

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Química

ANDRÉ FILIPE RODRIGUES DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DE MOLÉCULAS COM POTENCIAL BIOATIVO POR
ESPECTROSCOPIA DE AÇÃO E MOBILIDADE IÔNICA ACOPLADAS À
ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Versão da tese corrigida

São Paulo
Data do Depósito na SPG:
29/09/2020

ANDRÉ FILIPE RODRIGUES DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DE MOLÉCULAS COM POTENCIAL BIOATIVO POR
ESPECTROSCOPIA DE AÇÃO E MOBILIDADE IÔNICA ACOPLADAS À
ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do Título
de Doutor em Química*

Orientador: Prof. Dr. Thiago Carita Correra

São Paulo

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, 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

R696c Rodrigues-Oliveira, André Filipe
Caracterização de moléculas com potencial bioativo por espectroscopia de ação e mobilidade iônica acopladas à espectrometria de massas. / André Filipe Rodrigues-Oliveira. - São Paulo, 2020.
169 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.

Orientador: Correra, Thiago Carita

1. IRMPD. 2. UVPD. 3. Interações não covalentes. 4. Tandem MS. 5. Biofísica. I. T. II. Correra, Thiago Carita, orientador.



Universidade de São Paulo
Instituto de Química

"Caracterização de moléculas com potencial bioativo por espectroscopia de ação e mobilidade iônica acopladas à espectrometria de massas"

ANDRE FILIPE RODRIGUES DE OLIVEIRA

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências - no Programa de Química.

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

APROVADO(A) POR:

Prof. Dr. Claudimir Lucio do Lago
IQ - USP

Prof. Dr. Ricardo Vessecchi Lourenço
FFCLRP - USP

Profa. Dra. Camila Bacellar Cases da Silveira
PSI

SÃO PAULO
13 de novembro de 2020

Aos meus pais, por me ensinarem o valor do estudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por acreditar que é pela graça dEle que recebi as oportunidades e capacidade para chegar até este estágio.

Agradeço a minha parceira, amiga, companheira e esposa, Caroline, a quem devo minha motivação diária, minha força e meu amor. Obrigado por ter embarcado comigo nesse desafio. Obrigado pela paciência nos fins de semana e no tempo livre que ocupei escrevendo esta tese. Obrigado por me incentivar a ir em frente e por não me deixar me auto sabotar. Obrigado por me fazer ser uma pessoa melhor.

Agradeço aos meus pais, Paulo e Célia, por todo o sacrifício que fizeram para dar a mim e ao meu irmão o melhor que puderam. E posso garantir que nada seria melhor que isso. Não consigo expressar em palavras o amor e gratidão que sinto por vocês. Vocês são meu exemplo, minha base, minha raiz. E os grandes culpados se consegui conquistar alguma coisa e se ainda conquistarei. Essa conquista é de vocês também

Ao meu irmão, Junior, pelo apoio que sempre me deu, assim como à sua esposa Pamela e aos meus sobrinhos queridos, Isabelle, Júlia e Rafael, pelos momentos de alegria que me proporcionam. A todos os meus familiares, aos quais eu tenho muito amor e carinho. Nós não escolhemos a família em que nascemos, mas se eu tivesse a escolha, com certeza não escolheria outra.

Aos meus advogados, Eduardo e Caroline, que sempre valorizaram o meu trabalho e reconheceram que o doutorado é uma tarefa difícil e nunca me deixaram pensar o contrário. Estendo este agradecimento a Mariana, que mesmo longe, continua ocupando seu espaço em nosso coração. Obrigado pelo companheirismo e amizade.

Ao meu orientador, Thiago Correra, por todo o ensino, apoio e parceria nestes quatro anos de doutorado. Agradeço também a todos os colegas com quem trabalhei no laboratório MCPL. Foi uma honra ter feito parte deste grupo um prazer compartilhar uma dose de café com vocês no dia-a-dia.

Ao Dr. Philippe Dugourd por ter me recebido em seu grupo de pesquisa e ao Dr. Luke MacAleese por ter me supervisionado. Obrigado pela confiança e autonomia. Agradeço também a toda equipe do Grupo SpectroBio pelo acolhimento e auxílio.

Ao Prof. Dr. Lucas Ducatti e a Patrick Batista pela colaboração nas análises de QTAIM e NCI. Ao Prof. Dr. Atualpa Braga por responder pacientemente minhas dúvidas sobre cálculos teóricos.

Ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo, pela infraestrutura disponibilizada, essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

As agências de fomento, sem as quais a pesquisa aqui realizada não poderia ter sido realizada. Agradeço ao CNPq pela bolsa de doutorado (142342/2016-5) e à CAPES pela bolsa de doutorado sanduíche (88881.187787/2018-01), de capacitação técnica (88887.369857/2019-00) e pelo apoio financeiro cedido ao laboratório (23038.006960/2014-65). À FAPESP pela verba dedicado ao laboratório (2014/15962-5 e 2015/08539-1).

*“Para além da curva da estrada
Talvez haja um poço, e talvez um castelo,
E talvez apenas a continuação da estrada.
Não sei nem pergunto.*

[...]

*Importemo-nos apenas com o lugar onde estamos.
Há beleza bastante em estar aqui e não noutra parte qualquer.
[...]*”

Fernando Pessoa

RESUMO

Oliveira, A. F. R. **Caracterização de moléculas com potencial bioativo por espectroscopia de ação e mobilidade iônica acopladas à espectrometria de massas.** 2020. 169p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica analítica largamente utilizada em diversas áreas de estudo, como a química, bioquímica, ambiental, farmacêutica, entre outras. Embora esta técnica seja sensível e universal, a detecção por MS é baseada apenas na razão massa-carga (m/z) de íons, muitas vezes não provendo informações diretas sobre a configuração das espécies em fase gasosa. Portanto, a MS é limitada quando usada para a diferenciação de isômeros e para a determinação de sítios de protonação e coordenação. Para solucionar tal limitação, podem ser utilizadas técnicas de espectroscopia de íons, tanto vibracional quanto eletrônica, e mobilidade iônica, acopladas a MS. Nesta tese, as técnicas de espectroscopia de íons e mobilidade iônica são aplicadas a diferentes moléculas bioativas e com potencial bioativo, a fim de investigar suas características estruturais e diferenciação de isômeros em reação de *photoswitching*. Para tanto, um aparato instrumental desenvolvido em nosso grupo para a realização da espectroscopia de íons foi validado comparando-se os espectros da biotina e triptofano protonados em fase gasosa com os espectros encontrados na literatura. Nosso equipamento não só reproduziu os resultados da literatura, como apresentou sensibilidade superior em algumas regiões do espectro. Esses espectros também foram utilizados para a realização de um *benchmarking* de métodos para a determinação de espectros teóricos, a fim de verificar-se o nível de teoria mais adequado para os sistemas abordados neste projeto. Um conjunto de biomoléculas – tiamina, biotina, biocitina e triptofano – foi avaliado quanto sua conformação em meio gasoso, sítio de protonação, coordenação e interações intramoleculares. Também foram realizados estudos teóricos mais aprofundados, como a determinação da natureza de interações de hidrogênio relevantes para os sistemas bioativos abordados, aplicando esquemas de cálculos de orbitais naturais de ligação (NBO), teoria quântica de átomos em moléculas (QTAIM) e interações não-covalentes (NCI). Os resultados permitiram caracterizar uma série relevante de espécies de interesse biológico, ilustrando o poder dessas técnicas avançadas em espectrometria de massas e permitindo o estudo de outros sistemas futuros utilizando as técnicas e metodologias aqui introduzidas.

Palavras-chave: IRMPD, UVPD, Interações não covalentes, Tandem MS, Biofísica.

ABSTRACT

Oliveira, A. F. R. **Characterization of potential bioactive molecules by ion spectroscopy and ion mobility approaches coupled to mass spectrometry.** 2020. 169p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo.

Mass spectrometry (MS) has become an important analytical technique, widely employed in several areas of study, such as chemistry, biochemistry, and environmental and pharmaceutical sciences, among others. Although this technique is sensitive and comprehensive, detection by MS is based only on the mass-to-charge ratio (m/z) of ions, and does not provide direct information on the conformation of ions in the gas phase. Therefore, the efficiency of MS is limited for the differentiation of isomers and determination of protonation and coordination sites. Ion mobility and ion spectroscopy, either vibrational or electronic, approaches can be used to circumvent this limitation. In this thesis, action spectroscopy and ion mobility techniques are applied to different bioactive molecules, or to molecules with bioactive potential, in order to investigate the structural characteristics presented by them and also perform isomer differentiation in a photoswitching reaction. An instrumental apparatus for ion spectroscopy was developed in our group and was validated by comparing the protonated biotin and tryptophan spectra in the gas phase with the spectra available in the literature. Our equipment not only reproduced the results of the literature, but also showed superior sensitivity in some regions of the spectrum. These spectra were also used to carry out a benchmarking of theoretical spectra, in order to evaluate the most adequate level of theory for our systems. A set of biomolecules – thiamine, biotin, biocytin and tryptophan – were evaluated concerning to their conformation in gas phase, protonation and coordination site and intramolecular interactions. Also, natural bond orbitals (NBO), quantum theory of atoms in molecules (QTAIM) and non-covalent interactions (NCI) calculations were carried out to deeply investigate the nature of the hydrogen bonds of some of the studied systems. The results allowed us to characterize a set of relevant species involved in biological processes, exemplifying the capacity of these advanced approaches in mass spectrometry and giving basis to the future studies in the group using the techniques introduced here.

Keywords: IRMPD, UVPD, Non-covalent interactions, Tandem MS, Biophysics.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ΔH	Entalpia da Ligação de Hidrogênio
$\nabla^2\rho(r)$	Laplaciano da Densidade Eletrônica
ACN	Acetonitrila
ATD	Tempo de Arraste
BCP	Ponto Crítico de ligação
BOMD	Dinâmica Molecular de Born-Oppenheimer
CAS-MP2	Campo Auto Consistente de Espaço Ativo Completo Com Correção de Segunda Ordem
CASSCF	Campo Auto Consistente de Espaço Ativo Completo
CB	Conjunto de Bases
CCS	Seção de Choque
CCSD	<i>Coupled Cluster Singles and Doubles</i>
CI	Ionização Química
CID	Dissociação Induzida por Colisão
CIS	<i>Configuration Interaction Singles</i>
CISD	<i>Configuration Interaction Singles and Doubles</i>
CV	Voltagem de Compensação
D3	Correção de Dispersão de Terceira Ordem
DART	Análise direta em tempo real
DASA	Adutos Doadores-Aceptores de Stenhouse
DC	Corrente Contínua
DESI	Ionização de dessorção por eletrospray
DFT	Teoria do Funcional de Densidade
DIMS	Mobilidade Iônica Diferencial
DMS	Espectrometria de Mobilidade Diferencial
DTIMS	Mobilidade Iônica por tubo de arraste
E	Campo Elétrico
E2	Energia de Estabilização de Segunda Ordem
ED	Estado Dissociativo
EDA	Análise de Decomposição de Energia
E_{HB}	Energia da Ligação de Hidrogênio Intermolecular

EHSS	Espalhamento de Esferas Rígidas Exatas
EI	Ionização por Elétrons
E_{IHB}	Energia da Ligação de Hidrogênio Intramolecular
E_{IHB}^{AF}	Energia da Ligação de Hidrogênio Intramolecular de Afonin
E_{IHB}^{ESP}	Energia da Ligação de Hidrogênio Intramolecular de Espinosa
ESI	Ionização por eletrospray
f	Frequência ciclotrônica
FAIMS	Mobilidade Iônica Por Ondas Assimétricas de Campo Alto
FEL	Laser de Elétrons Livres
FT-ICR	Espectrômetro de massas de ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier
$G(r)$	Densidade de Energia Cinética
GC-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas
$H(r)$	Densidade de Energia Eletrônica Total
IMS	Espectrometria de Mobilidade Iônica
IRMPD	Espectroscopia de Dissociação de Múltiplos Fótons no Infravermelho
ISC	Cruzamento Inter-Sistemas
IVR	Redistribuição Vibracional Interna
K	Mobilidade Iônica
k	Constante de Velocidade de Reação
k_B	Constante de Boltzmann
l	Comprimento do Tubo de Arraste
LC-MS	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas
m	massa
M	Concentração Molar
m/z	Razão massa-carga
MALDI	Dessorção/ionização a laser auxiliada por matriz
MeOH	Metanol
MS	Espectrometria de Massas
ms	milisegundos
MS ⁿ	Espectrometria de massas de múltiplos estágios
N	densidade numérica do gás de arraste

NBO	Orbitais Naturais de Ligação
NCE	Energia de Colisão Normalizada
NCI	Interações Não-Covalentes
OPA	Amplificador paramétrico Óptico
OPO	Oscilador Paramétricos Óptico
P	Pressão
PA	Apromixação de Projeção
PAA	Fenilalquilamina
PBA	Fenilbutilamina
PE	Eficiência de Fotofragmentação
PEA	Feniletilamina
PID	Dissociação Fotoinduzida
PISA	Espectroscopia de Ação de Fotoisomerização
PMA	Fenilmetilamina
PPA	Fenilpropilamina
PY	Rendimento de Fotofragmentação
QTAIM	Teoria Quântica de Átomos em Moléculas
RCP	Ponto Crítico de Anel
RDG	Gradiente de Densidade Reduzida
RF	Radiofrequência
RMSD	Desvio Médio Quadrático
$s(r)$	Gradiente de Densidade Reduzida
S/N	Razão Sinal-Ruído
S_0	Estado Eletrônico Singlete Fundamental
S_1	Estado Eletrônico Singlete Excitado
SF	Fator de Escala
$\text{sign}(\lambda_2)\rho$	Produto Densidade Eletrônica Com o Sinal de λ_2 da matriz hessiana
SV	Voltagem de Separação
t	Tempo
T	Temperatura
t_d	Tempo de arraste
TD-DFT	Teoria do Funcional de Densidade Dependente do Tempo

TD-DH-DFT	Teoria do Funcional de Densidade Duplo Híbrido Dependente do Tempo
TDF	Tiamina Difosfato
TIMS	Mobilidade Iônica de Íons Aprisionados
TM	Método de Trajetória
Tryp	Triptofano
TWIMS	Mobilidade Iônica de Ondas Móveis
U	Potencial Elétrico de corrente Contínua
UV	Ultravioleta
UVPD	Espectroscopia de Fotodissociação no Ultravioleta
V	Potencial Elétrico Variável em Radiofrequência
$V(r)$	Densidade de Energia Potencial
v_d	Velocidade de arraste
z	Carga iônica
α	Mobilidade Diferencial
ΔG	Energia Livre de Gibbs Relativa
ε	Elipticidade
μ	Massa Reduzida
ν	Frequência eletromagnética
$\rho(r)$	Densidade Eletrônica
Ω	Seção de choque
ω	Velocidade Angular

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos osciladores e comparação entre bandas de absorção experimentais e da literatura em cm^{-1}	59
Tabela 2. Fatores de escala (SFs) utilizados para corrigir as frequências calculadas para cada nível de teoria.	62
Tabela 3. RMSD calculado a partir do centroide das bandas de infravermelho em cm^{-1} , excluindo e incluindo [entre colchetes] as vibrações afetadas pelas interações intramoleculares, em função do nível de teoria utilizado. O tempo requerido para os cálculos de otimização/frequência estão apresentados entre parêntesis, em min/processador.	64
Tabela 4. RMSD relativo aos centroides das bandas (em cm^{-1}) obtidas por cálculo não ajustados, em função do nível de teoria utilizado. O tempo requerido para os cálculos de otimização/frequência estão apresentados entre parêntesis, em min/processador.	66
Tabela 5. Comparação entre dados experimentais da literatura e calculados na região de <i>fingerprint</i> e baixa frequência, nos níveis de teoria M06-2X/6-31+G(d,p) and CAM-B3LYP/aug-cc-pVTZ.	68
Tabela 6. Energia livre de Gibbs relativa (ΔG), em kJ/mol, das estruturas de menor energia do triptofano e PBA protonados.	74
Tabela 7. Dados para o cálculo de energia de ligação empírica. Os valores ν_0 são os números de onda das bandas do estiramento N-H livre, ν_l os números de onda referentes ao $\text{N-H}^{\cdots\pi}$ e $-\Delta H$ as entalpias de ligação.	77
Tabela 8. Parâmetros topológicos obtidos através dos cálculos de QTAIM nos BCPs: densidade eletrônica ($\rho(r)$) ^a ; laplaciano da densidade eletrônica ($\nabla^2\rho(r)$) ^a ; densidade de energia potencial ($V(r)$) ^a ; densidade de energia cinética ($G(r)$) ^a ; densidade de energia eletrônica total ($H(r)$) ^a ; elipsidade (ϵ); distância entre o hidrogênio e o BCP ($d(\text{H}\cdots\text{BCP})$) ^b ; distância entre o hidrogênio e o átomo acceptor de hidrogênio ($d(\text{H}\cdots\text{A})$) ^b ; energia de ligação de hidrogênio (E_{IHB}^{AF}) ^c proposta por Afonin ¹⁵⁶ ; energia de ligação de hidrogênio (E_{IHB}^{SPp}) ^c proposta por Espinosa. ¹⁵⁷ ; Energia claculada por EDA ^{c,d} 140; Energia de ligação empírica ($-\Delta H$) ^c . ¹⁵⁹	78
Tabela 9. Valores de $\text{sign}(\lambda_2)\rho$ onde $s(r)$ apresenta mínimos.....	83

Tabela 10. Interações de orbitais doadores e aceptores e sua respectiva energia de segunda ordem (E2) em kJ/mol, calculado por NBO no nível de teoria D3- M06-2X/6-31+G**.	85
Tabela 11. Energias livre de Gibbs relativas (ΔG) em kJ/mol, calculadas para as estruturas otimizadas para cada sítio de protonação.	92
Tabela 12. Atribuição das bandas do espectro vibracional da biocitina. Valores de frequência em cm^{-1} .	95
Tabela 13. Atribuição das bandas vibracionais da tiamina monohidratada. Os valores de número de onda estão em cm^{-1} .	100
Tabela 14. Atribuição das bandas vibracionais da tiamina monohidratada. Os valores de número de onda estão em cm^{-1} .	107
Tabela 15. Parâmetros topológicos obtidos através dos cálculos de QTAIM nos BCPs: densidade eletrônica ($\rho(r)$) ^a ; laplaciano da densidade eletrônica ($\nabla^2\rho(r)$) ^a ; densidade de energia potencial ($V(r)$) ^a ; densidade de energia cinética ($G(r)$) ^a ; densidade de energia eletrônica total ($H(r)$) ^a ; elipsidade (ϵ); energia de ligação de hidrogênio (E_{IHB}^{AF}) ^c proposta por Afonin ¹⁵⁶ ; Energia de ligação empírica ($-\Delta H$) ^{c 140} .	108
Tabela 16. Valores de $\text{sign}(\lambda_2)\rho$ em que $s(r)$ tende a zero.	109
Tabela 17. Energias relativas em fase gasosa (kJ/mol) e excitações verticais ($S_0 \rightarrow S_1$) (E.V.), em nanômetros, de todos os isômeros do caminho de reação, considerando-se as protonações nos sítios O1H, O2H e NH no nível de teoria RI-B2PLYP(D3BJ)/aug-cc-pVDZ. Seção de choque cruzado (CCS) em Å^2 .	128
Tabela 18. Métodos, conjunto de bases e fatores de escalas utilizados para cálculos de frequência nos 50 artigos mais citados durante os 10 últimos anos (2007-2017). (FT-DTCF é um acrônimo para <i>Fourier Transform of Dipole Time Correlation Function</i> ; PLEF é um acrônimo para <i>Projection of Local Electric Field</i>).	153
Tabela 19. Métodos, conjunto de bases e fatores de escalas utilizados para cálculos de frequência nos 50 artigos recentes (2017).	155
Tabela 20. Comparação dos cálculos realizados com e sem uso da correção de dispersão empírica proposta por Grimme, aplicado ao triptofano. O uso desta correção piorou a descrição	

dos estiramentos N-H, indicado por um aumento na variação. Os cálculos feitos com M06-2X quase não são afetados.....	158
Tabela 21. Comparação dos cálculos realizados com e sem uso da correção de dispersão empírica proposta por Grimme, aplicado à biotina. O uso desta correção melhorou a descrição da ligação de hidrogênio, no entanto piorou a descrição dos estiramentos N-H, indicado por um aumento na variação. Os cálculos feitos com M06-2X quase não são afetados.	160
Tabela 22. Fatores de escala para biotina e triptofano obtidos pela minimização do RMSD/ajuste por uma banda.....	162
Tabela 23. <i>Final one electron symbolic density matrix</i> gerada pelo cálculo de CASSCF do confômero O2Hb. A ocupação orbitalar, apresentada nos elementos da diagonal, é indício do caráter multireferencial deste íon.	165

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação simplificada dos seletores de massa dos instrumentos utilizados para o aprisionamento de íons: a) *ion trap* 3D; b) *ion trap* linear; c) FT-ICR, onde os eletrodos E_E são os eletrodos de excitação, os eletrodos E_D são os eletrodos de detecção. Os eletrodos de aprisionamento E_A , posicionados a frente e atrás da cela de FT-ICR, estão omitidos. Em cada esquema, a seta verde indica o caminho percorrido pelo feixe de luz.....32
- Figura 2. Espectro IRMPD da tiamina em fase gasosa. Esquema representando a obtenção do espectro na espectroscopia de ação utilizando MS na região do infravermelho. Diversos feixes de luz de diferentes energias (ν) são incididas sobre o analito em tempos diferentes. Quando o analito interage com o fóton incidido, ocorre fragmentação. A intensidade da fragmentação é relacionada a intensidade da absorção.....37
- Figura 3. Mecanismos de fotodissociação na espectroscopia de ação: a) esquema do processo de fotodissociação no ultravioleta, onde após uma conversão interna (ISC), a espécie é levada a um estado dissociativo (ED);³⁴ b) absorção de um fóton com energia suficiente para alcançar o limiar de dissociação do estado excitado; c) dissociação após relaxação para um estado de energia maior que o limiar de dissociação do estado fundamental; d) esquema do processo de fotodissociação no visível, onde a dissociação pode ocorrer após múltiplas absorções.⁴⁹ e) Esquema do processo de fotodissociação na região do infravermelho, que ocorre através da absorção de múltiplos fótons seguidos por redistribuição da energia entre os níveis vibracionais³⁹39
- Figura 4. Esquema demonstrando o processo de separação na DTIMS. Extraído do trabalho de Penna e Correra.⁴⁷44
- Figura 5. Estratégias de modelagem para a obtenção do valor teórico de CCS. As linhas laranjas representam o cálculo por aproximação de projeção, as linhas azuis os cálculos pelo modelo de espalhamento de esferas exatas e as linhas verdes os cálculos pelo método de trajetória. A estrutura 3D representada é uma conformação da biocitina protonada.46
- Figura 6. Esquema demonstrando o funcionamento da técnica FAIMS. Os íons são conduzidos em direção aos eletrodos por uma RF denominada SV. Uma voltagem de compensação CV é capaz de estabilizar a trajetória iônica. Varrendo-se a CV, obtém-se um espectro FAIMS. Imagem extraída de Penna e Correra.⁴⁷47

Figura 7. Porcentagem de métodos e conjuntos de base mais utilizados para prever espectros de IRMPD. Os resultados foram obtidos através da pesquisa do tópico "*IRMPD spectroscopy*" refinado pela categoria "*article*" no banco de dados do Web of Science em dezembro de 2017. À esquerda estão os dados referentes aos 50 artigos mais citados (2007-2017), enquanto à direita estão os dados dos 50 artigos mais recentes até dezembro de 2017. A lista completa pode ser encontrada no apêndice (Tabela 18 e Tabela 19). Os dados dentro da linha pontilhada foram ampliados cinco vezes para melhor visualização. FT-DTCF se refere a transformada de Fourier da função de correlação tempo-dipolo. PLEF se refere à projeção do campo elétrico local. Extraído de Rodrigues-Oliveira.⁹⁹ Copyright 2018 American Chemical Society..... 56

Figura 8. Estrutura química da biotina, à esquerda, e triptofano, à direita, protonados. Os oxigênios carbonílicos e as aminas secundárias estão destacadas e discriminadas por números. 59

Figura 9. Espectro IRMPD de A) biotina protonada, B) Triptofano protonado (ambos obtidos por nosso grupo), C) biotina protonada e D) triptofano protonado (ambos obtidos da literatura). Visto que o espectro C, publicado por Frascetti e colaboradores, não foi corrigido pela potência, o espectro A também é reportado sem a correção. Extraído de Rodrigues-Oliveira.⁹⁹ Copyright 2018 American Chemical Society. 60

Figura 10. Geometria calculada da A) biotina protonada e B) triptofano protonado. Extraído de Rodrigues-Oliveira.⁹⁹ Copyright 2018 American Chemical Society. 61

Figura 11. Espectros calculados para A) biotina e B) triptofano em comparação com seus respectivos espectros experimentais. As linhas verticais definem o pico do espectro experimental. Os espectros calculados estão corrigidos por fatores de escala encontrados na literatura. Extraído de Rodrigues-Oliveira.⁹⁹ Copyright 2018 American Chemical Society. ... 63

Figura 12. Comparação do RMSD quando aplicados diferentes fatores de escala aos cálculos da (a) biotina e (b) triptofano, em função da metodologia utilizada. Representados em roxo estão os cálculos utilizando fatores de escala da literatura, em rosa os fatores de escala gerados a partir do '*fitting*' de uma das bandas e em verde o fator de escala gerado após a minimização dos erros. Extraído de Rodrigues-Oliveira.⁹⁹ Copyright 2018 American Chemical Society. ... 69

Figura 13. Estruturas do triptofano e PAAs protonados..... 72

Figura 14. Estruturas 3D do a) triptofano (confômero A), b) triptofano (confômero B), c) triptofano (confômero C), d) PMA, e) PEA, f) PPA e g) PBA(confômero A), h) PBA (confômero B) e i) PBA (confômero A), incluindo as visualizações gráficas dos BCPs (pontos verdes), RCPs (pontos vermelhos) e caminhos de ligação (linhas tracejadas)..... 75

Figura 15. Acima: Correlação entre E_{IHB}^{ESP} e os seguintes parâmetros de QTAIM: $\rho(r)$ (círculos); $\nabla^2\rho(r)$ (dividido por 10, quadrados cheios); e $G(r)$ (círculos cruzados). As linhas de tendência são representadas pelas linhas tracejadas vermelha (ajuste linear) e azul (ajuste polinomial). Abaixo: Correlação entre E_{IHB}^{esp} e $d(H\cdots A)$ (quadrados cheios). O ajuste linear foi obtido entre 4-20 kJ/mol, excluindo as interações H \cdots H e N-H \cdots O. O ajuste polinomial foi obtido excluindo apenas a interação H \cdots H. 79

Figura 16. Isosuperfícies obtidas pelos cálculos de NCI e respectivos gráfico do gradiente de densidade reduzida, s , versus $\text{sign}(\lambda_2)\chi\rho$ do A) triptofano, B) PMA, C) PEA, D) PPA, E) PBA, obtido no nível de teoria M06-2X/6-31+G** 82

Figura 17. Estrutura, isosuperfícies e gráficos de $s(r)$ em função de $\text{sign}(\lambda_2)\rho$ dos confômeros: a)triptofano A; b) triptofano B; c) triptofano C; d) PBA A; e) PBA B; f)PBA C. 84

Figura 18: Estrutura da biotina e da biocitina..... 89

Figura 19. Esquema do mecanismo de ação da biotina nos processos em que atua. 90

Figura 20. À esquerda: espectro vibracional da biocitina calculado a partir da protonação no oxigênio ureido em comparação ao espectro experimental (em cinza no plano de fundo). Os confômeros A - E (Tabela 11) apresentaram espectros iguais e só puderam ser diferenciados do confômero F. À direita e acima está a estrutura 3D da biocitina protonada no oxigênio do ureido (confômero A) e abaixo a estrutura 2D correspondente. 91

Figura 21. Estruturas 3D das conformações geradas a partir da biocitina protonada na amina. 93

Figura 22. Espectros vibracionais da biocitina, calculados a partir da protonação no nitrogênio do aminoácido, em comparação ao espectro experimental. A curva vinho no espectro experimental e a curva em cinza mais claro no plano de fundo se referem à fotodissociação feita com auxílio do laser de CO₂. Cálculos feitos com o nível de teoria M062x/6-31+G(d,p). 94

Figura 23: Estruturas da tiamina e tiamina difosfato.....	97
Figura 24: Esquema mostrando que a descarboxilação espontânea de α -cetoácidos gera um carbânion, que possui alta energia.	97
Figura 25: Esquema do mecanismo de ação da tiamina.	98
Figura 26. Estruturas conformacionais calculadas para a tiamina e suas energias livres de Gibbs (kJ/mol) relativas à conformação de menor energia.....	99
Figura 27. Espectro experimental (em baixo e em background) da tiamina comparado aos espectros calculados para os confôrmeros de A a G. As intensidades bandas dos espectros calculados foram aumentadas 5 x na faixa de 2500 a 3800 cm^{-1}	101
Figura 28. A) Formação do aduto de tiamina com água, m/z 283. À direita está a estrutura da tiamina; B) espectro mostrando a análise do aduto do fragmento da tiamina com água, m/z 140. À direita estão as estruturas dos principais fragmentos da tiamina.	102
Figura 29. Confôrmeros gerados para a tiamina monohidratada após otimização da geometria. Abaixo de cada estrutura estão indicadas as energias livres relativas em kJ/mol.	104
Figura 30. Espectros vibracionais da tiamina monohidratada em comparação ao espectro experimental. Cálculos feitos com o nível de toria $m062x/6-31+G(d,p)$ e com a inclusão das linhas de comando $OPT=(Tight)$ $Int=(Grid=Ultrafine)$ $CPHF=(Grid=Fine)$	105
Figura 31. Espectros gerados a partir da média ponderada pela distribuição de Boltzmann das espécies A+B (A) e A+B+C (B). O espectro experimental é exibido em cinza para comparação.	106
Figura 32. Estruturas 3D e pontos críticos calculados para os confôrmeros a) A, b) B e c) C da tiamina monohidratada.	108
Figura 33. Isosuperfícies de NCI dos confôrmeros A e B da tiamina monohidratada e seus respectivos gráficos de $s(r)$ em função de $\text{sign}(\lambda_2)\rho$	110
Figura 34. Exemplos de DASA já sintetizados, classificados como 1 ^a e 2 ^a geração. ²⁰⁵ DASA1 (DASA de primeira geração a esquerda) foi a espécie estudada nesse projeto.	113

Figura 35. Mecanismo de <i>photoswitching</i> do DASA1. A primeira estrutura contém os potenciais sítios de protonação em negrito.....	114
Figura 36. Espectros MS ² das soluções transparente e colorida de DASA1. Fragmentações por CID e PID.....	117
Figura 37. Esquema de fragmentação para o DASA1 cíclico e linear por CID e PID em 450 nm.	117
Figura 38. Razão entre intensidade dos fragmentos m/z 194 e m/z 238 <i>versus</i> CID energy. ...	118
Figura 40. Esquema do mecanismo de isomerização do DASA1 protonado, seja em fase gasosa ou em solução. A partir dos isômeros (ou confôrmeros) a até d, as espécies são exibidas com um sítio de protonação genérico, visto que a protonação não altera significativamente a conformação destas espécies. A protonação é diferenciada nos isômeros e e f. Estruturas em azul (g-j) são subprodutos que não participam do caminho principal de reação. Em parêntesis se encontram as energias livres relativas de cada espécie, enquanto em colchetes se encontram tais energias em solução (ambos em kJ/mol).	119
Figura 41. Diagrama de energia do progresso da reação do DASA1 em a) fase gasosa e b) solução (MeOH), considerando os diferentes sítios de protonação. A energia livre relative é calculada comparando os isômeros em um mesmo meio. Todos os cálculos foram feitos no nível de teoria ω B97D/6-31+G(d,p). O isômero NHf foi incluído em todos os diagramas por ser a espécie de menor energia.	121
Figura 42. Comparação entre espectros IRMPD experimental (sempre na parte inferior de todos os esquemas) e frequências calculadas de intermediários DASA1, no nível de teoria ω B97D/6-31+G(d,p) e usando um fator de escala (SF) 0,952. O esquema à esquerda refere-se às espécies O1H, o esquema do meio refere-se às espécies O2H e o esquema à direita refere-se às espécies NH. As linhas vermelhas seguem os picos experimentais mais relevantes. As intensidades não são normalizadas.....	122
Figura 43. Espectro IRMPD (fundo cinza) comparado com a média dos espectros de cada sistema (linhas pretas) em relação ao local da protonação. O espectro do isômero NHf foi adicionado a todas as médias. Os diagramas à esquerda referem-se às médias de todos os espectros de um determinado local de protonação, enquanto à direita a média foi calculada usando apenas os dois isômeros com menor energia.	124

Figura 44. a) Evolução do espectro UV (300-400 nm) do DASA1 em relação ao tempo de amostra, sendo tempo 0 a dissolução da amostra em MeOH a partir da solução estoque em ACN. A linha é usada como guia e foi atenuada usando um *Smoothing* (FFT com 2 pontos) no software Origin. b) excitações verticais ($S_0 \rightarrow S_1$) dos isômeros contidos no caminho de reação (RI-B2PLYP(D3BJ)/aug-cc-pVDZ). As barras verdes são excitações verticais dos isômeros NH, barras azuis dos isômeros O2H e barras ciano dos isômeros O1H. A curva vinho é o espectro do DASA1 em fase gasosa e a curva roxa o espectro do DASA1 em MeOH. 125

Figura 45. *Benchmarking* das excitações verticais ($S_0 \rightarrow S_1$) do O2Hb calculados usando diferentes níveis de teoria, comparados ao espectro de absorção em fase gasosa..... 126

Figura 46. Variação da proporção dos picos em espectros FAIMS do DASA1 em uma solução contendo diferentes tempos de preparação: 0 h; 2 h; 4 h; 24 h; 48 h. As análises foram feitas utilizando altas voltagens de funil, exceto pela curva tracejada a 24h, obtida com baixas voltagens de funil. A intensidade da curva tracejada foi aumentada 2,5 vezes para melhor visualização. 130

Figura 47. Espectro FAIMS do DASA1 após 24h: a linha contínua é referente ao espectro obtido com altas voltagens de funil e a linha tracejada é referente ao espectro obtido com baixas voltagens de funil. Os pontos são referentes ao rendimento de fotofragmentação obtido pela incidência de um laser a 450 nm (24 mW) a voltagens de compensação (CV) fixas. As caixas contêm o valor da razão das intensidades dos fragmentos m/z 194/238, após dissociação por CID (energia de NCE 15, janela de isolamento iônico 3). A fotofragmentação do pico A, marcado com asterisco, foi obtida reduzindo as voltagens dos funis..... 131

Figura 48. Espectro DTIMS do DASA1 utilizado soluções com tempo de a) 0 h e b) 24h. Os CCSs (Ω) dos dois picos principais concordam com os calculados para o DASA1 linear (119 \AA^2) e cíclico (107 \AA^2). 132

Figura 49. Separação das populações de DASA via FAIMS (à esquerda) e DTIMS (à direita). A proporção entre intensidades do $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ varia em função da espécie..... 133

Figura 50. Efeito da variação da voltagem de ativação dos picos A, B e C nos espectros de DTIMS..... 134

Figura 51. Orbitais naturais de ligação calculados para o O2Hb (HF/6-31+G**). O espaço ativo é composto majoritariamente por π e π^* 163

Figura 52. Comparação entre os espectros experimentais do DASA1 em fase gasosa e em solução. O espectro em fase gasosa está em ciano. Os espectros em solução são: espectro do DASA1 cíclico (solução transparente) em metanol (curva azul), espectro do DASA1 linear (amostra colorida) em água (curva vinho); espectro do DASA1 linear em metanol (curva verde).
..... 164

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	26
2. FUNDAMENTOS E METODOLOGIA.....	30
2.1. APRISIONAMENTO DE ÍONS	32
2.2. ESPECTROSCOPIA DE AÇÃO	37
2.2.1. <i>Espectroscopia de fotodissociação no ultravioleta (UVPD)</i>	38
2.2.2. <i>Espectroscopia de fotodissociação no infravermelho (IRMPD)</i>	39
2.2.3. <i>Obtenção de espectros de ação pela eficiência de fotofragmentação</i>	41
2.3. ESPECTROMETRIA DE MOBILIDADE IÔNICA	43
2.3.1. <i>Mobilidade Iônica Por Tubo de Arraste</i>	44
2.3.2. <i>Seção de choque</i>	45
2.3.3. <i>Mobilidade Iônica Por Ondas Assimétricas de Campo Alto</i>	47
2.4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	51
2.5. CÁLCULOS COMPUTACIONAIS.....	54
3. ESTUDO DE MOLÉCULAS COM POTENCIAL BIOATIVO	55
3.1 <i>Validação dos resultados teóricos e experimentais obtidos</i>	56
3.1.1. <i>Contextualização</i>	56
3.1.2. <i>Validação instrumental</i>	58
3.1.3. <i>Avaliação dos métodos computacionais</i>	61
3.1.4. <i>Correções de Dispersão e Anarmonicidade</i>	65
3.1.5. <i>Desempenho nas Regiões de Baixa Frequência e Fingerprint</i>	67
3.1.6. <i>Uso de Fatores de Escala Ajustados pelo Cálculo</i>	68
3.1.7. <i>Conclusão</i>	70
3.2. ORIGEM DA INTERAÇÃO N-H ⁺ ...II EM TRIPTOFANO E FENILALQUILAMINAS....	72
3.2.1. <i>Contextualização</i>	72
3.2.2. <i>Cálculos de QTAIM</i>	74
3.2.3. <i>Cálculos de NCI</i>	81
3.2.4. <i>Cálculos de NBO</i>	85
3.2.5. <i>Conclusão</i>	87
3.3. INVESTIGAÇÃO DO EQUILÍBRIO CONFORMACIONAL DA BIOCITINA	89
3.3.1. <i>Contextualização</i>	89
3.3.2. <i>Resultados</i>	91
3.3.3. <i>Conclusão</i>	96

3.4.	AVALIAÇÃO DA MICROSOLVATAÇÃO DA TIAMINA	97
3.4.1.	<i>Contextualização</i>	97
3.4.2.	<i>Resultados</i>	98
3.4.2.1.	<i>Tiamina</i>	98
3.4.2.2.	<i>Tiamina monohidratada</i>	101
3.4.2.3.	<i>Conclusão</i>	111
3.5.	ESTUDO DE REAÇÕES DE FOTOCONVERSÃO EM SOLUÇÃO	113
3.5.1.	<i>Contextualização</i>	113
3.5.2.	<i>Estudo de fragmentação e diferenciação do DASAI por MS²</i>	115
3.5.3.	<i>Análise Energética dos Isômeros do DASAI Protonado Durante o</i> <i>Processo de Photoswitching</i>	119
3.5.4.	<i>Espectroscopia IRMPD dos Isômeros do DASAI Protonado</i>	122
3.5.5.	<i>Espectroscopia UVPD dos Isômeros do DASAI Protonado</i>	124
3.5.6.	<i>Acompanhamento da Evolução da Reação por Espectrometria de</i> <i>Mobilidade Iônica</i>	129
3.5.7.	<i>Conclusão</i>	134
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	135
5.	BIBLIOGRAFIA	138
6.	APÊNDICE	152

1. INTRODUÇÃO

A criação da técnica de espectrometria de massas (MS) ocorreu no fim do século XIX e começo do século XX e pode ser atribuída a vários cientistas, dentre eles Arthur Jeffrey Dempster, Josef Heinrich Elizabeth Mattauch, Eugene Goldstein, Wilhelm Wien, Francis William Aston e sir John Joseph Thomson,¹ sendo Thomson o mais aclamado dentre os citados devido aos seus experimentos com raios catódicos, que o levaram a confirmar a existência do elétron.²⁻⁴ Um século depois, a MS deixou de ser uma técnica restrita a aferição da razão massa-carga (m/z) de gases mono ou diatômicos ionizados – e seus isótopos – e se tornou uma técnica versátil e indispensável em diversas áreas de estudo.⁵

No início de seu desenvolvimento, a MS foi aplicada à indústria bélica. Um equipamento conhecido como Calutron foi utilizado em escala preparativa no enriquecimento de Plutônio durante a segunda guerra mundial.¹ Contudo, devido a sua alta sensibilidade e velocidade, foi na forma analítica que a MS foi levada para fora dos laboratórios de física. A descoberta de que a ionização por elétrons (EI)⁶ tem a capacidade de promover a dissociação de moléculas orgânicas em padrões bem definidos, chamados de padrões de fragmentação, foi a base para a criação de extensas bases de dados de moléculas orgânicas. Por elas, as moléculas podem ser identificadas pelos valores e intensidades relativas das m/z dos analitos não fragmentados – chamados íons pais, íons precursores ou íons moleculares – e de seus fragmentos – chamados de íons filhos. Até o ano de 1969, as fontes de EI e de ionização química (CI) eram as únicas disponíveis e as análises de MS eram reservadas a pequenas moléculas voláteis ou passíveis de volatilização⁷.

Outro marco no histórico da MS foi a criação de técnicas mais brandas de ionização. Fontes de ionização como ionização por eletrospray (ESI) e dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI) permitiram com que macromoléculas, antes fora do alcance da MS, fossem facilmente ionizadas e levadas ao estado gasoso, podendo, então, ser detectadas por um espectrômetro de massas.^{1,5,7} Ou, por assim dizer, estas técnicas de ionização fazem “elefantes voarem”, parafraseando as palavras de John Fenn,⁸ um dos inventores da fonte de ionização por eletrospray e vencedor do prêmio Nobel de Química em 2002. De fato, esta técnica permite obter até mesmo espectros de vírus inteiros, e mais estudos têm sido feitos para aumentar ainda mais o alcance da MS neste sentido.⁹

O advento de novas técnicas de ionização ambiente, que podem ser aplicadas a amostras com pouco ou nenhum tratamento prévio, é atualmente uma das áreas mais promissoras no tocante ao desenvolvimento de instrumentação em MS.^{10,11} Embora muitas destas técnicas de ionização

ainda sejam encontradas apenas em laboratórios de pesquisa, ao menos duas delas, a ionização de dessorção por eletrospray (DESI)¹² e a análise direta em tempo real (DART),¹³ estão disponíveis comercialmente, sendo a última comumente utilizada em aeroportos nas revistas de bagagens para identificar traços de substâncias presentes em explosivos ou drogas de abuso.

