^a	3121
$\sigma~{ m NH}_3$ (assimétrico)	3340	3335
σ N–H (indol)	3500	3500
σ O–H	3555	3553

Dados retirados de Mino et al exceto os marcados com a que foram retirados de

Perevez, et al. 52,75

Cabe ressaltar que tais dados ilustram de forma muito clara a capacidade dessa técnica em elucidar a geometrias dos íons detectados por espectrometria de massas e espectrometria de massas tandem. A Figura 27, por exemplo, caracteriza de forma ortogonal as assinaturas espectroscópicas dos íons principais obtidos durante a avaliação da amostra de Trp+H⁺, permitindo a caracterização inequívoca das espécies observadas de forma inacessível por espectrômetros de massas comuns.



Figura 26: Reprodução dos espectros do triptofano e seus fragmentos

A maior diferença entre os espectros experimentais e a literatura é a intensidade relativa entre as bandas. Na literatura a banda referente ao estiramento O-H na região de 3550 que se mostrou a mais intensa, e no espectro experimental ela se equivale à intensidade do estiramento N-H••• π . Tal diferença tem origem na otimização da fonte de radiação, que no caso do OPO, tem potência variável ao longo do espectro o que resulta em regiões espectrais com maior sensibilidade que outras. Outra explicação é o fato do cálculo teórico simular espectros de absorção por um único fóton, e o processo de IRMPD ser uma espectroscopia de ação induzida por múltiplos fotons.



Espectro vibracional IRMPD do Triptofano e seus fragmentos

Figura 27: ortogonalidade entre o espectro de massas e espectros IRMPD do Trp+H $^+$ e seus fragmentos



Figura 28: Comparação do espectro do triptofano com a literatura.⁷⁵

Para avaliar a reprodutibilidade do sistema, diversas análises do Trp+H⁺, e também da fosfotirosina, foram realizadas ao longo da realização deste projeto. Os dados obtidos se encontram na Tabela 3, na qual os centros das bandas reportadas foram obtidos através da primeira derivada das curvas.

Tabela 3: reprodutibilida	de das análises do	o Trp da fosfotiros	ina. Dados em cm ⁻¹
Triptofano	NH _{3(assim.)}	$N-H_{indol}$	OH
literatura ⁷⁵	3340	3500	3555
calibração	3335	3500	3553
média das novas medições (n=5)	3325	3487.8	3540.6
desvio padrão	1	1	1
desvio da calibração	10	12.8	12.6
Fosfotirosina	NH _{3(assim.)}	СО-Н	РО-Н
	3343	3552	3667
calibração média das novas medições (n=6)	3339 3323	3555 3541 .8	3670 3654.5
desvio padrão	4	2	2
desvio da calibração	16	13.8	15.5

Como pode ser visto, houve uma certa variação da posição dos cristais nesse intervalo de seis meses entre as medições, tal variação pode ser vista na Figura 29. Tal variação tem origem em problemas de comunicação entre o software e os rotores dos cristais do OPO/PA, portanto é necessário que verificações sejam feitas periodicamente para que os dados coletados possam ser corrigidos. Em nosso grupo, o tempo estipulado é de seis meses.



Figura 29: mudança da calibração do sistema

Um ponto importante na reprodutibilidade dos dados obtidos é o conjunto de parâmetros utilizados para a realização dos espectros vibracionais. Dessa forma, na próxima seção há uma discussão sobre os efeitos de parâmetros como, número de médias acumuladas por espectro, resolução espectral e o tempo de irradiação.

5.2.1.1 Efeito dos parâmetros de aquisição para realização de um espectro IRMPD

Na realização de um espectro vibracional IRMPD, há vários parâmetros que podem ser ajustados no espectrômetro de massas, no laser e nos mecanismos de aquisição e tratamento dos dados a fim de obter-se um espectro satisfatório. Dentre os mais relevantes estão:

- i) Tempo de irradiação
- ii) Otimização do OPO/OPA
- iii) Número de espectros de massas realizados (médias acumuladas)
- iv) Número de passos na varredura do espectro (resolução espectral)

Os ensaios de tempo de irradiação foram feitos através da aquisição do espectro IRMPD de bases nitrogenadas, pois já foi reportado que alguns grupos de pesquisa tiveram dificuldades em realizar IRMPD com tal classe de compostos.

Tais grupos precisaram utilizar adutos com água, cátions ou mesmo dímeros para poderem obter estes espectros vibracionais, ou recorrer à técnicas de prédissociação ou espectroscopia de duas (ou mais) cores para que a fragmentação fosse possível. Além disso, a maioria destes estudos foi realizados na região de *fingerprint*, onde um brilho mais intenso e maior eficiência de fragmentação podem ser obtidas por lasers de elétrons livres.^{84–90}

Para avaliar o número e espectros e passos, utilizaram-se amostras de fosfotirosina que possui grande facilidade de fragmentar, aumentando a eficiência de fragmentação com pouco tempo de irradiação, permitindo uma avaliação mais rápida e sensível. Isso faz com que não tenha sido possível submeter o sistema a longos períodos de irradiação, dado que a intensidade do íon pai seria completamente suprimida. Isso

ressalta a discussão de que os valores aqui reportados são válidos apenas para esse sistema e devem ser usadas de forma relativa quando extrapolados para outros íons.

5.2.1.2 Tempo de irradiação

Ao iniciar a realização um espectro IRMPD, a primeira etapa é obter um espectro de massas da espécie desejada. Esta etapa pode parecer trivial, porém ao trabalhar com compostos de coordenação ou intermediários de reação, ou mesmo amostras muito diluídas, a dificuldade aumenta, sendo que efeitos de matriz também pode influenciar na detecção de tal íon, assim como prejudicar o processo de ionização e até mesmo o transporte das espécies de forma intacta para a fase gasosa.

A segunda etapa é verificar se o íon em questão fragmenta em algum comprimento de onda da faixa espectral disponível. Para tal, faz-se uma varredura rápida e manual com um tempo arbitrário de irradiação de tipicamente 500 ms. Caso alguma fragmentação ocorra, especialmente nos números de ondas que foram previstos por cálculos teóricos preliminares, é realizado um ajuste fino para obter o máximo de fragmentação, i. e. o máximo da banda de absorção desse sistema.

A terceira etapa é decidir o tempo de irradiação de tal forma que fragmentação não consuma mais 50% da intensidade do íon pai. No entanto, recomenda-se realizar varreduras exploratórias com maior tempo de irradiação para verificar a existência de bandas de menor intensidade que podem ser adicionadas ao espectro IRMPD final composto. O valor de 50% é estipulado para que a intensidade do íon percursor não atinja valores abaixo da linha de detecção. Deve-se ultrapassar esse limite apenas em regiões onde existam bandas de baixa absorção.

Em casos específicos onde nenhuma dissociação é observada nessa etapa, mesmo nas frequências dos osciladores preditos pelos cálculos teóricos, é possível realizar a otimização dos cristais do OPO/OPA ou uso de outras fontes de radiação como lasers de CO₂, alternativas que serão discutidas mais adiante.

Para os ensaios desta seção, os espectros IRMPD foram feitos com exatamente os mesmos parâmetros, variando apenas o tempo de irradiação para cada sistema. Os tempos escolhidos variam entre os sistemas haja visto que a fotofragmentação da banda mais intensa varia de espécie para espécie, pois mesmo que a intensidade de absorção em um espectro IR seja alta, a molécula ionizada precisa não só absorver a radiação, mas também redistribuir essa energia nos outros níveis vibracionais da molécula para então fragmentar. Sendo assim, anéis onde existe mais aromaticidade, por exemplo, tendem a fragmentar com mais dificuldade em relação à anéis com substituintes.

A Figura 30 mostra o efeito do tempo de irradiação no espectro IRMPD da guanina e citosina protonada. À primeira vista, pode-se notar visualmente que o aumento do tempo de irradiação acarreta numa diminuição do ruído em toda a faixa do espectro e o aumento da intensidade de todas as bandas visíveis.

Entretanto, pode-se notar também que a relação entre as bandas 3425 e 3550 cm⁻¹ se altera, ou seja, mesmo a intensidade de todas as bandas ter aumentado com o tempo de irradiação, algumas bandas tiveram um acréscimo maior que outras. Ainda, o aumento do tempo tornou as bandas visivelmente mais largas, porém tais bandas se mostraram mais definidas, o que vem a sugerir três possíveis casos: i) o acoplamento de mais de um oscilador naquela região; ii) aquecimento do íon; iii) fornecimento de energia para maior dissociação nas bordas da banda. Qual destes fatores ocorre ou talvez há uma combinação destes ainda está em aberto.

Realizou-se o mesmo procedimento para as bases Adenina e Timina respectivamente (Figura 30). Para tais bases, os resultados do aumento do tempo de irradiação foram os mesmos que para a guanina: bandas com intensidade maior junto com maior definição das mesmas.

A intensidade relativa das bandas 3425 e 3550cm⁻¹ também diminuiu com o aumento do tempo de irradiação, mas somente para a citosina, com a Timina tal efeito não foi observado. A eficiência da fotofragmentação da Adenina foi muito menor em relação às outras bases, dificultado um maior aprofundamento nas suas atribuições.