No caso da ionização por eletrospray, este tipo de fonte de ionização não fornece uma grande quantidade de energia aos analitos e não requer que as espécies tenham sido previamente volatilizadas, evitando a dissociação na fonte de ionização e – em certa extensão – uma reorganização estrutural, comuns nas fontes de ionização por elétrons.¹⁴

O uso de fontes brandas, aliado às altas taxas de obtenção de espectros e elevada sensibilidade, permitiu com que vários mecanismos de reação fossem estudados via MS, através da captura de intermediários metaestáveis ou de curto tempo de meia-vida em solução, em um processo conhecido como pesca de íons.^{15–20}

O desenvolvimento de instrumentos hifenados expandiu o horizonte de aplicações da MS e hoje os equipamentos de cromatografia gasosa ou líquida acoplados à MS (denominados GC-MS^{21,22} e LC-MS,²³ respectivamente) são extensamente utilizadas para análises e quantificações em laboratórios de análises ambientais, toxicológicas, forenses, de alimentos e em controle de qualidade farmacêutica e de materiais. Por muitas vezes, as técnicas cromatográficas acopladas à MS são os métodos analíticos de escolha definidos pelas agências reguladoras de cada área.^{24–26}

A possibilidade de analisar misturas complexas, muitas vezes incluindo centenas de analitos, fez com que essas técnicas hifenadas fossem peça fundamental nas estratégias classificadas como ciências ômicas. Temas como metabolômica,²⁷ proteômica²⁸ e lipidômica²⁹ são comuns para cientistas da área de MS e se tornaram destaque ao longo dos últimos anos, fazendo da MS uma das técnicas mais utilizadas para análises clínicas.³⁰

Recentemente, a técnica de LC-MS foi utilizada com sucesso no desenvolvimento de um método inovador de diagnóstico de pacientes portadores de SARS-COV-2, que causa a doença denominada COVID-19, desenvolvido nacionalmente poucos meses após a confirmação dos primeiros casos no Brasil. O método desenvolvido foi baseado na identificação de três peptídeos provenientes de nucleoproteínas do SARS-COV-2 e, embora seja menos sensível (identifica 83% dos casos positivos) que os testes padrão feitos via *real time* PCR, pode ser utilizado como método complementar ou alternativo, devido à alta demanda gerada durante a pandemia.³¹

Mesmo com tantos avanços, uma característica intrínseca à MS é a detecção de analitos baseada apenas em suas razões m/z , não fornecendo informações diretas sobre a estrutura e conformação dos íons estudados. Desta forma, as análises de MS se valem de processos de fragmentação para a diferenciação de isômeros. Estratégias como o uso de múltiplos eventos de fragmentação (MS^n) e o uso de fragmentos diagnósticos são úteis para a determinação estrutural, mas limitadas a moléculas que apresentem padrões de fragmentação distintos, o que não é o caso de diversos isômeros de posição e de pares de enantiômeros.^{32,33} Neste contexto, o acoplamento de técnicas espectroscópicas à espectrômetros de massas é uma poderosa ferramenta para o entendimento do comportamento conformacional de moléculas, determinação estrutural e diferenciação de isômeros.^{34,35}

A determinação estrutural de moléculas é de especial importância para o entendimento de diversos processos químicos e bioquímicos que dependem da conformação ou estereoquímica dos compostos envolvidos. Uma das aplicações mais emblemáticas acerca do estudo estrutural de biomoléculas é o desenho racional de novos fármacos baseados em sua estrutura e em ancoragem molecular.³⁶ Se antes muitos remédios tinham sua função farmacológica descobertas ao acaso, como no caso da fenolftaleína, dos sais de lítio, da isoniazida e muitos outros, este panorama mudou nos anos 1990, com a aprovação das drogas dorzolamida (agente antiglaucoma), saquinavir, indinavir, ritonavir e nelfinavir (inibidores da HIV protease).³⁷ Isto porque que estes fármacos foram racionalmente desenhados com base no conhecimento da estrutura 3D de seus alvos biológicos, derivados de dados experimentais e cálculos computacionais.³⁸

Sendo assim, na presente tese, será discutido o uso de técnicas modernas de espectroscopia de íons e espectrometria de mobilidade iônica (IMS) aplicadas ao estudo de diferentes propriedades de íons gerados a partir de moléculas bioativas, ou com potencial bioativo em meio gasoso. A partir destas técnicas, interpretadas com o auxílio de cálculos computacionais, foram avaliados os estados conformacionais, sítios de protonação e coordenação com água, presença e propriedades de interações intramoleculares e mecanismo de reação de diferentes classes de moléculas, que incluem vitaminas e derivados, aminoácidos, neurotransmissores e *photoswitches*.

Visando uma melhor compreensão do conteúdo desta tese, os fundamentos das técnicas experimentais e de cálculo computacional utilizadas serão descritos juntamente com a metodologia de estudo aqui aplicada. Um breve resumo sobre aprisionamento de íons, abordagem utilizada nos estudos aqui apresentados, foi incluído na próxima seção, para permitir

o entendimento dos resultados discutidos. Em seguida, serão apresentados os sistemas bioquímicos estudados em tópicos, cada qual contendo contextualização, resultados e conclusão. Assim, nas considerações finais, os pontos mais relevantes para cada um dos sistemas estudados são resumidos e uma correlação geral destes com o objetivo da tese é apresentada de forma conjunta.

2. FUNDAMENTOS E METODOLOGIA

Nesta tese são utilizadas técnicas complementares à MS para a diferenciação de isômeros e determinação da configuração de íons na fase gasosa. A principal técnica utilizada foi a espectroscopia de íons, que foi obtida através da estratégia chamada espectroscopia de ação. A espectroscopia de ação não é obtida pela aferição direta da absorção de fótons pelo analito, mas sim pela aferição da consequência da ação da interação fóton-analito. No caso da espectroscopia de ação acoplada à MS, a consequência medida é a extensão da fotodissociação do analito, causada pela absorção de fótons. As técnicas e processos utilizados na presente tese serão melhor detalhados nos próximos subtópicos.

As técnicas de espectroscopia de ação utilizadas foram a espectroscopia de dissociação de múltiplos fótons no infravermelho (do inglês *InfraRed Multiple Photon Dissociation*, IRMPD) e espectroscopia de fotodissociação no ultravioleta (do inglês *UltraViolet PhotoDissociation*, UVPD). No último caso, a região de análise foi estendida para a região do visível, embora a nomenclatura UVPD tenha sido mantida para tais casos. Os fundamentos destas técnicas serão abordados no tópico 2.2.

As análises de espectroscopia IRMPD na região de alta frequência (envolvendo estiramentos O-H e N-H) foram feitas no nosso grupo de pesquisa, MCPL, no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP) em um equipamento do tipo *ion trap* 3D modelo AmaZon SL (Bruker).³⁹ As análises de espectroscopia IRMPD na região de *fingerprint* ($\sim 800 - 2000 \text{ cm}^{-1}$) foram obtidas na *facility* CLIO da *Université Paris-Sud* em dois equipamentos: um *ion trap* 3D modelo Esquire (Bruker) e um FT-ICR Apex-qE (Bruker).⁴⁰ As análises de espectroscopia UVPD foram realizadas em um equipamento do tipo *linear ion trap* modelo LTQ Velos (Thermo), no *Institut Lumière Matière*, pertencente ao CNRS e à *Université Claude Bernard Lyon 1*. O funcionamento dos espectrômetros de massas do tipo aprisionamento de íons é explicado no tópico 2.1.

As análises de IMS foram realizadas no *Institut Lumière Matière*, sendo que duas diferentes técnicas foram utilizadas: espectrometria de mobilidade iônica por tubo de arraste (do inglês *Drift Tube Ion mobility spectrometry*, DTIMS), utilizando um equipamento customizado acoplado a um espectrômetro de massas do tipo TOF Maxis Impact (Bruker),⁴¹ e espectrometria de mobilidade iônica por ondas de campo assimétrico (do inglês *Field Asymmetric waveform Ion Mobility Spectrometry*, FAIMS) acoplada a espectrômetro LTQ Velos (Thermo). Os fundamentos referentes à IMS estão incluídos no tópico 2.3.

A interpretação dos resultados teve como auxílio o uso de cálculos de química computacional para a busca conformacional, obtenção dos espectros teóricos de vibração e excitação vertical, para a definição da seção de choque das espécies e para a descrição das interações intra e intermoleculares.

2.1. APRISIONAMENTO DE ÍONS

Para a realização da espectroscopia de íons via fotodissociação dentro dos espectrômetros de massas, é importante, no geral, que haja aprisionamento prévio de tais íons. Ainda que existam exceções,⁴² a maioria das análises de espectroscopia iônica são feitas em equipamentos que usam aprisionamento de Paul em sistemas quadrupolares (conhecidos como *ion traps*) ou de Penning (conhecidos como *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*, FTICR)⁴³ – Figura 1.

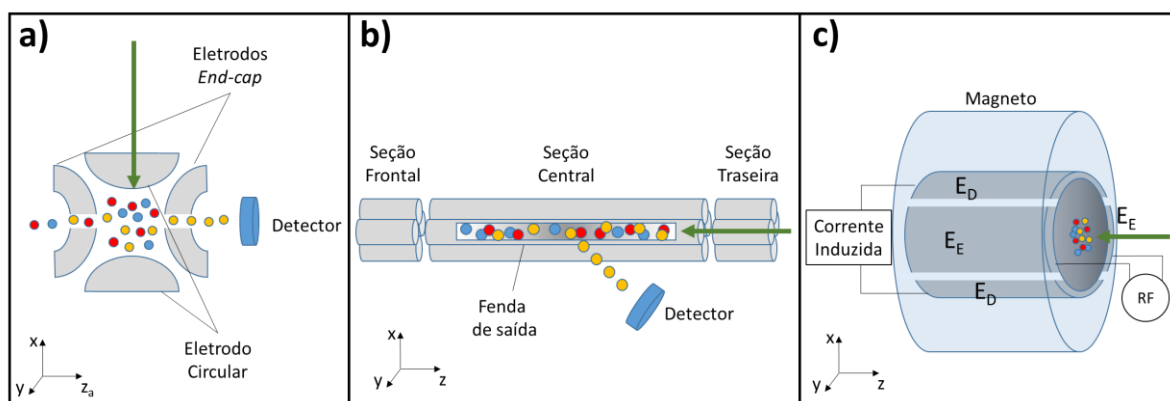


Figura 1. Representação simplificada dos seletores de massa dos instrumentos utilizados para o aprisionamento de íons: a) *ion trap* 3D; b) *ion trap* linear; c) FT-ICR, onde os eletrodos E_E são os eletrodos de excitação, os eletrodos E_D são os eletrodos de detecção. Os eletrodos de aprisionamento E_A , posicionados a frente e atrás da cela de FT-ICR, estão omitidos. Em cada esquema, a seta verde indica o caminho percorrido pelo feixe de luz.

Tais equipamentos são adequados para esse tipo de técnicas de fotodissociação por permitirem a localização da nuvem iônica em uma determinada região do espaço, o que facilita sua sobreposição ao feixe de laser e permitem modular o tempo de aprisionamento dos íons e, conseqüentemente, o tempo de interação destes com o feixe de laser. Apesar dos instrumentos apresentados serem capazes de acumular íons por alguns minutos, em uma análise de MS comum os íons são usualmente aprisionados durante uma faixa de dezenas de milissegundos. No entanto, para as realizar a espectroscopia de íons, esse tempo pode ser aumentando para que os íons sejam aprisionados por até alguns segundos, promovendo assim mais fragmentação.

Os *ion traps* foram primeiramente introduzidos na década de 1950, embora tenham sido disponibilizados comercialmente apenas na década de 1980. Tanto a sua versão tridimensional quanto a linear são baseadas em estruturas quadrupolares. Porém a diferente disposição dos eletrodos causa diferenças na movimentação dos íons, que podem ser descrita pelas equações de Mathieu.⁴⁴

No caso dos *ion traps* lineares (Figura 1b), um potencial elétrico U de corrente contínua (DC) é fixado a um par de eletrodos localizados em direções opostas. A este par de eletrodos é somado um potencial V que varia em uma radiofrequência (RF) de valor Ω . Ao outro par de eletrodos, é aplicado um potencial DC e RF de valor igual e sinal contrário. Nessas condições, o movimento dos íons nas direções x e y pode ser, então, descrito pelas equações 1 e 2:

$$\frac{d^2x}{dt^2} + \frac{2z}{mr_0^2} (U - V\cos\Omega t)x = 0 \quad (1)$$

e

$$\frac{d^2y}{dt^2} - \frac{2z}{mr_0^2} (U - V\cos\Omega t)y = 0, \quad (2)$$

onde z é a carga do íon, m a massa e r_0 é a metade da distância entre dois eletrodos no *ion trap*. Verifica-se, portanto, que o movimento dos íons depende da razão m/z dos íons. As equações acima podem ser representadas por meio de parâmetros adimensionais $u = x = -y$ fazendo com que possamos introduzir as grandezas a_i , q_i e ξ , onde

$$a_u = a_x = -a_y = \frac{8zU}{m\Omega^2 r_0^2}, \quad (3)$$

$$q_u = q_x = -q_y = \frac{4zV}{m\Omega^2 r_0^2} \quad (4)$$

e

$$\xi = \frac{\Omega t}{2}. \quad (5)$$

Dessa forma as equações 1 e 2 podem ser reescritas pela equação 6:

$$\frac{d^2u}{d\xi^2} + (a_u - 2q_u \cos 2\xi)u = 0. \quad (6)$$

Nessa equação 6, podemos observar que os parâmetros a e q podem ser ajustados para permitir que uma determinada relação m/z seja aprisionada alterando-se os potenciais U e V . Para cada m/z , haverá uma pequena faixa de valores de q e a em que a trajetória dos íons será estável no plano xy . Uma varredura nestes potenciais permite que os íons sejam selecionados de acordo com sua m/z .

Em suma, os íons são atraídos para o par de eletrodos com carga contrária à sua. Antes que eles atinjam o eletrodo, o potencial é invertido e os íons são repelidos em direção ao outro par de eletrodos. Os íons são restringidos no eixo z por um aumento no potencial DC, no caso de íons positivos, das seções frontal e traseira (Figura 1b). Tal potencial pode ser diminuído para a injeção ou ejeção de íons na cela. Os *ion traps* lineares tem com vantagem o acúmulo de íons ao longo da extensão da cela de aprisionamento, o que pode gerar maior sensibilidade.⁴⁴

Por sua vez, os *ion traps* 3D (Figura 1a) possuem dois eletrodos hiperbólicos (eletrodos *end-cap*) e um eletrodo circular que substitui dois dos eletrodos lineares, no caso dos *ion traps* lineares. Para estes equipamentos, os eletrodos *end-caps* estão eletricamente conectados, e os potenciais U e V são aplicados entre eles e o eletrodo circular. Neste caso, as equações de movimento são aplicadas nas dimensões radial r e axial z_a , assumindo a forma

$$\frac{d^2 z_a}{dt^2} - \frac{4z}{m(r_0^2 + 2z_0^2)} (U - V \cos \Omega t) z_a = 0 \quad (7)$$

e

$$\frac{d^2 r}{dt^2} + \frac{2z}{m(r_0^2 + 2z_0^2)} (U - V \cos \Omega t) r = 0. \quad (8)$$

Neste caso, os parâmetros adimensionais adquirem os valores de

$$a_u = a_{z_a} = -2a_r = -\frac{16zU}{m\Omega^2(r_0^2 + z_0^2)} \quad (9)$$

e

$$q_u = q_{z_a} = -2q_r = \frac{8zV}{m\Omega^2(r_0^2 + z_0^2)}. \quad (10)$$

Além disso, um novo parâmetro β_u é introduzido, sendo

$$\beta_u \approx \sqrt{a_u + \frac{q_u^2}{2}}. \quad (11)$$

Assim, para que a trajetória de um íon seja estável no eixo radial e axial, é necessário que β_u assuma um valor entre 0 e 1. Da mesma forma, pode-se desestabilizar a trajetória de um íon no eixo axial alterando-se os valores de U e V de modo que o parâmetro β_z seja maior que 1. Dessa forma, os íons podem ser ejetados ou levados em direção ao detector.^{5,44}

A análise de MS feita via FT-ICR (Figura 1c), por sua vez, é baseada no fato de que, quando expostos a campos magnéticos, os íons apresentam um movimento circular ressonante, chamado ressonância ciclotrônica de íons. Uma característica essencial para que esse movimento ressonante seja útil para a diferenciação de íons com diferentes m/z é o fato de que a frequência angular de um certo íon com determinada m/z será sempre o mesmo, independentemente do raio da órbita realizada.⁵

Os íons aprisionados em uma cela de FT-ICR são expostos a altos campos magnéticos constantes ($> 1\text{T}$). Tomando como base um campo magnético com linhas de campo direcionadas ao longo do eixo z , os íons sofrerão uma força perpendicular ao eixo do campo magnético, denominada força de Lorentz, que é descrita pela equação 12

$$F = zvB_0 \quad (12)$$

onde F é a força de Lorentz, z a carga do íon, v é a componente da velocidade gerada nos eixos x e y e B_0 é o campo magnético. Olhando na mesma direção do campo magnético, verifica-se que os íons positivos realizam um movimento anti-horário, enquanto íons negativos com mesma m/z realizam movimento igual, porém no sentido horário. O raio (r) da trajetória pode ser descrita pela equação 13

$$r = \frac{mv}{zB_0}. \quad (13)$$

Considerando-se que a velocidade angular $\omega = v/r$, e substituindo tais termos na equação acima, obtemos 14

$$\omega = \frac{zB_0}{m}. \quad (14)$$

Por último, considerando-se que frequência ciclotrônica é $f = \omega/2\pi$, temos que

$$f = \frac{zB_0}{2\pi m}, \quad (15)$$

ou seja, a frequência ciclotrônica é proporcional apenas ao campo magnético e inversamente proporcional à razão m/z , sendo independente da velocidade dos íons e do raio da trajetória.⁵ O campo magnético, porém, não afeta o movimento dos íons ao longo do eixo z . Para que os íons sejam aprisionados nesses eixos, são utilizados eletrodos de aprisionamento nas extremidades da cela, contendo potencial elétrico positivo, no caso de íons positivos, e negativo, no caso de íons negativos.

Antigamente, nos equipamentos de ICR – sem uso de transformada de Fourier - para que ocorresse a detecção do íon em movimento ciclotrônico, o mesmo tinha sua trajetória excitada através da aplicação de uma corrente alternada aplicada aos eletrodos de excitação em frequência igual à frequência do movimento ciclotrônico, de acordo com a equação

$$E_t = E_0 \cos \omega t, \quad (16)$$

onde E_t é a energia transmitida, E_0 é o potencial elétrico aplicado, ω é a frequência ciclotrônica e t o tempo. A amplificação da velocidade e do raio da trajetória faz com que o íon se aproxime de um dos eletrodos de detecção, gerando uma corrente elétrica causada pelo movimento dos elétrons do eletrodo em direção ao íon, no caso de íons positivos, ou em direção oposta ao íon, no caso de íons negativos. Devido ao movimento circular, o íon se aproximará, em um segundo instante, do segundo eletrodo de detecção da cela, na margem oposta ao primeiro. Essa aproximação induz acúmulo de cargas nas placas e, dessa forma, pode-se aferir a frequência ciclotrônica e, portanto, a razão m/z de um íon específico.

Todavia, o uso da transformada de Fourier permite que todos os íons sejam detectados de uma só vez. Para tal, são normalmente utilizados pulsos de excitação (*chirp*) na forma de

radiofrequências (RF) contendo uma série de frequências de excitação dos íons analisados. Com isso, os íons passam a apresentar um movimento coerente, assumindo a mesma fase, e todos são excitados conjuntamente.

Os dados obtidos são levados do domínio do tempo para o domínio da frequência através do uso da transformada de Fourier, correlacionando-se as frequências medidas aos valores de m/z . Visto que a frequência é uma das grandezas físicas medidas com maior acurácia, os equipamentos de FT-ICR são conhecidos por fornecer resultados com alta exatidão e poder de resolução.¹ Além disso, são utilizadas baixas pressões no equipamento ($<10^{-11}$ bar) e os íons expostos a campos magnéticos assumem uma ressonância ciclotrônica estável, o que faz com que eles possam ser aprisionados por muitos minutos e até mesmo horas.⁴⁵

2.2. ESPECTROSCOPIA DE AÇÃO

Como visto no tópico anterior, os espectrômetros de massas do tipo *ion trap* permitem o aprisionamento de íons por muitos segundos sem que haja perda significativa de sinal. Estes equipamentos podem ser acoplados a fontes de laser, de modo que seja realizado o processo de dissociação induzida por luz, a fotodissociação.⁴⁶ A partir desta técnica é possível utilizar o espectrômetro de massas para realizar espectroscopia de íons através da abordagem conhecida como espectroscopia de ação (Figura 2).

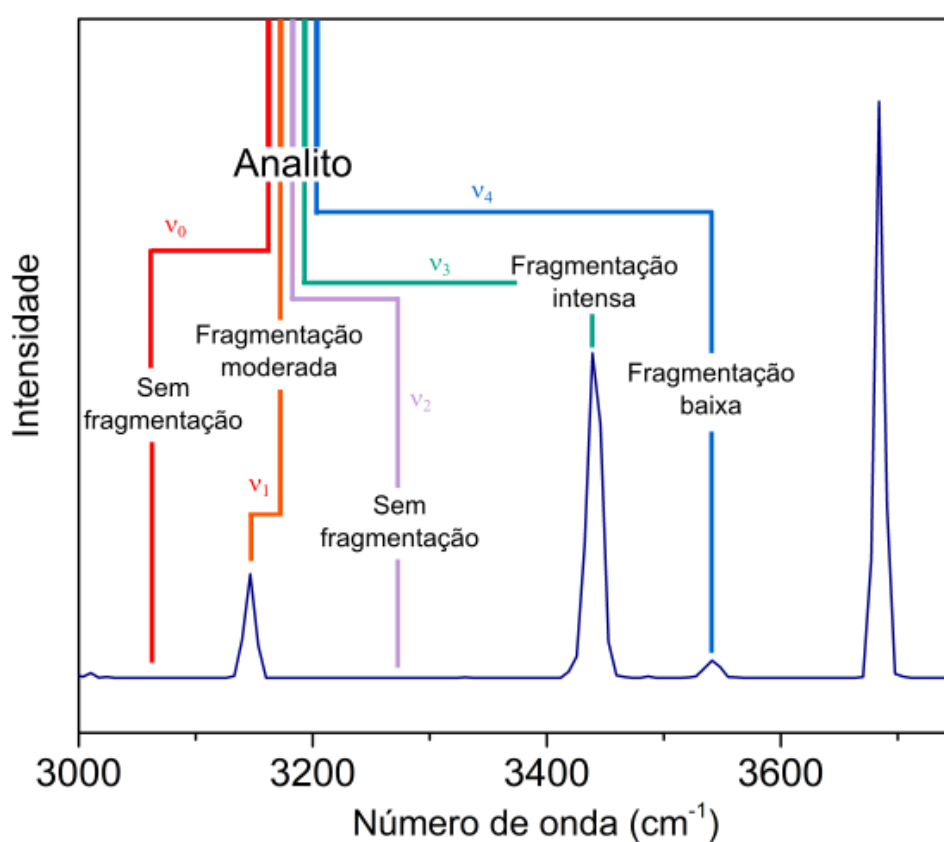


Figura 2. Espectro IRMPD da tiamina em fase gasosa. Esquema representando a obtenção do espectro na espectroscopia de ação utilizando MS na região do infravermelho. Diversos feixes de luz de diferentes energias (v) são incididas sobre o analito em tempos diferentes. Quando o analito interage com o fóton incidido, ocorre fragmentação. A intensidade da fragmentação é relacionada a intensidade da absorção.

A espectroscopia de ação é aquela em que o espectro de absorção de uma espécie é obtido não pela detecção direta da absorção, mas a partir da detecção do efeito causado pela interação da luz com o analito.⁴⁷ No caso da MS, o efeito causado é a fotodissociação das espécies analisadas, que será detectada de acordo com a formação de espécies com m/z distintas do analito. A extensão da fragmentação causada pela absorção de fótons pode ser diretamente

relacionada a absorvidade da espécie no comprimento de onda deste fóton (Figura 2). Variando a energia da luz incidida sobre o analito, obtém-se diferentes eficiências de fragmentação que podem ser correlacionadas ao espectro do analito na região espectral desejada. Desta forma, através da espectroscopia de ação é possível obter espectros de amostras em concentrações baixas, na ordem de μM , e de espécies específicas, na ausência de solventes, visto que a técnica se faz valer da sensibilidade e das outras propriedades inerentes à MS.

Como os mecanismos específicos de fotodissociação variam com relação à faixa espectral utilizadas, discutiremos em maiores detalhes a espectroscopia de fotodissociação no ultravioleta (UVPD) e no infravermelho (IRMPD) nas próximas subseções.

2.2.1. ESPECTROSCOPIA DE FOTODISSOCIAÇÃO NO ULTRAVIOLETA (UVPD)

Na espectroscopia de fotodissociação no ultravioleta (UVPD), a fragmentação ocorre em uma região de fótons muito energéticos (faixa de 300 a 1200 kJ/mol). Dada quantidade de energia geralmente causa a fragmentação das ligações do analito após a absorção de apenas um fóton. Isso se dá pois a absorção do fóton promove o íon do estado eletrônico fundamental para um estado excitado.³⁴ A partir deste estado excitado, a fotodissociação pode acontecer por ao menos três mecanismos distintos a depender da espécie, conforme representado na Figura 3.^{44,48}

O primeiro mecanismo consiste na absorção de um fóton, gerando um estado excitado. O elétron excitado pode ser transferido a um orbital em superposição ao estado excitado (do inglês *Inter-Crossing System*, ISC), sendo este um estado dissociativo (ED), levando à fragmentação (Figura 3a). O segundo mecanismo consiste na absorção de um fóton que tenha tal energia ao ponto de atingir o limiar de dissociação do estado excitado do íon em fase gasosa (Figura 3b).

Esses dois primeiros mecanismos de fragmentação acontecem de forma direta, ocorrendo na escala de tempo de femtosegundos e, no geral, rompendo a ligação diretamente relacionada ao orbital que é excitado. O terceiro mecanismo (Figura 3c) também envolve a geração de um estado excitado na etapa inicial. A transição vertical faz com que a molécula se encontre em um estado eletrônico e vibracional excitado. Ocorre, então, uma redistribuição interna da energia nos níveis vibracionais do sistema excitado, mantendo a energia interna da espécie elevada. A desativação vibracional procede até que a espécie retorne ao estado eletrônico fundamental, porém em níveis vibracionais superiores ao limiar de dissociação da espécie no estado eletrônico fundamental. Neste mecanismo, a dissociação ocorre na escala de

femto a picosegundos e a ligação mais lábil costuma ser rompida, devido a redistribuição interna de energia.

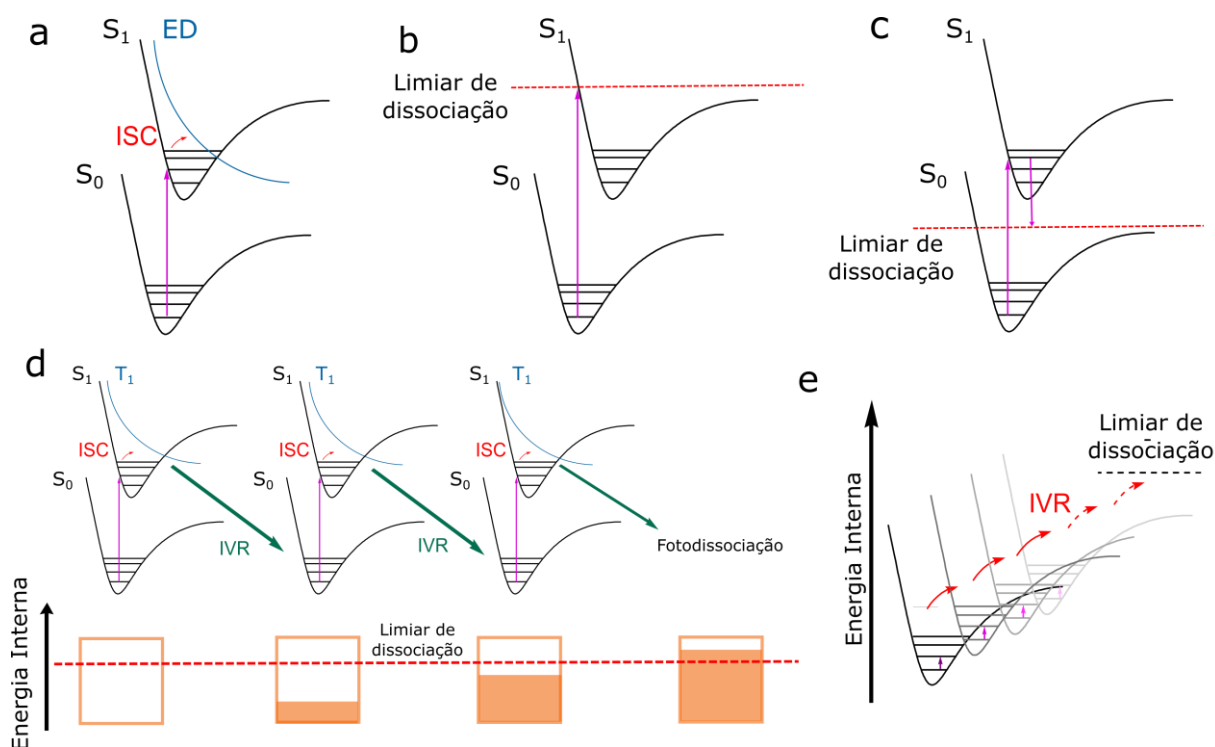


Figura 3. Mecanismos de fotodissociação na espectroscopia de ação: a) esquema do processo de fotodissociação no ultravioleta, onde após uma conversão interna (ISC), a espécie é levada a um estado dissociativo (ED);³⁴ b) absorção de um fóton com energia suficiente para alcançar o limiar de dissociação do estado excitado; c) dissociação após relaxação para um estado de energia maior que o limiar de dissociação do estado fundamental; d) esquema do processo de fotodissociação no visível, onde a dissociação pode ocorrer após múltiplas absorções.⁴⁹ e) Esquema do processo de fotodissociação na região do infravermelho, que ocorre através da absorção de múltiplos fótons seguidos por redistribuição da energia entre os níveis vibracionais.³⁹

Bouakil e colaboradores⁴⁹ demonstraram que o processo de fotodissociação no visível pode ocorrer através de um processo de absorção multifotônica intermediário entre os processos no UV e no infravermelho, onde o íon no estado excitado sofre conversão interna para um estado intermediário seguido por redistribuição energética e aumento na energia interna até que o íon atinja o limiar de dissociação (Figura 3d). Neste caso, a ligação a ser rompida também é a ligação mais lábil, como ocorre no caso do IRMPD, que será discutido a seguir.

2.2.2. ESPECTROSCOPIA DE FOTODISSOCIAÇÃO NO INFRAVERMELHO (IRMPD)

A espectroscopia de ação no infravermelho (Figura 3e), chamada de espectroscopia de fotodissociação multifotônica no infravermelho (IRMPD), como sugerido por seu nome, envolve a absorção de múltiplos fótons de energia menor do que os fótons no UV (25 a 50 kJ/mol). Após a primeira absorção de um fóton, o íon sofre relaxação através da redistribuição

interna de energia entre os demais níveis vibracionais, reduzindo a energia depositada na vibração excitada, mas mantendo a energia interna do íon elevada. A relaxação ocorre dessa forma devido à baixa pressão no espectrômetro de massas, que reduz a taxa de transferência de energia entre os íons e as espécies neutras por colisão. Após múltiplos processos de absorção e relaxação, a energia interna da molécula aumenta o suficiente para atingir o limiar de dissociação, onde a ligação mais lábil é rompida.^{34,39,50} O processo de redistribuição interna de energia ocorre na escala de picosegundos e podem ser necessários dezenas de ciclos de absorção e relaxação até que ocorra a fragmentação. A espectroscopia IRMPD é útil na determinação estrutural de íons em fase gasosa, assim como no estudo de interações inter- e intramoleculares, na determinação de sítios de ligação, entre outras aplicações.

A partir destas técnicas de espectroscopia de ação, foram desenvolvidas abordagens de dupla ressonância do tipo IR-IR e IR-UV afim de auxiliar no processo de dissociação ou permitir a seleção de populações específicas. É comum na espectroscopia IRMPD utilizar uma espécie de espectroscopia de dois fótons onde um fóton de um laser de CO₂ de alta potência e comprimento de onda fixo é seguido por um fóton de baixa potência sintonizável para permitir a varredura do espectro. Isso se faz necessário quando a potência dos sistemas sintonizáveis de bancadas do tipo OPO/OPA não são suficientes para que os íons atinjam o limiar de dissociação. Mesmo com o auxílio de lasers de CO₂, os sistemas de bancada são efetivos para a realização de IRMPD na faixa de 2500 a 4000 cm⁻¹, fazendo com que complexos lasers de elétrons livres (FEL), que dependem de aceleradores de elétrons de alta energia, sejam necessários para permitir a realização de IRMPD na faixa do fingerprint (normalmente de 600 a 2000 cm⁻¹).⁵¹ Dos FELs capazes de realizar espectroscopia IRMPD disponíveis, em apenas três instituições é possível a operação por usuários externos no regime de *facilities*.

Uma variação dessas técnicas, chamada de espectroscopia de pré-dissociação, é realizada em aparatos criogênicos que permitem com que o íon tenha uma molécula neutra chamada etiqueta ou *tag* agregado a si. Comumente são utilizados He e outros gases nobres ou gases inertes, como o N₂, permitindo uma fácil dissociação do aduto com baixo limiar de dissociação pela liberação do *tag* com a formação de apenas um único fragmento.

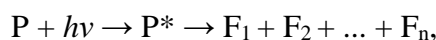
Apesar das estratégias criogênicas exigirem um aparato mais complexo, como um sistema criogênico e equipamentos construídos especificamente para estes experimentos, a redução da temperatura faz com que a largura das bandas seja drasticamente reduzida (de 20 para 5 cm⁻¹ no caso de espectroscopia no infravermelho), aumentando a resolução espectral e,

em caso de experimentos de dupla ressonância, permitindo uma melhor seleção das populações.⁴⁴

No caso específico da espectroscopia vibracional de pré-dissociação, temos que ressaltar que a energia de interação ion-tag é muito menor que a energia de ligações covalentes normalmente rompidas durante realização de espectroscopia IRMPD. Dessa forma, fontes de laser de bancada que são incapazes de gerar dissociação dos íons na região do *fingerprint* são suficientes para dissociar tais adutos, aumentando a faixa de cobertura espectral da técnica (600 – 4000 cm⁻¹) com instrumentos de bancada.

2.2.3. OBTENÇÃO DE ESPECTROS DE AÇÃO PELA EFICIÊNCIA DE FOTOFRAGMENTAÇÃO

Para todas as técnicas aqui citadas, a intensidade da absorção podem ser inferida a partir da eficiência de fotodissociação, que pode ser calculada de diferentes formas levando-se em consideração a intensidade do íon pai e de seus fragmentos.⁵² Uma forma bastante difundida é através do cálculo da constante de velocidade de primeira ordem da reação de fotodissociação. Para tal, considera-se que a fotodissociação ocorre através da reação



onde P é o íon pai, P^* é o íon ativado após a absorção do fóton e F são os n fragmentos gerados pelo íon pai. A taxa de decaimento da intensidade de íon pai em função do tempo pode ser escrita como

$$\frac{dP}{dt} = -kP, \quad (17)$$

onde P é a intensidade do íon pai, a partir da qual obtém-se uma expressão para a constante de velocidade por integração do tempo de fotodissociação (entre 0 e t) de acordo com as equações 18 e 19:

$$\int_0^t \frac{1}{P} dP = \int_0^t -k dt, \quad (18)$$

de onde

$$-kt = \ln(P)_t - \ln(P)_0. \quad (19)$$

Como em um determinado tempo t o íon pai terá formado fragmentos, produtos da reação unimolecular que ocorre após a absorção fotônica, a concentração $(P)_0$ pode ser definida como sendo igual a $P + \Sigma F_n$, sendo P a intensidade do íon pai em determinado tempo t , e F_n a concentração dos n fragmentos gerados pelo íon pai. Sendo assim, obtemos

$$-kt = \ln(P)_t - \ln(P + \Sigma F_n)_0. \quad (20)$$

A eficiência de fotofragmentação (PE) é então definida como

$$PE = kt = -\ln \frac{P}{P+\Sigma F_n}. \quad (21)$$

Todas as análises de IRMPD nesta tese tiveram suas intensidades calculadas com base na PE. Porém, nos casos em que a fotodissociação gerava muitos fragmentos com baixa intensidade, como nas análises de UVPD feitas neste trabalho, foi utilizado o rendimento de fotodissociação (PY), sendo

$$PY = \frac{\Sigma F_n}{P+\Sigma F_n}. \quad (22)$$

Vale ressaltar que muitos trabalhos não diferenciam tais equações, podendo denomina-las indiscriminadamente de eficiência ou de rendimento de fotodissociação. No entanto, como as duas foram utilizadas para diferentes fins, jugou-se necessário diferenciá-las, como consta no trabalho de Penna et al.³⁹

2.3. ESPECTROMETRIA DE MOBILIDADE IÔNICA

Assim como a espectroscopia de ação, a espectrometria de mobilidade iônica (IMS) funciona utilizando a MS como detector, sendo complementar àquela devido a sua capacidade de separar íons em fase gasosa de acordo com suas características estruturais. Isso é especialmente válido para as estratégias de mobilidades iônica que permitem o cálculo experimental da seção de choque (do inglês *Collisional Cross Section*, CCS), como o caso da mobilidade iônica em tubo de arraste (do inglês *Drift Tube Ion Mobility Spectrometry*, DTIMS). Esta é a estratégia mais direta de realizar mobilidade iônica, onde o íon em fase gasosa é acelerado por um campo elétrico enquanto percorre um caminho contendo um fluxo de gás em sentido contrário ao fluxo iônico.

Essa técnica foi desenvolvida por volta da década de 1960, embora registros de experimentos envolvendo mobilidade iônica remontam a 1898, mais de uma década antes da publicação dos trabalhos envolvendo os famosos experimentos de Thomsom acerca da MS. Embora o acoplamento da IMS com a MS – denominado IM-MS ou IMS-MS – pareça um passo lógico, visto que as duas técnicas são aplicadas na análise de íons em fase gasosa, tal acoplamento só ocorreu por volta da década de 1970.⁵³

Uma década depois, na antiga URSS, foi desenvolvida a técnica de IMS diferencial (DIMS), também chamada de espectrometria de mobilidade iônica por ondas assimétricas de campo alto (do inglês *high-Field Assymetric waveform Ion Mobility Spectrometry*, FAIMS),⁵³ que é baseada na mobilidade não-linear de íons quando expostos a campos elétricos oscilantes. Esta técnica foi primeiramente desenvolvida para a detecção de explosivos visando a identificação de minas terrestres e, por ter sido desenvolvida durante a guerra fria, teve sua descoberta e descrição escondida durante cerca de dez anos.⁵⁴ Embora a FAIMS tenha uma grande capacidade de separar íons em fase gasosa, esta técnica ainda não permite a obtenção do valor experimental da CCS.

Assim como a MS, as análises por IMS ocorrem na faixa de milissegundos, sendo, portanto, compatível com a taxa de análises dos espectrômetros de massas. Ainda, esta técnica é ortogonal à separação cromatográfica, permitindo fornecer uma segunda dimensão de separação na caracterização de espécies químicas.

Embora existam outras técnicas de mobilidade iônica, tais como TWIMS,^{55,56} TIMS⁵⁵ e DMS^{57,58} as próximas seções descreverão as técnicas de FAIMS e DTIMS, uma vez que estas foram as técnicas utilizadas na realização de experimentos nesta tese.

2.3.1. MOBILIDADE IÔNICA POR TUBO DE ARRASTE

A DTIMS é a forma mais convencional de se realizar experimentos de mobilidade iônica. Neste tipo de análise, o íon é transmitido por um tubo contendo uma série de eletrodos circulares que geram um campo elétrico na ordem de centenas de Volts, acelerando os íons em direção ao espectrômetro de massas (Figura 4). No sentido contrário, é aplicado um fluxo de gás, geralmente He ou N₂, de modo que os íons assumam velocidades diferentes de acordo com sua mobilidade.

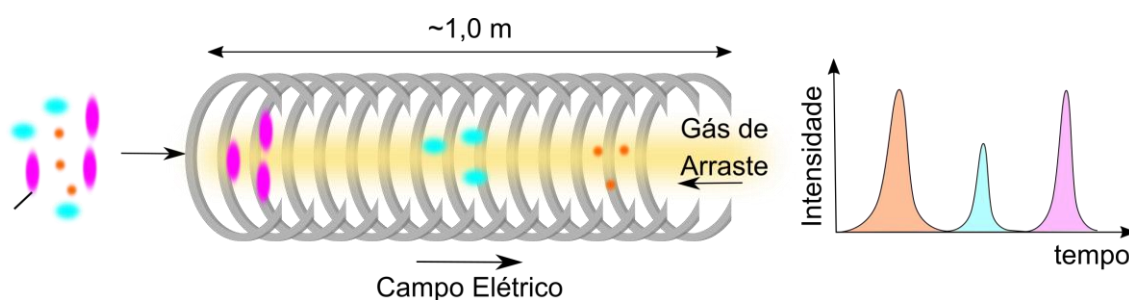


Figura 4. Esquema demonstrando o processo de separação na DTIMS. Extraído do trabalho de Penna e Correra.⁴⁷

A mobilidade K é a constante de proporcionalidade entre a velocidade v_d do íon acelerado e o campo elétrico E , de modo que

$$v_d = \frac{l}{t_d} = KE, \quad (23)$$

onde t_d é o tempo de arraste e l é o comprimento do tubo de arraste.⁵⁹ O tempo t_d pode ser descrito pela equação

$$t_d = \frac{16}{3} \frac{Nl}{zE} \sqrt{\frac{\mu k_B T}{2\pi}} \Omega, \quad (24)$$

onde N é a densidade numérica do gás de arraste, z é a carga iônica, μ é a massa reduzida do par íon-gás, k_B é a constante de Boltzmann, e Ω é a seção de choque (CCS) em Å².⁶⁰ Substituindo a equação 24 na 23, temos uma expressão para K ,⁶¹ sendo esta

$$K = \frac{3}{16} \frac{zE}{N\Omega} \sqrt{\frac{2\pi}{\mu k_B T}}. \quad (25)$$

Visto que os experimentos de DTIMS são feitos a N e T constantes, a mobilidade K pode ser obtida pela equação 23, realizando-se experimentos em diferentes E , correlacionando-os aos respectivos t_d .⁶² A partir do resultado de K , pode-se obter o valor da CCS de um determinado íon. Para que os resultados sejam comparáveis em sistemas e laboratórios diferentes, considera-se geralmente o valor de mobilidade reduzida K_0 , normalizada pelas condições padrão de pressão e temperatura ($T_0 = 273,15$ K, $N_0 = 2,687 \times 10^{25}$ m⁻³, $P_0 = 1$ bar), de onde se obtém

$$K_0 = K \frac{N}{N_0} = K \frac{P}{P_0} \frac{T_0}{T}. \quad (26)$$

Grosso modo, um íon mais expandido, com maior CCS, sofrerá mais colisões e terá interações com o gás de arraste, enquanto um íon mais compacto terá menos colisões e alcançará o detector em um tempo menor. Como essa expansão ou compactação dos íons são devidas ao seu estado conformacional, que por sua vez depende da estrutura destes íons, pode-se relacionar as CCSs a estrutura das espécies analisadas. Com instrumentos cada vez mais precisos, com condições rigorosamente controladas, tem sido possível construir bibliotecas de CCS de espécies iônicas,⁶³ tornando a IMS uma técnica cada vez mais relevante na caracterização molecular, especialmente no tocante a biomoléculas, nas diferentes estratégias de ciências ômicas.⁵⁹

2.3.2. SEÇÃO DE CHOQUE

Através do cálculo da mobilidade iônica, pode-se relacionar uma propriedade iônica macroscópica, a velocidade v_d , a uma propriedade microscópica, a CCS. É importante, porém, pontuar que esta correlação só é possível porque na DTIMS os íons estão abaixo do limite de campo elétrico baixo, dado que a mobilidade iônica reduzida é dependente da razão E/N , podendo ser descrita por uma expansão em j termos

$$K_0 \left(\frac{E}{N} \right) = K_0(0) \left[1 + a_2 \left(\frac{E}{N} \right)^2 + a_4 \left(\frac{E}{N} \right)^4 + \dots + a_j \left(\frac{E}{N} \right)^j \right]. \quad (27)$$

Em condições de campo baixo, considera-se que a energia cinética transferida por meio das colisões é muito menor que a energia térmica do sistema e a mobilidade iônica adquire uma dependência quase desprezível em relação à razão E/N . Assim, a dependência da mobilidade iônica e a CCS pode ser modelada a partir da geometria otimizada dos íons e, a depender do cálculo realizado, das interações entre o gás de arraste e o íon.^{53,61} Ainda não há consenso sobre até qual valor de E/N esse regime de baixo campo é de fato válido, mas valores típicos utilizados na DTIMS variam de 1 a 15 Td (1 Td = 10^{-21} V/m²)

Também é importante ressaltar que, embora a CCS possa ser aproximada à média das áreas projetadas dos rotâmeros de um íon, essa não é uma propriedade intrínseca dos íons. Na realidade, a CCS é uma propriedade do par íon-gás que depende da densidade numérica do gás de arraste, da pressão, da temperatura e do tempo gasto no sistema, além da carga e da geometria do íon. Isso faz com que o evento observável seja uma distribuição de tempos de arraste (ATD) gerados pelos diferentes estados energéticos de uma população e a CCS obtida acaba sendo um valor médio representativo desta população.⁶⁰ Alguns autores definem a CCS como a integral

da transferência de momento por colisão, visto que esta propriedade engloba não apenas a área da projeção dos rotâmeros da espécie, mas também a transferência de momento devido às interações de longo alcance, geradas pela polarizabilidade das espécies.^{54,59-61}

Felizmente, as ferramentas modernas de modelagem molecular permitem o cálculo da CCS em DTIMS com excelente correspondência aos valores experimentais (Figura 5). A primeira estratégia desenvolvida, a aproximação de projeção (PA) representada pelas linhas laranjas, considerava apenas a área projetada em uma superfície perpendicular à trajetória do gás de arraste. A segunda estratégia, representada pelas linhas azuis, trata os íons e as partículas de gás como esferas rígidas e leva em consideração os choques elásticos causados pelas colisões entre gás e íon (EHSS).

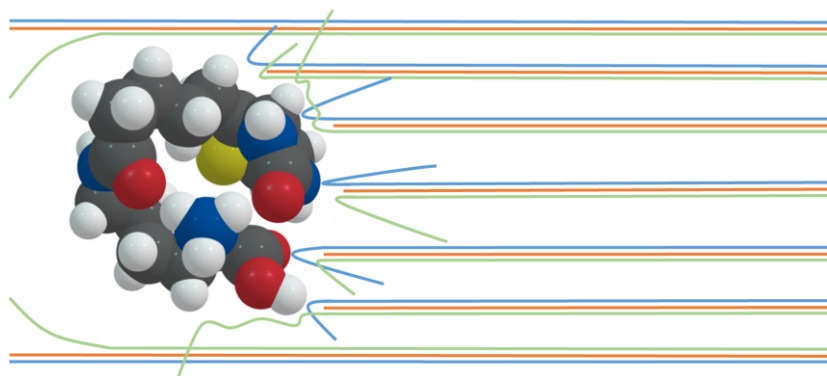


Figura 5. Estratégias de modelagem para a obtenção do valor teórico de CCS. As linhas laranjas representam o cálculo por aproximação de projeção, as linhas azuis os cálculos pelo modelo de espalhamento de esferas exatas e as linhas verdes os cálculos pelo método de trajetória. A estrutura 3D representada é uma conformação da biocitina protonada.

A terceira estratégia é o método de trajetória (TM), representado pelas linhas verdes. Nesta estratégia, além da área projetada do íon, são consideradas as colisões elásticas entre íon e gás e também são as interações de longo alcance que provocam transferência de momento entre as espécies envolvidas. Esta última abordagem tem maior custo computacional e é considerada por alguns pesquisadores como o “*gold standard*” no tocante aos cálculos de CCS.^{64,65} As duas primeiras são mais utilizadas no cálculo de íons grandes, como *nanoclusters* e proteínas, onde os efeitos de polarizabilidade não influenciam tanto os resultados experimentais quanto o tamanho do íon e sua distribuição de estados conformacionais.⁵⁴ Gabelica et al. demonstraram que para o aduto $[(\text{dTGGGGT})_4 + 3\text{NH}_4]^{5-}$, os cálculos de CSS feitos pela abordagem do TM forneceram resultados com erro menor que 3% em relação ao valor experimental. Um algoritmo modificado deste método chegou a resultados com erros menores que 1%. Os cálculos de EHSS tiveram erros entre 3 - 4% e os cálculos via PA

forneceram resultados com erros de até -13 %.⁶⁶ De fato, a acurácia dos métodos de cálculo, principalmente dos cálculos por PA e EHSS, é dependente do sistemas estudados. Esses métodos podem fornecer resultados com valores próximos aos obtidos por TM para moléculas pequenas e em corridas realizadas utilizando He como gás de arraste.⁵⁹

2.3.3. MOBILIDADE IÔNICA POR ONDAS ASSIMÉTRICAS DE CAMPO ALTO

A Figura 6 apresenta um esquema do funcionamento da técnica de FAIMS. Nesta técnica, o gás é usado para carregar os íons em direção ao detector, não para retê-los. Isto porque os íons são acelerados em direção ao espectrômetro de massas pelo fluxo de gás – geralmente He ou N₂ – e não pelo campo elétrico. Nesse arranjo, dois eletrodos separados por uma pequena distância, tipicamente de 0,5 mm, são dispostos de forma perpendicular à direção da trajetória iônica. Em um dos eletrodos é aplicada uma RF, chamada voltagem de separação (SV), com amplitude compatível com o gás de arraste, sendo tipicamente alguns kV pico a pico.

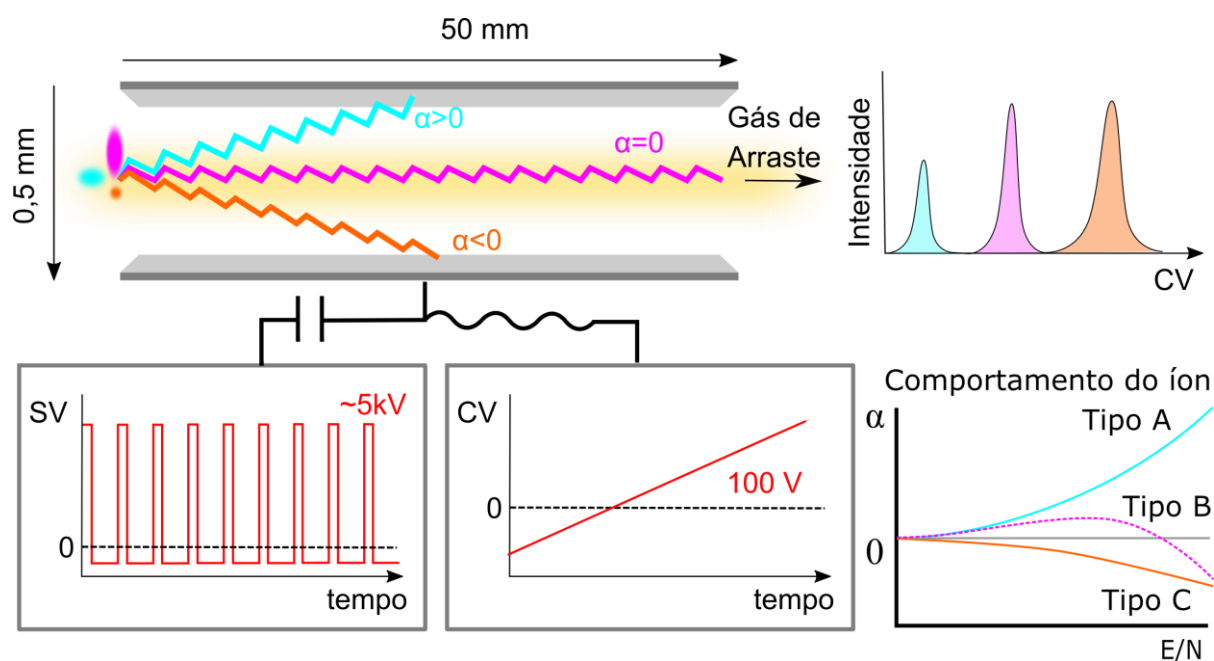


Figura 6. Esquema demonstrando o funcionamento da técnica FAIMS. Os íons são conduzidos em direção aos eletrodos por uma RF denominada SV. Uma voltagem de compensação CV é capaz de estabilizar a trajetória iônica. Varrendo-se a CV, obtém-se um espectro FAIMS. Imagem extraída de Penna e Correra.⁴⁷

Como mostrado na Figura 6, a SV é uma RF de alta frequência, porém com ondas assimétricas. Uma condição para o funcionamento da FAIMS é a de que a integral do pico positivo seja igual a integral do pico negativo, de modo que a média do campo elétrico aplicado seja nula. Para isso, o produto entre o potencial elétrico e o tempo de duração deve ser o mesmo para o pico negativo e positivo, ou seja, $V_{(+)} \times t_{(+)} = V_{(-)} \times t_{(-)}$. Portanto, se a voltagem do pico

negativo é metade da voltagem do pico positivo, a duração do primeiro deve ser duas vezes maior que a do segundo, para que esta relação seja verdadeira.⁶⁷

Assim, a FAIMS, diferentemente da DTIMS, é operada em regime de campos elétricos altos, fazendo com que a mobilidade seja dependente da razão E/N . Isso pode ser verificado por uma grandeza chamada mobilidade diferencial α exibida pelos íons, que por sua vez será uma função da mobilidade $K_0(E/N)_1$, gerada na condição de campo alto por menos tempo, e $K_0(E/N)_2$, gerada na condição de campo baixo por menos tempo.

A SV exerce uma força radial sobre os íons, o que faz com que eles sejam conduzidos em direção aos eletrodos. No entanto uma voltagem de compensação (CV) é aplicada para alterar a trajetória dos íons de modo que eles se desloquem axialmente em direção ao espectrômetro de massas. Cada CV será capaz de permitir que apenas algumas populações específicas de determinada mobilidade atinjam o detector em uma certa SV. Nessa condição, as mobilidades em campo alto e baixo serão iguais e a mobilidade diferencial será $\alpha = 0$. Varrendo-se uma faixa de CVs obtém-se um espectro de mobilidade iônica diferencial, ou espectro FAIMS.

Como supracitado, a CV para cada íon, e logo a mobilidade α , é dependente da amplitude da SV aplicada. Traçando-se uma curva de α vs SV, pode-se observar que os íons podem adquirir comportamentos denominados do tipo A, B e C (Figura 6). Os íons do tipo C possuem mobilidade reduzida com o aumento da SV. As colisões de tais íons com as moléculas do gás carreador podem ser tratadas como as de esferas rígidas, onde não há interações atrativas. Portanto, um aumento na voltagem de separação causa um aumento na energia cinética dos íons e, conseqüentemente, na energia de colisão. O aumento na energia e na frequência de colisões faz com que a mobilidade dos íons de tipo C seja reduzida.

Os íons de tipo A são aqueles que sofrem interações atrativas com as moléculas do gás carreador e/ou possíveis modificadores. Estes íons formam agregados com tais moléculas em condições de campo baixo, o que faz com que a mobilidade seja reduzida por conta no aumento do tamanho e massa do agregado em relação ao íon isolado. Esses agregados são quebrados em condições de campo alto e voltam a ser formados quando o campo baixo é reestabelecido. O aumento na SV aumenta a quantidade e energia das colisões entre íons e gás, diminuindo o tempo de permanência destes agregados e, assim, aumentando a mobilidade.

Os íons do tipo B têm um comportamento intermediário, sendo dois os mecanismos propostos para tal comportamento. No primeiro, considera-se que tais íons formam agregados, tais como íons do tipo A, porém em menor extensão e com energia de ligação mais fraca.

Portanto, em um primeiro momento, os íons do tipo B se comportam como os do tipo A. Com o aumento na SV, tais íons deixariam de formar agregados e passariam a se comportar como os do tipo C. Um segundo mecanismo propõe que, a baixas SV, os íons do tipo B interagem com moléculas de gás através de interações por polaridade, como íon-dipolo, ou dipolo-dipolo. O aumento na SV, porém, inibe tais interações, fazendo com que os íons se comportem como esferas rígidas em um segundo momento.⁶⁷ Shvartsburg⁵⁴ até mesmo propõe que todos os íons do tipo A seriam, na verdade, do tipo B se a SV fosse suficientemente alta. No entanto, a amplitude da SV é limitada pelo limiar de descarga dos gases utilizados.

A discussão acima expõe algumas características importantes da técnica FAIMS. Visto que um aumento na SV aumenta a mobilidade de íons do tipo A e diminui a de íons do tipo C, tal aumento gera um aumento na resolução do espectro. No entanto, o espaço entre os eletrodos na FAIMS é pequeno e os gases de arraste são isolantes até um certo valor de campo, atingindo um limiar onde começam a apresentar descargas elétricas. No caso do Hélio, por exemplo, não é possível utilizar E/N maiores que 400 Td em pressão ambiente.

Outra característica é a sensibilidade da técnica de FAIMS a modificadores. Pequenas quantidades de modificadores polares e/ou polarizáveis, como MeOH ou CO₂, quando adicionados ao gás de arraste, podem causar grandes mudanças no espectro de mobilidade iônica. Embora a formação de agregados gás-íons seja um fator a ser considerado nas análises de DTIMS, este é um fator essencial nas análises por FAIMS, onde até mesmo a umidade do ar pode causar alterações nos resultados.⁶⁸ No entanto, essa característica é geralmente utilizada a favor da técnica, na aplicação de modificadores a fim de melhorar a separação de populações de íons de mobilidade semelhantes.⁶⁹

Diferentemente da DTIMS, a análise por FAIMS pode ser feita em pressão ambiente, e geralmente o é. Isso faz com que não seja necessário o uso de equipamentos para redução e controle da pressão, o que facilita o acoplamento dos equipamentos de FAIMS aos espectrômetros de massas. De fato, muitas vezes é preciso apenas posicionar o aparato para realização de FAIMS em frente à entrada do espectrômetro para que seja feito o acoplamento. Neste caso, a posição da sonda de eletrospray deve ser adaptada para permitir que esteja próxima à entrada do equipamento de FAIMS, que por sua vez é instalado entre a sonda e a interface de amostragem do espectrômetro de massas. Nessas condições, a pressão ambiente implica em um maior número de colisões com o gás de arraste em um campo alto, o que faz com que a técnica de FAIMS seja conhecida por aquecer os íons em comparação com técnicas que operam em pressões mais baixas.⁷⁰

Sejam quais forem as técnicas de IMS utilizadas, muita atenção tem sido despendida no acoplamento desses aparatos à espectrometria de massas nos últimos anos, sobretudo com o surgimento de novas estratégias que produzam análises com maior resolução e reprodutibilidade. Os parâmetros controlados com precisão fazem com que a mobilidade $K_0(0)$ de um íon na DTIMS seja modelado com ótima correspondência e espera-se que o mesmo seja possível para a mobilidade diferencial α em um futuro não tão distante. Ainda assim, a ortogonalidade da IMS com outras técnicas de separação, a velocidade de análise e a capacidade de separar isômeros dificilmente distinguíveis por outras técnicas já atestam a relevância crescente da IMS nas análises das mais diversas classes de espécies químicas.

O uso sinérgico da IMS com as técnicas de espectroscopia iônica eleva ainda mais a capacidade destas técnicas na determinação conformacional e estrutural de íons. Mâitre et al. utilizaram análises de TIMS-MS em associação à espectroscopia IRMPD para estudar a dinâmica estrutural entre as espécies NAD^+ e NADH em fase gasosa e solução.⁷¹ O mesmo grupo aplicou a espectroscopia IRMPD associada à técnica de FAIMS-MS para a separação e identificação dos isômeros sarcosina, α -alanina e β -alanina.⁶⁹ Dugourd et al. utilizaram um sistema onde dois tubos de arraste são separados por um aprisionador de íons, onde podem ser incididos fótons capazes de realizar fotodissociação ou fotoconversão. Esse sistema foi utilizado para investigar fenômenos de transferências de carga em peptídeos em fase gasosa.⁷² Um aparato similar foi utilizado por Bieske et al. para desenvolver a espectroscopia de ação de fotoisomerização (PISA), onde a mobilidade de um íon é aferida no primeiro tubo e o íon é aprisionado entre o primeiro e o segundo tubo. Após a absorção fotônica, o efeito aferido, ao invés da fotofragmentação, é a magnitude da mudança estrutural de um íon, medido pela mobilidade iônica aferida no segundo tubo.⁷³ Estas estratégias são relativamente novas e certamente trarão avanços no entendimento do comportamento estrutural das mais diversas classes de íons.

2.4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Para a realização dos experimentos aqui relatados, as amostras foram preparadas em MeOH (Fluka), ACN (Fluka), grau LC-MS, ou água ultrapura tipo 1, em concentrações na ordem de 10^{-5} M. Os aminoácidos, vitaminas e derivados, a saber biotina, biocitina, tiamina e triptofano, foram obtidas comercialmente (Sigma-Aldrich). As amostras do aduto doador-aceptor de Stenhouse (DASA1) foram sintetizadas e cedidas pelo grupo do Prof. Dr. Julien de Winter (*Université de Mons*, Bélgica).

As análises de IRMPD na região de alta frequência foram realizadas no laboratório MCPL no IQ-USP e realizadas por infusão direta em um espectrômetro de massas do tipo *ion trap*, modelo Amazon SL (Bruker).³⁹ As ionizações foram realizadas via eletrospray, com a fonte de fábrica do espectrômetro, ou nanospray, com fonte desenvolvida por nosso grupo.

O espectrômetro foi modificado para que fosse possível a passagem de um feixe de laser incidindo sobre a nuvem de íons dentro da armadilha de íons. O eletrodo anelar foi perfurado de modo que dois furos opostos de 3 mm foram alinhados à uma janela de CaF_2 (Thorlabs, WG51050) na superfície externa do espectrômetro de massas, por onde é introduzido o feixe de laser. Após passar pelo primeiro furo, interagir com a nuvem iônica e sair pelo segundo furo, o laser é guiado por dois espelhos de ouro (Thorlabs, NB1-L01) dispostos a 45° dentro da câmara de vácuo, fazendo com que o feixe saia por uma segunda janela de ZnSe, permitindo que sua potência seja monitorada durante as análises.³⁹ Os valores de comprimento de onda e a potência aferida são introduzidas no arquivo bruto da análise através de um software baseado no sistema Labview de forma similar ao já descrito na literatura.⁴⁶

O aparato instrumental tem acoplado a si um sistema de osciladores paramétricos ópticos e amplificadores paramétricos ópticos (OPO/OPA) (Laservision Inc.), operando tipicamente na faixa de $2300\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$, com energias de $14\text{--}21\text{ mJ/pulso}$. O OPO/OPA é bombeado por um laser de Nd:YAG Surelite II (Continuum Laser) com um feixe de 1064 nm (530 mJ/pulso , $10\text{--}40\text{ ns}$, 10 Hz).

As análises IRMPD na região de *fingerprint* ($900\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$) foram obtidas na *facility* CLIO, na *Université Paris-Sud*, utilizando o laser de elétrons livres (FEL)⁷⁴ acoplado a um espectrômetro de massas FTICR Solarix ou ao espectrômetro do tipo *ion trap* Esquire, ambos da marca Bruker. Os detalhes referentes a estes sistemas estão descritos na literatura.⁷⁵

Os espectros vibracionais foram obtidos através do registro de um cromatograma da fragmentação dos analitos enquanto o comprimento de onda do laser incidente variava em função do tempo de análise. A eficiência de fotodissociação foi calculada conforme descrito no tópico 2.2.3. As análises foram feitas com diferentes tempos de incidência, variando de 1 a 20 pulsos por scan.

As análises do DASA1 por dissociação induzida por colisão (CID), UVPD e FAIMS foram realizadas no *Institut Lumière Matière*, na França, utilizando um LTQ Velos (Thermo Fischer Scientific) acoplado a um laser OPO/OPA Horizon (Continuum) bombeado por um laser Powerlite II Nd:YAG (Continuum) com frequência de 10 Hz e largura de pulso de 5 ns.^{49,76} As fragmentações por CID foram realizadas várias energias de ativação (chamadas neste equipamento de energia de colisão normalizada, NCE) com tempo de ativação de 10 ms. Os mesmos parâmetros foram usados para realizar MS³, isolando os fragmentos gerados pelo [DASA1+H]⁺. A fotodissociação com um único pulso de laser foi feita com um tempo de ativação de 170 ms (NCE = 0). O rendimento de foto-fragmentação (PY) foi definido como a razão de fragmentação (soma da intensidade dos íons fragmentos/intensidade dos íons precursores) corrigida para o número de fótons (~ potência do laser x comprimento de onda do laser). Uma vez que a fonte do laser não fornece energia constante em toda a faixa UV/Vis e para evitar a saturação ruído gerados pelas flutuações de energia do laser, a energia do laser foi sistematicamente reduzida durante a varredura no comprimento de onda, mantida entre 0,1-1,0 mW na faixa de 210-290 nm, 3,0-4,0 mW de 300 a 390 nm e 1,0-2,0 mW de 400 a 500 nm. Os espectros de UV/Vis em solução foram medidos com um espectrômetro de 200 nm - 1100 nm (Avantes).

As análises por FAIMS foram realizadas com um dispositivo FAIMS comercial (Heartland Mass Spectrometry)⁵⁸ acoplado ao espectrômetro de massa LTQ Velos equipado com um funil de íons de dois estágios (MassTech). A amplitude da voltagem de separação SV foi 4- 5 kV e a voltagem de compensação CV foi varrida de 0 a 16 V a uma taxa de varredura de 1 V/min. Utilizou-se N₂ como gás de arraste a um fluxo de 2 L/min. Dois conjuntos de tensões foram utilizados nos funis de estágio duplo, denominados altas e baixas voltagens de funil. Nas condições de altas voltagens de funil, os eletrodos foram ajustados a 320 V, 270 V, 200 V, 180 V, 100 V, 65 V, 10 V, e nas condições de baixas voltagens de funil, os eletrodos foram ajustados a 320 V, 270 V, 200 V, 160 V, 80 V, 10 V e 6 V.

Os espectros de DTIMS também foram obtidos no *Institut Lumière Matière*, em um instrumento desenvolvido pelo grupo do Prof. Dr. Fabien Chiroto.⁴¹ As análise de DTIMS foram

realizadas em um aparato contendo dois tubos de arraste de 79 cm, utilizando He (4,5 Torr) como gás de arraste, em temperatura ambiente. Para medir a seção de choque (CCS), o tempo de chegada dos íons foi medido em diferentes potenciais, variando de 150 V a 600 V. O CCS foi então extraído com base na relação Mason-Schamp,⁷⁷ resultando em um erro de 2 % no CCS absoluto. Um par de eletrodos localizados entre os dois tubos permite a seleção de isômeros específicos e sua injeção após a ativação colisional no segundo tubo de arraste.

2.5. CÁLCULOS COMPUTACIONAIS

Os cálculos foram realizados por servidores próprios e no cluster Heimdall, no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP). Os cálculos de busca conformacional foram feitos usando o software Spartan16⁷⁸ com o campo de força MMF94.⁷⁹ As conformações de menor energia, ou que incluíssem interações de interesse, foram otimizadas por cálculos de Teoria do Funcional de Densidade (DFT)⁸⁰ de maior nível de teoria utilizando o software Gaussian09 (rev. D01).⁸¹ Caso o nível de teoria não seja especificado, os cálculos de otimização e frequência foram realizados no nível de teoria M06-2X/6-31+G(d,p). Em alguns casos foi empregada a correção empírica de terceira ordem proposta por Grimme, denominada DFT-D3.⁸² Todas as estruturas tiveram seus espectros vibracionais calculados para garantir que não havia frequências imaginárias. A visualização gráfica das estruturas dos íons e dos espectros foram feitas através do software Chemcraft (versão 1.8).⁸³

As seções de choque teóricas (CCS) foram calculadas pelo método de trajetória, utilizando as configurações padrão implementadas no software Mobcal.⁸⁴

Cálculos de NBO foram obtidos usando o software NBO 7.0.⁸⁵ A topologia da densidade eletrônica no espaço interatômico foi obtida pela abordagem da Teoria Quântica de Átomos em Moléculas (QTAIM), usando o software AIMALL v. 17.11.14,⁸⁶ e pela abordagem de Interações Não-Covalentes (NCI), obtida pelo software NCIPLOT v. 3.0.⁸⁷ Para a visualização gráfica dos íons, caminhos de ligação, pontos críticos e superfícies, foram usados os softwares VMD v. 1.9.3,⁸⁸ Chemcraft v. 1.8⁸³ e AIMStudio (conforme implementado em AIMALL).⁸⁶

Os cálculos de excitação vertical foram feitos via TD-DFT (ω B97D/6-311++G(d,p)), CIS e CIS(D)/aug-cc-pVDZ⁸⁹ e CASSCF(12,12)/aug-cc-pVDZ⁹⁰ com correção Møller-Plesset de segunda ordem (CASMP2),⁹¹ usando no software Gaussian09 (rev. D01). O pacote NBO 3.1,⁹² foi empregado no cálculo de população e os orbitais calculados por este método foram usados para alimentar os cálculos de CASSCF. O pacote Orca 4.1.2⁹³ foi empregado nos cálculos de excitação vertical usando DFT Dupla Híbrida Dependente do Tempo (TD-DH-DFT) no nível de teoria RI-B2PLYP/aug-cc-pVDZ^{94,95} usando correção de dispersão D3BJ⁸² e utilizando o método *coupled cluster* bt-PNO-EOM-CCSD/cc-pVDZ⁹⁶ (usando def2/J⁹⁷ e cc-pVDZ/C⁹⁸ como conjuntos de bases auxiliares).

3. ESTUDO DE MOLÉCULAS COM POTENCIAL BIOATIVO

Nesta seção serão abordados os resultados obtidos durante o período do doutorado. Alguns dos tópicos seguintes já foram publicados em periódicos, e os outros serão enviados à publicação após a defesa desta tese. Os sistemas foram escolhidos para que diferentes aspectos da espectroscopia iônica e espectrometria de mobilidade iônica fossem aplicados.

O tópico 3.1 trata sobre a validação do aparato instrumental e apresenta os primeiros resultados publicados obtidos no equipamento de nosso grupo.⁹⁹ Além disso, os resultados experimentais foram comparados com uma série de cálculos teóricos com o propósito de definir-se o melhor nível de teoria para os cálculos de geometria e frequência nos estudos seguintes.

No tópico 3.2 são investigadas as interações intramoleculares do triptofano e de uma classe de moléculas com grupamentos similares, as fenilalquilaminas. Estas moléculas apresentam uma ligação do tipo $N-H^+ \cdots \pi$ que não haviam sido formalmente descritas por métodos de topologia de densidade eletrônica. O resultados deste estudo foram recentemente publicados.¹⁰⁰

O estudo acerca do sítio de protonação e conformação da biocitina em meio gasoso é descrito no tópico 3.3. Os dados experimentais sugerem que o sítio de protonação é na amina primária e que mais de uma população está acessível nas análises.

A estrutura da tiamina em meio gasoso foi determinada. Ainda, os efeitos de microssolvatação foram avaliados e o espectro experimental é condizente com a presença de duas populações. Em uma delas, a coordenação acontece longe da carga intrínseca, diferente do que seria esperado. Tais resultados são encontrados no tópico 3.4.

Por último, o tópico 3.5 mostra os resultados obtidos durante o período sanduíche, em que uma reação de fotoisomerização, do tipo *photoswitching* foi investigada por IRMPD, UVPD e IMS. Os resultados são um passo na busca pela identificação de intermediários a fim de compreender-se melhor tal mecanismo.

3.1 VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS TEÓRICOS E EXPERIMENTAIS OBTIDOS

3.1.1. CONTEXTUALIZAÇÃO

Diversas metodologias para modelagem de espécies em fase gasosa e predição de espectros vibracionais têm sido empregadas para a interpretação de espectros IRMPD. Afim de decidir-se a melhor metodologia computacional a ser empregada para a otimização geométrica e o cálculo de frequências vibracionais dos sistemas aqui estudados, pesquisou-se na literatura quais os métodos mais utilizados nos 50 artigos mais citados e nos 50 artigos mais recentes a época (Figura 7), que continham o termo *IRMPD spectroscopy*. As metodologias foram empregadas no cálculo de alguns de nossos sistemas e os espectros teóricos e experimentais foram comparados.

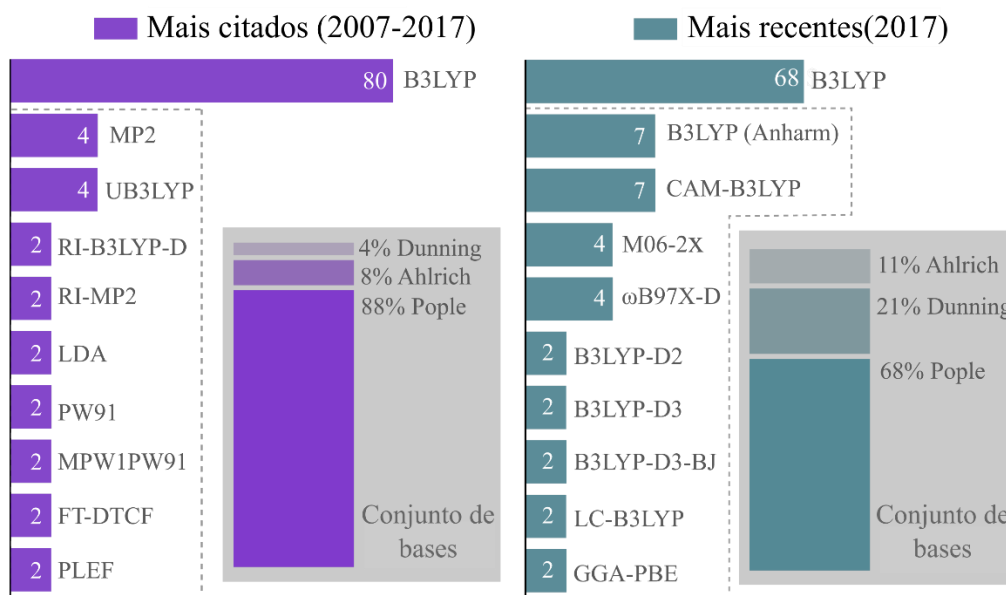


Figura 7. Porcentagem de métodos e conjuntos de base mais utilizados para prever espectros de IRMPD. Os resultados foram obtidos através da pesquisa do tópico "*IRMPD spectroscopy*" refinado pela categoria "*article*" no banco de dados do Web of Science em dezembro de 2017. À esquerda estão os dados referentes aos 50 artigos mais citados (2007-2017), enquanto à direita estão os dados dos 50 artigos mais recentes até dezembro de 2017. A lista completa pode ser encontrada no apêndice (Tabela 18 e Tabela 19). Os dados dentro da linha pontilhada foram ampliados cinco vezes para melhor visualização. FT-DTCF se refere a transformada de Fourier da função de correlação tempo-dipolo. PLEF se refere à projeção do campo elétrico local. Extraído de Rodrigues-Oliveira.⁹⁹ Copyright 2018 American Chemical Society.

Embora o uso do método B3LYP seja largamente disseminado em ambos os cenários (80% dos artigos mais citados e 68% dos mais recentes utilizam esse método), verifica-se uma diminuição na taxa de uso deste método, o que pode ser evidência de uma busca de métodos mais confiáveis. É notável a que as bases de Pople são majoritariamente utilizadas com B3LYP e ainda são os conjuntos de bases mais utilizados. No entanto, verifica-se um aumento no uso

de conjunto de bases de Dunning e de métodos que incluam correções para dispersão, anarmonicidade e interações de longo alcance. No entanto, esta mudança ainda tem sido discreta.

É importante ressaltar que os métodos DFT mais comuns são conhecidos por fornecer valores de energia com erros sistemáticos, resultantes das muitas aproximações utilizadas para descrever a densidade eletrônica, especialmente quando as espécies estudadas possuem interações de longo alcance.^{101,102} Tais erros podem influenciar na determinação da estrutura eletrônica das espécies modeladas. Por esta razão, as propriedades fornecidas por tais métodos necessitam ser ajustadas por fatores de escala (SFs) adequados a cada método.

A eficiência dos SFs tem sido amplamente discutida na literatura.^{101,103-107} Embora essa abordagem forneça boas correlações entre dados experimentais e teóricos, não há disponibilidade de SFs para todas as combinações de métodos e conjunto de bases. Ainda, o cálculo de moléculas com características químicas diferentes pode exigir o uso de SFs diferentes, e esses valores são ocasionalmente atualizados ou corrigidos por novos estudos. Como consequência, os pesquisadores frequentemente utilizam SFs empíricos para ajustar os cálculos teóricos,⁵⁰ embora esses SFs empíricos não possuam interpretações físicas e possam levar a conclusões equivocadas. Os SFs empíricos geralmente são obtidos através do ajuste de uma banda principal, aplicando-se o mesmo ajuste ao restante do espectro teórico. Outros trabalhos lançam mão do uso de SFs duplos, onde a região de alta frequência é escalada por um fator diferente da região de *fingerprint*.^{50,108}

É relevante discutir que os métodos mais utilizados para cálculos termodinâmicos não possuem precisão maior do que cerca de 10 kJ/mol.^{105,106} Esse fato pode ser problemático, visto que a energia livre relativa é muitas vezes utilizada para diferenciar espécies. Infelizmente, o uso de métodos mais acurados e os cálculos de oscilação anarmônica possuem custo computacional elevados, limitando o uso destas técnicas como método de escolha para o cálculo do espectro vibracional de múltiplas espécies, o que faz das técnicas experimentais para diferenciação de isômeros ainda mais relevantes.

Algumas abordagens de dinâmica molecular utilizadas para descrever as oscilações anarmônicas são conhecidas por fornecer bons resultados, como no caso do estudo de Gregoire e colaboradores,¹⁰⁹ onde o espectro vibracional na região de *fingerprint* é obtido considerando a presença de diferentes populações - indicadas como mínimos locais - de alguns peptídeos a 300 K. Hernandez e colaboradores¹¹⁰ realizaram uma modelagem de dinâmica molecular de Born-Oppenheimer (do inglês *Born-Oppenheimer Molecular Dynamics* (BOMD)) do

fragmento formado por 6 alaninas a partir do peptídeo AAAAAAMA a 300 K. Por esta abordagem, os espectros vibracionais são obtidos através da aplicação da transformada de Fourier à função de auto-correlação da primeira derivada do momento de dipolo, obtido nos cálculos de dinâmica molecular. Isso permitiu que os autores identificassem, no fragmento supracitado, a formação de uma ligação de hidrogênio do tipo Zundel, onde o hidrogênio está igualmente distante dos dois átomos doadores de elétrons. Uma abordagem semelhante foi utilizada por Galimberti e colaboradores, no entanto, neste caso, a transformada de Fourier é aplicada ao Tensor Polar atômico ao invés da função de auto-correlação do momento de dipolo.¹¹¹

Embora existam métodos que calculem com mais exatidão os espectros vibracionais de íons em fase gasosa, pode-se observar na Figura 7 que o uso dos métodos DFT para interpretação de espectros IRMPD ainda é dominante, e não há indícios de que esse cenário se alterará tão logo. Isso se dá porque tais métodos são menos custosos computacionalmente e pelo fato de que a resolução inerente à técnica IRMPD¹¹² – que fornece bandas com largura de aproximadamente 20 cm^{-1} – não permite com que pequenas diferenças de energia potencial sejam distinguidas. Por essa razão é relevante avaliar a efetividade dos métodos mais utilizados para calcular espectros vibracionais em fase gasosa. Os métodos utilizados neste estudo foram B3LYP, CAM-B3LYP, M06-2X e MP2 associados aos conjuntos de bases mais utilizados (6-31+G**, 6-311++G**, 6-311++G(3df,2pd), aug-cc-pVDZ e aug-cc-pVTZ). Também foi avaliado o fator de correção de dispersão proposto por Grimme (DFT-D3)⁸² e cálculos de frequência a partir do modelo de oscilador anarmônico.

3.1.2. VALIDAÇÃO INSTRUMENTAL

A avaliação dos métodos teóricos é feita comparando-se os espectros teóricos aos experimentais. Os sistemas utilizados para avaliação dos métodos de cálculo foram a biotina e o triptofano (Figura 8) dado que já havia disponível na literatura os espectros experimentais dessas moléculas.^{113,114} Visto que o aparato instrumental utilizado era novo e ainda não haviam publicações com espectros experimentais obtidos no nosso laboratório, era importante que sistemas já conhecidos fossem reproduzidos para validar a eficiência do instrumento utilizado neste estudo e nos estudos subsequentes.

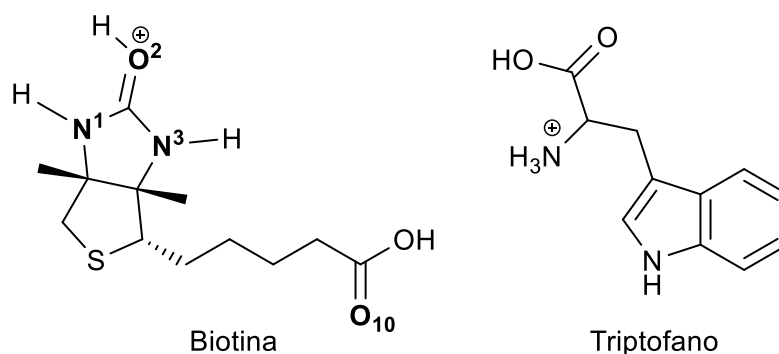


Figura 8. Estrutura química da biotina, à esquerda, e triptofano, à direita, protonados. Os oxigênios carbonílicos e as amidas estão destacadas e discriminadas por números.

O segundo motivo reside no fato de que os dois sistemas possuem interações intramoleculares. Esse tipo de interação apresenta anarmonicidade maior que uma ligação comum, o que faz com que a aproximação do oscilador harmônico não descreva as bandas envolvidas em vibrações afetadas por estas interações de maneira satisfatória. O resultado disso são bandas mais alargadas no espectro experimental e que, no geral, apresentam um desvio para as regiões de menor frequência comparadas aos cálculos teóricos.