Figura 30: espectros IRMPD da Guanina[H]⁺ e Citosina[H]⁺ obtidos com diferentes tempos de Irradiação



Figura 31: Espectro IRMPD Adenina[H]+ e da Timina[H]+ em diferentes tempos de irradiação

Em especial para a Timina observou-se a formação de bandas, provavelmente oriundas de ruído, no tempo de 1000ms, e em regiões que antes apresentava uma linha base limpa. A primeira hipótese para tal seria a potência do laser e a sobreposição do feixe nas bordas dos furos do eletrodo em anel do ion trap, o que pode ser excluído uma vez que todas as análises desta secção foram realizadas no mesmo dia e outras corridas com o mesmo tempo de irradiação não apresentaram tal efeito.

Ainda, o aumento do tempo de irradiação revelou a que a banda principal em 3550 cm⁻¹ pode ser divida em três bandas muito próximas. A interpretação de cada sistema em particular se encontra na seção 5.2.1.6, onde cada base nitrogenada é estudada individualmente para a investigação do tautomerismo e sítio de protonação de cada sistema.

5.2.1.3 Otimização dos cristais do OPO/PA e curva de potência

Como mencionado na seção 3.3.4, os Osciladores Paramétricos Óticos e seus amplificadores (OPO/PA) são compostos de cristais anisotrópicos alinhados de tal maneira que a radiação eletromagnética que passa por eles é convertida em duas novas frequências. Esse processo demanda diversas reflexões e refrações que precisam estar não apenas alinhadas, mas também devem respeitar o caminho da onda a fim de não propiciar diferença de fase e consequente perda de sinal.

Levando em consideração que o OPO/PA varre uma faixa considerável do espectro, é de se esperar que diferentes v tenham caminhos diferentes, resultando em ganhos diferentes de sinal. Portanto, deve-se otimizar a posição dos cristais de tal modo que determinada região de frequência tenha mais ganho que outras e, através da utilização e uma série de otimizações, permitir a realização de análises em diferentes regiões do espectro utilizando diferentes otimizações.

A mudança da posição dos cristais para otimização é feita de forma iterativa, onde 5 dos 6 cristais do sistema podem ser alterados iterativamente até que se atinja o máximo para determinado número de onda.

A Figura 32 mostra o a diferença de energia por pulso (à frequência de 10Hz) entre duas configurações de otimização. Em suma, a Figura 32 mostra o espectro IRMPD do Trp+H⁺ juntamente com a curva de potência realizadas nessas diferentes otimizações dos cristais, evidenciando assim que uma diferença de energia do feixe altera as intensidades das bandas em um espectro do mesmo composto.



Figura 32: espectro IRMPD triptofano feito com 500ms de irradiação em diferentes calibrações; (em destaque) curva de energia do OPO/OPA dependente do número de onda e otimização

Destes dados, pode-se perceber de um modo geral que mesmo a energia tendo aumentado para todos os pontos em relação à otimização anterior, a diferença relativa das intensidades nas regiões de 3033 com a região de 3800 foi invertida, sendo que para a primeira varredura, a região do estiramento O-H tem energia superior à região C-H. Na otimização nova tem-se o inverso. Assim, comprova-se que de fato algumas regiões variam de intensidade de acordo com a as posições escolhidas e por isso é importante a correção da eficiência de fragmentação pela curva de potência do OPO/OPA

5.2.1.4 Número de médias

Outro parâmetro a ser escolhido na aquisição de um espectro IRMPD é o número de médias utilizadas na aquisição de cada ponto. Ou seja, quantos espectros de massa são adquiridos para cada ponto da varredura do espectro. Tal fator é de total importância pois tanto as intensidades dos íons podem variar devido ao processo de ionização não ser estável, quanto a eficiência de fragmentação por flutuações da fonte de laser. Quanto maior o número de médias acumuladas por ponto, menor deverá ser essa variação, contando que a fonte de íons se mantenha razoavelmente constante e que a intensidade dos íons pai e fragmentos não caia drasticamente e fique próximo à linha base. Para tal comprovação, realizou-se o espectro da fosfotirosina variando o número de médias de 3, 5,7,10,15 e 20 (Figura 33)

No entanto, percebe-se que mesmo que o ruído tenha diminuído, há uma certa variação na intensidade das bandas, principalmente se focarmos na banda de maior intensidade do espectro. Ora a banda 3555 cm⁻¹ possui a maior intensidade, ora a banda 3670 cm⁻¹ apresenta-se relativamente maior. Tais dados levam a crer que a variação da intensidade está mais sujeita a algum fator externo, necessitando assim de um número maior de médias a fim de obter-se um espectro mais reprodutível.

Na questão do ruído, notavelmente pode-se perceber que a partir de 5 médias as bandas de menor intensidade podem ainda ser razoavelmente interpretadas logo, a escolha entre 5 e um número maior de médias deverá depender do tempo disponível para cada análise.

A cada média adicionada tem-se um aumento considerável do tempo total de análise, pois cada ponto exige mais um ciclo de irradiação e detecção. Ou seja, um espectro realizado com 500 ms de irradiação, resolução 2 cm⁻¹, entre 2800 e 4000 cm⁻¹ com 3 médias leva 1,4 horas enquanto um espectro de 7 médias leva 2,9 horas e um de 20 médias levará 7,6 horas. Esse tempo não se reflete apenas no número de análises realizada por dia de trabalho, mas também no consumo de amostra e solventes.



Figura 33: Espectro IRMPD da o-fosfotirosina com diferentes números de médias acumuladas na aquisição do espectro

5.2.1.5 Resolução

Em nosso laboratório, o comprimento de onda é controlado pelo software *Motor Control* que move os cristais fazendo a varredura em comprimento de onda. O *SpectraScan* recebe do usuário o intervalo espectral a ser varrido e o número de passos em que esse intervalo será varrido, como mostrado na Figura 19.

O maior problema aqui é como dividimos o intervalo e o incremento na varredura em comprimento de onda, a resolução será dada também em comprimento de
onda que é inversamente proporcional ao número de onda. Isso implica que a resolução em número de onda não terá um valor fixo. Para exemplificar, a Figura 34 apresenta os dados de uma análise feita em resolução de 0,2nm no intervalo de 2800 a 4100 cm⁻¹. Nela podemos ver que a resolução variou de 2,98 a 3,65. A conversão de comprimento de onda para número de onda segue a Eq. 5.1.1.



Figura 34: diferença no valor da resolução no intervalo de 4100 a 2800cm⁻¹ com resolução de

0.2nm

Tabela 4: resoluçãoem comprimento de onda e em número de onda

Resolução	
nm	cm^{-1}
0,22	3,05-4,02
0.12	1,7-2,09
0,05	0,76 - 0,86
0,033	0,51 - 0,58
0,025	0,38 - 0,43

A Figura 35 apresenta os espectros retirados em quatro valores de resolução, onde os três últimos não apresentam diferença significativa na qualidade do espectro. O problema da neste caso, foi a escolha da aquisição do espectro baseado no número de pontos obtidos e o incremento entre cada ponto estar fixo na escala de comprimento de onda, tornando a variação entre as diferentes medidas um tanto bruscas. Entretanto, como a resolução do OPO é 1.7cm⁻¹, não é interessante realizar análises fora dessa escala pois resoluções maiores na aquisição de um espectro resultam em um número excessivo de pontos e assim necessitaria um melhor tratamento dos dados naquela determinada região.



Figura 35: espectros da fosfotirosina em diferentes resoluções

Uma vez que esse problema foi visualizado, a programação do SpectraScan pode ser corrigida, e assim o usuário já insere os valores em número de onda e em quantos passos e visualiza imediatamente qual a resolução necessária tornando os dados no espectro estarão igualmente espaçados na escala de número de onda.

5.2.1.6 Uso conjunto do laser de CO₂

Como foi possível visualizar nos espectros da fosfotirosina (Figura 35), a região de número de onda menor possui baixa eficiência de fragmentação. Uma primeira alterativa para aumentar a fragmentação e permitir uma maior sensibilidade na detecção de possíveis bandas é o aumento do tempo de irradiação. Porém, como já demonstrado, nem todas as bandas são favorecidas igualmente, chegando a um limite que efeitos de alargamento e deslocamentos para o azul podem ocorrer.

Também é possível realizar a otimização dos cristais do OPA para obter mais energia na faixa espectral necessária, porém nem sempre se obtém um ganho de intensidade pronunciado.