Tabela 1. Descrição dos osciladores e comparação entre bandas de absorção experimentais e da literatura em cm^{-1} .

	Oscilador	Literatura	Experimental
<i>Biotina</i>	σ C–H	2960	2958
	σ C=O ⁺ –H \cdots O	3180	3183
	σ N–H (sim)	3405	3406
	σ N–H (assm)	3475	3480
	σ O–H	3562	3567
<i>Triptofano</i>	σ N–H $\cdots\pi$	3044 ^a	3059
	σ N–H \cdots O	3123 ^a	3121
	σ NH ₃ (assim)	3340	3335
	σ N–H (indol)	3500	3500
	σ O–H	3555	3553

^a Extraído do trabalho de Pereverzev et al.¹¹⁵

O espectro da biotina foi comparado com o obtido por Fraschetti e colaboradores¹¹³ (Tabela 1 e Figura 9A) e as bandas mostraram variação de 2 a 5 cm^{-1} . Embora o padrão de intensidade seja diferente, ressalta-se o fato de que nosso grupo obteve uma sensibilidade maior nas bandas da faixa de 2700-3300 cm^{-1} , permitindo a detecção de bandas que foram descritas anteriormente com intensidades duas ordens de magnitude mais fracas (Figura 9C).

O espectro do triptofano foi comparado com o obtido por Mino e colaboradores¹¹⁴ e mais uma vez a variação entre as bandas foi baixa, diferindo de 0 a 5 cm^{-1} (Tabela 1 e Figura 9B). No entanto, o padrão de intensidade foi bem parecido com o da literatura, mostrando uma boa proporção entre as regiões de maior e menor número de onda do espectro. Além disso, para obtenção dos espectros do nosso grupo, foram utilizados 5 pulsos de laser, enquanto na literatura utilizou-se 20 pulsos para a biotina e 15 pulsos para o triptofano, o que pode justificar diferenças na razão sinal/ruído.

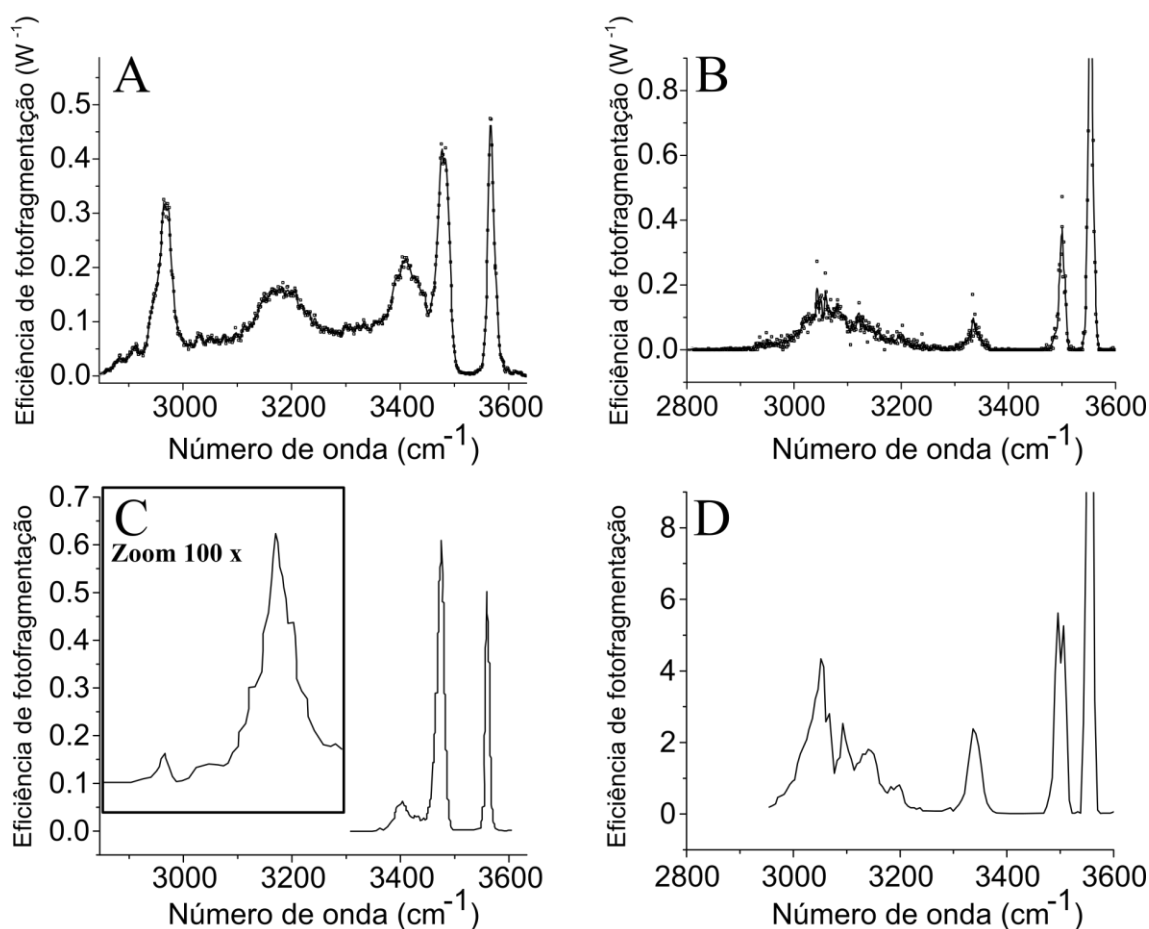


Figura 9. Espectro IRMPD de A) biotina protonada, B) Triptofano protonado (ambos obtidos por nosso grupo), C) biotina protonada e D) triptofano protonado (ambos obtidos da literatura). Visto que o espectro C, publicado por Frascetti e colaboradores, não foi corrigido pela potência, o espectro A também é reportado sem a correção. Extraído de Rodrigues-Oliveira.⁹⁹ Copyright 2018 American Chemical Society.

No caso do triptofano, os estiramentos $\text{N-H}\cdots\text{O}$ e $\text{N-H}\cdots\pi$, bastante alargados devido à anarmonicidade causada pelas interações intramoleculares, foram comparados com o trabalho de Pereverzev et al.¹¹⁵ para contornar a dificuldade de definir o centro dessas bandas. O estudo citado foi realizado a 5 K, e nele foram identificados dois confôrmers de triptofano que contribuem para o espectro de infravermelho obtido, uma vez que ambos diferem em apenas 2

kJ/mol. Nossa análise mostrou uma melhor correspondência com os números de onda mostrados pelo confômero de energia mais alto. Portanto, as bandas experimentais foram comparadas com esses números de onda. Tomando como base a boa correspondência entre os métodos reportados na literatura e os obtidos experimentalmente, pode-se atestar a eficiência do aparato instrumental utilizado para os demais estudos.

3.1.3. AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS COMPUTACIONAIS

O estudo de Fraschetti¹¹³ demonstrou que a protonação da biotina ocorre no oxigênio carbonílico do grupamento ureido, fazendo com que as espécies assumam uma conformação torcida, na qual o oxigênio carboxílico interage com o próton (Figura 10). O espectro vibracional calculado é afetado principalmente por diferenças na distância da ligação de hidrogênio e no ângulo diédrico γ , representados na Figura 10.

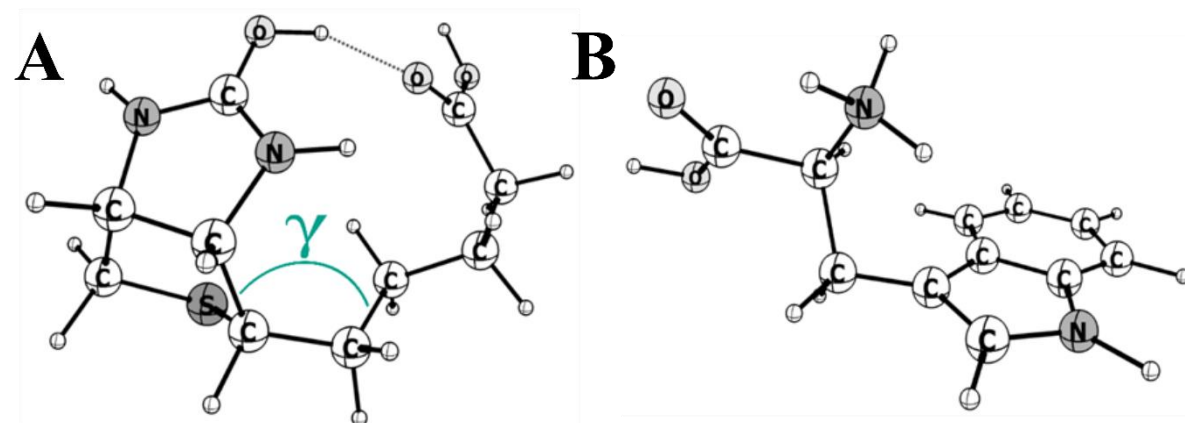


Figura 10. Geometria calculada da A) biotina protonada e B) triptofano protonado. Extraído de Rodrigues-Oliveira.⁹⁹ Copyright 2018 American Chemical Society.

A protonação do triptofano ocorre no nitrogênio primário do aminoácido e os modos de vibração do NH_3 são afetados pela ligação de hidrogênio entre a amina e o oxigênio carboxílico, assim como pela interação $\text{N-H}\cdots\pi$,^{114,115} fazendo com que a região entre $2800 - 3300 \text{ cm}^{-1}$ exiba uma banda aparente alargada, que é o resultado de uma série de diferentes oscilações presentes nesta região. Além disso, a existência de mais de um confômero de baixa energia causa ampliação adicional nas regiões onde interações de van der Waals apresentam absorção.

A partir das estruturas apresentadas acima, as geometrias foram otimizadas em cada um dos níveis de teoria investigados neste estudo, e os espectros vibracionais calculados. Para realizar a correção dos espectros calculados, os SFs foram obtidos de várias fontes, uma vez que não havia uma fonte única relatando todos os valores necessários (Tabela 2). Como diferentes grupos de pesquisa usaram conjuntos de moléculas diferentes para estimar os SFs,

pode-se esperar que os mesmos dependam do conjunto de dados usado. No entanto, devido ao uso de conjuntos de moléculas extensos, contendo moléculas com diferentes características químicas, essa variação pode ser negligenciada.

Tabela 2. Fatores de escala (SFs) utilizados para corrigir as frequências calculadas para cada nível de teoria.

Método/CB ^a	6-31+G(d,p)	6-311++G(d,p)	6-311++G(3df, 2pd)	aug-cc-pVDZ	aug-cc-pVTZ
B3LYP	0.964 ^[104]	0.963 ^[116]	0.969 ^[117]	0.970 ^[104]	0.968 ^[104]
CAM-B3LYP	0.953 ^[b]	0.953 ^[116]	0.953 ^[116]	0.956 ^[116]	0.954 ^[116]
M06-2X	0.947 ^[116]	0.947 ^[116]	0.947 ^[116]	0.950 ^[116]	0.956 ^[104]
MP2	0.941 ^[104]	0.952 ^[b]	0.952 ^[117]	0.959 ^[104]	0.953 ^[104]

a) Conjunto de bases (CB) b) Esses valores não foram encontrados na literatura. Para CAM-B3LYP/6-31+G(d,p), o SF utilizado foi o mesmo do CAM-B3LYP/6-311++G(d,p). Para MP2/6-311++G(d,p) o SF utilizado foi o mesmo do MP2/6-311++G(3df, 2pd).

Também, é interessante ressaltar que os SFs apresentam grande variação entre diferentes métodos, porém pouca variação com relação à mudança no conjunto de bases.¹⁰⁴ Isso é observado nos SFs da Tabela 2. A maior variação foi observada entre MP2/6-31+G(d, p) (SF = 0,941) e MP2/aug-cc-pVDZ (SF = 0,959) - ambos os valores obtidos pelo NIST.

A comparação entre o espectro experimental e os calculados mostrou que a maioria dos cálculos não descrevem as interações de longo alcance de forma eficiente (Figura 11). O intervalo de número de onda relativo aos estiramentos C-H (2800-3300 cm⁻¹) não foi utilizado para comparações, porque os espectros calculados mostraram várias bandas nessa região e a banda experimental alargada, resultado da superposição de vários picos de estiramentos C-H, não permitiriam a atribuição precisa do centroide da banda a ser comparada (Figura 11, Tabela 3).

A fim de obter uma análise quantitativa da eficiência dos métodos de cálculo o desvio médio quadrático (RMSD) para ambos os sistemas foi calculado de acordo com a equação 28, onde N é o número de picos usados para o cálculo do erro, V_{exp} é o valor experimental do pico e V_{teo} é o valor teórico do pico. A comparação entre os RMSDs em função da metodologia usada, assim como o tempo requerido para cada cálculo, está representado na Tabela 3.

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |V_{exp}^i - V_{teo}^i|^2}, \quad (28)$$

Primeiramente não foram incluídos nos cálculos os números de onda dos estiramentos N-H e O-H envolvidos em interações de longo-alcance. O RMSD foi então recalculado para incluir as ligações de hidrogênio, como mostrado entre colchetes na Tabela 3. Comparando esses valores de RMSD com os obtidos sem as ligações de hidrogênio, observa-se que o desvio dos cálculos de biotina e triptofano foi consideravelmente maior quando as interações

intramoleculares eram consideradas, o que é explicado devido à maior anarmonicidade das vibrações geradas por estas interações, conforme descrito na literatura.¹¹⁸⁻¹²⁰

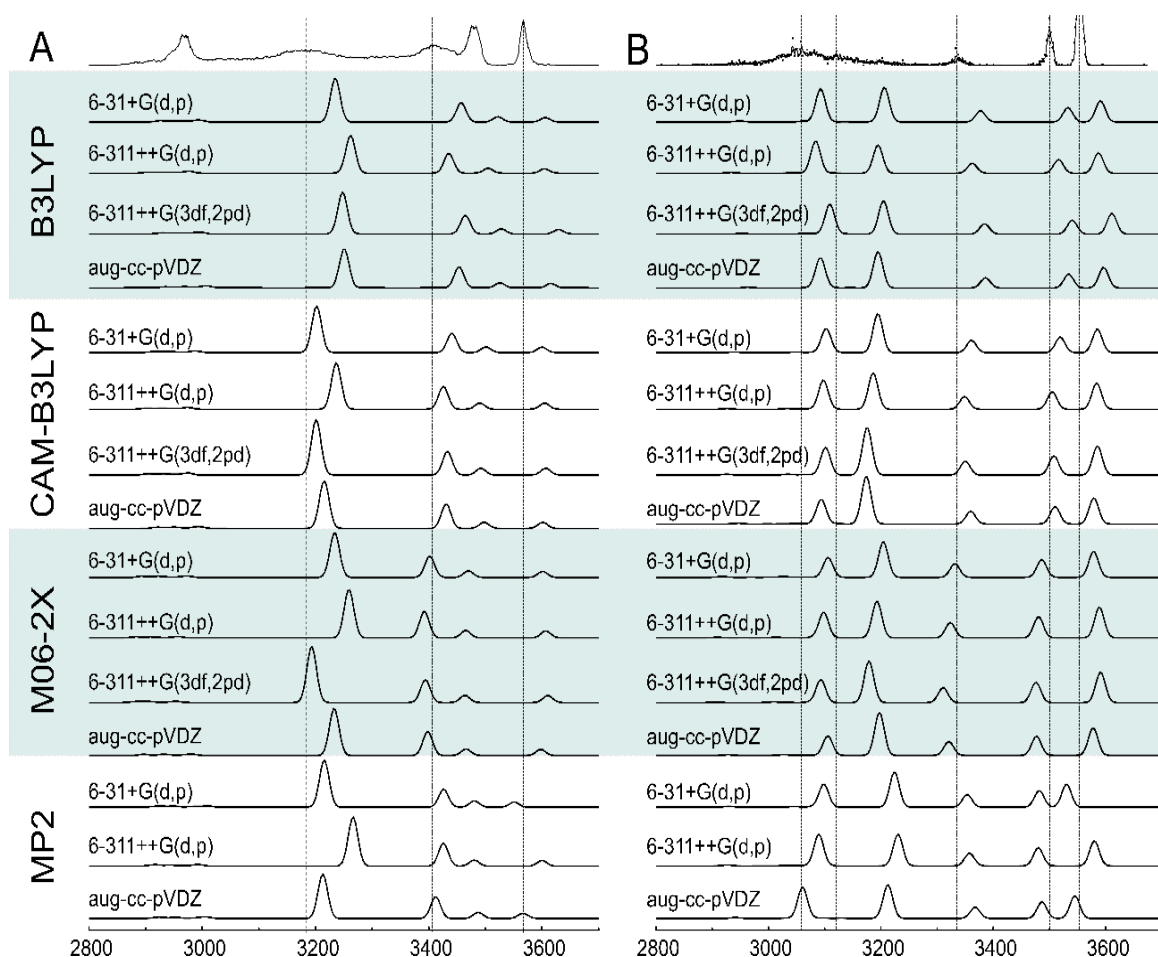


Figura 11. Espectros calculados para A) biotina e B) triptofano em comparação com seus respectivos espectros experimentais. As linhas verticais definem o pico do espectro experimental. Os espectros calculados estão corrigidos por fatores de escala encontrados na literatura. Extraído de Rodrigues-Oliveira.⁹⁹ Copyright 2018 American Chemical Society.

A afirmação de que o aumento no RMSD é causado pelos desvios gerados pela anarmonicidade é suportada pelo fato do CAM-B3LYP conseguir descrever os sistemas estudados melhor que o B3LYP, já que o método CAM-B3LYP corrige o termo da interação de troca das interações de longo alcance (do inglês *term for long-range exchange interaction*).¹⁰⁵

Ao calcular-se o RMSD sem incluir as bandas de estiramento da ligação de hidrogênio, todos os valores de RMSD diminuiriam, exceto os valores do CAM-B3LYP para biotina. Esse comportamento indica que a contribuição da banda de ligação de hidrogênio para o desvio total foi menor para o CAM-B3LYP em comparação com os outros métodos. Para o triptofano, essa

tendência não foi observada e, embora o CAM-B3LYP tenha descrito melhor as interações intramoleculares, os valores de RMSD foram bastante reduzidos quando as bandas das interações de longo alcance não foram consideradas.

Tabela 3. RMSD calculado a partir do centroide das bandas de infravermelho em cm^{-1} , excluindo e incluindo [entre colchetes] as vibrações afetadas pelas interações intramoleculares, em função do nível de teoria utilizado. O tempo requerido para os cálculos de otimização/frequência estão apresentados entre parêntesis, em min/processador.

	Método/CB	6-31+G(d,p)	6-311++G(d,p)	6-311++G(3df,2pd)	aug-cc-pVDZ	aug-cc-pVTZ
Biotina	B3LYP	45[47] (72/46)	31[48] (188/271)	57[59] (1325/1346)	44[51] (503/241)	42[43] ^{b,c} (4048/7839)
	CAM-B3LYP	34[31] (154/105)	25[35] (343.5/131)	29[26] (1564/1589)	26[28] (442.5/417)	20[18] ^{b,c} (5857/4235)
	M06-2X	21[31] (104/68)	26[44] (265/153.5)	28[24] (2063.5/2666)	26[28] (750/1080)	31[32] ^{b,c} (12062/5044)
	MP2	15[21] (681/1861)	22[46] (647/2196)	^a (11524 ^{b/a})	6[16] (4415/9837.5)	^a
Triptofano	B3LYP	38[50] (73/36)	27[40] (97/101)	50[58] (1874/1236)	43[49] (266/352)	36[47] (2928/5632)
	CAM-B3LYP	19[43] (83/61)	20[37] (238/175)	21[35] (1807/1417)	21[33] (663/371)	12[30] (1275/2016)
	M06-2X	17[45] (50/36)	24[41] (163/120)	29[38] ^b (367 ^b /524 ^b)	21[43] (597/440)	24[50] (2642/6379)
	MP2	20[52] (1981/931)	23[54] (2745/2128)	^a (6829 ^{b/a})	21[44] (4012/3456)	^a (15439 ^{b/a})

^a Análises não concluídas devido ao longo tempo demandado.

^b Cálculos feitos com 16 processadores. Todos os outros cálculos foram realizados utilizando 8 processadores.

^c Cálculos realizados utilizando o comando 'opt = calcfc' devido a problemas de convergência.

O conjunto de bases 6-311++G(3df,2pd) forneceu os piores resultados quando associado ao método B3LYP, mesmo sendo uma base estendida com funções difusas em todos os átomos. Ele mostrou boa concordância quando usado com outros funcionais, apesar de ser um conjunto de bases computacionalmente caro. É perceptível que o conjunto de bases 6-311++G(d,p) não forneceu bons resultados quando a ligação de hidrogênio foi levada em consideração. No entanto, quando a ligação de hidrogênio foi removida do cálculo do RMSD, 6-311++G(d,p) foi, na maioria dos casos, a melhor base para uso quando associado aos métodos baseados em B3LYP em ambos os sistemas.

Os cálculos de MP2 mostraram boa concordância com os espectros experimentais, mas os tempos demandados para tais cálculos foram significativamente maiores, fazendo que este não seja o método de escolha para cálculos de sistemas moleculares extensos. No entanto, como MP2/aug-cc-pVDZ foi o nível da teoria que melhor descreveu os espectros experimentais, podemos confiar nessas informações para obter um valor mais preciso da distância e ângulo γ da ligação de hidrogênio da biotina protonada no estado gasoso - 1,71Å e 75°, respectivamente.

O conjunto de bases aug-cc-pVTZ forneceu bons resultados nos cálculos dos espectros de infravermelho do triptofano e da biotina. O CAM-B3LYP forneceu bons resultados quando

associado a um conjunto de bases estendido. No entanto, os cálculos usando esse conjunto de bases consumiram muito tempo e às vezes produziam RMSDs aproximadamente iguais ou até piores que os cálculos realizados com um conjunto de bases menor. Devido ao alto custo computacional, não foi possível realizar cálculos usando esse conjunto de bases associado ao MP2.

M06-2X e CAM-B3LYP foram os métodos que apresentaram melhores resultados em um tempo razoável. M06-2X/6-31+G(d,p) foi o nível de teoria que demonstrou ter o melhor custo-benefício entre baixo erro e custo computacional, visto que foi o nível da teoria com os melhores resultados para o triptofano e o melhor dos métodos baseados em DFT para biotina quando interações de longo alcance não foram consideradas. CAM-B3LYP/aug-cc-pVDZ é mais custoso computacionalmente, porém é uma escolha razoável para modelar interações intramoleculares, como ligações de hidrogênio, com um custo aceitável.

Vale ressaltar que a determinação do centroide da banda referente à interação intramolecular do triptofano é afetada pela possível existência de múltiplas conformações, como discutido anteriormente. Esse comportamento pode ser representado pelo aumento observado no RMSD quando essa banda é utilizada para seu cálculo, conforme mostrado entre colchetes na Tabela 3.

3.1.4. CORREÇÕES DE DISPERSÃO E ANARMONICIDADE

É estabelecido na literatura que os métodos DFT mais comuns, como o B3LYP, não são eficazes na descrição de interações de longo alcance. Por conseguinte, avaliamos duas abordagens usadas para superar erros causados pela má descrição destes efeitos, além do uso de SFs. Recentemente, tem crescido o uso de cálculos de frequências anarmônicas e as correções de dispersão para a predição de espectros IRMPD.⁹⁹ A correção da dispersão empírica, proposta por Grimme para funcionais DFT (denominado DFT-D),^{82,121} é utilizada para modelar sistemas contendo interações de longo alcance, resultando em uma conformação mais confiável após a otimização. Para comparar a eficiência desses métodos na previsão dos espectros experimentais, usamos espectros teóricos não ajustados (pelo uso de SFs) e comparamos os resultados desses métodos, conforme mostrado na Tabela 4.

Os cálculos por DFT-D3, no geral, demandaram aproximadamente o mesmo tempo para terminarem em comparação aos feitos sem uso do fator D3, sendo ainda mais rápidos em algumas ocasiões.

Tabela 4. RMSD relativo aos centroides das bandas (em cm^{-1}) obtidas por cálculo não ajustados, em função do nível de teoria utilizado. O tempo requerido para os cálculos de otimização/frequência estão apresentados entre parêntesis, em min/processador.

	Método/CB	6-31+G(d,p)	6-311++G(d,p)	6-311++G(3df,2pd)	aug-cc-pVDZ
Biotina	B3LYP	175 (72/46)	176 (188/271)	170 (1325/1346)	160 (503/241)
	M06-2X	211 (104/68)	217 (265/153.5)	200 (2063.5/2666)	197 (750/1080)
	B3LYP-D3	168 (109.5/71.5)	169 (215/222)	163 (1086/1027)	151 (578/381)
	M06-2X-D3	211 (120/86)	217 (199/150)	200 (2233/1752.5)	197 (654/887)
	B3LYP anarmônico	90 (28/9434)	-	-	-
	M06-2X anarmônico	145 (55/9717)	-	-	-
	B3LYP	173 (73/36)	165 (97/101)	165 (1874/1236)	152 (266/352)
	M06-2X	217 (50/36)	212 (163/120)	205 ^a (367 ^a /524 ^a)	200 (597/440)
Tryptofano	B3LYP-D3	180 (42/44)	172 (83/128)	171 (352/509)	158 (265/569)
	M06-2X-D3	217 (45/64)	212 (62/93)	205 ^a (219 ^a /496 ^a)	200 (290.5/616)
	B3LYP anarmônico	36 (32/6580.5)	-	-	-
	M06-2X anarmônico	183 (39/7919)	-	-	-

^a Cálculos feitos com 16 processadores. Todos os outros cálculos foram realizados utilizando 8 processadores.

Para ambos os sistemas, esse fator de correção não melhorou os cálculos realizados com o M06-2X, o que era esperado, pois essa funcionalidade já inclui correção de dispersão em sua formulação. No entanto, quando aplicado ao B3LYP, diferentes tendências do valor de RMSD foram observadas para cada sistema. Para a biotina, uma comparação de cada oscilador mostra que a correção D3 melhorou a descrição da ligação de hidrogênio, enquanto piorou a descrição das bandas de estiramento simétrico e assimétrico do oscilador N-H – principalmente o primeiro – conforme detalhado nas informações de suporte (Tabela 20 e Tabela 21 no apêndice). O oscilador O-H livre mostrou pouca variação.

Os RMSDs no cálculo do triptofano foram maiores ao usar a correção D3 e, mais uma vez, observa-se uma pior descrição das bandas referentes aos estiramentos do N-H, principalmente o oscilador N-H \cdots O, que se trata de uma ligação de hidrogênio.

Uma vez que os cálculos harmônicos e anarmônicos são precedidos por etapas de otimização idênticas, o custo computacional para a otimização permanece praticamente

inalterado para ambos os métodos. Os cálculos de frequência, no entanto, foram muito dispendiosos computacionalmente. Os cálculos anarmônicos mostraram melhora na previsão dos espectros vibracionais de ambas as moléculas, mas os resultados foram tão satisfatórios quanto o uso de SFs para triptofano ao usar B3LYP.

De fato, os cálculos anarmônicos nem sempre apresentam melhores resultados do que os cálculos harmônicos, como demonstrado no trabalho de Buczek et al.¹²² Em seu estudo, os autores demonstraram que os cálculos anarmônicos não eram adequados para serem usados com um conjunto de bases pequeno, mas forneciam melhores espectros a partir do conjunto de bases 6-31+G(d,p) para os mais estendidos. No entanto, vale pontuar que eles usavam sistemas menores, como água e formaldeído. Como esse cálculo teórico demandou muito tempo, não conseguimos utiliza-lo com os conjuntos de bases mais extensos.

O uso de correções de dispersão não forneceu melhores resultados do que o uso de SFs. Esses resultados sugerem que os cálculos devem ser duplamente corrigidos usando a correção de dispersão e o SF. Johnson et al.¹⁰⁷ até mesmo propôs alguns SFs para vibrações anarmônicas - nos quais o SF para B3LYP/6-31+G(d,p) é virtualmente 1. Todavia, pode-se argumentar que se a intenção é prever espectros vibracionais e um SF é necessário, uma opção prática seria realizar um cálculo menos dispendioso e usar um SF bem estabelecido.

3.1.5. DESEMPENHO NAS REGIÕES DE BAIXA FREQUÊNCIA E *FINGERPRINT*

A partir dos dados experimentais obtidos na literatura, foram obtidas as bandas experimentais na faixa de frequência mais baixa, *fingerprint* e estiramentos envolvendo duplas ligações, por espectroscopia de pré-dissociação ou usando lasers de elétrons livres. A partir destes dados, visou-se avaliar a eficiência dos cálculos teóricos para a previsão de bandas das moléculas contendo interações de longo alcance também na faixa de frequências baixas (Tabela 5). Frascetti et al. avaliaram a região contendo os estiramentos das carbonilas da biotina e demonstraram que os números de onda dessas oscilações são afetados pela ligação de hidrogênio formada após a protonação do oxigênio.¹¹³

A Tabela 5 mostra que ambos os níveis de teoria forneceram uma boa previsão dos espectros de infravermelho, de modo que os cálculos apresentaram valores de RMSD próximos aos obtidos em frequências mais altas - 25 e 19 cm^{-1} para biotina e triptofano, respectivamente, utilizando M06-2X/6-31+G(d,p) e 25 e 14 cm^{-1} para biotina e triptofano, respectivamente, utilizando CAM-B3LYP/aug-cc-pVDZ.

Tabela 5. Comparação entre dados experimentais da literatura e calculados na região de *fingerprint* e baixa frequência, nos níveis de teoria M06-2X/6-31+G(d,p) and CAM-B3LYP/aug-cc-pVTZ.

	Oscilador	Literatura	M06-2X	CAM-B3LYP
Biotina	δ N ¹ H ₂ and N ³ H ₂ (scissoring); C ² -N ³ (stretching)	1632	1601	1612
	σ C ² =O ²	1642	1648	1646
	σ C ¹⁰ =O ¹⁰	1706	1700	1693
	σ C=C; δ C-H (wag); O-H (wag)	1425	1391	1399
Triptofano	δ NH ₃ (umbrella)	1441	1414	1435
	σ C=O	1785	1782	1751

A análise do triptofano na região da *fingerprint* foi realizada por Pereverzev et al.¹¹⁵ Como explicado anteriormente, o grupo identificou dois confôrmeros do triptofano ao usar um sistema IR-IR-UV criogênico, permitindo obter espectros altamente resolvidos. Visto que o espectro reportado para o que os pesquisadores denominaram como confôrmero A corresponde melhor ao obtido por nosso grupo, utilizamos suas bandas para realizar o cálculo de RMSD. Nesse caso, M06-2X/6-31+G(d,p) descreveu melhor o trecho C=O, enquanto CAM-B3LYP/aug-cc-pVDZ forneceu uma melhor previsão das bandas da região de *fingerprint*.

3.1.6. USO DE FATORES DE ESCALA AJUSTADOS PELO CÁLCULO

Além do uso de fatores de escala bem estabelecidos da literatura, baseados em conjuntos de testes, dois outros procedimentos difundidos na literatura são: i) ajuste dos SFs pela minimização do RMSD e; ii) ajuste do SF pela concordância forçada de uma das bandas. Na primeira abordagem, todas as bandas são multiplicadas por um fator genérico 'x', sendo o valor de x otimizado para que o RMSD do espectro atinja um valor mínimo. Na segunda, ajusta-se os dados teóricos para que uma banda escolhida se encaixe perfeitamente nos dados experimentais, aplicando-se o SF utilizado a todas as outras bandas.

Para verificar o desempenho dessas metodologias, realizamos os procedimentos de minimização do RMSD e comparamos o RMSD obtido por esses métodos com os fatores de escala bem estabelecidos, como mostra a Figura 12. Os fatores de escala obtidos para cada otimização podem ser encontrados no apêndice (Tabela 22.). Neste estudo, o ajuste via minimização de RMSD foi feito utilizando o pacote solver do software Excel H&S 2016.

Uma característica marcante da Figura 12 é que, comparando-se, para ambos os sistemas, os resultados obtidos pelo uso dos SFs da literatura com os obtidos pelo uso de SFs ajustados, pode-se observar claramente que os funcionais baseados em B3LYP são corrigidos em maior extensão que M06-2X e MP2, o que sugere que os funcionais baseados em B3LYP são mais dependentes do sistema sendo modelado do que as outras metodologias estudadas. Isso poderia indicar que tais funcionais possuem menor robustez e que a eficiência dos mesmos é mais dependente da espécie calculada, quando comparados ao M06-2X e ao MP2.

A Figura 12 mostra que, ao adotar SFs ajustados pelo cálculo, CAM-B3LYP se mostrou tão eficiente quanto B3LYP quando o menor e o maior conjunto de bases eram utilizados. Nos dois sistemas, o uso de SFs ajustados para funcionais baseados em B3LYP apresentam melhor desempenho que todos os outros métodos. A melhora no desempenho das metodologias baseadas no B3LYP não é inesperado, pois os procedimentos de ajuste produzem RMSDs mínimos por definição. No entanto, é importante pontuar que esses valores são muito menores que os RMSDs encontrados para o método *ab initio* MP2, embora não seja correto supor que a modelagem teórica resultante do cálculo de MP2 seja pior que os funcionais híbridos.

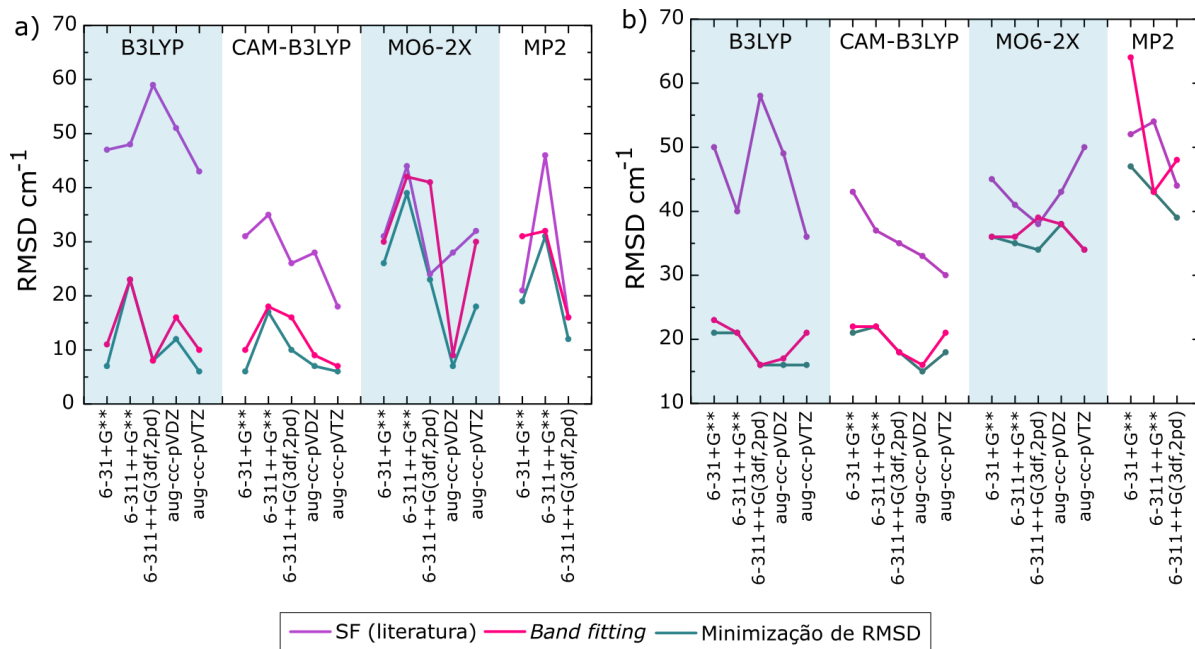


Figura 12. Comparação do RMSD quando aplicados diferentes fatores de escala aos cálculos da (a) biotina e (b) triptofano, em função da metodologia utilizada. Representados em roxo estão os cálculos utilizando fatores de escala da literatura, em rosa os fatores de escala gerados a partir do ‘fitting’ de uma das bandas e em verde o fator de escala gerado após a minimização dos erros. Extraído de Rodrigues-Oliveira.⁹⁹ Copyright 2018 American Chemical Society.

Cabe ressaltar que na escolha pelo uso de SFs otimizados pelo cálculo em que é empregado, a metodologia B3LYP forneceria os melhores resultados, apesar desta metodologia ser inadequada para a modelagem das ligações de hidrogênio, conforme descrito anteriormente. Mesmo que o uso de fatores de escala ajustados especificamente para um determinado cálculo resulte em menor RMSDs, a concordância forçada feita para a obtenção do SF pode resultar em interpretações equivocadas.

3.1.7. CONCLUSÃO

Ao realizar cálculos teóricos, é uma decisão lógica confiar em metodologias já estabelecidas para a escolha do nível de teoria a ser empregado. O funcional B3LYP se destacou como uma abordagem eficiente para o cálculo de bons espectros vibracionais em menores períodos de tempo quando comparado aos tempos empregados pelos métodos *ab initio*. No entanto, o B3LYP apresenta algumas desvantagens, como a imprecisão nos cálculos de energia e na descrição de ligações de hidrogênio e das interações de van der Waals, o que pode levar equívocos no tocante a atribuição estrutural de espécies.

Os resultados aqui apresentados sugerem que nível teoria M06-2X/6-31+G(d,p) apresenta uma boa relação custo-benefício na previsão de espectros vibracionais. Comparando esse nível de teoria com B3LYP/6-31+G(d,p), observamos pouco aumento no tempo de cálculo, enquanto a diminuição no RMSD foi significativa. Em contrapartida, para uma melhor descrição das interações de longo alcance, o funcional CAM-B3LYP parece ser a melhor escolha, principalmente quando associado aos conjuntos de base aug-cc-pVDZ ou aug-cc-pVTZ.

A correção da dispersão empírica proposta por Grimme para os métodos de DFT (DFT-D3) melhorou ligeiramente cálculos da biotina feitos utilizando B3LYP, mas, por outro lado, aumentou a RMSD dos espectros calculados do triptofano. Apesar de fornecer bandas calculadas com melhor correspondência às bandas experimentais formadas pela ligação de hidrogênio, esse cálculo piorou a descrição dos estiramentos N-H. Os cálculos anarmônicos forneceram melhores espectros vibracionais previstos do que os cálculos harmônicos quando o conjunto de base 6-31+G(d,p) foi usado. Contudo, o custo computacional foi substancialmente maior. Ainda assim, nenhuma dessas abordagens foi mais eficiente que o uso de SFs.

Deve-se notar que o SF pode ser obtido ajustando o fator de escala com base em uma das bandas de uma determinada espécie ou através da minimização de RMSD. Nesse caso, nossos resultados mostram que o método B3LYP/6-31+G(d, p) mais econômico tem melhor

desempenho – com base nos resultados de RMSD – do que as outras metodologias testadas, incluindo cálculos de MP2, apesar de sua imprecisão intrínseca.

3.2. ORIGEM DA INTERAÇÃO N-H⁺...π EM TRIPTOFANO E FENILALQUILAMINAS

3.2.1. CONTEXTUALIZAÇÃO

O triptofano (Figura 13a) é um aminoácido essencial, ou seja, faz parte do conjunto de nove aminoácidos que são essenciais à vida dos mamíferos, mas não são produzidos por tais organismos.¹²³ Essas biomoléculas participam de vários processos biológicos, tais como crescimento e manutenção celular, neurotransmissão, sinalização celular, entre outros.¹²⁴ Esta molécula é extensivamente explorada por pesquisadores na área da espectroscopia devido às suas propriedades ópticas, como absorção UV e fluorescência, que ocorrem devido a presença de um anel indol em sua estrutura. Portanto, muitos estudos são dedicados à determinação estrutural do triptofano e seus derivados em solução¹²⁵⁻¹²⁷ e em fase gasosa.^{128,129}

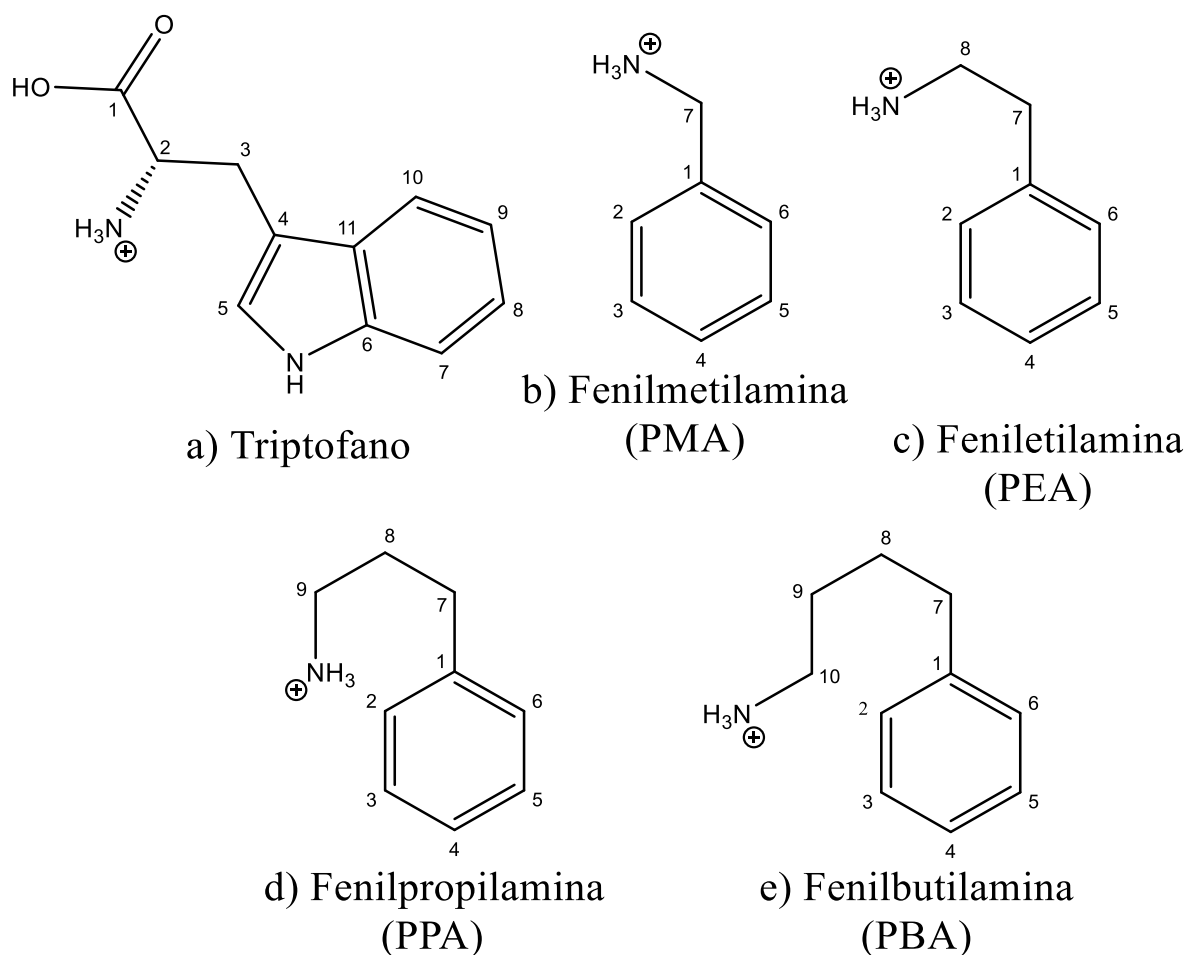


Figura 13. Estruturas do triptofano e PAAs protonados

Como descrito no tópico 3.1.3, o espectro IRMPD do triptofano protonado obtido neste estudo, assim como por outros grupos de pesquisa, apresenta uma larga banda aparente formada

pela vibração N-H envolvida na interação de longo alcance entre a amina e o sistema π do anel indol (N-H⁺... π). Observa-se que a banda experimental do estiramento N⁺-H, cujo próton interage com sistema π , tem deslocamento para regiões de menor energia (deslocamento para o vermelho, do inglês *redshift*).^{99,114,115}

Um comportamento similar é observado nas fenilalquilaminas (PAAs) protonada, contendo de 2 a 4 carbonos na cadeia lateral (Figura 13b-d). Essas moléculas não só possuem grupamentos químicos similares aos do triptofano, como também agem como neurotransmissores no corpo humano.