Uma solução alternativa é o acoplamento de uma segunda fonte de radiação para a realização de um experimento conhecido como espectroscopia de duas cores. Um exemplo de espectroscopia de duas cores é o UV-IRMPD. Neste caso, um fóton no ultravioleta tende a fragmentar o íon, mas quando um único fóton IR é absorvido, a diferença de energia entre o íon inicial e o íon excitado não é mais a igual à energia da transição que era acessada pelo UV, logo a fragmentação cessa.⁹¹



Figura 36: Comparação entre fragmentação por colisão, UV e IR (adaptado).^{91-93,94}

Esta abordagem se baseia no fato que a radiação do laser de CO_2 esquenta o íon até próximo ao seu limiar de dissociação através de seu intenso fluxo de fótons e alta potência (tipicamente na faixa de 5 a 50 W em 10.6 µm). Dessa forma, os fótons do OPO/OPA precisam promover uma ativação muito menor dos íons que se encontram mais próximos do limite de dissociação, como mostrado na Figura 36. De forma análoga, pode-se entender que os fótons do OPO/OPA são a "última gota d'agua" que efetiva a fragmentação. Para evitar que os fótons do CO₂, absorvidos por todos os íons presentes, esquentem os íons e promovam isomerização ou excessivo alargamento de banda, o fóton do OPO é irradiado anteriormente ao disparo do laser de CO_2 para a seleção do íon a ser ativado e então levado até o limiar de fragmentação com o CO_2 .

Para desenvolver essa técnica em nosso laboratório, realizou-se, em conjunto com a Dra. Tatiana Penna, o espectro IRMPD do dímero protonado da fosfotirosina como apenas 1 pulso do OPO, 5 pulsos do OPO e então 1 pulso do OPO alternando ao laser de CO₂, conforme os resultados apresentados na Figura 37.



Espectro IRMPD dímero Fosfotirosina

Figura 37: Espectro IRMPD do dímero protonado da fosfotirosina

Pela Figura 37, pode-se notar que o aumento do número de pulsos do OPO/OPA tem um efeito muito mais acentuado no aumento da eficiência de fragmentação das bandas acima e 3500 cm⁻¹ do que o uso do laser de CO₂, que não aumentou a eficiência em relação ao uso de apenas um pulso do OPO/OPA, aumentando apenas a linha base. Entretanto, as bandas em comprimento de onda mais baixos não foram afetados na mesma extensão. O uso do laser de CO₂ se mostrou mais relevante na região de número de onda mais baixo, onde se revelou uma banda em 2600 cm-1 que havia sido observada por Esteves *et al* em experimentos de fosfotirosina protonada solvatada com água. Essas espécies solvatadas normalmente possuem um limiar de dissociação mais baixo, permitindo a dissociação de forma mais fácil.⁸³

Em resumo, o uso da fonte da laser de CO_2 é capaz de auxiliar na realização do espectro ao permitir a detecção de bandas de baixa absortividade ou em sistema que não fragmentam facilmente quando utilizado de forma complementar à espectroscopia IRMPD convencional, uma vez que o espectro resultante possa ter um aumento significativo do ruído e da linha base.

5.2.2 Aplicações da Espectroscopia IRMPD

Como aplicação da espectrometria IRMPD, decidiu-se trabalhar com bases nitrogenadas da DNA. Diversos estudos foram feitos ou utilizando técnicas criogênicas, moléculas mensageiras ou estudos na região do *fingergprint*, porém um espectro na região de estiramento de hidrogênio de suas formas protonada nunca fora publicada. Também não publicou-se espectro de pares de bases nesta região. Como objetiva-se estudar a ligação das bases entre si e estas por sua vez são formadas através de ligações de hidrogênio, espera-se que esses sistemas possam ser muito melhor entendidas em experimentos na faixa de infravermelho médio. Assim, o estudo das bases nitrogenadas é de fato um ótimo começo para apresentar nosso aparato teóricoexperimental para a comunidade científica.

5.2.2.1 Estrutura do DNA: sítios de protonação e equilíbrios tautoméricos

Em seu artigo na *Nature* em 25 de abril de 1953, J. D. Watson e F. H. C. Crick publicaram a sua versão da estrutura do DNA como uma dupla fita torcida em torno de um eixo, assemelhando-se a uma hélice, sendo unidas por ligações de hidrogênio entre pares de bases nitrogenadas, cada um composto por uma pirimidina e uma purina (Figura 38). Este modelo divergiu do modelo proposto até então, onde a hélice era composta por três fitas, sendo que os fosfatos estariam presentes no centro e as bases estariam nas extremidades.⁹⁵

Dentre as purinas temos a Guanina e a Adenina, e entre as pirimidinas temos a Citosina e Timina, como mostrado na Figura 39.⁹⁶



Figura 38: Estrutura básica das purinas e pirimidinas

Em outro artigo do mesmo ano, Watson e Crick propõe que os pares de bases se mantêm através de duas ligações de hidrogênio.⁹⁷ No entanto, em estudos posteriores, estruturas cristalográficas dos pares das bases nitrogenadas indicaram que ocorre uma terceira ligação ente a amina da guanina (posição 3) e o grupo oxo da citosina (posição 2), tal configuração é chamada de canônica pois segue o modelo de W&C.



Figura 39: Estrutura das bases nitrogenadas do DNA

Outros trabalhos cristalográficos propõe outros arranjos entre as bases, como o modelo de Hoogsteen para o par citosina-guanina.^{93,98,99} Vale ressaltar no entanto que no modelo canônico (WC) as iminas (posição 9 para as purinas e posição 1 para pirimidinas) estão ligadas a uma pentose. Logo, na estrutura do DNA e RNA estes hidrogênios estão ausentes.



Figura 40: possíveis estruturas para o par de bases C-G (adaptado).⁹⁸

Baseado nas estruturas da Figura 40, pode-se esperar que haja vários possíveis sítios de protonação e tautômeros e que apenas uma configuração específica é necessária para que cada arranjo, como a dupla hélice, possa se formar, dado que a posição da protonação irá alterar a estabilidade e tornar mais de um arranjo é possível.

Essa complexidade foi ainda prevista por W&C e ainda pode ser considerada como uma fonte de possíveis mutações espontâneas.^{93,95,97} Tais mutações, vindas do tautomerismo, já foram caracterizadas e resultam no pareamento incorreto das bases, onde uma guanina na forma enólica pode então ligar-se a uma timina, e dependendo de onde essa troca pode ocorrer, uma sequência de bases GAG (que especifica o aminoácido glutamato) se apresente em um códon CTT que expressará a leucina, o que resulta em proteínas que podem ter funções diferentes no organismo, podendo causar doenças ou modificações na célula.

Existem, entretanto, mecanismos de reparação de DNA que detectam algumas dessas mutações, porém estes mecanismos não são perfeitos. Caso esta mutação não

cause a morte celular, esta pode vir a dividir es suas cópias apresentarão a mesma mutação, bem como as cópias das cópias também, sendo possível a acumulação de mutações ao longo dos anos. Caso as mutações ocorram em células reprodutivas há uma possibilidade maior de que estas mutações passem aos descentendes do indivíduo.

Dos casos mais famosos de mutações e acúmulos de mutações em células somáticas encontram-se os casos de câncer, que ocorrem quando uma célula perde o controle sobre seu mecanismo de apoptose juntamente com seu disfarce perante o sistema imune, resultando no crescimento descontrolado de tecido defeituoso que pode danificar um órgão específico e vir a invadir tecidos vizinhos.

O estudo do pareamento de bases em também é importante pois, além de fornecer informações sobre o possível comportamento de substâncias análogas, eles dão indícios de como ocorre o reconhecimento molecular e também é essencial para o desenvolvimento de novos fármacos.¹⁰⁰ Ademais, há estudos que sugerem que o pareamento de Hoogsteen pode ocorrer juntamente com o de WC, formando uma terceira fita de DNA na forma C-G-C e T-A-T que são relativamente estáveis e também tendem a ser dependentes de sequencias específicas de DNA, possibilitando a supressão de trechos via formação desta tripla hélice.¹⁰⁰

No ramo da química dura, o tautomerismo tem sido bastante estudado em fase condensada por métodos principalmente espectroscópicos, como a espectroscopia no infravermelho e ressonância magnética nuclear. Estudos utilizando a espectrometria de massas começaram nos meados dos anos 60 mas ganharam mais peso no fim dos anos 90 com importantes estudos de tautomerismo e reatividade em fase gasosa.¹⁰¹

Entretanto, mesmo que para as bases nitrogenadas os principais produtos de fragmentação por CID sejam estruturalmente diferentes,¹⁰¹ eles apresentam a mesma massa não permitindo a diferenciação somente pelo espectro de massas, sendo

necessário métodos de MS³ ou superior. Há também estudos de fragmentação que se baseiam na diferenciação de tautômeros pela intensidade relativa de sinal dos fragmentos, pois espécies diferentes possuirão energias de fragmentação diferentes, resultando no aumento ou diminuição do sinal dos íons formados.^{101,102}

Logo, a espectroscopia IRMPD pode auxiliar nesse tipo de estudo, pois fornece o espectro vibracional seletivo do íon isolado no interior do espectrômetro que é dependente das interações e da conformação dos isômeros.

Segundo Alergretri e colaboradores, o processo de ionização por eletrospray não deve ter efeito significativo no equilíbrio tautomérico.¹⁰¹ Logo, as espécies em fase gasosa devem ser as mesmas que existiam em solução, sendo que os fragmentos nas formas enólicas (menos estáveis em solução) eram tidas como muito baixas e até inexistentes.^{95,101}

Porém, as espécies de menor energia em solução não necessariamente são as de menor energia em fase gasosa, como é o caso da espécie enólica em relação à imínica para a Uracila e Timina, por exemplo. No entanto há artigos sugerindo transferência de próton no processo de ionização, contrariando Allegretti e assim há a possibilidade da modificação da estrutura.¹⁰¹ O principal desafio desta técnica, então, reside na possibilidade de existência de um ou mais populações de tautômeros, como bem apresentado por Maître e colaboradores, que realizaram estudos termodinâmicos e de mobilidade iônica mostrando uma possível interconversão dessas espécies.^{8,103,104}

Diversas pesquisas e estudos já foram realizadas para a investigação do equilíbrio tautoméricos das bases nitrogenadas, bem como em suas espécies protonadas.^{67,72,76,79–89} A maioria destes estudos foram feitos vibracionalmente com a espécie neutra em matriz de argônio ou neônio. Estudos em fase gasosa via IRMPD também foram amplamente feitos, porém apenas em espécies coordenadas à cátions

116

metálicos e/ou ligantes de maior massa molecular acoplados às bases. Por exemplo, o artigo de Hamlow *et al.* que ligaram as bases à desoxirribose, o próprio açúcar presente no DNA, e assim a fragmentação pode ser facilitada. Tais recursos foram utilizados devido a dificuldades técnicas, pois devido a alta aromaticidade das bases nitrogenadas a fotofragmentação se mostrava inviável, até então.

Dessa forma, propusemo-nos a realizar os espectros IRMPD das bases nitrogenadas protonadas isoladas e, também, dos pares de bases (A-T e C-G) para investigar se nosso equipamento é capaz produzir dados relevantes para o entendimento desses sistemas.

Os espectros foram realizados com soluções na ordem de 0.01 mM acidificadas com 0.1% de ácido fórmico por injeção direta a fluxo de 0,1 μ L/min, potencial de ionização de 4000/500V e 20 psi de gás de nebulização (N₂). Não foi utilizado gás de secagem. Para o par de bases, o fluxo de injeção foi alterado para 7 μ L/min.

Os espectros IRMPD foram realizados com aquisição de 5 médias e resolução de 2 cm⁻¹. Cada sistema foi testado com vários tempos de irradiação para escolher o espectro com melhor definição. Os íons escolhidos para o cálculo de eficiência de fragmentação foram os mesmos apresentados nos espectros de massa de cada sistema.

Os cálculos teóricos foram realizados com o software Gaussian09 com o nível de teoria B3LYP/6-311+G(d,p) cujas frequências foram escaladas com base no melhor ajuste entre os tautômeros e os dados experimentais.

Este ajuste foi feito da seguinte forma: A primeira derivada do espectro experimental foi feita e com base nela os pontos de inflexão foram escolhidos, em seguida o espectro experimental foi deconvoluído a fim de verificar se tais pontos de inflexão realmente faziam algum sentido real ou se era provenientes de ruídos.

As bandas assim encontradas foram comparadas com os dados calculados e o melhor fator de escala foi obtido de forma iterativa através da minimização do desvio médio quadrático utilizando-se a ferramenta *solver* do Microsoft Excel. O fator de correção foi iterativamente modificado até que a condição de menor soma dos quadrados fosse obtida. Esse mesmo procedimento foi realizado para todos os tautômeros. O tautômero que apresentou o menor desvio médio quadrático pode ser entendido como o tautômero cujo espectro teórico mais se assemelhava ao experimental.

Este método, no entanto, é de difícil utilização caso existam bandas muito largas que sejam compostas por mais de um oscilador que não permitam suas diferenciações.

Esta forma para julgar qual é o espectro teórico que mais se assemelha ao experimental foi desenvolvido pois os métodos presentes até então na literatura em relação a espectros IRMPD são somente visuais, onde o leitor precisa comparar visualmente e aceitar que um espectro teórico se aproxima mais ao experimental do que outros cálculos. Logo, se o autor mostra apenas cálculos que diferem grosseiramente ao experimental e houver ao menos um cálculo cujo o formato e posições das bandas se assemelham, esse é considerado então como sendo a espécie presente em fase gasosa.

5.2.2.1.1 Espectros de Massas

Os espectros de massas das pirimidinas citosina e timina (Figura 41 e Figura 42 respectivamente) apresentaram fragmentações indicando perda de amônia (-17 Da), perda de água (-18 Da) e perda de ácido isociânico (-43 Da). O mecanismo de fragmentação foi bem descrito por Daniel *et al*, que revisitou todos os mecanismos de fragmentação da Uracila. Este estudo, inclusive, conseguiu fazer a diferenciação entre produtos de diversos tautômeros, e como as pirimidinas em si são muito parecidos em

estrutura, acredita-se que sofram os mesmos mecanismos de fragmentação conforme apresentado na Figura 43.¹⁰²



Figura 41: fotofragmentação CitosinaH⁺ por 1000ms de irradiação ou 10 pulsos





Figura 43: mecanismo de fragmentação por CID da uracila protonada em diferentes formas tautoméricas.¹⁰²

Para as purinas, os mecanismos de fragmentação são mais complexos. Gregson, entretanto, relatou a dissociação induzida por colisão CID da guanina com isótopos marcados no oxigênio e nos nitrogênios 1,3 e 10, provando que a perda de amônia pode ocorrer tanto pela saída dos nitrogênios 1 e 10.⁹⁰ No espectro podemos ver íons relativos a perda de amônia (m/z 135), perda de cianamida (NH₂CN, m/z 110), cujo mecanismo consta na Figura 44. O único problema com esse caminho de fragmentação é que, mesmo ele não indicando o sítio de protonação, acaba sugerindo a protonação no N³ baseado da estrutura prévia à dissociação, dado que o tautômero sugerido como o mais estável pela literatura tem a protonação no N^{9.105} Ao comparar o estudo de Gregson com a fotofragmentação (Figura 45), entretanto, alguns íons diferentes são observados. A principal diferença é a presença do íon de m/z 128, que resulta numa diferença de 24 Da cuja atribuição ainda não foi esclarecida.



Figura 44: atribuição dos íons encontrados na fragmentação da guanina protonada (adaptado).¹¹⁰



Figura 45: fotofragmentação Guanina+H⁺ por 2020ms de irradiação

Cheong *et. al.* apresentaram o estudo de fotofragmentação da adenina no UV e atribuiram o íon e m/z 136 à adenina protonada. Esse íons apresentou perda de amônia (m/z 119), HCN (m/z 109), NH₂CN (m/z 94) e duas perdas de HCN (m/z 82).¹¹¹ Porém em nosso experimento de fotofragmentação por IR, apresentado na Figura 46, houve a

observação do íon de m/z 112, resultando numa diferença de 24 Da assim como observado para a Guanina. A identidade desse íon permanece desconhecida dado que as únicas possibilidades para a sua formação seriam a perda de C_2 ou CH_{12} a partir do íon de m/z 136, ou uma perda de 7 Da a partir do íon 119, o que não soa quimicamente plausível. A atribuição e possível rota de fragmentação se encontra na Figura 47.



Figura 46: Espectro de massas da fotofragmentação da [Adenina+H]⁺



Figura 47: atribuição proposta dos íons encontrados na fragmentação da adenina protonada

Sendo assim, tanto para a citosina quanto para a guanina, há um segundo fragmento diferindo 24 Da do íon protonado e diferindo em 7 Da do primeiro fragmento

que não foi identificado. A realização de espectros IRMPD desses fragmentos não foi possível pois eles fragmentam fora da região de detecção do equipamento (>100 Th).

5.2.2.1.2 Espectros IRMPD

As bases nitrogenadas do DNA apresentam diversas formas tautoméricas, todas elas já estudadas através de outras técnicas, mas nunca da forma realizada neste trabalho. Assim, será apresentado o espectro vibracional IRMPD da espécie protonada em fase gasosa comparada aos cálculos dos tautômeros menor energia e que estão de acordo com a literatura.

Para a Guanina, Colominas, et al declaram que a espécie protonada nas posições 7 e 9 é a mais estável em fase gasosa e é aquela com maior população não excluindo a possível presença de outros tautômeros.¹⁰⁰ No nosso espectro apresentado na Figura 48, há um aglomerado de bandas na parte central (3450 cm⁻¹) e uma banda de baixa intensidade em 3650 cm⁻¹. Todos essas bandas representam estiramentos NH com exceção do estiramento mais afastado, que representam os estiramento NH₂ e OH. A banda em 3050 é um artefato, como evidenciado na curva de potência. Nosso espectro, portanto, está congruente com a literatura, onde o espectro experimental mais se assemelha à estrutura 7,9 (Figura 48).



Figura 48: comparação dos espectros teóricos com experimental (identificado as estruturas por

pontos de protonação).

Espectro IRMPD Citosina[H]*



Figura 49: Espectro IRMPD da CitosinaH+

Para a citosina protonada, especificamente, a grande diferença é a presença de duas bandas claramente visíveis na faixa de 3550 cm^{-1} o que indica a presença não somente do estiramento N¹H mas também o OH, que é encontrado apenas no tautômero da forma enólica, corroborando com a literatura.¹¹²

Para a adenina protonada existe uma banda na região de 3400-3450 cm⁻¹, porém como mostrado nas linhas tracejadas na Figura 50, há certos ombros que podem ser atribuídos à bandas como a presente em 3520 cm⁻¹. Neste caso, a estrutura calculada que mais se assemelha ao experimental é o tautômero 7,9 que é superior em energia em 26,3kJ.mol⁻¹.