Segundo Chiavarino et al.,¹³⁰ os espectros da feniletilamina (PEA), fenilpropilamina (PPA) e fenilbutilamina (PBA) apresentavam deslocamento para o vermelho, em relação ao valor calculado nas bandas associadas ao estiramento N-H⁺. Isso sugere que todas espécies apresentam interação N-H⁺... π . No caso da fenilmetilamina (PMA), porém, a conformação mais estável é alcançada quando o grupo amina protonado está em uma orientação *anti* em relação ao grupo fenila (Figura 14d), o que impede não apenas a interação N-H⁺... π , mas também o alargamento e o *redshift* da banda de estiramento N-H⁺.

A modelagem destas interações intramoleculares pode ser complexa, principalmente no tocante à avaliação da força e magnitude das energias destas interações. Os métodos mais comuns empregados para descrever estas interações incluem QTAIM,¹³¹ NCI¹³² e NBO,¹³³ que foram utilizados nos últimos anos para analisar diversos sistemas.^{14,134-138}

Alguns estudos de modelagem do triptofano neutro por QTAIM e NBO demonstram que essa molécula apresenta ligação de hidrogênio entre a amina protonada e a carbonila do ácido carboxílico.^{125,139} Todavia, não há estudos descrevendo as interações intramoleculares do triptofano protonado. Os PAAs protonados em fase gasosa tiveram sua ligação N-H⁺... π avaliadas pela estratégia de análises de decomposição de energia (do inglês *energy decomposition analysis*, EDA).¹⁴⁰ Apenas o PEA e alguns de seus derivados foram analisados por NCI.^{141,142} No entanto, não há estudos que utilizem os cálculos propostos neste estudo a todos os íons citados.

Portanto, este estudo tem o objetivos de fornecer uma descrição detalhada das interações N-H⁺... π no conjunto de moléculas apresentado. A descrição deste tipo de interação é relevante devido sua presença no meio biológico, especialmente no caso das interações do tipo cátion- π em proteínas.¹⁴³⁻¹⁴⁵ Além disso, essa caracterização também é relevante para estudos relacionados a outras espécies possivelmente contenham a ligação N-H⁺... π , sendo que uma descrição formal de tais estudos é rara. Portanto, realizamos cálculos QTAIM, NBO e NCI

neste estudo para avaliar as propriedades das ligações N-H \cdots π , estimar a energia da ligação de hidrogênio e correlacionar os resultados teóricos com os resultados de espectroscopia de íons em fase gasosa.

3.2.2. CÁLCULOS DE QTAIM

A otimização estrutural das espécies, foi realizada utilizando-se o nível de teoria D3-M06-2X/6-31+G(d,p). Jabłoński and Palusiak^{146,147} demonstraram que a escolha do método e do conjunto de bases não afetam substancialmente a descrição das interações intramoleculares nos cálculos de QTAIM. Além disso, o uso de M06-2X ou outros funcionais do tipo meta-GGA híbridos, foi reportado para o estudo de sistemas similares e foram considerados adequados para tal.¹⁴⁸⁻¹⁵¹ Os três confôrmeros acessíveis reportados para o triptofano e PBA (aqui denominados A, B e C) foram considerados, e as energias relativas destas espécies são exibidas na Tabela 6. A visualização gráfica dos pontos críticos está demonstrada na Figura 14.

Tabela 6. Energia livre de Gibbs relativa (ΔG), em kJ/mol, das estruturas de menor energia do triptofano e PBA protonados.

<i>Ion</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>
<i>Triptofano</i>	0.00	0.02	0.32
<i>PBA</i>	0.00	0.53	0.83

Embora a técnica de QTAIM seja útil para descrever ligações de hidrogênio, sua interpretação é complexa, visto que a correlação entre os parâmetros obtidos nos pontos críticos de ligação (BCPs) e a força da ligação de hidrogênio não é direta.

O aumento na energia da ligação de hidrogênio pode ser avaliada por um aumento na densidade eletrônica ($\rho(r)$), onde r representa as coordenadas do BCP), pela densidade de energia cinética ($G(r)$) ou pela decréscimo na densidade de energia potencial ($V(r)$) e na densidade de energia eletrônica total ($H(r)$). Também, é geralmente observada a diminuição da distância entre o átomo de hidrogênio e o BCP da ligação de hidrogênio ($d(\text{H}\cdots\text{BCP})$). De acordo com Fuster e Grabowski¹⁵² a análise de $H(r)$ e $d(\text{H}\cdots\text{BCP})$ pode ser usada para estimar a força da ligação de hidrogênio.

Rozas et al¹⁵³ elaboraram uma classificação das ligações de hidrogênio de acordo com o laplaciano da densidade eletrônica ($\nabla^2\rho(r)$) nos BCPs, onde as ligações são consideradas fracas quando $\nabla^2\rho(r)$ e $H(r) > 0$; médias quando $\nabla^2\rho(r) > 0$ e $H(r) < 0$; fortes quando $\nabla^2\rho(r)$ e

$H(r) < 0$. Outros estudos também utilizam relações entre $H(r)$ e $G(r)$ para descrever as ligações de hidrogênio, tais como $2G(r) + V(r)$ e a razão $|V(r)|/G(r)$ ¹⁵⁴.

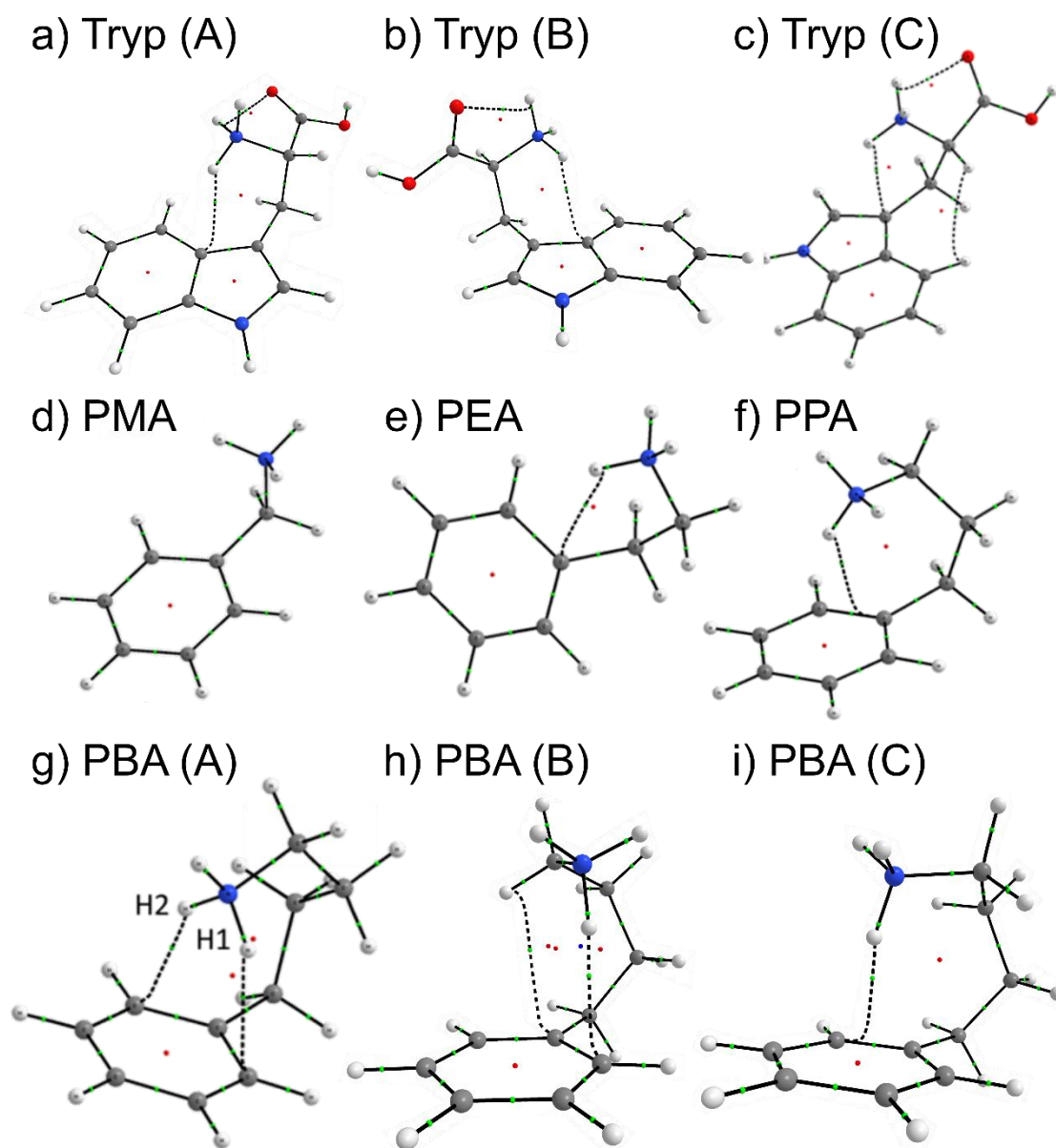


Figura 14. Estruturas 3D do a) triptofano (confômero A), b) triptofano (confômero B), c) triptofano (confômero C), d) PMA, e) PEA, f) PPA e g) PBA(confômero A), h) PBA (confômero B) e i) PBA (confômero A), incluindo as visualizações gráficas dos BCPs (pontos verdes), RCPs (pontos vermelhos) e caminhos de ligação (linhas tracejadas).

Além disso, a força das ligações de hidrogênio pode ser determinadas a partir das energias de ligação obtidas pelos cálculos de QTAIM. Grabowski propõe que as ligações de hidrogênio podem ser classificadas de acordo com suas energias (E_{HB}) como sendo fracas ($\sim 4-17$ kJ/mol), moderadas ($\sim 17-63$ kJ/mol) e fortes ($\sim 63-168$ kJ/mol).¹⁵⁵

Contudo, estimar as energias das ligações de hidrogênio intramoleculares (E_{IHB}) não é tão simples quanto as das ligações de hidrogênio intermoleculares (E_{HB}).^{140,156} No último caso, a E_{HB} é calculada pela diferença entre a energia total de um complexo (formado pela ligação de hidrogênio) e seus constituintes isolados. Já no caso da E_{IHB} , não é possível separar inteiramente estes constituintes.

Entre as estratégias existentes para o cálculo da E_{IHB} usando QTAIM, as abordagens de Espinosa (E_{IHB}^{ESP})¹⁵⁷ e de Afonin (E_{IHB}^{AF})^{156,158} se destacam, correlacionando E_{IHB} com $|V(r)|$, sendo

$$E_{IHB}^{AF} = |V(r)| \times 0.277 - 0.45 \quad (29)$$

e

$$E_{IHB}^{ESP} = |V(r)| \times 0.5. \quad (30)$$

A energia de ligação experimental pode ser estimada pela equação empírica proposta por Iogansen,¹⁵⁹ descrita como

$$-\Delta H = 0.33 \times \sqrt{(\Delta\nu - 40)}, \quad (31)$$

Onde ΔH representa a entalpia da ligação de hidrogênio e $\Delta\nu$ é a diferença em cm^{-1} entre os estiramentos D-H (onde D represente o átomo doador do próton) livres (ν_0) e ligados (ν_1). Esta equação é válida quando a ligação de hidrogênio causa um *redshift* na maior que 40 cm^{-1} na banda do estiramento D-H. Para determinar a $-\Delta H$, comparou-se a banda do estiramento $\text{N-H}^+\cdots\pi$ do PEA e PBA com a banda do N-H livre do PMA, disponíveis no trabalho de Chiavarino et al.¹³⁰ No caso do triptofano, comparou-se a frequência da banda do estiramento $\text{N-H}^+\cdots\pi$ ¹¹⁵ com a do estiramento da ligação N-H⁺ livre da glicina¹⁶⁰ (Tabela 7).

Enquanto alguns pesquisadores consideram a média entre os estiramentos simétricos e assimétricos como ν_0 ^{161,162}, nós decidimos utilizar ambos os valores, estabelecendo uma faixa estimada de $-\Delta H$ para as ligações $\text{N-H}^+\cdots\pi$. Embora a eficiência da equação 31 tenha sido demonstrada em outros trabalhos,^{156,163} ela foi formulada para determinar E_{HB} e deve ser considerada apenas como uma estimativa.

Tabela 7. Dados para o cálculo de energia de ligação empírica. Os valores ν_0 são os números de onda das bandas do estiramento N-H livre, ν_1 os números de onda referentes ao N-H+... π e $-\Delta H$ as entalpias de ligação.

Oscilador	$\nu_0 (cm^{-1})$	$\nu_1 (cm^{-1})$	$\Delta\nu (cm^{-1})$	$-\Delta H (kJ/mol)$
Triptofano	3351 (asym) /	3040 ^c	311 /	20 - 23
	3298 (sym) ^{a,c}		258	
PEA	3340 (asym) /	3143 ^d	125 /	13 - 17
	3268 (sym) ^{b,d}		197	
PBA	3340 (asym) /	3050 ^d	218 /	18 - 22
	3268 (sym) ^{b,d}		290	

^aN-H da glicina protonada. ^bN-H do PMA protonado. ^cExtraído de Pereverzev et al.¹¹⁵ ^dExtraído de Chiavarino et al.¹³⁰

Os parâmetros topológicos obtidos nos BCPs estão presentes na Tabela 8. Pode-se observar que todas as ligações de hidrogênio identificadas podem ser classificadas como fracas, visto que possuem valores positivos de $\nabla^2\rho(r)$ e $H(r)$. Isso é corroborado pelos valores de E_{IHB}^{AF} que, segundo a classificação de Grabowski,¹⁵⁵ estão dentro da faixa de ligações de hidrogênio fracas. Os valores de E_{IHB}^{ESP} , no entanto, incluiriam algumas das ligações na classificação moderada.

As interações identificadas atendem critérios para ligação de hidrogênio propostos por Kosch e Popelier.¹⁶⁴ A única exceção é encontrada no confômero C do triptofano, no qual uma interação atrativa H...H é observada entre os hidrogênios do C2 e C10. Pode-se afirmar que esta interação se trata de uma interação de van der Waals fraca, tendo-se como evidência os baixos valores de $\rho(r)$ e $|V(r)|$. Este tipo de interação já foi reportado na literatura e é motivo de algumas controvérsias quanto sua real existência.^{165,166} No geral, esta é considerada uma interação estabilizante e de natureza quântica, isto é, com contribuição majoritário do termo de troca-correlação.¹⁶⁷

Tabela 8. Parâmetros topológicos obtidos através dos cálculos de QTAIM nos BCPs: densidade eletrônica ($\rho(r)$)^a; laplaciano da densidade eletrônica ($\nabla^2\rho(r)$)^a; densidade de energia potencial ($V(r)$)^a; densidade de energia cinética ($G(r)$)^a; densidade de energia eletrônica total ($H(r)$)^a; elipsidade (ε); distância entre o hidrôgênio e o BCP ($d(H\cdots BCP)$)^b; distância entre o hidrogênio e o átomo aceptor de hidrogênio ($d(H\cdots A)$)^b; energia de ligação de hidrogênio (E_{IHB}^{AF})^c proposta por Afonin¹⁵⁶; energia de ligação de hidrogênio (E_{IHB}^{SP})^c proposta por Espinosa.¹⁵⁷; Energia calculada por EDA^{c,d 140}; Energia de ligação empírica ($-\Delta H$)^{c 159}

<i>Interação</i>	$\rho(r)/10^{-2}$	$\nabla^2\rho(r)/10^{-2}$	$V(r)/10^{-2}$	$G(r)/10^{-2}$	$H(r)/10^{-3}$	ε	$d(H\cdots BCP)$	$d(H\cdots A)$	E_{EDA}	E_{IHB}^{AF}	E_{IHB}^{Esp}	$-\Delta H$
<i>Tryp (A) (N-H$\cdots\pi$)</i>	1.71	5.51	-1.14	1.26	1.21	2.41	0.837	2.260	-	6.38	14.92	20 – 23
<i>Tryp (A) (N-H$\cdots O$)</i>	2.20	9.92	-1.90	2.19	2.88	1.83	0.892	2.136	-	11.96	24.99	-
<i>Tryp (B) (N-H$\cdots\pi$)</i>	1.68	5.42	-1.11	1.23	1.22	2.32	0.843	2.271	-	6.19	14.58	20 – 23
<i>Tryp (B) (H$\cdots O$)</i>	2.40	10.2	-2.08	2.32	2.37	0.84	0.845	2.081	-	13.26	27.34	-
<i>Tryp (C) (N-H$\cdots\pi$)</i>	2.16	6.36	-1.39	1.49	1.01	0.86	0.832	2.221	-	8.22	18.23	20 – 23
<i>Tryp (C) (H$\cdots O$)</i>	2.42	10.5	-1.94	2.29	3.44	1.75	0.837	2.095	-	12.25	25.52	-
<i>Tryp (C) (H$\cdots H$)</i>	0.58	1.95	-0.31	0.40	0.89	6.49	1.168	2.353	-	0.37	4.07	-
<i>PMA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>PEA (N-H$\cdots\pi$)</i>	1.47	5.48	-0.99	1.18	1.88	2.40	0.947	2.373	26.90/ 35.48 ^c	5.35	13.06	13 – 17
<i>PPA (N-H$\cdots\pi$)</i>	1.89	5.76	-1.21	1.33	1.13	2.51	0.822	2.280	32.72/ 44.39 ^c	6.93	15.91	-
<i>PBA (A) (N-H1$\cdots\pi$)</i>	1.13	3.63	-0.65	0.78	1.28	1.26	0.978	2.533		2.87	8.57	
<i>PBA (A) (N-H2$\cdots\pi$)</i>	1.68	4.67	-1.05	1.11	0.58	0.72	0.836	2.279		5.76	13.79	
<i>PBA (B) (N-H$\cdots\pi$)</i>	1.98	4.80	-1.18	1.19	0.10	0.78	0.780	2.188	42.51/ 57.91 ^c	6.69	15.48	18 – 22
<i>PBA (B) (C-H$\cdots\pi$)</i>	0.78	2.51	-0.41	0.52	1.10	3.43	1.362	2.885		1.08	5.35	
<i>PBA (C) (N-H$\cdots\pi$)</i>	2.10	5.84	-1.34	1.40	0.61	2.60	0.770	2.198		7.85	17.57	

^aem a.u.; ^bem Angstrom; ^cem kJ/mol; ^dEnergias calculadas por B3LYP/ ω B97D (usando 6-311++G(d,p))

Ao contrário do que foi proposto por Fuster e Grabowski,¹⁵² os valores $H(r)$ e $d(H\cdots BCP)$ não foram úteis na estimativa da força da ligação de hidrogênio para os sistemas aqui relatados. Isso pode ser devido ao foco em ligações de hidrogênio moderadas e fortes na abordagem reportada por eles. Por outro lado, os valores de $\nabla^2\rho(r)$ e $G(r)$ exibiram uma relação linear com E_{IHB}^{ESP} ($R^2 = 0,950$ e $0,984$, respectivamente, Figura 15). No caso de $\rho(r)$, os dados exibiram uma tendência linear quando a ligação $N-H\cdots O$ não foi considerada ($R^2 = 0,982$, Figura 15).

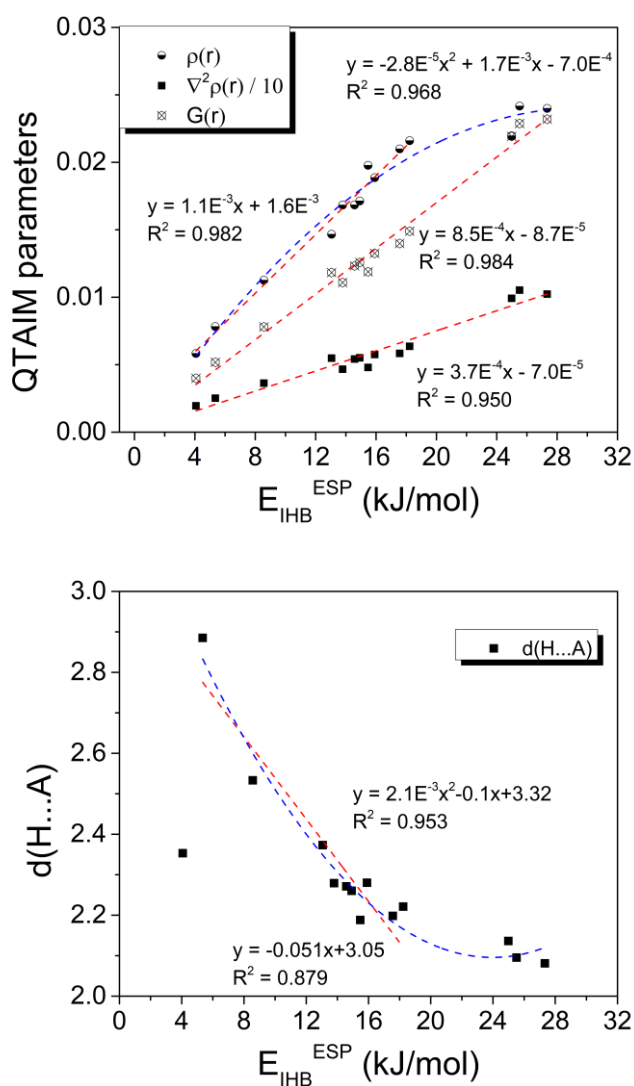


Figura 15. Acima: Correlação entre E_{IHB}^{ESP} e os seguintes parâmetros de QTAIM: $\rho(r)$ (círculos); $\nabla^2\rho(r)$ (dividido por 10, quadrados cheios); e $G(r)$ (círculos cruzados). As linhas de tendência são representadas pelas linhas tracejadas vermelha (ajuste linear) e azul (ajuste polinomial). Abaixo: Correlação entre E_{IHB}^{ESP} e $d(H\cdots A)$ (quadrados cheios). O ajuste linear foi obtido entre 4-20 kJ/mol, excluindo as interações $H\cdots H$ e $N-H\cdots O$. O ajuste polinomial foi obtido excluindo apenas a interação $H\cdots H$.

Da mesma forma, $d(H\cdots A)$ exibiu uma certa correlação com E_{IHB}^{ESP} ($R^2 = 0,879$, Figura 15) quando as interações $H\cdots H$ e $N-H\cdots O$ não foram consideradas. Uma tendência semelhante

também foi observada ao comparar-se os parâmetros de QTAIM com os valores E_{IHB}^{AF} , no entanto, os valores E_{IHB}^{AF} são inferiores aos valores E_{IHB}^{ESP} .

Os valores de E_{IHB}^{AF} e E_{IHB}^{ESP} são consideravelmente inferiores aos de E_{EDA} e as energias empíricas da ligação de hidrogênio ($-\Delta H$) para triptofano (20-23 kJ/mol), PEA (13-17 kJ/mol) e PBA (18-22 kJ/mol) na Tabela 8 estão em melhor acordo com os respectivos valores E_{IHB}^{ESP} (14-18, 13 e 16-26 kJ/mol, respectivamente, Tabela 8). Portanto, para os sistemas abordados em nosso estudo, a Eq. 30 produz valores melhores do que a Eq. 29, e a E_{IHB}^{ESP} é considerada a abordagem que melhor descreve os íons de interesse.

No tocante aos pontos críticos, os confôrmeros A e B do triptofano formam um BCP entre N-H⁺ e C11, mas em faces opostas do plano do anel indol. Todavia, o confôrmero Triptofano C forma um BCP entre N-H⁺ e C4. Além disso, os resultados do QTAIM sugerem que a ligação N-H⁺... π é mais fraca do que a ligação N-H⁺...O=C, que é considerada uma ligação mais forte por ser uma ligação de hidrogênio assistida por ressonância^{168,169}. No entanto, este comportamento é menos acentuado no confôrmero C, onde a diferença entre as energias das interações N-H⁺... π ($E_{IHB}^{ESP} = 18$ kJ/mol, Tabela 8) e N-H⁺...O ($E_{IHB}^{ESP} = 25$ kJ/mol, Tabela 8) é aproximadamente 7 kJ/mol. Assim, ambas as interações contribuem de forma semelhante para a estabilização geral do Triptofano C.

Com exceção do PMA, todos os PAAs apresentaram BCPs formados pela interação N-H⁺... π (Figura 14). O PBA C apresenta apenas uma interação N-H⁺... π , enquanto PBA A apresenta duas destas interações, uma entre H1 e C6 e outra entre H2 e C2. Dentre todos os PAAs, a elipsidade da interação H2... π do PBA A é a mais próxima de zero, indicando que a densidade eletrônica está, em maior extensão, concentrada em um plano contendo o caminho de ligação,¹⁷⁰ aumentando a estabilidade desta ligação. A segunda interação, entre H1 e C6, aumenta ainda mais a estabilidade desta conformação. Já PBA B apresenta apenas uma ligação N-H⁺... π e uma ligação C-H... π , mais fraca.

Analisando as interações formadas pelas PAAs, consideram-se a soma das duas interações de PBA A, pode-se observar que o aumento no tamanho da cadeia lateral gera um aumento de 1,18 a 1,33 e 1,89 a.u. na $G(r)$ e de 0,99 a 1,21 e 1,70 a.u. na $|V(r)|$. Conseqüentemente, os valores de E_{IHB}^{ESP} vão de 13 a 16 e 22 kJ/mol para PEA, PPA e PBA A, respectivamente. Ainda que PBA A tenha sido tomado como exemplo, a mesma tendência é observada na comparação com outros confôrmeros.

3.2.3. CÁLCULOS DE NCI

As interações intra e intremoluculares podem ser visualizadas utilizando cálculos de NCI, onde o espaço interatômico é mapeado para encontrar regiões onde o gradiente de densidade reduzida (RDG), $s(r)$, tende a zero. Portanto, a NCI pode ser considerada complementar à QTAIM, visto que esta apresenta vales no gráfico de $s(r)$ a cada ponto crítico e mapeia o espaço 3D inteiro, não apenas o caminho de ligação, o que auxilia na procura por zonas de depleção de densidade eletrônica.^{87,132,171} As isosuperfícies geradas pelos cálculos de NCI são representadas numa escala de cor indicando a força da ligação, sendo as interações fortemente atrativas, fortemente repulsivas e interações fracas representadas por cores azuis, vermelhas e verdes, respectivamente. O valor absoluto de ρ aumenta com a força da ligação, enquanto o sinal de λ_2 da matriz hessiana indica o tipo de interação, sendo negativo para interações atrativas e positivo para interações repulsivas.

A Figura 16 exhibe as isosuperfícies de NCI do triptofano e dos série PPAs protonados, bem como os gráficos de $s(r)$ em função do produto do sinal de λ_2 e ρ (denominado $\text{sign}(\lambda_2)\rho$). Os conformeros Triptofano C e PBA A foram escolhidos para representar os respectivos íons. A Tabela 9 lista os valores de $\text{sign}(\lambda_2)\rho$, para todas as espécies, em que $s(r)$ apresenta vales.

Como esperado, o PMA não exhibe nenhum vale referente à ligações de hidrogênio intramoleculares. A região repulsiva em $\text{sign}(\lambda_2)\rho = +0,021$ (Figura 16b) corresponde a uma repulsão estérica causada pela aproximação entre os átomos de carbono do anel fenílico, que é observada em todos os compostos estudados, incluindo PMA.

O cálculo de NCI do PEA (Figura 16c) reproduz os resultados já descritos na literatura.¹⁴² A interação N-H⁺... π é representada pela região azul centrada no BCP ($\text{sign}(\lambda_2)\rho = -0,015$) e uma região laranja centrada no ponto crítico de anel (RCP) ($\text{sign}(\lambda_2)\rho = +0,015$), gerado pelo pseudo-anel de cinco membros formado pela cadeia lateral e C1.

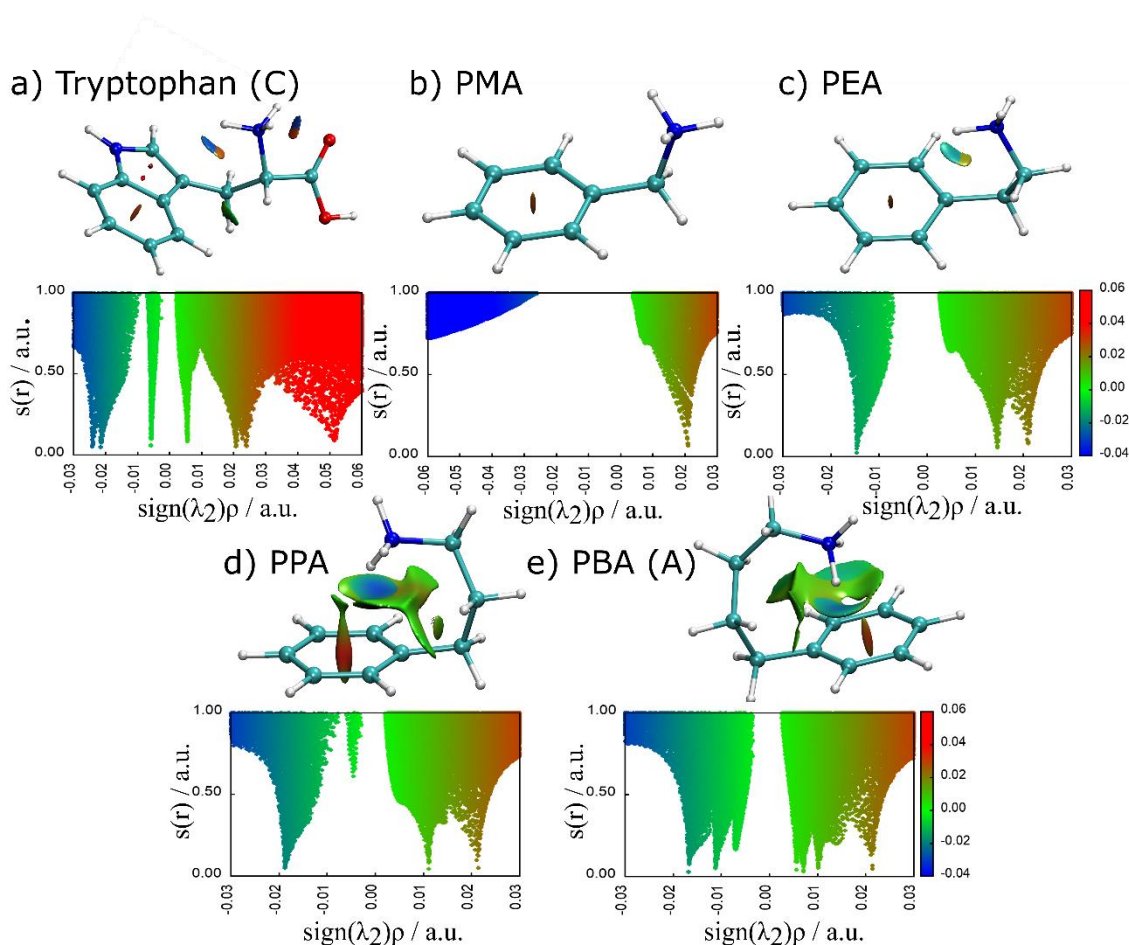


Figura 16. Isosuperfícies obtidas pelos cálculos de NCI e respectivos gráfico do gradiente de densidade reduzida, s , versus $\text{sign}(\lambda_2)\rho$ do A) triptofano, B) PMA, C) PEA, D) PPA, E) PBA, obtido no nível de teoria M06-2X/6-31+G**.

Esta região repulsiva centrada no RCP é observada em todos os PAAs e é enfraquecida pelo aumento da distância entre o átomo de nitrogênio e C1, conforme observado para o PPA $\text{sign}(\lambda_2)\rho = +0,011$, Figura 16d) e PBA A $\text{sign}(\lambda_2)\rho = +0,010$, Figura 16e).

Por exemplo, de PEA a PPA, a adição de um carbono à cadeia lateral traz o próton para mais perto de C1, reduzindo assim sua distância de 2,37 Å, no primeiro íon, para 2,28 Å no último. Enquanto isso, a distância do nitrogênio ao carbono C1 aumenta de 2,90 para 2,95 Å. No caso do PBA A, a distância entre N e C1 sobe para 3,07 Å, enquanto H1 está mais longe do sistema π (2,53 Å de C6) do que H2 (2,28 Å de C2).

Além disso, para PBA A (Figura 16e), dois vales em aproximadamente $\text{sign}(\lambda_2)\rho = -0,017$ e $\text{sign}(\lambda_2)\rho = -0,011$ podem ser observados e atribuídos a duas interações $\text{N-H}^+\cdots\pi$, como discutido anteriormente. Os outros vales em valores positivos de $\text{sign}(\lambda_2)\rho$ correspondem às interações repulsivas resultantes da formação de um pseudo-anel de sete membros. Pode-se observar um comportamento similar no PPA, no qual ocorre a formação de

pseudo-anel de seis membros. Contudo, devido à tensão de torção relativamente menor no primeiro anel do que no último, as interações repulsivas no PBA são mais fracas do que no PPA. Além disso, ao contrário do QTAIM, a análise NCI também detecta a presença de interações do tipo $H \cdots H$ no PPA e todos os conformêmeros do PBA, como observado anteriormente na análise de QTAIM do triptofano. Os vales de $s(r)$ para esta interação não são discerníveis no caso do PPA (Figura 16d). Entretanto, o cálculo de NCI do PBA A permite identificar que esta interação possui um caráter atraente ($\text{sign}(\lambda_2)\rho = -0,007$) e repulsivo ($\text{sign}(\lambda_2)\rho = -0,006$), sendo o caráter atraente ligeiramente mais intenso (Figura 16e).

Tabela 9. Valores de $\text{sign}(\lambda_2)\rho$ onde $s(r)$ apresenta mínimos.

<i>Ion</i>	<i>s1</i>	<i>s2</i>	<i>s3</i>	<i>s4</i>	<i>s5</i>	<i>s6</i>	<i>s7</i>	<i>s8</i>	<i>s9</i>	<i>s10</i>
<i>Tryp (A)</i>	-0.022	-0.017	-0.005	0.005	0.016	0.022	0.049	-		
<i>Tryp (B)</i>	-0.023	-0.017	-0.011	-0.004	0.005	0.011	0.015	0.021	0.023	0.049
<i>Tryp (C)</i>	-0.024	-0.021	-0.0057	0.0057	0.021	0.024	0.051	-		
<i>PMA</i>	0.021	-	-	-	-	-	-	-		
<i>PEA</i>	-0.015	0.015	0.021	-	-	-	-	-		
<i>PPA</i>	-0.019	-0.004	0.011	0.021	-	-	-	-		
<i>PBA (A)</i>	-0.017	-0.011	-0.0071	0.0058	0.0072	0.010	0.021	-		
<i>PBA (B)</i>	-0.019	-0.009	0.008	0.021	-	-	-	-		
<i>PBA (C)</i>	-0.021	-0.006	0.008	0.021	-	-	-	-		

Em relação ao triptofano protonado (Figura 16a), duas isosuperfícies são observadas no conformêmero C, envolvendo o grupamento NH^+ : i) a primeira representa as regiões atrativas e repulsivas, correspondendo à ligação $N-H^+ \cdots O=C$, mais forte ($\text{sign}(\lambda_2)\rho = -0,024$ e $\text{sign}(\lambda_2)\rho = +0,024$) e; ii) o segundo representa a interação $N-H^+ \cdots \pi$ ($\text{sign}(\lambda_2)\rho = -0,021$ e $\text{sign}(\lambda_2)\rho = +0,024$). Ambas as isosuperfícies exibem um volume assimétrico com uma região azul centrada no BCP e uma região laranja centrada no RCP dos pseudo-anéis. Além disso, a interação $H \cdots H$ exibe uma região atrativa ($\text{sign}(\lambda_2)\rho = -0,006$) e uma repulsiva $\text{sign}(\lambda_2)\rho = +0,006$, assim como observado nos cálculos de NCI do PPA e PBA A. O vale em $\text{sign}(\lambda_2)\rho = +0,051$ corresponde às interações repulsivas entre os carbonos do anel pirrói. Os outros conformêmeros do triptofano também exibiram resultados semelhantes, como mostrado na Figura 17.

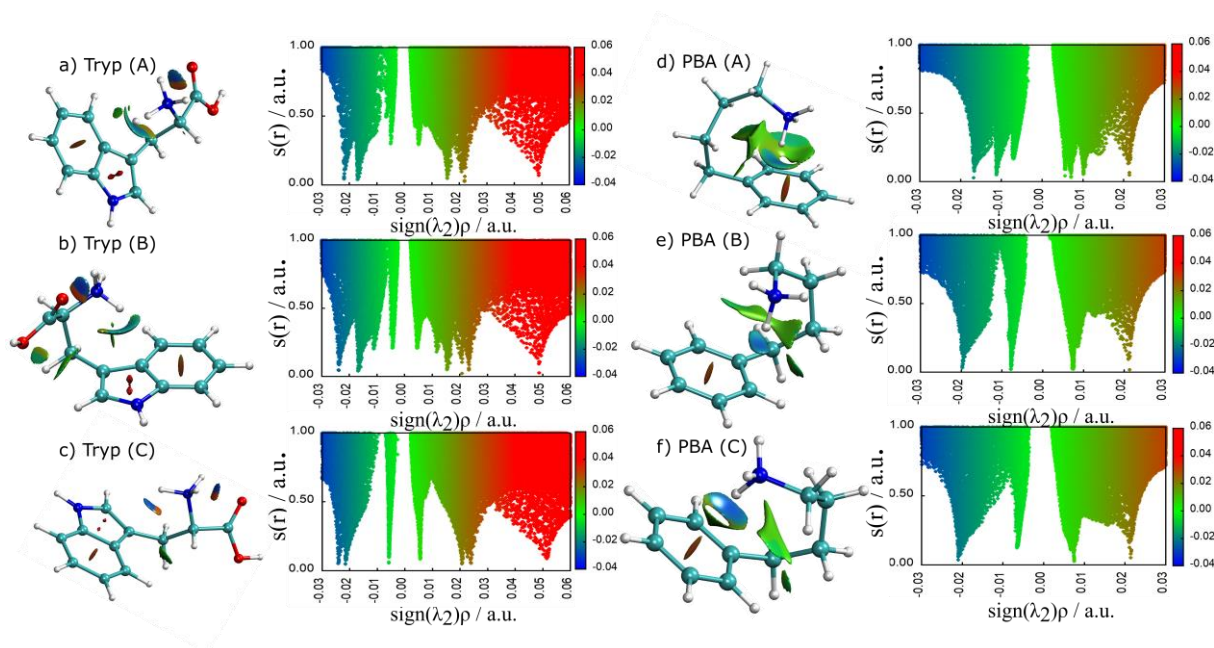


Figura 17. Estrutura, isosuperfícies e gráficos de $s(r)$ em função de $\text{sign}(\lambda_2)\rho$ dos confôrmeros: a) triptofano A; b) triptofano B; c) triptofano C; d) PBA A; e) PBA B; f) PBA C.