Figura 50: espectro IRMPD da AdeninaH⁺

Para a Timina (Figura 51), a semelhança entre os dois possíveis tautômeros de menor energia impede a diferenciação das espécies através do espectro IRMPD, sendo necessária talvez uma análise se espectroscopia criogênica para atingir maior resolução e poder verificar se há de fato três bandas em 3550 cm⁻¹. Porém como esta análise foi realizada em diferentes tempos de irradiação, acredita-se que tais bandas estejam de fato presentes e não sejam artefatos aleatórios. Estudos de mobilidade iônica ou espectroscopia de duas cores também poderiam resolver essa questão, por exemplo, ao uma um feixe fixado em 3550 cm⁻¹ para extinguir a população de tautômeros e então realizar a espectroscopia. O mesmo poderia ser feito em 3575 cm⁻¹. Caso os espectros

sofressem mudanças, seria comprovado então a existência de mais de um tautômero coexistindo em fase gasosa.



Espectro IRMPD Timina[H]⁺

Figura 51: espectro IRMPD da Timina+H⁺

5.2.2.1.3 Investigação de equilíbrio conformacional em pares de Bases nitrogenadas complementares

Como mostrado na Figura 40, os pares de bases Citosina (C) e Guanina (G) podem se agregar de três formas e como sugerido por Cruz-Ortiz et al, há uma certa dependência do pH para a formação preferencial de determinadas estruturas comprovando ainda a coexistência de duas populações de isômeros em fase gasosa através de mobilidade iônica DIMS.⁹⁸ Uma outra possibilidade é o espectro de fragmentação do par [G-C+H]⁺, que apresenta tanto as espécies [G+H]⁺ quanto [C+H]⁺, sendo que a intensidade da [G+H]⁺ esteve ou superior (em pH 5.8) ou levemente equivalente à intensidade do íon [C+H]⁺ (em pH 3.2), indicando mais uma vez que os

pares Hoo tendem a se formar em meio mais ácido. Entretanto, em nossos experimentos, conforme apresentado na Figura 52, espécie protonada formada após fragmentação em maior intensidade é citosina, sendo que o pH da solução se apresentou próximo a 5.



Figura 52: fotofragmentação do par citosina e guanina

O mesmo não ocorre para o par [A-T+H]⁺, que quando fragmentado apresenta apenas a espécie [A+H]⁺ (Figura 53), o que é coerente com a estrutura proposta para o agregado, onde a espécie protonada é sempre a adenina.



Figura 53: fragmentação do par adenina e timina

Os espectros IRMPD dos pares de bases se encontram nas Figura 54 para o par [C-G+H]⁺ e Figura 55 para o par [A-T+H]⁺. Nestes espectros podemos perceber que há um enorme alargamento das bandas. Tal fato pode ser explicado devido não somente ao tamanho do sistema, mas também a grande anarmonicidade uma vez que há interação através de ligação de hidrogênio entre os sistemas. No entanto, a posição das bandas (ou do agregado de bandas) pode ser visualmente atribuído como demonstrado pelas linhas pontilhadas.

Nosenko *et al*, comenta que para sistemas grandes, anarmônicos e que apresentam interações intramoleculares (ou intermoleculares neste caso) tendem a sofrer deslocamento para o vermelho bem como o alargamento de bandas devido à grande capacidade calorífica destes osciladores que tendem a acoplar suas vibrações e, para que esses obstáculos sejam considerados no cálculo computacional, é necessário realizar estudos com multiexcitação, pois afinal a fragmentação ocorre por processos multifotônicos.⁹³





Para o sistema citosina e guanina, os resultados se assemelham parcialmente aos propostos por Cruz-Ortiz et al. Segundo as intensidades relativas dos fragmentos, deveríamos ter encontrado uma maior predominância dos isômeros Hoogstein. Porem, pelo espectro IRMPD, nota-se uma predominância do modelo W&C. Ainda, o pH da solução deveria indicar uma maior predominância da espécie $[G+H]^+$ nos espectros de fragmentação, o que não foi observado.



Figura 55: espectro IRMPD do agregado TA(H+) obtido com 5 pulsos (ou 500ms de irradiação)

Sobre a atribuição dos confôrmeros, para o sistema [A-T+H]⁺, mesmo com o alargamento das bandas, é possível notar uma semelhança com os cálculos teóricos porém não é possível fazer distinção entre os dois modelos propostos, haja visto que eles diferem apenas no tautomerismo da adenina, e justamente por isso que não identificamos a espécie timina protonada no espectro de massas após fragmentação.

Conclusão

6 Considerações finais

A espectroscopia IRMPD, como mencionado inúmeras vezes ao longo deste texto, pode ser uma ferramenta muito útil em diversas áreas da ciência que necessitam caracterização estrutural, diferenciação de isômeros ou mesmo na busca conformacional. Entretanto, por não haver equipamentos comerciais para realização desse tipo de experimentos, há uma série de fatores que ainda necessitam ser estudados, tanto na questão de instrumentação, quanto de software, assim como na otimização de parâmetros para realização dos experimentos.

Esta dissertação tratou não somente na descrição da instrumentação, mas também nos parâmetros para realização e otimização de espectros IRMPD referentes a este instrumento específico, como número de médias acumuladas, tempo de irradiação, resolução. Realizou-se, além de estudos de validação do sistema, um estudo de caso sobre sítio de protonação e equilíbrio tautomérico das bases nitrogenadas do DNA bem como na caracterização em fase gasosa do par conjugado de bases.

Dentre os desafios instrumentais encontrados nesse desenvolvimento encontram-se a necessidade de modificação do seletor de massas e da câmara de vácuo que teve de ser conduzida junto à fabricante.

Em seguida, a etapa de acoplamento e alinhamento das fontes de radiação ao espectrômetro foi conduzida. Após o alinhamento físico das fontes de radiação, é necessário o desenvolvimento e adaptação de software capaz de promover a integração entre a aquisição dos dados e o controle realizado pelo software nativo do espectrômetro de massa com as fontes de radiação.

O tempo de irradiação se mostrou um dos principais fatores a ser otimizado, pois, juntamente como o número de médias acumuladas e resolução, influencia diretamente no tempo em que uma análise de espectroscopia IRMPD necessita para ser feita.

Desta maneira, cada análise precisa ser pensada de forma individual e empírica. Ou seja, como cada sistema apresentará intensidades diferentes de fragmentação, diversas análises variando-se o tempo de irradiação deveram ser feitas a fim de ou otimizar regiões com baixa definição ou mesmo para verificar a existência de bandas com intensidade muito inferiores às principais bandas do espectro. Caso um aumento do tempo não seja possível, o uso de fontes secundárias de radiação deve ser considerado de forma complementar.

Sobre a otimização do OPO/OPA, que também tem como objetivo aumentar a intensidade de fragmentação para regiões específicas do espectro, percebesse que esse procedimento mostrou-se útil mas também irá depender de qual região deseja-se estudar mais aprofundadamente, pois o ganho em potência varia para cada caso e pode não ser satisfatório.

Mostrou-se, também, que número de médias acumuladas no espectro de massa é de total importância a fim de obter-se maior reprodutibilidade do espectro, principalmente para espécies de matriz complexa e/ou que apresentam múltiplos fragmentos. Da mesma forma que os outros parâmetros, dependerá de cada sistema, do tempo disponível e também nível de precisão requerida para cada analise.

Este equipamento se mostrou capaz de realizar espectroscopia IRMPD das bases nitrogenadas do DNA protonadas, o que até então havia se mostrado uma dificuldade por outros grupos de pesquisa da área. Tais sistemas haviam sido estudados apenas com moléculas derivadas das bases nitrogenadas, como seus respectivos ácidos nucleicos e/ou glicosídeos, o que torna o espectro vibracional mais poluído uma vez que há muito mais osciladores envolvidos. Ainda sobre o estudo das bases, as dificuldades encontradas foram a respeito da escolha de uma metodologia para cálculos teóricos, escolha de um fator de correção, e por fim, a atribuição do espectro experimental aos candidatos calculados estaticamente, principalmente em casos onde os isômeros possuem estrutura muito próxima ou quando o espectro experimental apresenta bandas muito largas, dificultando a separação e deconvolução das bandas, para tal, o uso da ferramenta solver foi de grande ajuda mas ainda requer maior estudo e também verificação com outros sistemas.

Em suma, esta dissertação trouxe os fundamentos das quatro grandes áreas envolvidas na formação da espectroscopia IRMPD, que são a espectrometria de massas, espectroscopia vibracional, química teórica e instrumentação, ilustrando a utilidade da técnica com um exemplo relevante. Espera-se, então, que este texto sirva de base para os próximos alunos do grupo e demais usuários que necessitem de formação nessa área de pesquisa iniciada em nosso país, ou que vieram a realizar experimentos na instrumentação desenvolvida.