Comparando-se os diferentes confôrmeros de triptofano entre si, observa-se que estes apresentam maior similaridade na região atrativa ($\text{sign}(\lambda_2)\rho < 0$). Todos os confôrmeros apresentaram a interação $\text{H}\cdots\text{H}$, vista apenas no triptofano C nos cálculos de QTAIM. No Triptofano C, os vales correspondentes às interações $\text{N-H}^+\cdots\pi$ e $\text{N-H}^+\cdots\text{O}$ estão mais próximos um do outro, evidenciando o caráter mais forte da interação $\text{N-H}^+\cdots\pi$ neste confôrmero. No entanto, a interação $\text{N-H}^+\cdots\pi$ formada com o carbono C4 no Triptofano C faz com que a cadeia lateral forme um pseudo-anel de cinco membros, em contraste com a interação $\text{N-H}^+\cdots\pi$ formada com o carbono C11 nos outros confôrmeros, que formam um pseudo-anel de seis membros. Por esta razão, a região repulsiva da interação $\text{N-H}^+\cdots\pi$ no Triptofano C é mais forte do que nos outros confôrmeros. Triptofano B apresenta um vale em $\text{sign}(\lambda_2)\rho = -0,011$, correspondente a uma interação $\text{O}\cdots\text{H-C}$ causada pela aproximação da hidroxila ao C2-H. Esta interação também apresenta uma região repulsiva com um vale em $\text{sign}(\lambda_2)\rho = +0,016$. Outros vales repulsivos do Triptofano B, que não são observáveis nos demais confôrmeros, podem ser atribuídos à interação repulsiva entre a hidroxila e o sistema π em $\text{sign}(\lambda_2)\rho = +0,015$.

No que tange aos confôrmeros de PBA, PBA A apresenta dois vales entre o $\text{sign}(\lambda_2)\rho = -0,02$ e $-0,01$, correspondentes às suas duas interações $\text{N-H}^+\cdots\pi$. Isso não é observado nas demais conformações, que apresentam apenas uma interação $\text{N-H}^+\cdots\pi$. O vale correspondente à interação $\text{C-H}\cdots\pi$ no PBA B não pôde ser observada. Além disso, a interação repulsiva causada

pelo pseudo-anel de sete membros (formado pela cadeia lateral) é mais fraca nos confôrmeros B e C, sendo o valor de $s(r)$ desta interação indiscernível do valor referente à interação H⁺...por volta de $\text{sign}(\lambda^2)\rho = 0,008$.

3.2.4. CÁLCULOS DE NBO

A energia de estabilização de segunda ordem NBO (E2) é geralmente usada para investigar efeitos de delocalização e transferência de carga com base na interação entre orbitais *Lewis-like* ocupados (doadores) e orbitais não-Lewis não ocupados (aceptores)¹⁷². Os resultados da análise da população por NBO das espécies investigadas neste estudo indicam as mesmas tendências observadas pelas análises QTAIM e NCI. A Tabela 10 lista todas as interações orbitares, sua hibridização e valores de E2 calculados.

Triptofano C exibe uma interação N-H⁺... π que tem uma contribuição majoritária da doação do orbital π (ligação π C4-C5) para o orbital antiligante da ligação N-H⁺ ($\pi \rightarrow \sigma^*$), e um *backdonation* menos significativo do grupo N-H para o sistema π . A soma dos valores de E2 dessas duas contribuições para o N-H⁺... π no triptofano C protonado é -28 kJ/mol, que é ligeiramente maior do que a energia E2 total para a interação N-H⁺...O=C (-25 kJ/mol). Como o valor E_{IHB} da interação N-H⁺... π é menor, um valor E2 mais alto pode indicar um caráter de transferência de carga maior para esta interação em relação à interação N-H⁺...O=C. Os outros confôrmeros do triptofano recebem doações dos orbitais π das ligações C11-C6 e C10-C9 para o orbital σ^* do grupo N-H⁺, e seus valores E2 (11 kJ/mol para ambos) são inferiores aos das interações N-H⁺...O=C (Tryp A = 18 kJ/mol e Tryp B = 22 kJ/mol).

Tabela 10. Interações de orbitais doadores e aceptores e sua respectiva energia de segunda ordem (E2) em kJ/mol, calculado por NBO no nível de teoria D3- M06-2X/6-31+G**.

Interação	Doador		Aceptor		Tipo	E2 (kJ/mol)	$F_{(i,j)}$ (a.u.)	$\epsilon_j - \epsilon_i$ (a.u.)
Tryp (A) (π -H)	0.7207px ^{99.99} - 0.6933px ^{99.99}	C11 - C6	0.4851sp ^{2.89} - -8744s	N - H	$\pi - \sigma^*$	-9.00	0.034	0.69
Tryp (A) (H-- π)	0.7213px ^{99.99} - 0.6926px ^{99.99}	C10 - C9	0.4851sp ^{2.89} - -8744s	N - H	$\pi - \sigma^*$	-2.18	0.017	0.70
(A) (H-- π) total						~-11		
Tryp (A) (H--O)	sp ^{0.69}	O	0.4885sp ^{3.28} - -8726s	N - H	n- σ^*	-4.44	0.030	1.10
Tryp (A) (H--O)	px ^{99.99}	O	0.4885sp ^{3.28} - -8726s	N - H	n- σ^*	-13.97	0.046	0.78
(A) (H--O) total						~-18		
Tryp (B) (π -H)	C11 - C6		0.4847sp ^{3.06} - -8747s	N - H	$\pi - \sigma^*$	-8.79	0.034	0.68

<i>Tryp</i> (B) (H-- π)		C10 - C9	0.4847sp ^{3.06} - -8747s	N - H	π - σ^*	-2.47	0.017	0.69
(B) (H--π) total						--11		
<i>Tryp</i> (B) (H--O)		O	0.4860sp ^{3.17} - -8739s	N - H	n- σ^*	-5.61	0.034	1.10
<i>Tryp</i> (B) (H--O)		O	0.4860sp ^{3.17} - -8739s	N - H	n- σ^*	-16.53	0.050	0.79
(B) (H--O) total						--22		
<i>Tryp</i> (C) (π -H)	0.7407pz ^{99.99} - 0.6718pz ^{99.99}	C4 - C5	0.4873sp ^{2.99} - -0.8732s	N - H	π - σ^*	-25.19	0.059	0.72
<i>Tryp</i> (C) (H-- π)	0.8732sp ^{2.99} - 0.4873s	N - H	0.6718pz ^{99.99} - -0.7407pz ^{99.99}	C4 - C5	σ - π^*	-2.76	0.021	0.83
(C) (H--π) total						--28		
<i>Tryp</i> (H--O)	sp ^{0.69}	O	0.4878sp ^{3.18} - -0.8729s	N - H	n- σ^*	-5.73	0.035	1.10
<i>Tryp</i> (H--O)	px ^{99.99}	O	0.4878sp ^{3.18} - -0.8729s	N - H	n- σ^*	-18.95	0.053	0.79
(C) (H--O) total						--25		
PMA (H--π)	-	-	-	-	-	-	-	-
PEA (π-H)	0.7028pz ^{99.99} - 0.7114pz ^{99.99}	C1 - C2	0.4903sp ^{3.10} - -0.8716s	N - H	π - σ^*	-17.57	0.048	0.69
PPA (π-H)	0.7003py ^{99.99} - 0.7139py ^{99.99}	C1 - C2	0.4857sp ^{2.92} - -0.8741s	N - H	π - σ^*	-26.82	0.060	0.71
PPA (π-H)	0.7092py ^{99.99} - 0.7050py ^{99.99}	C3 - C4	0.4857sp ^{2.92} - -0.8741s	N - H	π - σ^*	-2.47	0.018	0.70
PPA total						--29		
PBA (A) (π-H1)	0.6977py ^{99.99} - 0.7164py ^{99.99}	C1 - C6	0.4956sp ^{3.26} - -0.8686s	N - H1	π - σ^*	-3.93	0.023	0.71
PBA (A) (π-H1)	0.7095py ^{99.99} - 0.7047py ^{99.99}	C4 - C5	0.4956sp ^{3.26} - -0.8686s	N - H1	π - σ^*	-4.73	0.025	0.70
PBA (A) (π-H2)	0.7193py ^{99.99} - 0.6947py ^{99.99}	C2 - C3	0.4906sp ^{3.06} - -0.8714s	N - H2	π - σ^*	-24.48	0.058	0.71
PBA (A) total						--33		
PBA (B) (π-H)		C1 - C6		N - H	σ - σ^*	-2.09	0.021	1.07
PBA (B) (π-H)		C1 - C2		N - H	π - σ^*	-4.52	0.025	0.70
PBA (B) (π-H)		C6 - C5		N - H	π - σ^*	-25.48	0.059	0.71
PBA (B) (π-H)		N - H		C5 - C6	σ - π^*	-2.18	0.019	0.84
PBA (B) (π-H-C)		C1 - C2		C10 - H	σ - π^*	-2.97	0.021	0.77
PBA (B) total						--37		
PBA (C) (π-H)		C1 - C2		N - H	σ - σ^*	-2.47	0.023	1.10
PBA (C) (π-H)		C1 - C2		N - H	π - σ^*	-36.23	0.071	0.73
PBA (C) (π-H)		C3 - C4		N - H	π - σ^*	-5.27	0.027	0.72

PBA (C) (π -H)	C6 - C5	N - H	π - σ^*	-2.43	0.018	0.72
PBA (C) total				~-46		

O valor de E2 para os conformeros PEA, PPA e PBA cresce à medida que o número de carbonos da cadeia lateral aumenta. A E2 da doação do orbital π da ligação C1-C2 ao orbital σ^* da ligação N-H do PEA é -18 kJ/mol, enquanto o orbital σ^* da ligação -NH do PPA recebe doação de dois orbitais π , das ligações C1-C2 e C3-C4, resultando em uma E2 total de -29 kJ/mol.

No PBA A, o orbital σ^* da ligação N-H1 recebe elétrons de dois orbitais π (das ligações C1-C6 e C4-C5), resultando em um valor de E2 de -9 kJ/mol, enquanto a doação do orbital π da ligação C2-C3 para o orbital σ^* da ligação N-H2 resulta em uma E2 de -24 kJ/mol, o que representa uma energia de estabilização total de -33 kJ/mol – ou seja, quase o dobro da estabilização total para PEA. As energias E2 do PBA B e C são ainda mais altas, sendo -37 e -46 kJ/mol, respectivamente. No primeiro, o próton interage com o orbital σ da ligação C1-C6 e com os orbitais π das ligações C1-C2 e C5-C6. Além disso, há uma doação do orbital σ da ligação C1-C2 para a orbital σ^* da ligação C10-H.

No PBA C, o próton interage com todos os átomos que participam do sistema π . Este aumento no valor de E2 dos PAAs pode estar associado a um aumento nos graus de liberdade nas cadeias mais longas, o que permite que elas se torçam livremente sem comprometer a interação N-H⁺... π .

3.2.5. CONCLUSÃO

Em resumo, as interações N-H⁺... π do triptofano e PAAs (de um a quatro carbonos na cadeia lateral) foram modeladas usando cálculos de QTAIM, NCI e NBO. Observou-se que para os PAAs, os cálculos indicaram um aumento na força da interação conforme o comprimento da cadeia lateral aumentava, o que pode ser explicado pelo aumento na flexibilidade da cadeia alquílica, permitindo uma melhor interação do próton com o sistema π . Além disso, cadeias mais longas aumentam a distância entre o nitrogênio e o anel fenílico sem perturbar a interação N-H⁺... π .

Para o triptofano, a interação H... π desempenha um papel significativo no estado conformacional desta espécie protonada. Nos conformadores A e B, a ligação N-H⁺... π é consideravelmente mais fraca do que a ligação H...O, enquanto no Triptofano C, a diferença não é tão grande, o que indica que ambas as interações contribuem de forma similar para a

estabilização deste confômero. Além disso, uma interação de van der Waals $H\cdots H$ também foi identificada.

Os valores de E_{IHB} baseados nos cálculos de QTAIM obtidos usando a abordagem de Espinosa (E_{IHB}^{ESP}) foram consistentes com os valores experimentais, obtidos com base no *redshift* das vibrações associadas ao estiramento $N-H^+$. Ou seja, os resultados teóricos corroboram os dados experimentais e fornecem suporte teórico para a suposição de que $N-H^+\cdots\pi$ é a causa para o *redshift* reportado nos espectros vibracionais dos sistemas estudados.

Os cálculos de NBO são condizentes com os resultados do QTAIM: A interação $N-H^+\cdots\pi$ exibe uma natureza de transferência de carga significativa, que é mais acentuada nos PAAs do que no triptofano.

3.3. INVESTIGAÇÃO DO EQUILÍBRIO CONFORMACIONAL DA BIOCITINA

3.3.1. CONTEXTUALIZAÇÃO

A biotina (conhecida como vitamina B7, B8 ou H) (Figura 18) atua como cofator de enzimas conhecidas como “enzimas biotina-dependentes”, classificadas como carboxilases. Essas enzimas são responsáveis pela fixação e transporte de carboxilas e a biotina tem o papel de ser a porção carreadora do grupamento transportado, a partir de moléculas doadoras – tais como metilmalonil-CoA, HCO_3^- ou oxaloacetato – para moléculasceptoras de carboxilas – como piruvato e acetil-CoA.¹⁷³

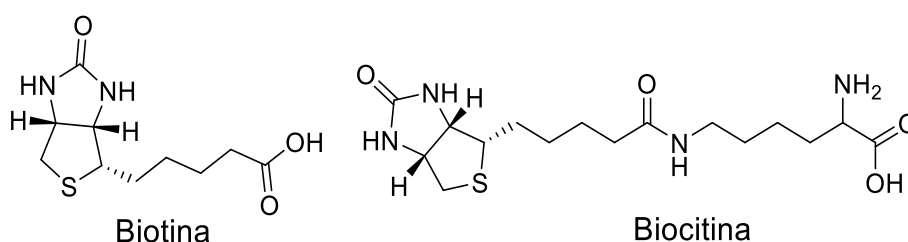


Figura 18: Estrutura da biotina e da biocitina.

No geral, as enzimas biotina-dependentes possuem três porções: o domínio Biotina carboxilase, formado pela biotina e responsável pelo carreamento de carboxilas; o domínio carboxiltransferase, que transfere a carboxila da carboxibiotina para a molécula aceptora; o domínio biotinil, que contém uma lisina pela qual a biotina é covalentemente ligada. A molécula resultante da adição da lisina à biotina é a biocitina (Figura 18). Dependendo do organismo, essas porções podem estar separadas ou ligadas na forma de sítios em uma proteína.¹⁷⁴

A biotina atua como coenzima em processos como o suprimento de NADPH para lipogênese e regulação da liberação de insulina, inibição da oxidação de ácidos graxos, síntese de neurotransmissores, etc. Dentre as enzimas que possuem a biotina como cofator, destaca-se a piruvato carboxilase. Esta enzima é responsável por gerar oxaloacetato a partir de piruvato e bicarbonato, sendo a reação catalisada por um complexo de MgATP (Figura 19).^{175,176} A geração de oxaloacetato repõe tal substrato no ciclo do ácido cítrico e é a primeira etapa para o processo de gliconeogênese.¹⁷⁷

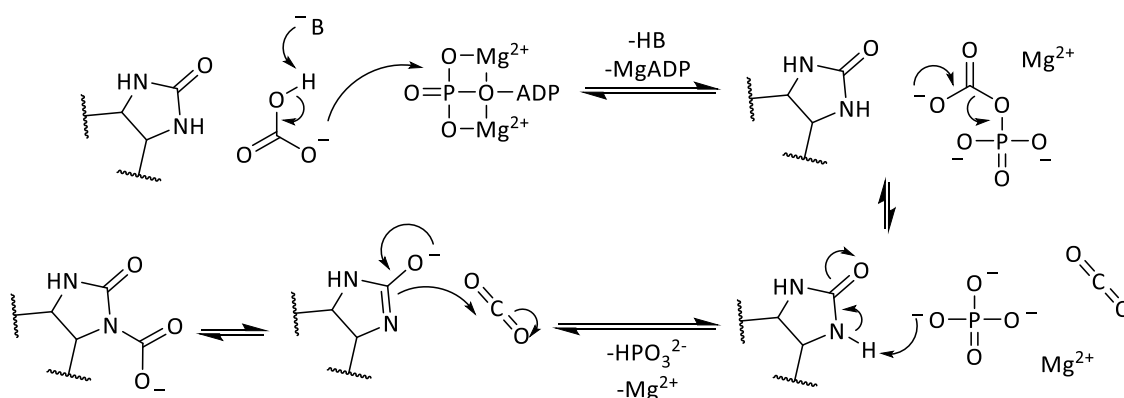


Figura 19. Esquema do mecanismo de ação da biotina nos processos em que atua.

O mecanismo mais aceito para a carboxilação da biotina está ilustrado na Figura 19, onde o bicarbonato reage primeiramente com o complexo de MgATP, resultando na formação de carboxifosfato. Após a primeira etapa, ocorre possível liberação de dióxido de carbono que sofre ataque da biotina na forma de enolato, sempre realizado pelo N¹, nitrogênio oposto à cadeia alifática (Figura 19). Embora esta seja a via mais provável, admite-se que o ataque pode ser realizado diretamente ao carboxifosfato, com liberação de PO₃³⁻ de forma concertada. Tal proposta é baseada em estudos cinéticos, efeito isotópico, alterações químicas dos substratos, variações de pH e modelagem molecular.^{173,178}

No âmbito de química sintética, a reatividade do ácido carboxílico da biotina é a porção mais explorada para reações. A derivatização da biotina foi usada para marcação de proteínas¹⁷⁹ e síntese de catalisadores.¹⁸⁰ Uma aplicação promissora para essa molécula é na função de *drug delivery* em tratamento oncológico, visto que grande parte das células cancerígenas possuem receptores de biotina.¹⁸¹

Como demonstrado no tópico 3.1.2, Fraschetti e colaboradores¹¹³ demonstram, através de modelagem molecular e da técnica de IRMPD, que a biotina adquire uma conformação torcida, quando protonada em estado gasoso. Isso se dá pelo fato da protonação acontecer na carbonila do grupamento ureido, que interage via ligação de hidrogênio à carbonila do ácido carboxílico terminal da molécula.

No entanto, a biocitina possui em sua estrutura vários sítios básicos que são passíveis de sofrerem protonação. O sítio de protonação da biocitina ainda não foi investigado. Assim, foi determinado o sítio de protonação da biocitina e seu estado conformacional em meio gasoso

3.3.2. RESULTADOS

O estudo acerca da determinação do sítio de protonação da biocitina se iniciou através do cálculo de otimização desta molécula protonada no mesmo oxigênio em que ocorre a protonação da biotina, o oxigênio carbonílico do ciclo ureido. A Figura 20 mostra a comparação entre o espectro experimental e os espectros calculados para as estruturas de energia mínima da biocitina protonada no oxigênio carbonílico do grupamento ureido.

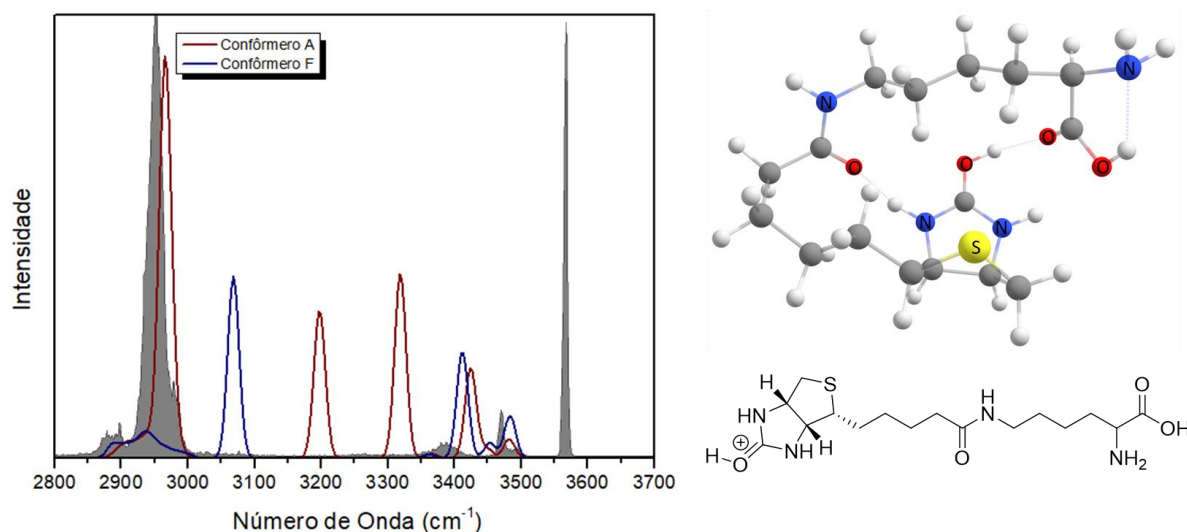


Figura 20. À esquerda: espectro vibracional da biocitina calculado a partir da protonação no oxigênio ureido em comparação ao espectro experimental (em cinza no plano de fundo). Os conformêros A - E (Tabela 11) apresentaram espectros iguais e só puderam ser diferenciados do conformêro F. À direita e acima está a estrutura 3D da biocitina protonada no oxigênio do ureido (conformêro A) e abaixo a estrutura 2D correspondente.

A Tabela 11 contém as energias livres relativas calculadas de todas as conformações otimizadas para cada um dos sítios de protonação. Observa-se que, na coluna relativa aos conformêros protonados no O do grupamento ureido, cinco espécies convergiram para conformêros idênticos ou semelhantes ao ponto de não serem distinguíveis. Esses conformêros são representados pelo conformêro A, exibido na Figura 20, que contém 3 interações intramoleculares: uma entre o próton do ácido carboxílico e a amina, comum em aminoácidos; uma entre o oxigênio do ureido protonado e o oxigênio carboxílico e uma entre o próton do N3 e o oxigênio carbonílico do grupamento amida. O conformêro F, único distinguível, não possui esta última interação, o que justifica o aumento em sua energia livre relativa (ΔG). Contudo, ambos os espectros são consideravelmente discrepantes ao espectro experimental. Adicionando-se o fato que o ΔG relativo destas espécies é alto, é improvável que a biocitina esteja protonada no oxigênio do ureido. Pode-se, no entanto, perceber que a protonação da

biocitina gera conformações que contenham diversas interações intramoleculares que contribuem para sua estabilização, fomentadas pelo grande número de grupamentos polares nesta molécula.

Tabela 11. Energias livre de Gibbs relativas (ΔG) em kJ/mol, calculadas para as estruturas otimizadas para cada sítio de protonação.

Confômero	O - Ureido	O- Amida	O - Ácido	N1- Ureido	N3- Ureido	N- amina
A	45.49 ^a	60.55	56.97	157.65	92.87	8.68
B	45.48 ^a	71.45	37.29	195.13	92.90	0
C	45.46 ^a	111.17	38.69	141.57	88.08 ^b	22.67
D	45.46 ^a	94.42	95.71	160.94	92.92	18.65
E	45.46 ^a	92.25	131.06	180.1	118.86 ^b	9.44
F	67.81	110.19	114.67	158.48	108.72	7.67
G	-	-	-	-	-	32.41
H	-	-	-	-	-	114.83
I	-	-	-	-	-	86.6

^a Cálculos convergiram para o mesmo confômero ou próximo ao ponto de possuírem espectros indistinguíveis; ^b Transferência de próton do N3 para o oxigênio carbonílico da amida;

Levando-se em contas as energias constantes na Tabela 11 verifica-se que os confômeros calculados a partir da biocitina protonada na amina da porção aminoácido possuem energia muito menor que os confômeros gerados a partir da protonação nos outros sítios básicos. O confômero de menor energia fora os protonados na amina é o confômero B gerado a partir da protonação no oxigênio carbonílico, que possui ΔG relativo de 37 kJ/mol, o que equivaleria a uma população desta espécie de apenas 0,000033% da população total a temperatura ambiente. Assim sendo, pode-se considerar que a análise dos ΔG relativos elimina a possibilidade de que a protonação esteja ocorrendo em outro sítio. Os confômeros G-I foram obtidos através de manipulação manual na estrutura inicial, pré-otimização, para incluir possíveis interações ignoradas pela distribuição conformacional gerada pelo software Spartan, no entanto a otimização resultou em estruturas com altas energias.

As estruturas calculadas para os confômeros A-F estão exibidas na Figura 21. É possível observar que, em todas as estruturas, o grupamento amônio realiza ligação de hidrogênio com os oxigênios carbonílicos da amida e do ureido. Nos confômeros A, C, D e E, o terceiro próton do amônio interage com o oxigênio da hidroxila, enquanto nos confômeros B e F a interação ocorre com a carboxila. Nos confômeros E e F há uma ligação de hidrogênio

adicional entre o oxigênio da amida e o N3. Em todos os confôrmeros o grupamento amônio está em uma disposição contrária ao enxofre, exceto o confôrmero E.

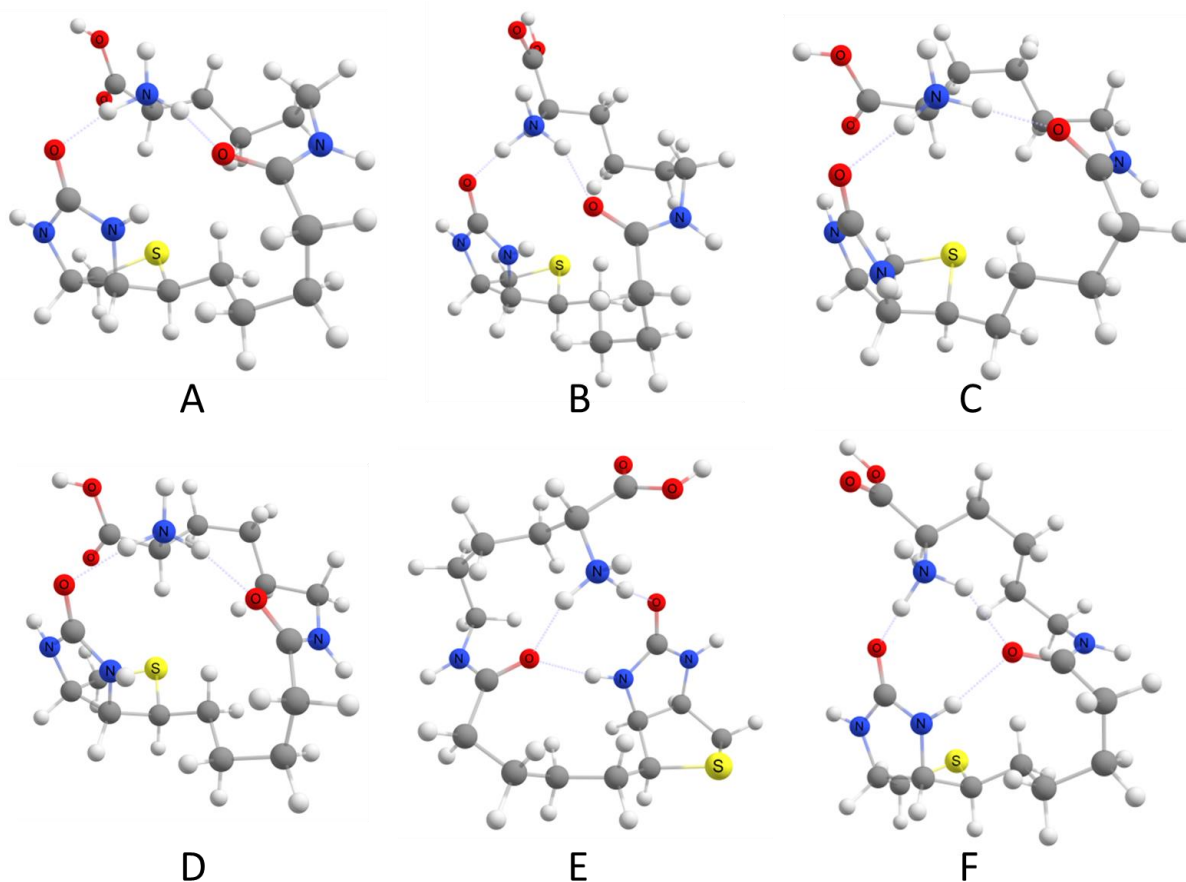


Figura 21. Estruturas 3D das conformações geradas a partir da biocitina protonada na amina.

A Figura 22 exibe a comparação entre os espectros calculados para a biocitina protonada na amina em comparação ao espectro experimental. Os confôrmeros G-I não foram considerados por possuírem altas energias. Os dados da região de alta frequência foram obtidos no nosso grupo enquanto a região de *fingerprint* foi obtida nas instalações do CLIO (Orsay, França). Esta última foi feita com e sem uso do auxílio do laser de CO₂. Pontua-se que além da calibração rotineira do espectro, feita a cada análise, foi descontado 30 cm⁻¹ de cada ponto do espectro obtido em CO₂ para que o mesmo coincidissem com o espectro gerado sem uso deste auxílio. Este valor de ajuste foi definido tomando-se como base o pico experimental em 1681 cm⁻¹ relativo a carbonila. O motivo da discrepância entre os espectros experimentais é desconhecido.

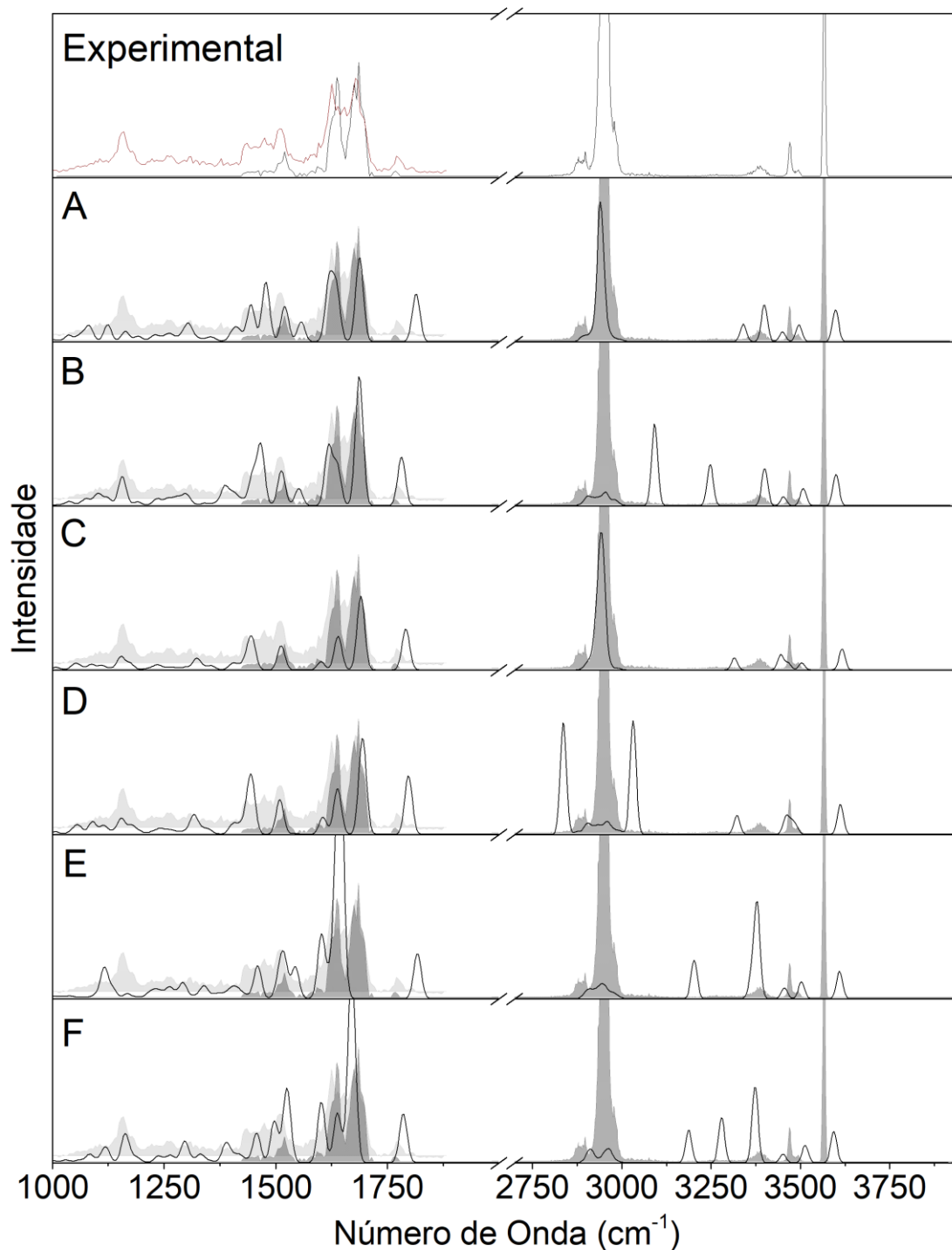


Figura 22. Espectros vibracionais da biocitina, calculados a partir da protonação no nitrogênio do aminoácido, em comparação ao espectro experimental. A curva vinho no espectro experimental e a curva em cinza mais claro no plano de fundo se referem à fotodissociação feita com auxílio do laser de CO₂. Cálculos feitos com o nível de teoria M062x/6-31+G(d,p).

Comparando-se os espectros calculados ao experimental (Figura 22) verifica-se que o confômero B, ainda que calculado como sendo o de menor energia, tem um espectro muito diferente do experimental na região de alta frequência. O isômero D também possui bandas não contempladas no espectro experimental na faixa de alta frequência, enquanto os confômeros E e F destoam do experimental em todas as regiões do espectro.

Os confômeros A e C são os que apresentam melhor correspondência entre os espectros experimental e calculado. Esse é um resultado de certa forma surpreendente, visto que são conformações com energia mais alta, 9 e 23 kJ/mol respectivamente. Alguns de relatos descrevem que conformações de energia mais altas poderem ser aprisionadas cineticamente a partir das espécies em solução,¹⁸² o que poderia explicar essa observação, assim como pelo fato das diferenças de energia calculadas serem menores por conta de incertezas intrínsecas aos métodos de cálculo utilizados.

Tabela 12. Atribuição das bandas do espectro vibracional da biocitina. Valores de frequência em cm^{-1} .

Experimental	Oscilador	A	Oscilador	C
1158	-	-	δ CH	1156
1517	δ NH3 (umbrella)	1521	σ CN (amida)	1511
1637	σ C=O (amida)	1626	σ C=O (amida)	1640
1685	σ C=O (ureido) δ NH	1689	σ C=O (ureido)	1690
1771	σ C=O (ácido)	1816	σ C=O (ácido)	1790
2890	-	-	-	-
2948	σ CH σ NH2 LH (amina)	2940	σ CH σ NH2 LH (amina)	2944
-	σ NH livre (amina)	3342	-	-
3386	σ N3H (ureido)	3400	σ NH livre (amina)	3314
3470	σ NH (amida)	3449	σ NH (amida) σ N1H (ureido)	3444
3493	σ N1H (ureido)	3496	σ N3H (ureido)	3502
3565	σ OH	3599	σ OH	1615

Na região de *fingerprint*, observa-se que esses dois confôrmers apresentam boa correspondência. O conformero A parece prover melhor correspondência na proporção entre as bandas de 1600 a 1700 cm^{-1} . Além disso, o espectro experimental obtido com auxílio do laser de CO_2 apresenta, por volta de 1500 cm^{-1} , uma região com fotodissociação, porém com uma curva achatada, provavelmente gerada pela sobreposição de várias bandas, o que pode ser explicado pelas múltiplas bandas que o espectro do conformero A apresenta na mesma faixa. Isso se soma ao fato de a energia calculada para esta conformação ser menor que a do conformero C.

Por sua vez, o espectro do conformero C apresenta melhor correspondência na frequência das bandas experimentais em 1160 cm^{-1} , ausente no conformero A, 1598 cm^{-1} , possivelmente correspondente à banda em 1557 cm^{-1} no conformero A, e 1770 cm^{-1} , deslocado 22 e 47 cm^{-1} dos confôrmers C e A respectivamente. Conta ainda a favor do conformero C o fato de que, assim como o espectro experimental, o espectro calculado para esta espécie apresenta apenas quatro bandas na região de 3250 a 3750 cm^{-1} , ao invés das 5 apresentadas pelo conformero A. Portanto, ainda que o ΔG relativo calculado para o conformero C seja maior que os outros considerados, os dados experimentais apontam para confirmação desta estrutura.

3.3.3. CONCLUSÃO

O sítio de protonação da biocitina foi investigado através da espectroscopia IRMPD e de cálculos teóricos. Verificou-se que, diferente de sua precursora biotina, esta molécula não possuía o sítio de protonação no oxigênio do grupamento ureido. Cálculos de energia livre de Gibbs mostraram que o sítio de protonação mais provável era a amina primária do aminoácido e a espectroscopia IRMPD em alta frequência e no *fingerprint* confirmou os resultados teóricos.

Através da comparação entre espectros experimental e teórico da biocitina protonada na amina, identificaram-se duas conformações possíveis, que possuíam alta energia livre relativa. Evidências experimentais apontam que o conformero C correspondia ao estado conformacional da biocitina em fase gasosa, apesar de a energia calculada ser 23 kJ/mol. O conformero A, de energia 9 kJ/mol também pode estar presente na população acessada. Estas observações podem estar associadas ao fenômeno de aprisionamento cinético, previamente reportado na literatura.^{182,183}

3.4. AVALIAÇÃO DA MICROSOLVATAÇÃO DA TIAMINA

3.4.1. CONTEXTUALIZAÇÃO

A tiamina (vitamina B1), em sua forma fosforilada, age como cofator de enzimas desidrogenase em três complexos enzimáticos mitocondriais: piruvato desidrogenase, α -cetoglutarato desidrogenase e desidrogenase de cetoácidos de cadeia ramificada.¹⁷⁷ Tais enzimas atuam na descarboxilação de α -cetoácidos gerando dióxido de carbono.¹⁸⁴

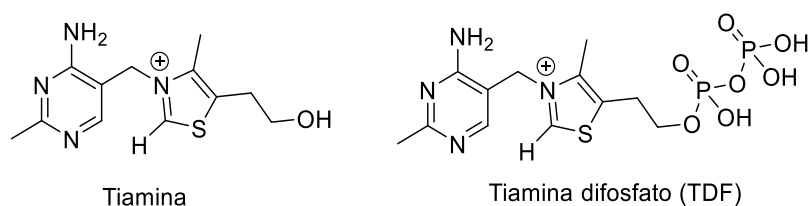


Figura 23: Estruturas da tiamina e tiamina difosfato.

Ao entrar nas células, a tiamina é fosforilada por proteínas quinases específicas para formar a tiamina difosfato (TDF) (Figura 23), a forma ativa dessas vitaminas.¹⁸⁵ Em sua estrutura, a tiamina e seus análogos possuem um anel tiazol com o nitrogênio tetra-substituído, conferindo carga positiva intrínseca à molécula.

A TDF está diretamente envolvida como cofator no metabolismo da glicose. Atua no ciclo do ácido tricarboxílico e na via pentose fosfato, que resulta na geração de NADPH, neurotransmissores, ácidos nucleicos, lipídeos, aminoácidos, esteroides e glutatona.¹⁸⁶ A deficiência de tiamina pode causar a síndrome de beribéri, fadiga gastrointestinal, mal funcionamento cardiovascular, irritabilidade, perda de sono, perda de memória, distúrbios emocionais, entre outros.¹⁸⁷

O processo de descarboxilação de α -cetoácidos, no qual a TDF está envolvida, gera um carbânion na carbonila da cetona. Esse intermediário possui alta energia impossibilitando que a reação ocorra de forma espontânea (Figura 24).^{184,185}

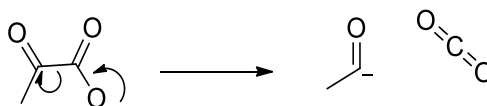


Figura 24: Esquema mostrando que a descarboxilação espontânea de α -cetoácidos gera um carbânion, que possui alta energia.

Nessas reações, a TDF, ligada à holoenzima, atua como um catalizador, fazendo com que a reação ocorra por um caminho no qual a energia do estado de transição é menor, sendo

restituída ao final do processo. O mecanismo aceito envolve a formação de uma ílida gerada a partir da desprotonação do carbono 2 do anel tiazólico. O carbânion gerado ataca a carbonila da cetona formando um intermediário tetraédrico, seguido da liberação do dióxido de carbono. Ao final, ocorre liberação do aldeído proveniente do cetoácido e a restituição da TDF (Figura 25).^{184,188}

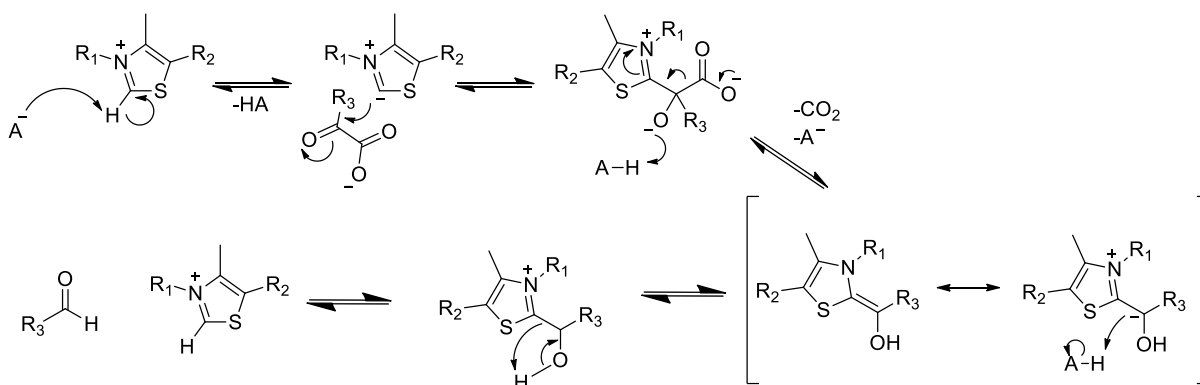


Figura 25: Esquema do mecanismo de ação da tiamina.

Além da sua função nos processos biológicos, alguns autores utilizam a tiamina para reações químicas. Na literatura é possível encontrar casos onde a tiamina é utilizada como catalisador básico¹⁸⁹⁻¹⁹¹ e como precursor de moléculas com atividade biológica, como bactericidas.¹⁹²

A avaliação da conformação de uma biomolécula é importante para o melhor entendimento dos mecanismos em que ela participa, principalmente quando efeitos de solvatação são considerados. Realizou-se, portanto, tal estudo, valendo-se do fato de que as espécies possuem carga positiva e ligações N-H e O-H. Também, avaliou-se os efeitos de microssolvatação da tiamina ao determinar-se o sítio de interação deste íon com a água.

3.4.2. RESULTADOS

3.4.2.1. TIAMINA

Como pode-se observar na Figura 23 e na Figura 26, a tiamina possui uma estrutura relativamente rígida, por ser formada por dois ciclos e uma cadeia lateral pequena. Isso faz com que a distribuição conformacional para este íon não apresente grande variabilidade, sendo as principais variáveis os ângulos entre os planos que contém os ciclos e a torção da cadeia lateral.

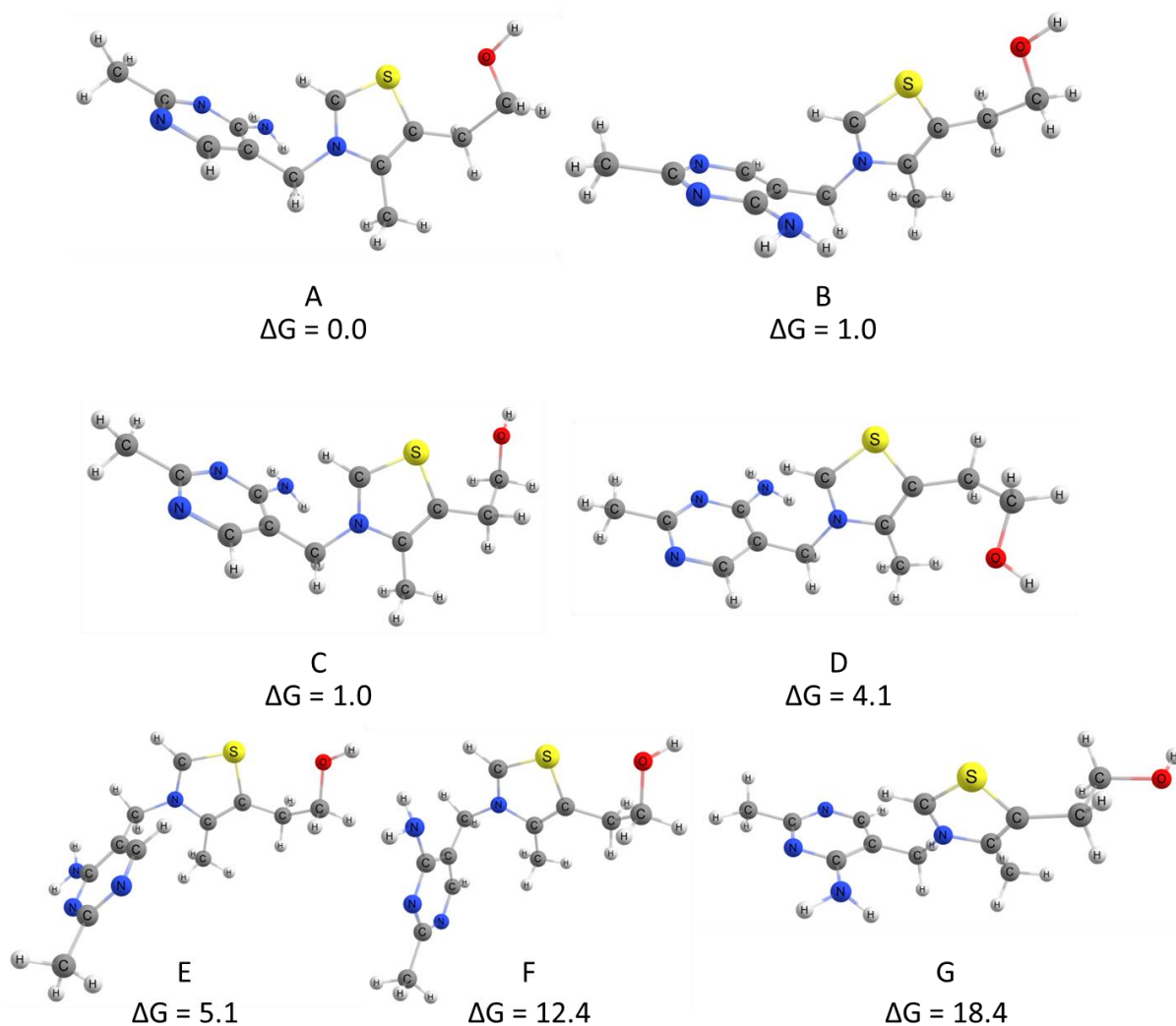


Figura 26. Estruturas conformacionais calculadas para a tiamina e suas energias livres de Gibbs (kJ/mol) relativas à conformação de menor energia

Observa-se na Figura 26 que a análise conformacional da tiamina gera vários conformêros com energias próximas. Dada a diferença de energia calculadas, pode-se considerar que as espécies A a E não poderiam ser diferenciadas unicamente pela energia relativa e dados experimentais são necessários para a determinação estrutural deste íon. No tocante ao espectro experimental, pode-se esperar que haja contribuição de mais de uma espécie devido à provável presença de múltiplas populações de energia próxima no meio gasoso.

Tabela 13. Atribuição das bandas vibracionais da tiamina monohidratada. Os valores de número de onda estão em cm^{-1} .

Experimental	Oscilador	Teórico
-	$\sigma(\text{sim.})$ CH (EtOH)	2892
2971	$\sigma(\text{sim.})$ CH	2950
-	σ CH (assim.)	3004
3148	σ CH (N=CH)	3115
3401	$\sigma(\text{sim.})$ NH	3408
3439	$\sigma(\text{sim.})$ NH	3405
3540	$\sigma(\text{assim.})$ NH	3523
3683	σ OH	3691

No entanto, a Figura 28 mostra que, mesmo experimentalmente, não é possível a diferenciação entre os confôrmeros da tiamina devido à semelhança de seus espectros calculados. Mesmo na região de *fingerprint*, que costuma apresentar maior especificidade entre confôrmeros, não há a presença de alguma característica que possibilite essa diferenciação. A exceção é o confôrmero F que possui as bandas calculadas entre 3100 e 3600 cm^{-1} mais deslocadas para a região do vermelho em relação aos outros confôrmeros. Isso pode ser racionalizado por uma maior aproximação do próton localizado no carbono entre o N e o S, que é relativamente ácido, a amina, interferindo nos estiramentos C-H e N-H destes grupamentos.

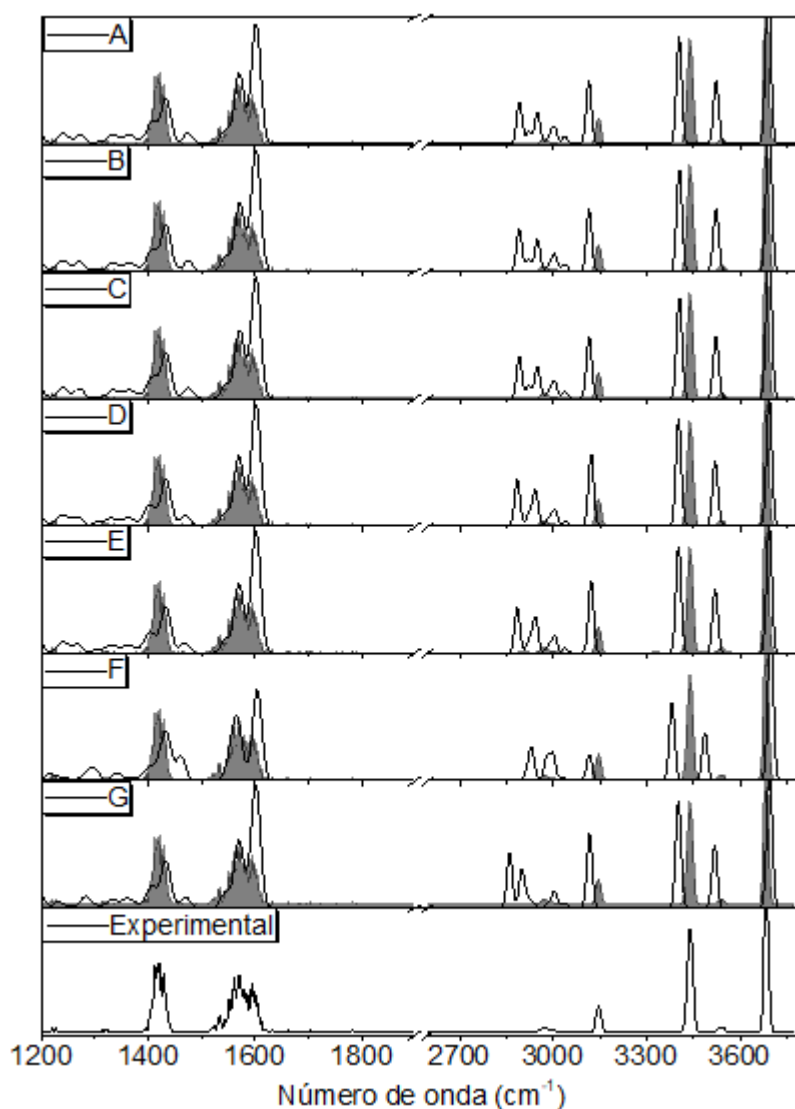


Figura 27. Espectro experimental (em baixo e em background) da tiamina comparado aos espectros calculados para os conformêros de A a G. As intensidades bandas dos espectros calculados foram aumentadas 5 x na faixa de 2500 a 3800 cm^{-1} .

3.4.2.2. TIAMINA MONOHIDRATADA

A obtenção de um aduto de razão m/z equivalente ao íon $[M+H_2O]^+$ foi possível ao realizar-se análises da tiamina via nanospray quando a amostra estava diluída na solução MeOH/H₂O (1:1). Iniciou-se, portanto o estudo de microsolvatação da tiamina para investigar como este íon interage com a molécula de água em meio gasoso (Figura 29). A primeira etapa foi a otimização dos parâmetros de ionização para que se obtivesse a maior intensidade possível do aduto de interesse. A intensidade máxima foi obtida com a saída do capilar do nanospray posicionada de 1 a 2 centímetros a frente da entrada do espectrômetro de massas em ângulo 0°. Para que não houvesse perdas por dessolvatação ou dissociação devido à energia térmica, o gás

de dessolvatação não foi utilizado. A voltagem de ionização definida foi 4500V e o solvente mais eficiente foi a mistura MeOH/H₂O (2:8). Quando maiores quantidades de MeOH eram utilizadas, observou-se uma diminuição na intensidade do aduto [M+H₂O]⁺ e um rápido consumo de amostra devido a menor viscosidade deste solvente. Por sua vez, maiores quantidades de água diminuíam as intensidades de todos os íons de forma geral, além de exigir uma maior proximidade do capilar do nanospray à entrada do espectrômetro de massas. Ressalta-se o fato de que as voltagens utilizadas eram muito maiores que as voltagens padrão de análises por nanospray, que operam geralmente na faixa de 1 - 2 kV, o que pode ter influenciado para a visualização do aduto em questão.

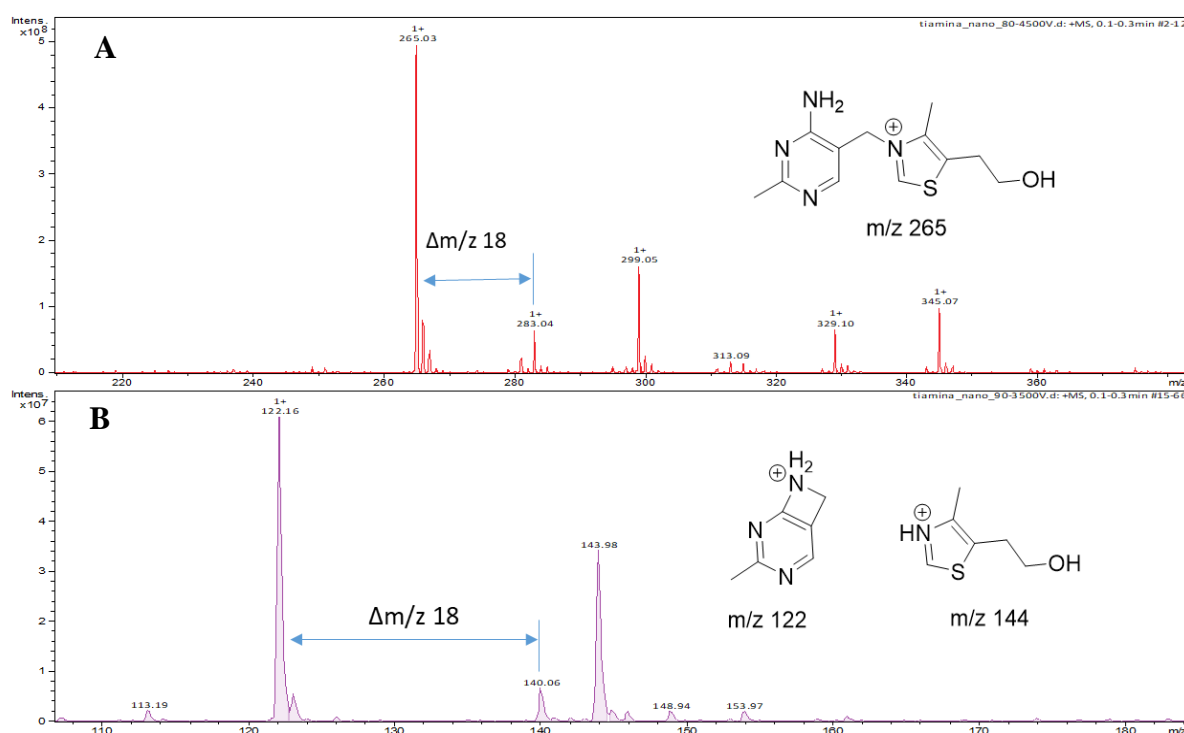


Figura 28. A) Formação do aduto de tiamina com água, m/z 283. À direita está a estrutura da tiamina; B) espectro mostrando a análise do aduto do fragmento da tiamina com água, m/z 140. À direita estão as estruturas dos principais fragmentos da tiamina.

A tiamina se dissocia facilmente, gerando dois fragmentos principais de m/z 122 e 144 na fonte de ionização, como é observado na Figura 28B. Está presente neste espectro o íon de m/z 140, que não é encontrado quando o íon [M+H₂O]⁺ não é gerado. Infere-se, portanto, que o íon m/z 140 seja o aduto do fragmento m/z 122 com água. Verifica-se ainda que não há presença detectável de um possível íon m/z 162, que seria o aduto do fragmento m/z 144 com água. A princípio, se imaginava que isto era um indício de que a água interagia com a tiamina em algum sítio próximo à região que contém o anel de 6 membros, precursor do fragmento de

m/z 122. Isso poderia ser explicado pela presença de múltiplas aminas que aumentam a polaridade nesta região.

Contudo, ainda que a tiamina fragmente facilmente, é improvável que um processo de dissociação aconteça antes da dessolvatação da água coordenada. A ligação covalente que deve ser quebrada no processo de dissociação tem energia maior que a energia da ligação intermolecular que liga a água à tiamina. O mais provável é que a fragmentação ocorra anteriormente à formação do aduto, no processo de ionização e formação de spray. Tiamina e fragmento de m/z 122 formariam o agregado com água já na fase gasosa ou na interface líquido gás no aerossol formado no processo de ionização. Observa-se, também, a formação do aduto $[M+MeOH]^+$ de m/z 154, no entanto este último não foi investigado a fundo.

A princípio esperava-se que a água interagisse com o nitrogênio que continha a carga positiva, visto que o oxigênio da água possui uma densidade de carga negativa, capaz de estabilizar parcialmente a carga positiva intrínseca da tiamina. No entanto, os cálculos mostraram que não foi significativa a diferença de energia entre os confôrmeros que continham a água interagindo com a região carregada e os que continham a água interagindo com outros sítios da molécula (Figura 30). Portanto, o espectro experimental é essencial para a determinação correta do sítio de coordenação da água à tiamina.

A Figura 30 mostra que o confôrmero A, além de possuir menor energia, mostrou boa correspondência com o espectro teórico e um perfil de intensidade das bandas semelhante. Embora o confôrmero B também tenha apresentado boa correspondência dos picos de maior intensidade (entre $3250 - 3600 \text{ cm}^{-1}$), é interessante observar que o esperado é que o espectro experimental de fato esteja deslocado para o vermelho em relação ao espectro teórico. Como discutido em tópicos anteriores, interações inter ou intramoleculares causam uma deformação na curva potencial das vibrações, fazendo com que elas tenham um comportamento mais anarmônico. Essa deformação faz com que os níveis vibracionais se aproximem, diminuindo a energia necessária para a excitação vibracional de uma espécie.

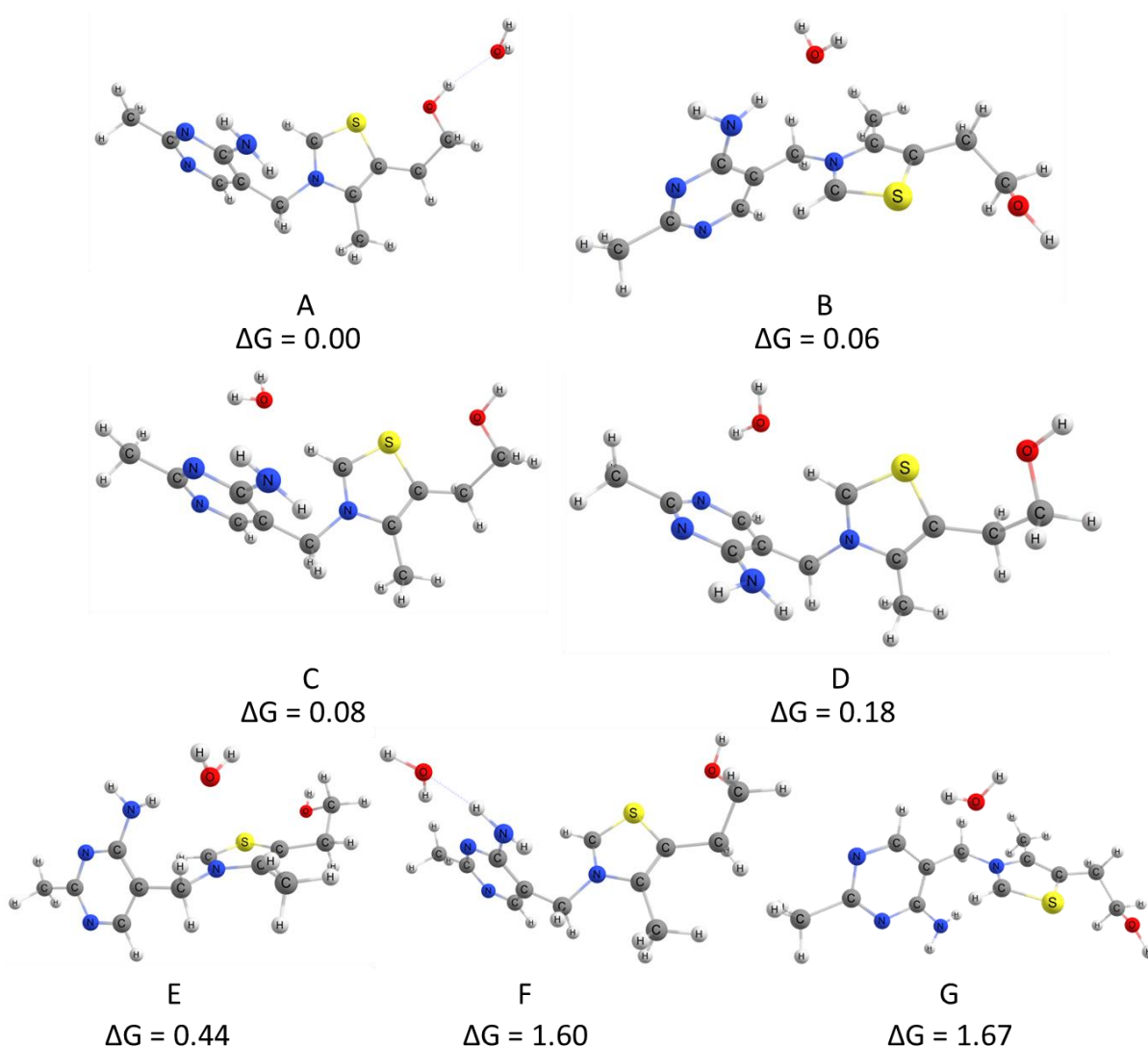


Figura 29. Confôrmeros gerados para a tiamina monohidratada após otimização da geometria. Abaixo de cada estrutura estão indicadas as energias livres relativas em kJ/mol.

Os cálculos feitos neste estudo, por sua vez, são cálculos realizados a partir da aproximação dos osciladores para um modelo harmônico, por isso, é esperado que bandas que estejam associadas a interações de van der Waals estejam deslocadas para regiões de menor energia. Um exemplo deste fenômeno é encontrado no trabalho de Masson et al.¹⁹³, onde as vibrações N-H da glicina formando cluster com He ou H₂ era deslocada de 40 a 110 cm⁻¹. No caso da tiamina monohidratada, a banda de maior energia do confôrmero A, em 3490 cm⁻¹, mostra uma discrepância de 37 cm⁻¹, para a banda experimental de maior intensidade, em 3453 cm⁻¹, que é atribuída ao estiramento da ligação OH que participa da ligação de hidrogênio com a água (Tabela 14). É inconclusivo se a banda calculada em 3410 cm⁻¹ equivale à banda experimental em 3354 cm⁻¹, o que representaria um deslocamento de 56 cm⁻¹, ou se equivale à

banda experimental sobreposta pela banda de maior intensidade, formando uma espécie de ombro à esquerda desta banda. Neste último caso, a banda calculada teria uma ótima concordância em relação à banda experimental.

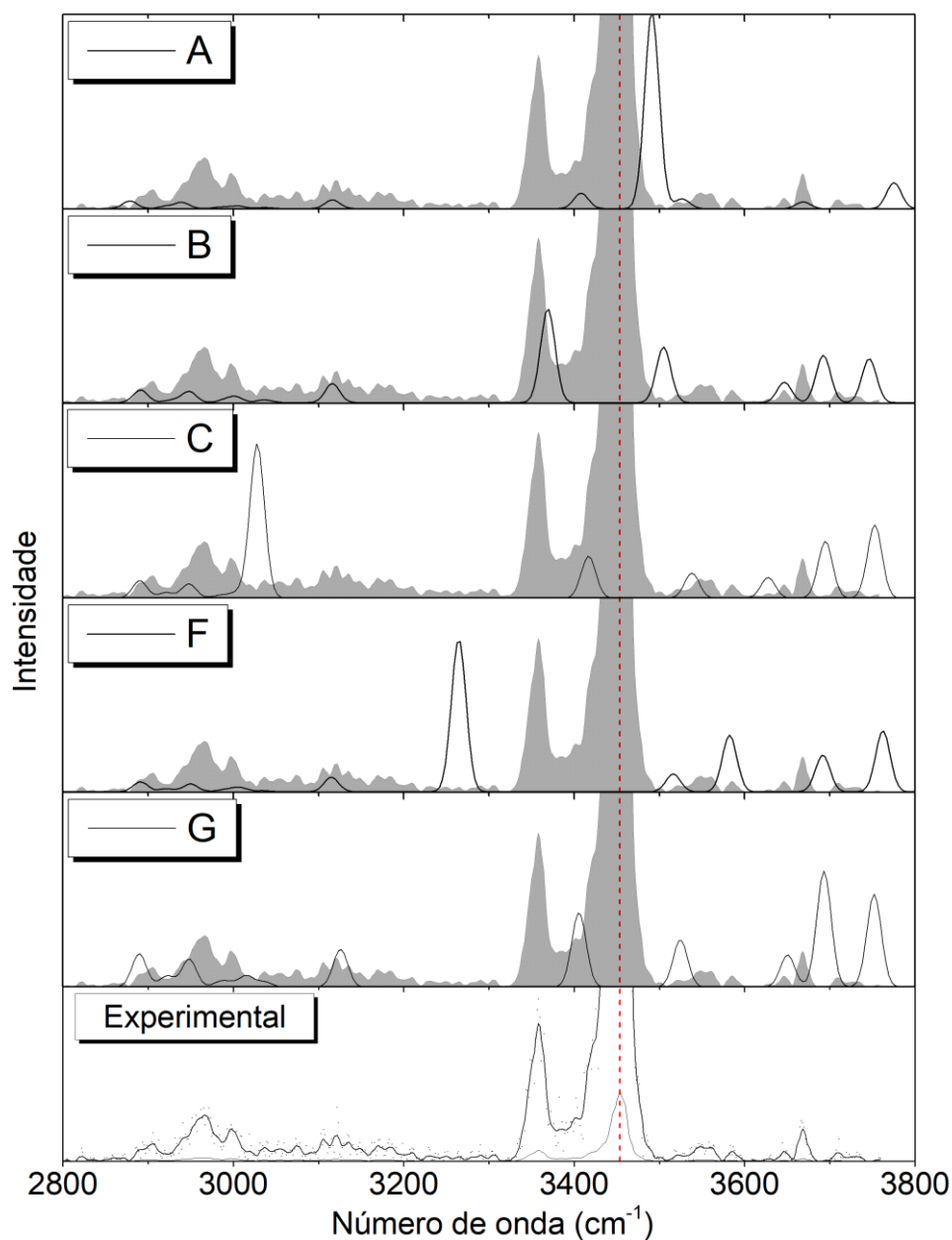


Figura 30. Espectros vibracionais da tiamina monohidratada em comparação ao espectro experimental. Cálculos feitos com o nível de teoria m062x/6-31+G(d,p) e com a inclusão das linhas de comando OPT=(Tight) Int=(Grid=Ultrafine) CPHF=(Grid=Fine).

Com relação a região de maiores frequências, enquanto outros espectros calculados apresentam 3 bandas após 3600 cm^{-1} , o confômero A apresenta somente duas. Todavia, o espectro experimental apresenta apenas uma banda facilmente identificável nessa região, em

3669 cm^{-1} . Tal banda é ladeada por duas bandas aparentes em 3645 e 3714 cm^{-1} , porém com baixas relações S/N.

Vale pontuar que algumas das conformações possuem espectros muito semelhantes, como os espectros dos confôrmeros B e E e dos confôrmeros C e D. A diferença entre os confôrmeros de cada par é o ângulo entre o plano dos anéis de 5 e 6 membros, que afetam a energia livre das espécies, mas não apresentam muito impacto no espectro vibracional. Por esta razão, os espectros dos confôrmeros E e D foram omitidos da Figura 30.

Outro fator importante a se considerar é o fato de que a diferença de energia entre os confôrmeros é muito pequena, o que indica que estas espécies apresentem populações consideráveis, que podem ser quantificados pela distribuição de Boltzmann. De fato, visto que que a diferença entre energias é muito menor que a incerteza intrínseca ao cálculo de energias dos métodos DFT, estas energias relativas são virtualmente iguais. Portanto, avaliou-se a correspondência entre o espectro experimental e o gerado pela média ponderada pela distribuição de Boltzmann dos confôrmeros A+B e dos confôrmeros A+B+C.

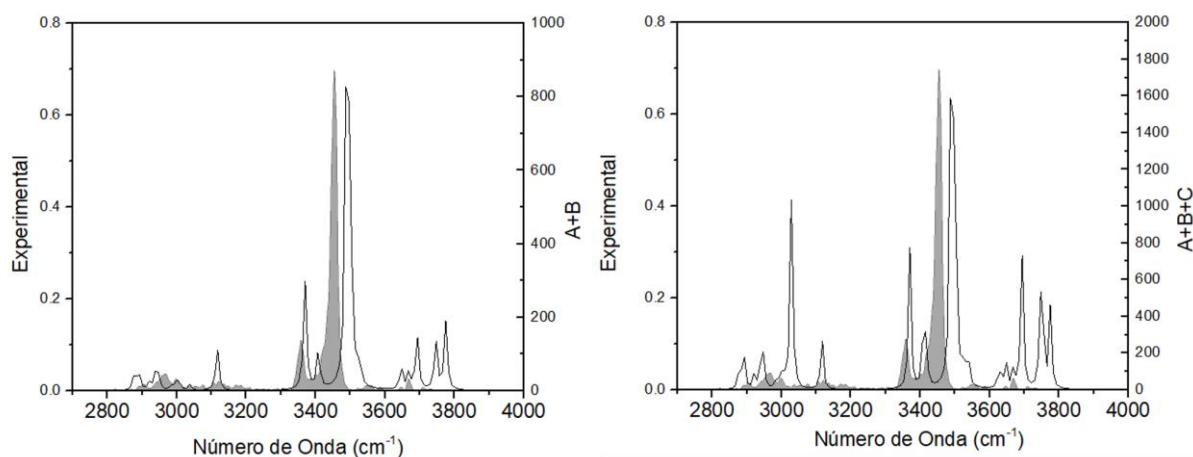


Figura 31. Espectros gerados a partir da média ponderada pela distribuição de Boltzmann das espécies A+B (A) e A+B+C (B). O espectro experimental é exibido em cinza para comparação.

A Figura 31 Mostra uma ótima correspondência entre o espectro experimental e o espectro formado pela média entre A e B. Verifica-se que a banda experimental em 3358 cm^{-1} é atribuída ao estiramento da ligação NH simétrico da amina do confôrmero B, e não à banda em 3410 cm^{-1} , referente ao estiramento da ligação NH simétrico da amina calculada para o confôrmero A, como deixa evidente a Tabela 14. Responde-se, pois, a dúvida sobre a correspondência desta banda calculada, que se refere a banda experimental próxima a 3401 cm^{-1} , mas sobreposta pela banda experimental em 3453 cm^{-1} .

Quando o confômero C era considerado (Figura 31B), o espectro da média apresentou pior correspondência ao espectro experimental, tendo como característica mais marcante a presença de uma banda calculada fina e intensa em aproximadamente 3030 cm⁻¹, que não é vista em solução.

Tabela 14. Atribuição das bandas vibracionais da tiamina monohidratada. Os valores de número de onda estão em cm⁻¹.

Experimental	Oscilador	A	Oscilador	B	Oscilador	C
2906	σ(sim.) CH (EtOH)	2878	σ(sim.) CH (EtOH)	2891	σ(sim.) CH (EtOH)	2890
2967	σ(sim.) CH	2939	σ(sim.) CH	2948	σ(sim.) CH	2921
2998	σ(asssim.) CH	3006	σ(asssim.) CH	3003	σ(asssim.) CH	2948
3121	σ CH (N=CH)	3116	σ CH (N=CH)	3116	σ CH (N=CH)	3035
3358	-	-	σ(sim.) NH	3369	-	-
3401	σ(sim.) NH	3408	-	-	-	-
3453	σ OH	3491	-	-	σ(sim.) NH	3416
3554	σ(assim.) NH	3527	σ(assim.) NH	3505	σ(assim.) NH	3538
3645	-	-	σ(sim.) H ₂ O	3646	σ(sim.) H ₂ O	3628
3669	σ(sim.) H ₂ O	3669	σ OH	3692	σ OH	3695
3714	σ(assim.) H ₂ O	3775	σ(assim.) H ₂ O	3746	σ(assim.) H ₂ O	3793

O fato mais interessante nesta análise é que os resultados indicam que a água não está interagindo apenas com a região contendo carga formal, mas majoritariamente com a hidroxila da cadeia lateral. Esse efeito foi observado por Prell e colaboradores¹⁸³ em análises da prolina protonada monohidratada, onde a água deixava de interagir com o sítio de protonação e passava a interagir com a hidroxila do ácido carboxílico devido a fatores entrópicos.

Como visto no tópico 3.2.2, os cálculos de QTAIM são úteis para descrever as interações inter e intramoleculares e, até mesmo estimar as energias de ligação de hidrogênio. Os BCPs dos confômeros A, B e C da tiamina monohidratada estão apresentados na Figura 32. Os parâmetros topológicos obtidos nos cálculos de QTAIM estão listados na Tabela 15.

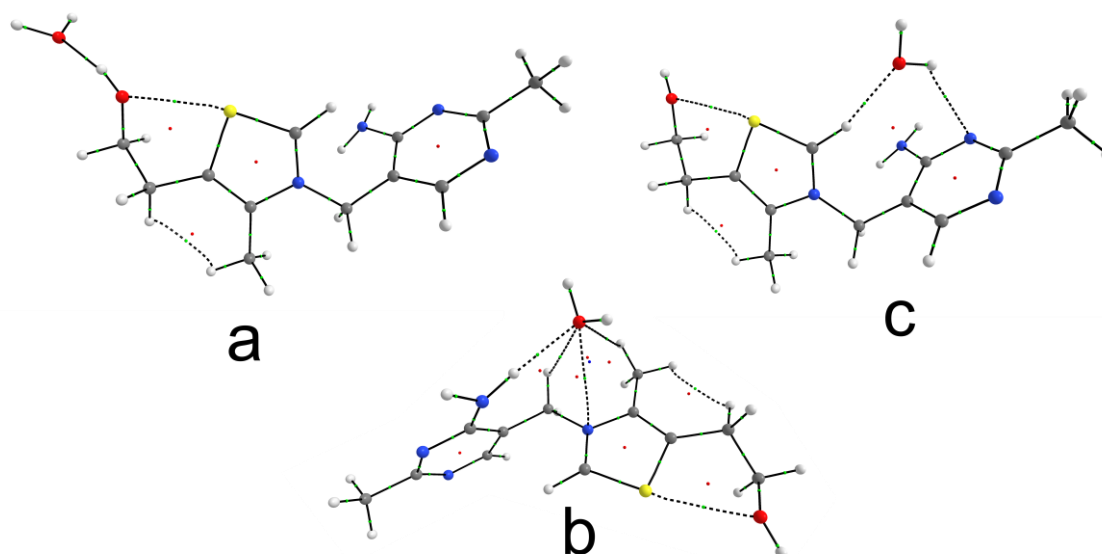


Figura 32. Estruturas 3D e pontos críticos calculados para os conformêros a) A, b) B e c) C da tiamina monohidratada.

Tabela 15. Parâmetros topológicos obtidos através dos cálculos de QTAIM nos BCPs: densidade eletrônica ($\rho(r)$)^a; laplaciano da densidade eletrônica ($\nabla^2\rho(r)$)^a; densidade de energia potencial ($V(r)$)^a; densidade de energia cinética ($G(r)$)^a; densidade de energia eletrônica total ($H(r)$)^a; elipsidade (ϵ); energia de ligação de hidrogênio (E_{HH}^{AF})^c proposta por Afonin¹⁵⁶; Energia de ligação empírica ($-\Delta H$)^{c 140}.

Interação	$\rho(r)$	$\nabla^2\rho(r)$	$V(r)$	$G(r)$	$H(r)$	ϵ	E_{HH}^{AF}	$-\Delta H$
A (O _w ...H)	0.031	0.110	-0.025	0.026	0.0011	0.067	16.0	19.0
A (O...S)	0.021	0.071	-0.017	0.017	0.0005	0.048	10.3	
A (H...H)	0.010	0.040	-0.006	0.008	0.0022	1.015	2.1	
						A	28.4	
						(Total)		
B (O _w ...N)	0.008	0.027	-0.006	0.006	0.0004	1.242	2.3	16.0
B (O _w ...H-N)	0.021	0.064	-0.017	0.017	-0.0006	0.037	10.6	
B (O _w ...HMe)	0.009	0.031	-0.006	0.007	0.0009	0.143	2.4	
B (O _w ...HEt)	0.011	0.038	-0.008	0.009	0.0008	0.077	3.9	
B (O...S)	0.019	0.064	-0.015	0.016	0.0005	0.038	9.1	
B (H...H)	0.010	0.040	-0.006	0.008	0.0022	0.956	2.1	
						B	30.3	
						(Total)		
C (O _w ...H-C)	0.022	0.070	-0.017	0.017	0.0001	0.101	10.7	
C (O _w H...N)	0.014	0.050	-0.011	0.012	0.0008	0.176	6.0	
C (O...S)	0.018	0.063	-0.015	0.015	0.0005	0.039	8.8	
C (H...H)	0.010	0.040	-0.006	0.008	0.0022	0.894	2.2	
						C	27.7	
						(Total)		

^aem a.u.; ^bem Angstrom; ^cem kJ/mol. O_w se refere ao oxigênio da água.

A soma das energias das interações intermoleculares do confôrmero C é a menor dentre os três analisados. Um dos prótons da água, neste composto, faria uma ligação de hidrogênio com um dos nitrogênios do anel de seis membros, enquanto o oxigênio interage com o hidrogênio ácido ligado ao carbono vizinho ao indol. Esta última ligação de hidrogênio teria energia de 10,7 kJ/mol, calculada pela equação de Afonin.¹⁵⁶ No entanto, o *redshift* desta ligação não foi identificado, o que impede a estimativa da energia experimental e indica que, de fato, o confôrmero C não é acessível.

A equação de Afonin foi utilizada por fornecer os resultados de energia mais próximos dos obtidos experimentalmente. A energia calculada da ligação de hidrogênio no confôrmero A, formada entre o oxigênio da água e o próton da hidroxila, é de 16 kJ/mol, enquanto a entalpia de ligação experimental é 19 kJ/mol. Esta é uma ligação de hidrogênio com força moderada, segundo a classificação de Grabowski¹⁵⁵ e, de fato, é a ligação mais forte entre as interações identificadas. Isso poderia explicar o motivo da água se ligar preferencialmente à hidroxila. As outras interações identificadas são uma interação H...H e uma do tipo S...O, observadas em todas as outras conformações.

O confôrmero B é o que possui mais interações intermoleculares com a água, todas envolvendo o oxigênio da água. As interações inter e intramoleculares deste confôrmero somam uma energia de 30 kJ/mol. A interação mais forte é uma ligação de hidrogênio entre o próton da amina primária da tiamina com o oxigênio da água. Esta ligação possui energia calculada de 11 kJ/mol e entalpia estimada de 16 kJ/mol.

Através dos cálculos de NCI, representados na Figura 33, é possível visualizar melhor o observado pelos cálculos de QTAIM para os confôrmeros A e B. Os valores de $\text{sign}(\lambda_2)\rho$ em que $s(r)$ tende a zero estão listados na Tabela 16.

Tabela 16. Valores de $\text{sign}(\lambda_2)\rho$ em que $s(r)$ tende a zero.

<i>Entrada</i>	<i>A</i>	<i>B</i>
1	-0.031	-0.021
2	-0.021	-0.018
3	-0.014	-0.014
4	-0.010	-0.010
5	-0.007	-0.008
6	0.007	0.008
7	0.010	0.009
8	0.015	0.014
9	0.025	0.025
10	0.041	0.040

Na Figura 33 vemos que, de fato, a interação $O_w \cdots H-O$ é a mais intensa, demonstrado pela isosuperfície de cor azul e um vale em $\text{sign}(\lambda_2)\rho = -0,031$ (Tabela 16). Esta interação é seguida em energia pelas interações $H-O \cdots S$ ($\text{sign}(\lambda_2)\rho = -0,021$) e por uma interação do tipo $C-H \cdots \pi$ ($\text{sign}(\lambda_2)\rho = -0,014$), não identificada no cálculo de QTAIM. Esta última é formada entre o hidrogênio ácido gerado pela proximidade do nitrogênio quaternário e o sistema π do anel aromático de seis membros. Demais interações atrativas de menor energia são devidas à duas interações $H \cdots H$ identificadas.

As interações repulsivas – observadas na região de $\text{sign}(\lambda_2)\rho > 0$ – de maior energia são formadas pela repulsão no centro dos anéis de cinco ($\text{sign}(\lambda_2)\rho = 0,041$) e seis membros ($\text{sign}(\lambda_2)\rho = 0,025$). As interações repulsivas de menor energia são referentes aos RCPs formados nos pseudo-anéis neste confômero.

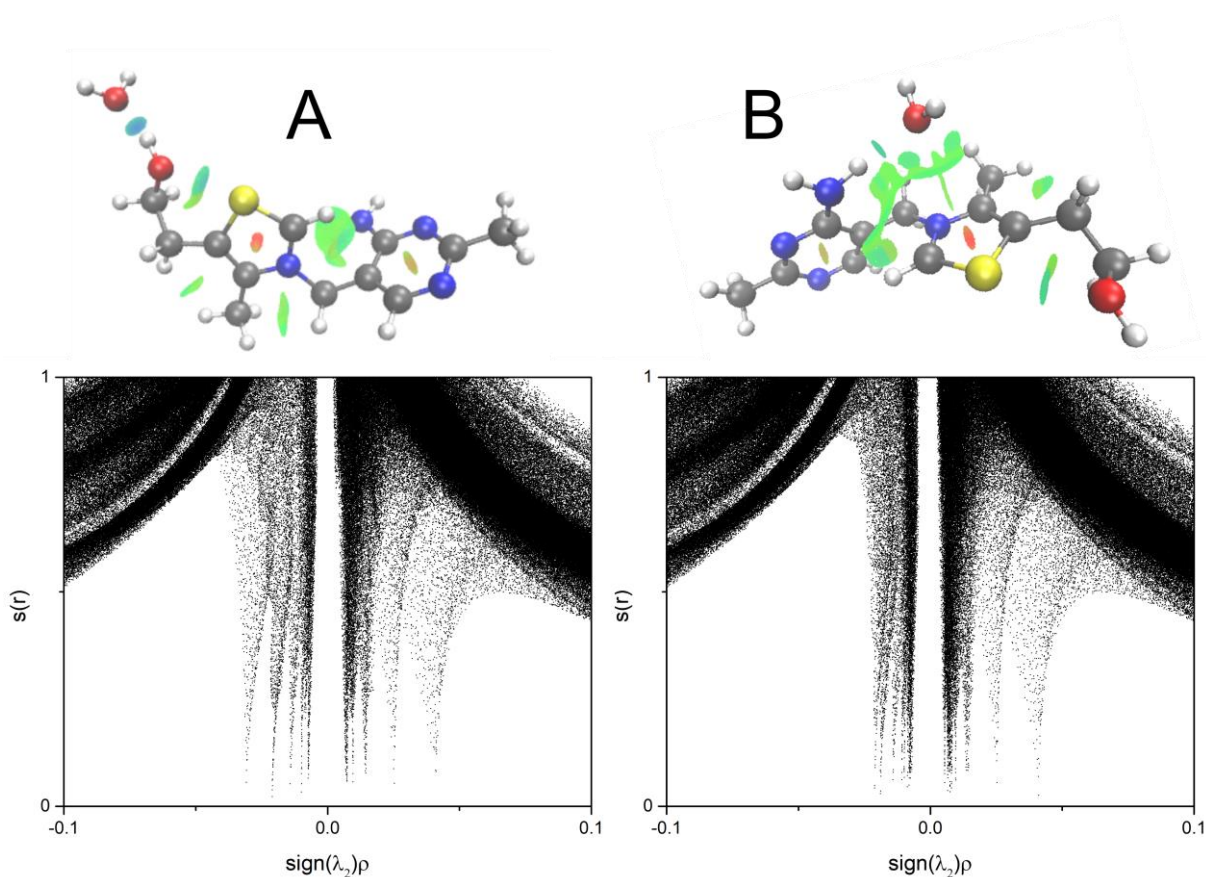


Figura 33. Isosuperfícies de NCI dos confômeros A e B da tiamina monohidratada e seus respectivos gráficos de $s(r)$ em função de $\text{sign}(\lambda_2)\rho$.