7 Referências

- 1. Di Giacomo, F. A Short Account of RRKM Theory of Unimolecular Reactions and of Marcus Theory of Electron Transfer in a Historical Perspective. *J. Chem. Educ.* **92**, 476–481 (2015).
- 2. Palafox, M. A. Computational chemistry applied to vibrational spectroscopy: A tool for characterization of nucleic acid bases and some of their 5-substituted derivatives. *Phys. Sci. Rev.* **2**, (2017).
- 3. Rogalewicz, F., Hoppilliard, Y. & Ohanessian, G. Fragmentation mechanisms of α-amino acids protonated under electrospray ionization: A collisional activation and ab initio theoretical study. *Int. J. Mass Spectrom.* **195–196**, 565–590 (2000).
- 4. Dunbar, R. C., Moore, D. T. & Oomens, J. IR-Spectroscopic Characterization of Acetophenone Complexes with Fe+, Co+, and Ni+ Using Free-Electron-Laser IRMPD. *J. Phys. Chem. A* **110**, 8316–8326 (2006).
- 5. Akinyemi, T. E. *et al.* Influence of Transition Metal Cationization versus Sodium Cationization and Protonation on the Gas-Phase Tautomeric Conformations and Stability of Uracil: Application to [Ura+Cu]+ and [Ura+Ag]+. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **28**, 2438–2453 (2017).
- 6. Polfer, N. C. *et al.* IRMPD spectroscopy of metal-ion/tryptophan complexes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **8**, 2744 (2006).
- 7. Polfer, N. C. Infrared multiple photon dissociation spectroscopy of trapped ions. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 2211 (2011).
- 8. Bakker, J. M., Salpin, J.-Y. & Maître, P. Tautomerism of cytosine probed by gas phase IR spectroscopy. *Int. J. Mass Spectrom.* **283**, 214–221 (2009).
- 9. Chiavarino, B., Crestoni, M. E., Fornarini, S., Scuderi, D. & Salpin, J.-Y. Interaction of Cisplatin with Adenine and Guanine: A Combined IRMPD, MS/MS, and Theoretical Study. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 1445–1455 (2013).
- Reynisson, J. & Steenken, S. DFT calculations on the electrophilic reaction with water of the guanine and adenine radical cations. A model for the situation in DNAElectronic Supplementary Information available. See http://www.rsc.org/suppdata/cp/b1/b109204a/. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 4, 527– 532 (2002).
- 11. Dass, C. Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry. Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry (2006). doi:10.1002/9780470118498
- 12. Correra, T. C. & Riveros, J. M. Sequential Methyl-Fluorine Exchange Reactions of Siloxide Ions in the Gas Phase. *Angew. Chemie Int. Ed.* **51**, 8632–8635 (2012).
- Eller, K. & Schwarz, H. Organometallic chemistry in the gas phase. *Chem. Rev.* 91, 1121–1177 (1991).
- 14. Polfer, N. C. & Dugourd, P. Laser Photodissociation and Spectroscopy of Mass-

separated Biomolecular Ions. (Springer). doi:10.1007/978-3-319-01252-0

- 15. Riveros, J. M. & Shih, S. ESR Spectra of ·CH3 and ·CD3 in Aqueous Solution. *Chem. Phys.* **3132**, 1968–1970 (1969).
- 16. Stevens, S. M. *et al.* Blackbody infrared radiative dissociation of partially solvated mixed ligand Ru(II) complex ions. *J. Phys. Chem. A* **108**, 9892–9900 (2004).
- Hamlin, T. A., Swart, M. & Bickelhaupt, F. M. Nucleophilic Substitution (Sn2): Dependence on Nucleophile, Leaving Group, Central Atom, Substituents, and Solvent. *ChemPhysChem* 19, 1315–1330 (2018).
- 18. Washburn, H. W., Wiley, H. F., Rock, S. M. & Berry, C. E. Mass Spectrometry. *Ind. Eng. Chem. Anal* **17**, 74–81 (1945).
- 19. Organisation for Economic Co-operation and Development. & Nuclear Energy Agency. *Nuclear Energy Today*. (OECD Publishing, 2003).
- 20. Günther, A. *et al.* BerlinTrap: A new cryogenic 22-pole ion trap spectrometer. *J. Mol. Spectrosc.* **332**, 8–15 (2017).
- 21. Di Stefano, L. H., Papanastasiou, D. & Zubarev, R. A. Size-Dependent Hydrogen Atom Attachment to Gas-Phase Hydrogen-Deficient Polypeptide Radical Cations. J. Am. Chem. Soc. 140, 531–533 (2018).
- 22. Dimitris PapanastasiouEmmanuel Raptakis. Segmented linear ion trap for enhanced ion activation and storage. 22 (2016).
- 23. A. H. P.;Glish, G. L. Thermally Assisted Infrared Multiphoton Photodissociation in a Quadrupole Ion Trap. (2001). doi:10.1021/AC010245+
- 24. Hashimoto, Y., Hasegawa, H., Yoshinari, K. & Waki, I. Collision-activated infrared multiphoton dissociation in a quadrupole ion trap mass spectrometer. *Anal. Chem.* **75**, 420–425 (2003).
- 25. Kaiser, R. E., Louris, J. N., Amy, J. W., Cooks, R. G. & Hunt, D. F. Extending the mass range of the quadrupole ion trap using axial modulation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **3**, 225–229 (1989).
- 26. March, R. E. An Introduction to Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. J. Mass Spectrom. **32**, 351–369 (1997).
- 27. Jonscher, K. R. & Yates, J. R. The Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometer—A Small Solution to a Big Challenge. *Anal. Biochem.* **244**, 1–15 (1997).
- 28. de Hoffman, E. & Stroobant, V. *Mass Spectrometry*. (2007). doi:10.1039/9781847551306
- 29. Mass Spectrometry Data Center, NIST. Available at: https://chemdata.nist.gov/. (Accessed: 13th March 2019)

- 30. Clegg, G. A. & Dole, M. Molecular beams of macroions. III. Zein and polyvinylpyrrolidone. *Biopolymers* **10**, 821–826 (1971).
- Little, D. P., Speir, J. P., Senko, M. W., O 'connor, P. B. & Mclafferty ', F. W. Infrared Multiphoton Dissociation of Large Multiply Charged Ions for Biomolecule Sequencing. *Anal. Chem* 66, 2809–2815 (1994).
- 32. Schindler, T., Berg, C., Niedner-Schatteburg, G. & Bondybey, V. E. Protonated water clusters and their black body radiation induced fragmentation. *Chem. Phys. Lett.* **250**, 301–308 (1996).
- 33. Payne, A. H. & Glish, G. L. Thermally Assisted Infrared Multiphoton Photodissociation in a Quadrupole Ion Trap. doi:10.1021/ac010245+
- 34. Newsome, G. A. & Glish, G. L. Improving IRMPD in a quadrupole ion trap. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 20, 1127–1131 (2009).
- 35. De Broglie, L. La Physique Nouvelle Et Les Quanta. (Ernest Flammarion, 1937).
- 36. Peixoto, E. M. A. *Teoria Quântica*. (Universidade de São Paulo, 1988).
- 37. Whittaker, E. T. A history of the theories of aether and electricity : from the age of Descartes to the close of the nineteenth century : Whittaker, E. T. (Edmund Taylor), 1873-1956 : Free Download, Borrow, and Streaming : Internet Archive. (Dublin University press, 1910).
- 38. Webb, S. *Measuring the universe : the cosmological distance ladder*. (Springer, 1999).
- 39. Singh, S. 中國宇宙開闢神話裏混沌和大霹靂(Big Bang) 類似性. p 23, 153–183 (2012).
- 40. Janssen, M. & Stachel, J. The Optics and Electrodynamics of Moving Bodies. (2004).
- 41. Clerk, J. & Maxwell. A Dynamical Theory of the Electromagnetic Field. *Phil. Trans* 459–512 (1865).
- 42. Schlamminger, S. *et al.* Determination of the Planck constant using a watt balance with a superconducting magnet system at the National Institute of Standards and Technology. *Metrologia* **51**, S15–S24 (2014).
- 43. Einstein, A. Concerning an Heuristic Point of View Toward the Emission and Transformation of Light. *English Am. J. Phys.* **17**, (1905).
- 44. Kragh, H. *Dirac : a scientific biography*. (Cambridge University Press, 1990).
- 45. Hollas, J. M. Modern spectroscopy. (Wiley, 2004).
- 46. MAnikandaN, P. Intramolecular Vibrational Energy Redistribution: Connecting the Quantum State Space and Classical Phase Space Perspectives for Polyatomic Molecules. (Indian Institute of Technology Kanpur, 209AD).

- Nesbitt, D. J. & Field, R. W. Vibrational Energy Flow in Highly Excited Molecules: Role of Intramolecular Vibrational Redistribution. *J. Phys. Chem.* 100, 12735–12756 (1996).
- 48. Garand, E. *et al.* Characterization of an activated iridium water splitting catalyst using infrared photodissociation of H2 tagged ions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**, 10109–10113 (2012).
- 49. Scuderi, D. *et al.* Structural Characterization by IRMPD Spectroscopy and DFT Calculations of Deprotonated Phosphorylated Amino Acids in the Gas Phase. *ChemPhysChem* **10**, 1630–1641 (2009).
- 50. Liu, X. *et al.* Tracking Intramolecular Vibrational Redistribution in Polyatomic Small-Molecule Liquids by Ultrafast Time–Frequency-Resolved CARS. *J. Phys. Chem.* A **121**, 4948–4952 (2017).
- 51. Fung, Y. M. E., Kjeldsen, F., Silivra, O. A., Chan, T. W. D. & Zubarev, R. A. Facile Disulfide Bond Cleavage in Gaseous Peptide and Protein Cations by Ultraviolet Photodissociation at 157 nm. *Angew. Chemie Int. Ed.* **44**, 6399–6403 (2005).
- 52. Pereverzev, A. Y. *et al.* Vibrational Signatures of Conformer-Specific Intramolecular Interactions in Protonated Tryptophan. *J. Phys. Chem. A* **120**, 5598–5608 (2016).
- 53. Cismesia, A. P., Bailey, L. S., Bell, M. R., Tesler, L. F. & Polfer, N. C. Making Mass Spectrometry See the Light: The Promises and Challenges of Cryogenic Infrared Ion Spectroscopy as a Bioanalytical Technique. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 27, (2016).
- 54. Martens, J., Berden, G., Gebhardt, C. R. & Oomens, J. Infrared ion spectroscopy in a modified quadrupole ion trap mass spectrometer at the FELIX free electron laser laboratory. *Rev. Sci. Instrum.* **87**, 103181–8 (2016).
- 55. Lagutschenkov, A., Langer, J., Berden, G., Oomens, J. & Dopfer, O. Infrared spectra of protonated neurotransmitters: dopamine. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13, 2815–2823 (2011).
- 56. Armstead, R. L. A free electron laser weapon for sea archer. (Naval Postgraduate School Monterey, 2001).
- 57. Mucha, E. *et al.* Unravelling the structure of glycosyl cations via cold-ion infrared spectroscopy. *Nat. Commun.* **9**, 4174 (2018).
- 58. Uno, K. Longitudinally Excited CO2 Laser. *Intech open* **2**, 64 (2018).
- 59. Svelto, O. Principles of Lasers. (Springer, 2010). doi:0.1007/978-1-4419-1302-9
- 60. Südmeyer, T. *et al.* Novel ultrafast parametric systems: high repetition rate single-pass OPG and fibre-feedback OPO. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **34**, 2433–2439 (2001).
- 61. Piskarskas, A., Smil'gyavichyus, V. & Umbrasas, A. Continuous parametric generation of picosecond light pulses. *Sov. J. Quantum Electron.* **18**, 155–156 (1988).
- 62. Rustad, G., Arisholm, G. & Farsund, Ø. Parametric oscillators and amplifiers; (190.2620) Frequency conversion; (190.4410) Nonlinear optics. (2011).
- 63. Alcamí, M., Mó, O. & Váñez, M. Computational chemistry: A useful (sometimes mandatory) tool in mass spectrometry studies. *Mass Spectrom. Rev.* **20**, 195–245 (2001).
- 64. Sukker, G. M., Wazzan, N., Ahmed, A. & Hilal, R. Conformation and electronic structure of Carbidopa. A QM/MD study. *J. Theor. Comput. Chem.* **15**, 1–22 (2016).
- 65. Dega-Szafran, Z., Komasa, A., Olejniczak, A., Katrusiak, A. & Szafran, M. Spectroscopic and theoretical studies of the H-bonded complex of quinuclidine with 2,6-dichloro-4-nitrophenol. *Vib. Spectrosc.* **93**, 29–35 (2017).
- 66. Dega-Szafran, Z., Roszak, K., Katrusiak, A., Komasa, A. & Szafran, M. Threecomponent complex of piperidine-ethanol, p- hydroxybenzoic acid and water studied by X-ray, Raman, FTIR and DFT. *Vib. Spectrosc.* **92**, 194–199 (2017).
- 67. Oomens, J., Sartakov, B. G., Meijer, G. & von Helden, G. Gas-phase infrared multiple photon dissociation spectroscopy of mass-selected molecular ions. *Int. J. Mass Spectrom.* **254**, 1–19 (2006).
- 68. Baric, D. *et al.* Basicity of exceedingly strong non-ionic organic bases in acetonitrile —Verkade's superbase and some related phosphazenes. 284–288 (2004).
- 69. Zhao, Y. & Truhlar, D. G. Density Functional for Spectroscopy: No Long-Range Self-Interaction Error, Good Performance for Rydberg and Charge-Transfer States, and Better Performance on Average than B3LYP for Ground States. *J. Phys. Chem. A* **110**, 13126–13130 (2006).
- Zhao, Y. & Truhlar, D. G. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theor. Chem. Acc.* 120, 215–241 (2008).
- 71. Rodrigues-Oliveira, A., Moreira, F., Cervi, G. & Correra, T. C. Evaluation of Common Theoretical Methods for Predicting IRMPD Vibrational Spectra of Anharmonic Oscillators. (2018).
- 72. Rodrigues-Oliveira, F., M Ribeiro, F. W., Cervi, G. & Correra, T. C. Evaluation of Common Theoretical Methods for Predicting Infrared Multiphotonic Dissociation Vibrational Spectra of Intramolecular Hydrogen-Bonded Ions. *ACS Omega* **3**, 31 (2018).
- 73. Thorlabs, Inc. Seu fornecedor de Fibras Ópticas, Diodos Laser, Instrumentação

Óptica e Controle e Medida de Polarização. Available at: https://www.thorlabs.com/index.cfm. (Accessed: 20th August 2018)

- 74. Scuderi, D. *et al.* Structure of singly hydrated, protonated phospho-tyrosine. *Int. J. Mass Spectrom.* **308**, 338–347 (2011).
- Mino, W. K., Gulyuz, K., Wang, D., Stedwell, C. N. & Polfer, N. C. Gas-Phase Structure and Dissociation Chemistry of Protonated Tryptophan Elucidated by Infrared Multiple-Photon Dissociation Spectroscopy. *J. Phys. Chem. Lett.* 2, 299– 304 (2011).
- 76. Martens, J., Grzetic, J., Berden, G. & Oomens, J. Structural identification of electron transfer dissociation products in mass spectrometry using infrared ion spectroscopy. (2016). doi:10.1038/ncomms11754
- El Aribi, H., Orlova, G., Hopkinson, A. C. & Siu, K. W. M. Gas-phase fragmentation reactions of protonated aromatic amino acids: Concomitant and consecutive neutral eliminations and radical cation formations. *J. Phys. Chem. A* 108, 3844–3853 (2004).
- Lioe, H., O'Hair, R. a J. & Reid, G. E. Gas phase ion Chem. biomolecules. Part 37 - Gas-phase reactions of protonated tryptophan. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 15, 65–76 (2004).
- 79. Piatkivskyi, A. *et al.* Structure and reactivity of the distonic and aromatic radical cations of tryptophan. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **24**, 513–523 (2013).
- 80. Lepère, V. *et al.* Characterization of neutral fragments issued from the photodissociation of protonated tryptophane. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **9**, 5330–5334 (2007).
- Rodrigues-Oliveira, A. F., Ribeiro, F. W. M., Cervi, G. & Correra, T. C. Evaluation of Common Theoretical Methods for Predicting Infrared Multiphotonic Dissociation Vibrational Spectra of Intramolecular Hydrogen-Bonded Ions. ACS Omega 3, (2018).
- 82. Wartewig, S., John Wiley & Sons. & Wiley InterScience (Online service). *IR and Raman spectroscopy : fundamental processing*. (Wiley-VCH, 2003).
- 83. Esteves, L. C. *et al.* Revisiting the Mechanism of Hydrolysis of Betanin. *Photochem. Photobiol.* **94**, 853–864 (2018).
- Gillis, E. A. L. & Fridgen, T. D. The hydrated Li+-adenine-thymine complex by IRMPD spectroscopy in the N-H/O-H stretching region. *Int. J. Mass Spectrom.* 297, 2–8 (2010).
- 85. Van Zundert, G. C. P. *et al.* IR spectroscopy of isolated neutral and protonated adenine and 9-methyladenine. *ChemPhysChem* **12**, 1921–1927 (2011).
- 86. Chiavarino, B., Crestoni, M. E., Fornarini, S., Scuderi, D. & Salpin, J. Y. Interaction of cisplatin with adenine and guanine: A combined IRMPD, MS/MS, and theoretical study. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 1445–1455 (2013).