No confômero B, a interação mais forte é a formada entre o O_w e o próton da amina primária ($\text{sign}(\lambda_2)\rho = -0,021$). A interação $H-O \cdots S$ ($\text{sign}(\lambda_2)\rho = -0,018$) é mais fraca que no caso do confômero A, provavelmente porque a carga parcial negativa é maior no oxigênio da

hidroxila do confômero A, dado que o próton hidroxílico participa de uma ligação de hidrogênio. A interação do tipo C-H \cdots π também é observada neste confômero, sendo sua força similar ($\text{sign}(\lambda_2)\rho = -0,014$). Uma série de interações atrativas geram vales quase indistinguíveis no gráfico de $s(r)$ em função de $\text{sign}(\lambda_2)\rho$, com sinais indo de $\text{sign}(\lambda_2)\rho = -0,010$ a $-0,008$. Tais vales são gerados pela interação do O_w com dois hidrogênios alquílicos e com o nitrogênio quaternário. Também ocorre a contribuição de interações atrativas do tipo H \cdots H.

Na região repulsiva, observa-se os vales gerados pelos anéis de cinco ($\text{sign}(\lambda_2)\rho = 0,040$) e seis membros ($\text{sign}(\lambda_2)\rho = 0,025$), previamente descritos no caso do confômero A. As interações repulsivas restantes também são geradas pela repulsão causada entre os pseudo-anéis formados neste confômeros. Portanto, os cálculos de QTAIM e NCI foram relevantes na identificação de interações intramoleculares e na interpretação da busca conformacional da tiamina monohidratada.

3.4.2.3. CONCLUSÃO

A espectroscopia IRMPD foi utilizada para o estudo conformacional e de microsolvatação da tiamina. No âmbito conformacional, a tiamina possui uma estrutura rígida que impede que haja uma variedade conformacional muito grande. Isso faz com que as conformações de menor energia possuam espectros indistinguíveis, impossibilitando a diferenciação conformacional na fase gasosa. Devido às baixas diferenças de energia, é provável que mais de uma conformação esteja presente na fase gasosa.

O estudo de microsolvatação da tiamina mostrou que ao menos duas conformações de menor energia contribuem para a formação do espectro observável. O mais interessante nestas análises é que a espécie de menor energia contém a água interagindo com a hidroxila, distante da carga formal intrínseca à tiamina. Embora outros confômeros, como o confômero C, apresentem energias muito próximas aos confômeros A e B, aparentemente não há presença detectável destas populações.

Os cálculos de QTAIM demonstraram que a interação do oxigênio da água com o próton da hidroxila é de fato a interação mais forte entre todas as conformações, com energia compatível a de ligações de hidrogênio moderadas. O confômero B, por sua vez, apresentou mais interações intermoleculares, sendo a soma das energias destas interações maior que a das interações do confômero A. Lançando mão da equação de Afonin, foi possível obter as energias de ligação entre água e tiamina com boa concordância com os valores experimentais, obtidos pela equação de Iogansen com os valores obtidos por IRMPD. Os cálculos de NCI

corroboraram os obtidos por QTAIM e permitiram a identificação de interações complementares, tal como uma ligação do tipo C-H... π , observada nos dois confôrmeros.

3.5. ESTUDO DE REAÇÕES DE FOTOCONVERSÃO EM SOLUÇÃO

Os resultados desta seção foram obtidos durante período sanduíche (agosto/2018 - outubro/2019), realizado no *Institut Lumière Matière* da *Université Claude Bernard Lyon 1*, sob orientação do Dr. Philippe Dugourd com bolsa PDSE concedida pela CAPES.

3.5.1. CONTEXTUALIZAÇÃO

Os *photoswitches* moleculares, ou fotointerruptores, em tradução livre, são moléculas que apresentam isomerização reversível ativada por luz. O processo de isomerização resulta em mudanças nas propriedades químicas do composto, o que torna essa classe de moléculas uma interessante ferramenta fotoquímica.^{194,195} O uso de luz como o agente ativante da reação apresenta diversas vantagens, visto que ela é fácil de produzir e seu uso reduz a geração de resíduos, o que faz com que a luz seja considerada amigável ao meio ambiente, além de ser ortogonal à outros estímulos e possuir alta resolução temporal e espacial.^{196–198} A luz também possui vantagens no uso terapêutico por ser não-invasiva, não requerer contato físico e não interferir em parâmetros fisiológicos.^{199,200} Alguns dos *photoswitches* conhecidos são os espiroiranos, os azobenzenos, os diariletenos, as fulgimidas, os dihidropirenos, os índigos e as acilhidrazonas.²⁰¹

Os Adutos Doadores-Aceptores de Stenhouse (do inglês *Donor-Acceptor Stenhouse Adducts* – DASA) são uma classe de moléculas que sofrem fotoisomerização quando recebem luz na região do visível. O processo é reversível quando o aduto em solução é submetido a aquecimento (Figura 35).^{202–204}

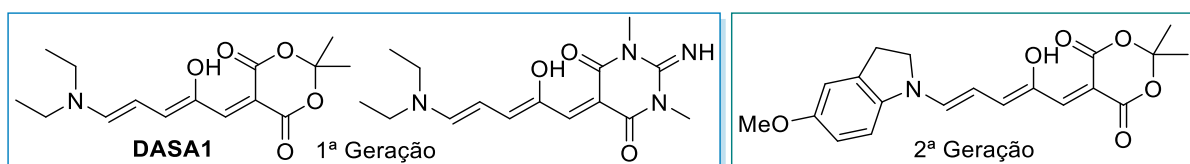


Figura 34. Exemplos de DASA já sintetizados, classificados como 1ª e 2ª geração.²⁰⁵ DASA1 (DASA de primeira geração a esquerda) foi a espécie estudada nesse projeto.

Essas moléculas foram recentemente sintetizadas por Helmy et al²⁰⁶ através de uma reação compatível com meio aquoso e que utiliza reagentes relativamente baratos, como ácido barbitúrico, furanos e aminas secundárias. Devido à variedade de derivados de furanos e aminas secundárias que podem ser empregados nesta síntese, uma igual variedade de moléculas do tipo DASA têm sido reportadas. No entanto, todos estes adutos têm em comum uma cadeia central contendo três ligações duplas conjugadas, flanqueadas por uma porção doadora - normalmente

uma amina terciária - e uma porção aceptora – normalmente um anel de seis membros contendo carbonilas (Figura 34).

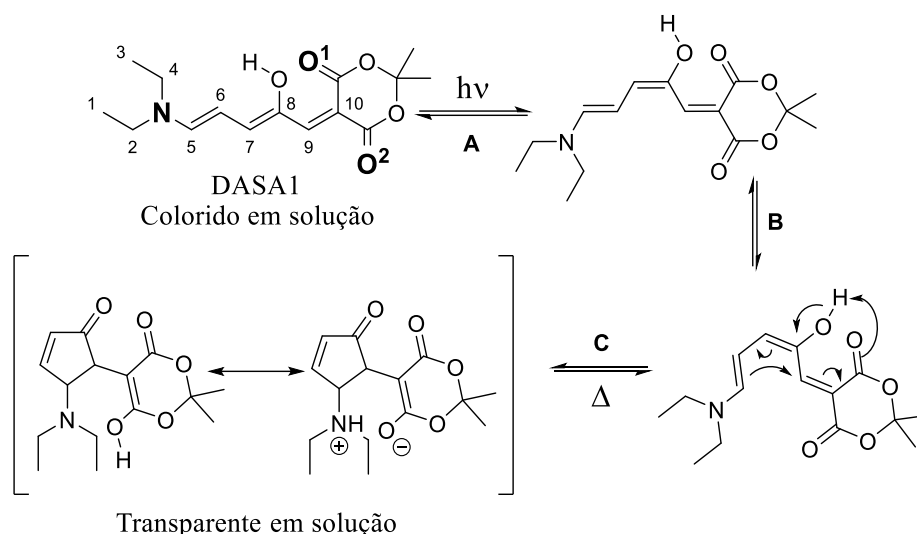


Figura 35. Mecanismo de *photoswitching* do DASA1. A primeira estrutura contém os potenciais sítios de protonação em negrito.

O mecanismo de *photoswitching* proposto para o DASA se inicia com a fotoabsorção na região do visível, o que faz com que a molécula sofra isomerização E/Z na dupla ligação entre carbonos 7 e 8 (Figura 35A). A reação segue com uma rotação no eixo da ligação simples entre os carbonos 6 e 7 (Figura 35B) seguido por uma eletrociclização 4π (Figura 35B), resultando em uma molécula mais compacta, que não apresenta absorção na luz visível e que possui maior hidrofiliabilidade, provavelmente devido à formação de zwitterion.²⁰⁶ A reação reversa pode ser obtida por aquecimento dos produtos cíclicos.²⁰⁴ Esta propriedade, aliada à grande variabilidade sintética dos DASAs permitem com que estas espécies sejam aplicadas em *drug-delivery*,^{207–212} ciência de materiais^{203,213–216} e na criação de sensores,^{217–219} entre outros.

Diversos grupos de pesquisa têm se dedicado a estudar o mecanismo de interconversão dos DASAs,^{195,198,202,220–224} incluindo o grupo liderado pelo vencedor do Prêmio Nobel de Química de 2016, Bernard L. Feringa, que se dedica a estudar máquinas moleculares. Alguns de seus trabalhos avaliam a influência do solvente no processo de *photoswitching*. Em um primeiro estudo, uma das moléculas do tipo DASA (nomeada aqui como DASA1) foi solubilizada em diferentes solventes. Verificou-se que em tolueno, a excitação da molécula ocorre em 545 nm, gerando um estado excitado transiente com um *redshift* de aproximadamente 50 nm.²⁰⁴ Eles também observaram que a reação é totalmente reversível em solventes apolares,

enquanto nem a reação direta ou inversa ocorre em solventes polares apróticos. Em solventes polares próticos, a reação direta é mais lenta, porém a reação inversa não acontece, provavelmente devido à estabilização da forma zwitteriônica.²⁰⁵ O mesmo grupo também mostrou que o grupamento hidroxila no carbono 9 (Figura 35) desempenha um importante papel no processo de isomerização.²²⁵ Outros estudos experimentais e teóricos têm sido realizados para caracterizar os estados excitados desta reação, sugerindo que a etapa de absorção do fóton é seguindo por duas etapas de ativação térmica para, então, gerar o produto cíclico.^{226,227}

Bull et al.²²⁸ fizeram uso de um espectrômetro de mobilidade iônica por tubo de arraste sequencial (DTIMS/DTIMS/MS) para separar, em fase gasosa, diferentes isômeros de um tipo de DASA contendo uma etiqueta de carga negativa ligada à amina terciária. Houve sucesso na separação de isômeros lineares e cíclicos usando N₂ como gás de arraste. Foram feitos testes dopando-se o gás de arraste com isopropanol ou alterando-se o gás de N₂ para CO₂, a fim de modificar-se as interações entre analito e gás de arraste. Com isso, foi possível observar uma melhora na separação de intermediários; no entanto os picos de intermediários lineares não se distinguiram além da formação de um ombro a partir do pico referente aos isômeros lineares. Além disso, eles demonstraram que, em fase gasosa, ocorre interconversão entre os isômeros cíclicos e lineares induzida por luz ou aquecimento. No entanto, o DTIMS foi capaz de separar apenas isômeros lineares de cíclicos, não havendo ainda uma técnica de separação capaz de separar diferentes espécies participantes da reação.

Sendo assim, o estudo reportado nesta tese avalia a evolução da reação de *photoswitching* do DASA1 protonado, utilizando FAIMS/MS e DTIMS/MS, e análises inéditas via UVPD e IRMPD. Também é proposto um método rápido e simples de diferenciação dos isômeros lineares e cíclicos do DASA1 a partir da razão de dois fragmentos diagnósticos desta molécula.

3.5.2. ESTUDO DE FRAGMENTAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DO DASA1 POR MS²

Lerch et al.²⁰⁵ demonstraram que a forma linear do DASA1 é estável em ACN e sofre ciclização espontânea e irreversível quando solubilizada em MeOH. Por esta razão e pelo fato de que o sinal de MS era instável e pouco intenso quando ACN era usado, uma solução estoque de DASA1 foi preparada em ACN e, a partir desta solução, as amostras em MeOH foram preparadas imediatamente antes das análises. É importante ressaltar que a partir do momento em que a solução é transferida para o MeOH, a reação tem início, o que aumenta o número de espécies em solução, sendo estas espécies intermediários, produtos e subprodutos. A reação

prossegue e pode ser acompanhada por uma mudança na cor da reação, partindo de um forte rosa - com pico de absorção em 515 nm, resultante da presença de isômeros lineares em solução - para uma solução transparente, sem absorção no visível, contendo majoritariamente isômeros cíclicos.

É sabido que isômeros distintos podem ser diferenciados por seus padrões de fragmentação ou pela presença de íons fragmentos específicos, denominados fragmentos diagnósticos. Tais fragmentos podem possuir a mesma razão m/z , mas por serem gerados por vias diferentes podem ser diferenciados por outras etapas de fragmentação, permitindo identificar indiretamente os isômeros iniciais.^{229,230} Por esta razão, foram analisados os padrões de fragmentação de amostras de DASA1 assim que o MeOH foi adicionado – início da reação (solução colorida) – e em estágio avançado de reação (solução transparente), considerando-se a fragmentação por CID e por PID em 450 nm (Figura 36).

Observando a Figura 36, pode-se perceber que a dissociação por CID do DASA1 gerou dois fragmentos principais, de m/z 238 (perda de uma acetona - 58 Da) e m/z 194 (perda de dióxido de carbono - 44 Da) (Figura 37), sendo o fragmento m/z 194 gerado pelo fragmento m/z 238.

Como o fragmento m/z 238 é encontrado ainda que a energia de colisão seja nula, supõe-se que sua presença, mesmo que em parte, seja gerada ainda na fonte de ionização. Ambos os isômeros lineares e cíclicos do DASA1 aparentam possuir os mesmos fragmentos, dos quais 238 e 194 são os mais intensos. No entanto, observou-se que as amostras coloridas (majoritariamente DASA1 linear) produziam uma maior proporção dos fragmentos m/z 238, enquanto amostras transparentes (majoritariamente DASA1 cíclico), favoreciam o surgimento do fragmento m/z 194. Pode-se claramente observar esta tendência quando analisada a taxa de ramificação (do inglês *branching ratio*) dos fragmentos, em um gráfico da razão das intensidades dos fragmentos em função da amplitude do CID (Figura 38).

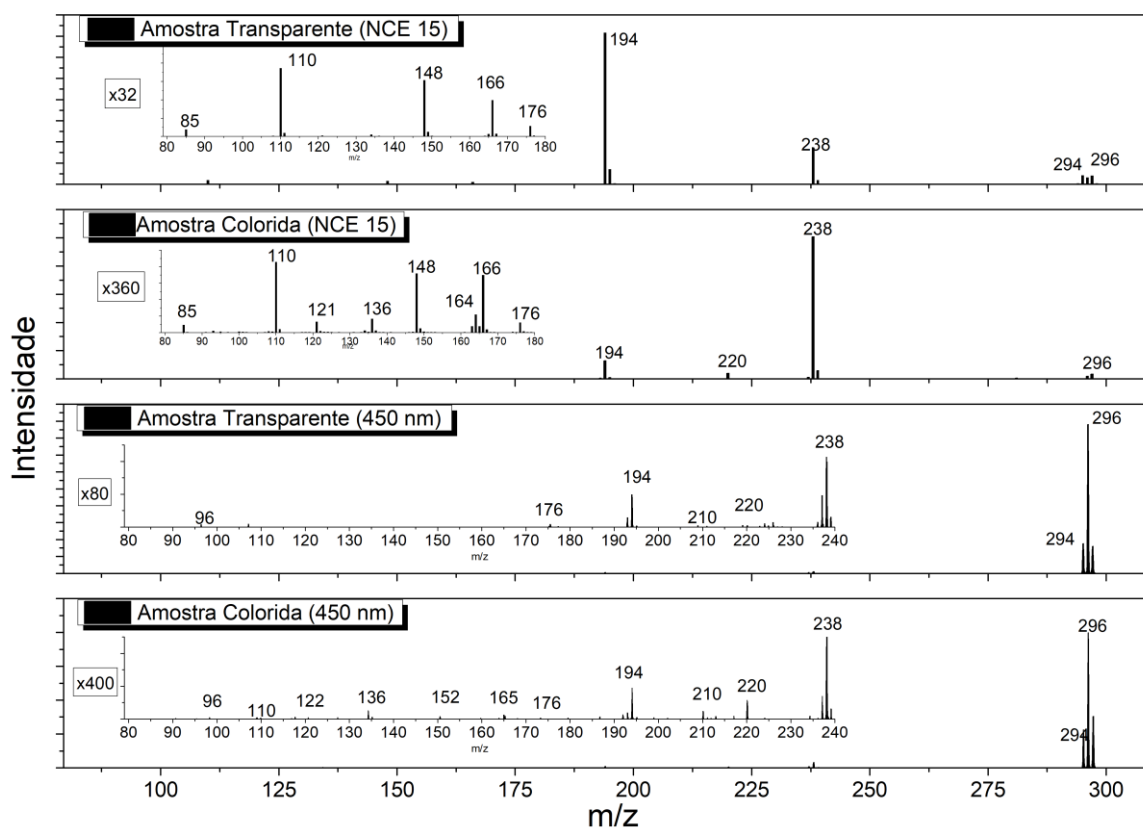


Figura 36. Espectros MS² das soluções transparente e colorida de DASA1. Fragmentações por CID e PID.

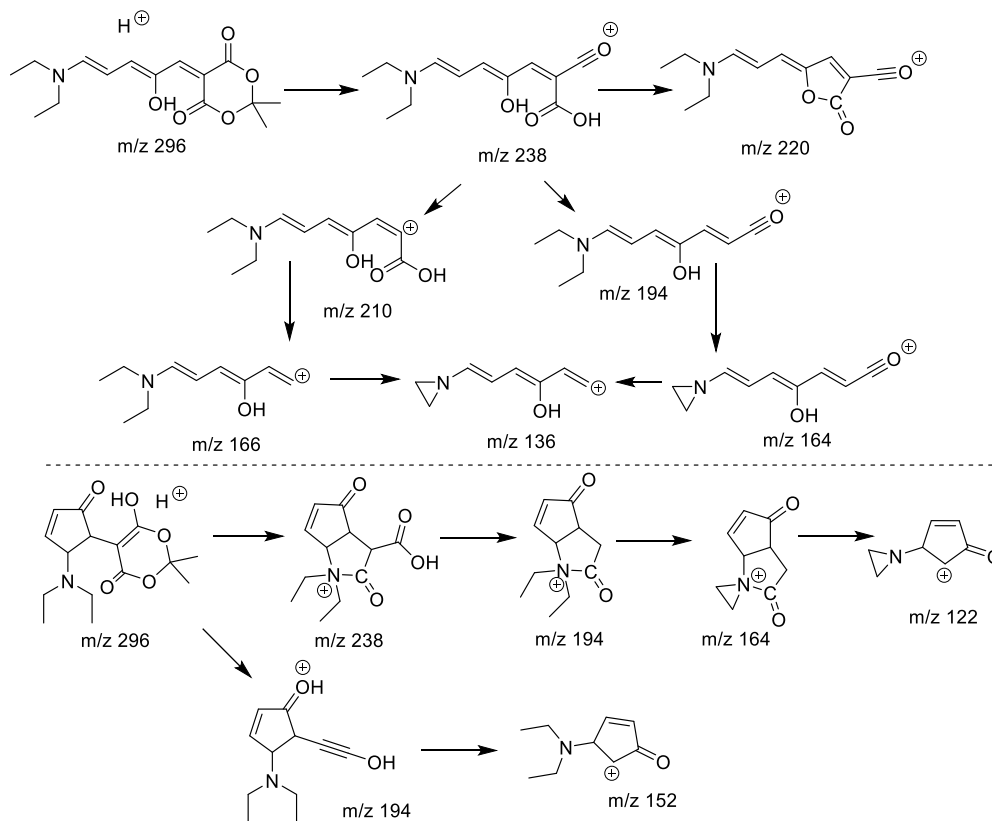


Figura 37. Esquema de fragmentação para o DASA1 cíclico e linear por CID e PID em 450 nm.

Como mostra a Figura 38, a razão 194/238 gerado pela fragmentação do DASA1 cíclico, portanto proveniente de uma amostra transparente (círculos de cor vinho), apresenta um crescimento acentuado em função do aumento da energia de colisão, atingindo um pico em NCE 15. Após este valor, observa-se uma maior fragmentação do fragmento 194, o que diminui a razão, seguido pela consumação quase total do fragmento 238, o que explica o crescimento da razão após NCE 20.

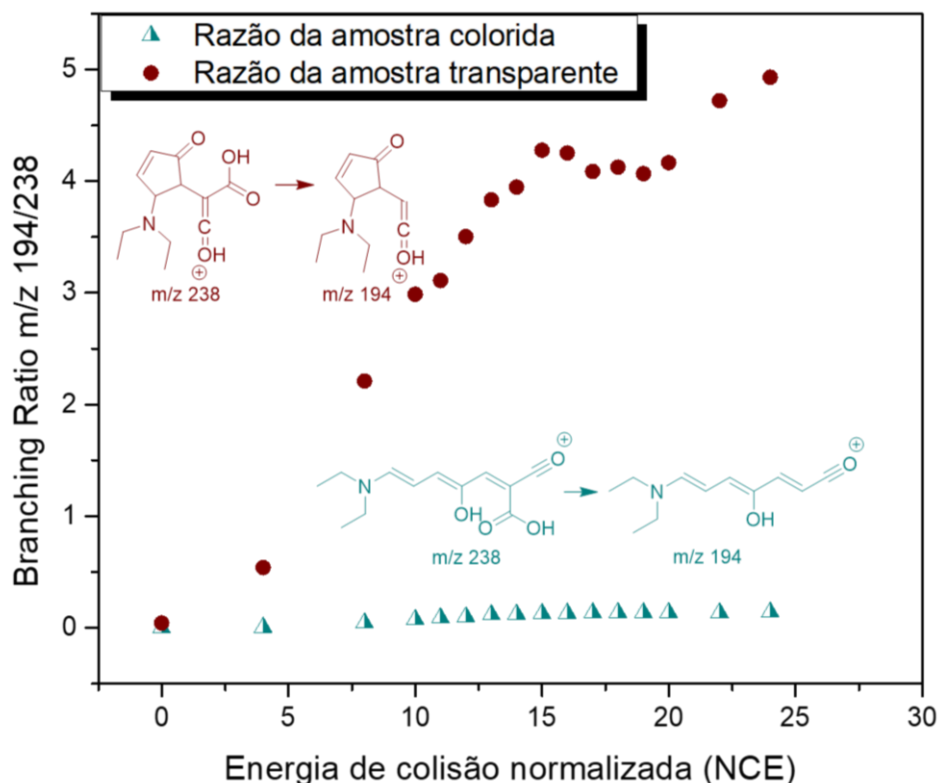


Figura 38. Razão entre intensidade dos fragmentos m/z 194 e m/z 238 versus CID energy.

Já no composto linear, o crescimento na razão 194/238 é discreto e a razão se mantém sempre próxima à zero. A estrutura proposta para os fragmentos pode nos fornecer informações para explicar tal tendência. A forma linear do fragmento 238 apresenta uma estrutura de ressonância ampla, capaz de estabilizar a carga positiva. A mesma característica não é encontrada no fragmento 238 cíclico. Esta característica explicaria a diferença de intensidade entre os dois isômeros e a razão 238/194 pode ser usada para diferenciar as espécies lineares e cíclicas.

3.5.3. ANÁLISE ENERGÉTICA DOS ISÔMEROS DO DASA1 PROTONADO DURANTE O PROCESSO DE PHOTOSWITCHING

O mecanismo de *Photoswitching* do DASA1, considerando-se todos os sítios de protonação, está apresentado na Figura 39. O mecanismo foi esquematizado baseando-se nas informações disponíveis na literatura e nas estruturas de menor energia calculadas no nível de teoria ω B97D/6-31+G(d,p). Esse nível de teoria foi selecionado por já ter sido utilizado no trabalho de Bull et al.²²⁸ e apresentar bom desempenho para moléculas que realizam transferência de carga, como é o caso dos DASAs. Os cálculos foram realizados considerando o nitrogênio (NH) e os oxigênios carboxílicos 1 e 2 (O1H e O2H) como potenciais sítios de protonação, como apresentado na Figura 35.

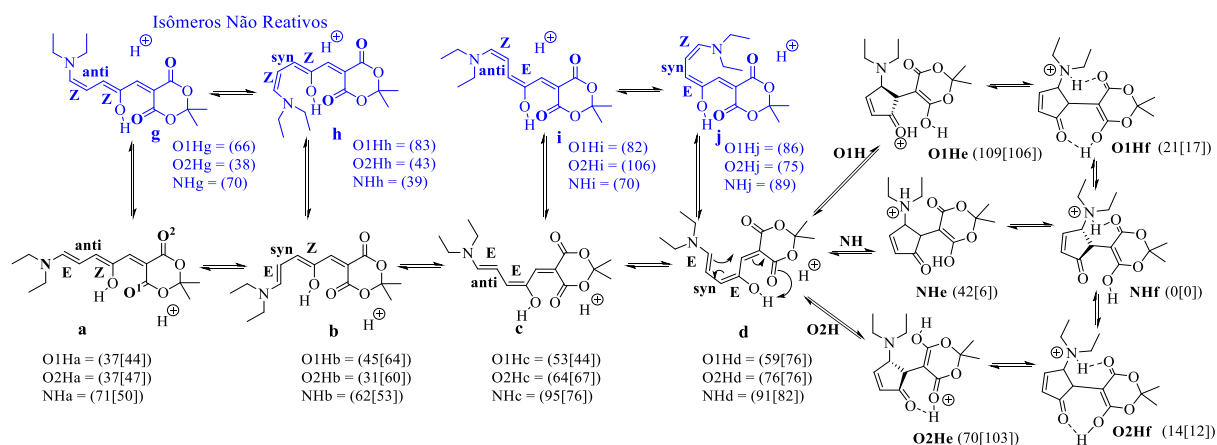


Figura 39. Esquema do mecanismo de isomerização do DASA1 protonado, seja em fase gasosa ou em solução. A partir dos isômeros (ou conformêros) **a** até **d**, as espécies são exibidas com um sítio de protonação genérico, visto que a protonação não altera significativamente a conformação destas espécies. A protonação é diferenciada nos isômeros **e** e **f**. Estruturas em azul (**g-j**) são subprodutos que não participam do caminho principal de reação. Em parêntesis se encontram as energias livres relativas de cada espécie, enquanto em colchetes se encontram tais energias em solução (ambos em kJ/mol).

Como apresentado na Figura 39, o mecanismo se inicia seja a partir das espécies *EantiZ* (isômero **a**) ou *EsynZ* (isômero **b**), visto que estas espécies são conformêros, possuem energias próximas e a isomerização de qualquer destas espécies pode dar continuidade à reação. A absorção de um fóton resulta na isomerização E/Z da dupla ligação entre os carbonos 7 e 8, gerando as espécies *EantiE* (isômero **c**), seguido pela espécie *EsynE* (isômero **d**). A isomerização pode ocorrer entre os carbonos 5 e 6, gerando quatro isômeros não reativos (isômeros **g-j**).²³¹ É importante salientar que a conformação do diedro formado entre as duas primeiras duplas ligações é *gauche* e não puramente *anti* ou *syn*, mas para facilitar o entendimento, a notação *syn* foi utilizada quando o ângulo do diedro varia entre 0 a 90° e entre

270 a 360°, ao passo que a notação *anti* foi utilizada quando o ângulo do diedro varia entre 90 a 270°.

A partir do isômero **d**, são formados os isômeros cíclicos que podem ter diversas conformações e interações intramoleculares, a depender do sítio de protonação. Quando protonado no nitrogênio, a ciclização resulta primeiramente em uma estrutura onde os dois ciclos se dispõem de forma quase planar entre si (**NHe**). Ao final, os ciclos adquirem uma disposição ortogonal e uma ligação de hidrogênio é formada entre o oxigênio carboxílico 2 (**O2**) e o amônio, gerando o isômero **NHf**. Este último isômero é o que apresenta o valor mínimo de energia global, portanto todas as rotas de reação são direcionadas a ele independentemente da protonação inicial.

O primeiro isômero cíclico gerado a partir da protonação no oxigênio carboxílico 2 (**O2H**) é o isômero **O2He**, que possui os dois ciclos em ortogonal, com uma ligação de hidrogênio formada entre o oxigênio carboxílico 1 (**O1**) e o oxigênio carboxílico formado a partir do que era a hidroxila nos isômeros lineares. Na próxima etapa, os ciclos adquirem uma disposição planar, uma em relação à outra, e uma nova ligação de hidrogênio é formada entre **O2** e o grupamento amina, gerando a espécie **O2Hf**. O próton é, então, transferido para a amina e a primeira ligação de hidrogênio é rompida, fazendo com que os ciclos se disponham ortogonalmente, gerando o isômero **NHf**.

Com relação à protonação no **O1**, não é observada a transferência de próton da hidroxila para o **O1**, que nos casos anteriores ocorre entre os isômeros **d** e **e**, visto que o **O1** já está protonado. Isso faz com que a espécie **O1He** tenha a maior energia entre os isômeros em fase gasosa (109 kJ/mol – Figura 40). Quando a protonação acontece no **O2** ou **N**, o isômero de menor energia é o **d** (**O2Hd**: 76 kJ/mol; **NHd**: 95 kJ/mol). A formação do isômero **O1Hf** acontece após a rotação da ligação entre os ciclos e uma dupla transferência de prótons, gerando uma espécie com estrutura muito próxima ao **O2Hf**. Os ciclos adquirem disposição perpendicular e a ligação de hidrogênio C=O1--H-O é rompida, gerando **NHf**.

Pode-se observar na fase gasosa, considerando-se os isômeros **a** e **b**, que os protômeros **O1H** e **O2H** possuem energia similar, sendo a energia de **O1Hb** (45 kJ/mol) a maior entre estas espécies, enquanto a de **O2Hb** (31 kJ/mol) é um pouco menor que **O1Ha** e **O2Ha** (ambos 37 kJ/mol). Todavia, quando tais isômeros estão protonados no nitrogênio, gerando as espécies **NHa** (71 kJ/mol) e **NHb** (62 kJ/mol), os protômeros gerados adquirem energias até duas vezes mais altas que seus análogos protonados nas carboxilas. Logo, infere-se que a protonação no nitrogênio nas formas lineares de **DASA1** não é favorável em fase gasosa. Contudo, as formas

cíclicas do DASA1 protonado no nitrogênio - **NHe** (42 kJ/mol) e **NHf** (0 kJ/mol) - possuem menor energia em comparação aos mesmos isômeros protonados nas carboxilas - **O1He**:109 kJ/mol; **O2He**:70 kJ/mol; **O1Hf**: 21 kJ/mol; **O2Hf**:14 kJ/mol. Além disso, alguns dos subprodutos possuem energias na mesma faixa das energias dos isômeros que fazem parte do caminho de reação, por exemplo **O2Hg** (38 kJ/mol), **O2Hh** (43 kJ/mol) e **NHh** (39 kJ/mol).

A fim de avaliar-se o perfil energético da reação em solução, a geometria dos isômeros citados foi otimizada em solução no nível de teoria SMD-(methanol)- ω B97D/6-31+G(d,p). Verificou-se que as energias calculadas estavam na mesma faixa, de 0 a 110 kJ/mol com relação ao **NHf**. Em solução, o isômero **NHa**, a forma totalmente estirada do DASA1 protonado no N, possui energia relativa de 50 kJ/mol, pouco superior aos protômeros **O1Ha** (44 kJ/mol) e **O2Ha** (47 kJ/mol). Essa pequena diferença indica que, se não houver significantes níveis de transferência de próton na interface líquido-gás no processo de ionização por eletrospray, poderíamos detectar as três formas protoméricas presentes em solução.

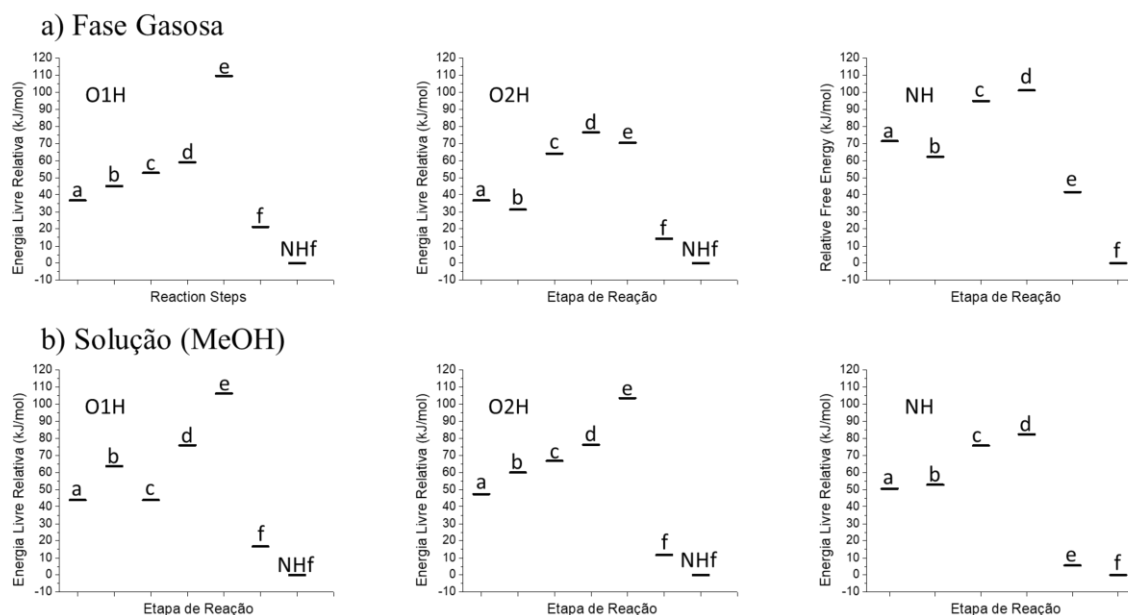


Figura 40. Diagrama de energia do progresso da reação do DASA1 em a) fase gasosa e b) solução (MeOH), considerando os diferentes sítios de protonação. A energia livre relativa é calculada comparando os isômeros em um mesmo meio. Todos os cálculos foram feitos no nível de teoria ω B97D/6-31+G(d,p). O isômero **NHf** foi incluído em todos os diagramas por ser a espécie de menor energia.

Em resumo, os cálculos aqui apresentados sugerem que uma série de diferentes protômeros e isômeros coexistam em fase gasosa e que não é sítio de protonação preferencial em solução e sim uma mistura de protômeros.

3.5.4. ESPECTROSCOPIA IRMPD DOS ISÔMEROS DO DASA1 PROTONADO

Considerando o que foi discutido acerca da modelagem da reação do DASA1, é de se esperar que os espectros IRMPD seriam o resultado da superposição de bandas provenientes de diferentes isômeros. De fato, pode-se notar na Figura 41 que os espectros de IRMPD do DASA1 apresentam um grande número de picos, que podem coincidir aleatoriamente com bandas de diferentes isômeros e levar a suposições errôneas. Além disso, nenhum dos espectros calculados foi completamente concordante com o espectro experimental.

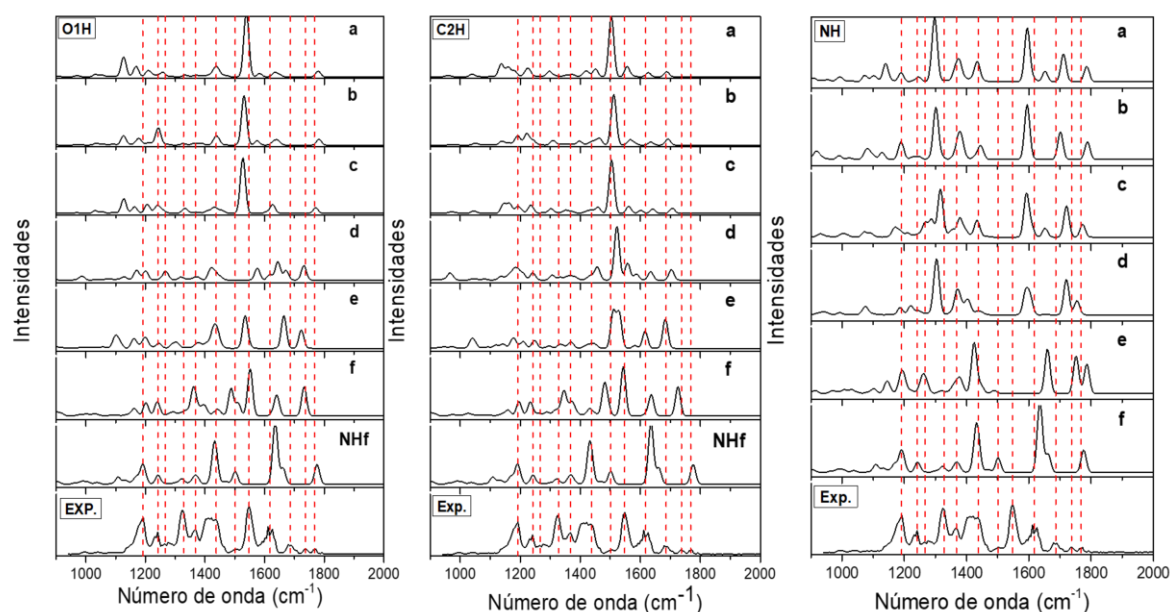


Figura 41. Comparação entre espectros IRMPD experimental (sempre na parte inferior de todos os esquemas) e frequências calculadas de intermediários DASA1, no nível de teoria ω B97D/6-31+G(d,p) e usando um fator de escala (SF) 0,952. O esquema à esquerda refere-se às espécies O1H, o esquema do meio refere-se às espécies O2H e o esquema à direita refere-se às espécies NH. As linhas vermelhas seguem os picos experimentais mais relevantes. As intensidades não são normalizadas.

As frequências calculadas para os isômeros lineares de **NH** (a-d) não possuem bandas na faixa de $1480\text{--}1560\text{ cm}^{-1}$, contrastando com o espectro experimental que contém uma banda intensa em 1548 cm^{-1} e uma banda fraca a 1500 cm^{-1} . Além disso, esses isômeros apresentam uma banda intensa em $1297\text{--}1303\text{ cm}^{-1}$, que não está presente no espectro experimental, proveniente do estiramento das ligações C-O (éster) contidas no anel de seis membros. A exceção é o **NHc**, que apresenta uma banda em 1316 cm^{-1} , apenas 9 cm^{-1} a menos que banda experimental em 1325 cm^{-1} . No entanto, devido à alta energia dessa espécie, ela dificilmente seria isolada durante o experimento. Além disso, o **NHc** possui uma banda fraca calculada em 1643 cm^{-1} , não observada no espectro.

Todas as bandas do confômero **NHf** aparentam ser contempladas nas bandas experimentais com boa correspondência. No entanto, o espectro do **NHf** por si não explica o espectro experimental. As bandas calculadas em 1636 cm^{-1} e 1660 cm^{-1} , referentes ao estiramento das ligações C=C e C=O do anel de seis membros, são as mais discrepantes do espectro, mas a variação é de no máximo 26 cm^{-1} em comparação com as bandas experimentais 1618 cm^{-1} e 1686 cm^{-1} . Como o **NHf** é o isômero de menor energia e porque a reação gera isômeros cíclicos muito rapidamente, como será observado nas análises de DTIMS alguns tópicos mais a frente, podemos sugerir que o IRMPD experimental contenha as bandas desse íon.

Visto que a discussão acima nos leva a sugerir que o espectro experimental do IRMPD é formado por diferentes espécies, ele foi comparado ao espectro gerado a partir da média dos espectros de vários íons (Figura 42). O espectro gerado a partir da média dos isômeros **NH**, considerando todos os isômeros (Figura 42e) ou apenas os isômeros de menor energia (Figura 42f), não possuem picos relevantes, como o de $\sim 1560\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 1250\text{ cm}^{-1}$. É perceptível que esses espectros não correspondem ao experimental.

Os sistemas **O1H** e **O2H** têm espectros muito semelhantes. Ao considerar todos os espectros destes 2 sistemas, podemos observar a discrepância entre os espectros teórico e experimental. Entretanto, ao considerar-se as somas dos espectros **O1Hf** + **NHf** (Figura 42b) ou **O2Hf** + **NHf** (Figura 42d), observamos uma alta similaridade entre os espectros teórico e experimental. Isso indica que, pelo menos no final da reação, todos os três sítios básicos são protonados.