- 87. Salpin, J. Y. & Scuderi, D. Structure of protonated thymidine characterized by infrared multiple photon dissociation and quantum calculations. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **29**, 1898–1904 (2015).
- 88. Ali, O. Y. & Fridgen, T. D. Structures of electrosprayed Pb(Uracil-H)+ complexes by infrared multiple photon dissociation spectroscopy. *Int. J. Mass Spectrom.* **308**, 167–174 (2011).
- 89. Alahmadi, Y. J., Gholami, A. & Fridgen, T. D. The protonated and sodiated dimers of proline studied by IRMPD spectroscopy in the N-H and O-H stretching region and computational methods. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 26855–63 (2014).
- 90. Fridgen, T. D. Infrared consequence spectroscopy of gaseous protonated and metal ion cationized complexes. *Mass Spectrom. Rev.* 28, 586–607 (2009).
- 91. Ragavendran, V. & Muthunatesan, S. New insights into the vibrational spectroscopic investigation on S-cis & amp; S-trans forms of 2-Methoxy benzoyl chloride. (2017). doi:10.1016/j.vibspec.2017.04.006
- 92. Baek, J. Y. *et al.* Ultraviolet photodissociation spectroscopy of cold, isolated adenine complexes with a potassium cation. *Chem. Phys. Lett.* **635**, 163–167 (2015).
- 93. Nosenko, Y., Menges, F., Riehn, C. & Niedner-Schatteburg, G. Investigation by two-color IR dissociation spectroscopy of Hoogsteen-type binding in a metalated nucleobase pair mimic. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 8171 (2013).
- 94. Brodbelt, J. S. Photodissociation mass spectrometry: new tools for characterization of biological molecules. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 2757–2783 (2014).
- H C Crick, W. F. Molecular Structl, lre of Deoxypentose Nucleic Acids. *Nature* 171, 192 (1953).
- 96. Hélène, C., Montenay-Garestier, T. & Dimicoli, J.-L. Interactions of tyrosine and tyramine with nucleic acids and their components: Fluorescence, nuclear magnetic resonance and circular dichroism studies. *Biochim. Biophys. Acta Nucleic Acids Protein Synth.* **254**, 349–365 (1971).
- 97. WATSON, J. D. & CRICK, F. H. C. Genetical Implications of the Structure of Deoxyribonucleic Acid. *Nature* **171**, 964–967 (1953).
- 98. Cruz-Ortiz, A. F. *et al.* Fingerprints of Both Watson–Crick and Hoogsteen Isomers of the Isolated (Cytosine-Guanine)H+ Pair. *J. Phys. Chem. Lett.* **8**, 5501–5506 (2017).
- 99. Park, J. J., Lee, C. S. & Han, S. Y. Proton Transfer Accounting for Anomalous Collision-Induced Dissociation of Proton-Bound Hoogsteen Base Pair of Cytosine and Guanine. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **29**, 2368–2379 (2018).
- 100. Colominas, C., Luque, F. J. & Orozco, M. Tautomerism and Protonation of Guanine and Cytosine. Implications in the Formation of Hydrogen-Bonded

Complexes. J. Am. Chem. Soc. 118, 6811–6821 (1996).

- Allegretti, P. E., Schiavoni, M. de las M., Castro, E. A. & Furlong, J. J. P. Tautomeric Equilibria Studies by Mass Spectrometry. *World J. Chem.* 2, 25–62 (2007).
- 102. Beach, D. G. & Gabryelski, W. Revisiting the Reactivity of Uracil During Collision Induced Dissociation: Tautomerism and Charge-Directed Processes. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 23, 858–868 (2012).
- 103. Salpin, J.-Y. *et al.* Infrared Spectra of Protonated Uracil, Thymine and Cytosine. *ChemPhysChem* **8**, 2235–2244 (2007).
- 104. Molano-Arevalo, J. C. *et al.* Insights from ion mobility-mass spectrometry, infrared spectroscopy, and molecular dynamics simulations on nicotinamide adenine dinucleotide structural dynamics: NAD ⁺ vs. NADH. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 20, 7043–7052 (2018).
- 105. Wong, Y. P. Tautomerism of nucleic acid bases. Guanine and cytosine. J. Am. Chem. Soc. 95, 3511–3515 (1973).
- Danilov, V. I., Anisimov, V. M., Kurita, N. & Hovorun, D. MP2 and DFT studies of the DNA rare base pairs: The molecular mechanism of the spontaneous substitution mutations conditioned by tautomerism of bases. *Chem. Phys. Lett.* 412, 285–293 (2005).
- 107. Mennucci, B., Toniolo, A. & Tomasi, J. Theoretical Study of Guanine from Gas Phase to Aqueous Solution: Role of Tautomerism and Its Implications in Absorption and Emission Spectra. (2001). doi:10.1021/jp0111362
- 108. Valdespino-Saenz, J. & Martínez, A. Adenine–Au and adenine–uracil–Au. Nonconventional hydrogen bonds of the anions and donator–acceptor properties of the neutrals. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **939**, 34–43 (2010).
- 109. Brancolini, G. & Di Felice, R. Electronic Properties of Metal-Modified DNA Base Pairs. J. Phys. Chem. B 112, 14281–14290 (2008).
- 110. Gregson, J. M. & Mccloskey, J. A. Collision-induced dissociation of protonated guanine. International Journal of Mass SpectrometIy and Ion Processes 165, (1997).
- 111. Cheong, N. R. et al. Photofragmentation in selected tautomers of protonated adenine. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**, 291–295 (2011).
- 112. Gould, I. R., Vincent, M. A. & Hillier, I. H. A theoretical study of the infrared spectra of guanine tautomers. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Spectrosc.* **49**, 1727–1734 (1993).

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Gustavo Cervi Local e data de nascimento: Lages, SC, 8/11/1992.

1.EDUCAÇÃO

Ensino Médio: Sociedade Educacional de Santa Catarina, SOCIESC, Joinville, Brasil, 2010

Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville, SC 2011 a 2016 Graduação em Licenciatura em Química

2. FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Técnico em química. Sociedade Educacional de Santa Catarina, SOCIESC, Joinville, Brasil 2016

Curso de curta duração em Amber Workshop: conducting Molecular Dynamics. (Carga horária: 26h). Universitat Politècnica de Catalunya, UPC, Barcelona, Espanha

3. OCUPAÇÃO

Natrium Química, Vínculo institucional. Analista químico e microbiologista, 2011.

Bolsista de Iniciação científica CNPQ vigência 06/2012 a 05/2013 e 02/2015 a 06/2016. UDESC- Joinville.

Bolsista de mestrado pela FAPESP, vigência 01/11/2016 a 01/01/2019. IQ-USP

4. PUBLICAÇÕES (Artigos Completos e Resumos em Congressos)

Artigos completos publicados em periódicos

1. RODRIGUES-OLIVEIRA, ANDRÉ F.; M. RIBEIRO, FRANCISCO W.; CERVI, GUSTAVO; C. CORRERA, THIAGO

Evaluation of Common Theoretical Methods for Predicting Infrared Multiphotonic Dissociation Vibrational Spectra of Intramolecular Hydrogen-Bonded Ions. ACS Omega., v.3, p.9075 - 9085, 2018. *Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1021/acsomega.8b00815]*

2. **CERVI, GUSTAVO**; PEZZIN, SÉRGIO HENRIQUE; MEIER, MARCIA MARGARETE Differential Scanning Calorimetry study on curing kinetics of diglycidyl ether of bisphenol A with amine curing agents for self-healing systems. Materia-Rio de Janeiro., v.22, p.1 - 6, 2017. *Referências adicionais : Português. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1590/s1517-707620170002.0183]*

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

 MEIER, M. M.; ZANON, R. A. S.; CERVI, G.; JANTISCH, J. A. S.
Correlação entre ângulo de Contato e Absorção de água de Polímeros Empregados em Materiais Restauradores Dentais In: Congresso Brasileiro de Polímeros, 2013, Florianópolis.
Anais do 120 Brasileiro de Polímeros., 2013. v.único. p.64 - 67

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

2. WANG, YUJUAN; NEGRI, LUCAS H.; **CERVI, GUSTAVO**; DE OLIVEIRA, VALMIR; KALINOWSKI, HYPOLITO J.; PATERNO, ALEKSANDER S.

Multiplexed FBG Optical Instrumentation Using an FPGA-Based System In: Latin America Optics and Photonics Conference, 2012, Sao Sebastiao.

Latin America Optics and Photonics Conference. Washington: OSA, 2012. p.LM2A.7 -Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [http://www.opticsinfobase.org/abstract.cfm?URI=LAOP-2012-LM2A.7]

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. MEIER, M. M.; SANTANA, M.; BERTONCINI, M.; CERVI, G.; PEZZIN, S. H.; XAVIER, T. A.; BRAGA, R. R.

Viabilidade do CO2 supercrítico como solvente verde na funcionalização de cargas para compósitos dentais In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2014, Natal.

37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química., 2014.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

2. CERVI, G.; SANTOS, P. A.; MEIER, M. M.

Efeito do solvente no processo de silanização de partículas de vidro para compósitos dentai In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2013, Águas de Lindóia.

36a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. , 2013. v.único.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

3. CERVI, G.; SANTOS, P. A.; MEIER, M. M.

Efeito do solvente no processo de silanização de partículas de vidro para compósitos dentai In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2013, Águas de Lindóia.

36a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química., 2013. v.único.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

4. SANTOS, P. A.; CERVI, G.; PEZZIN, S. H.; MEIER, M. M.

Tratamento da superfície de cargas de compósitos dentais com dietilfosfatoetiltrietoxisilano e 3metacriloxipropiltrimetoxisilano In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2013, Águas de Lindóia.

36a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química., 2013. v.único. p.1 - 1

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital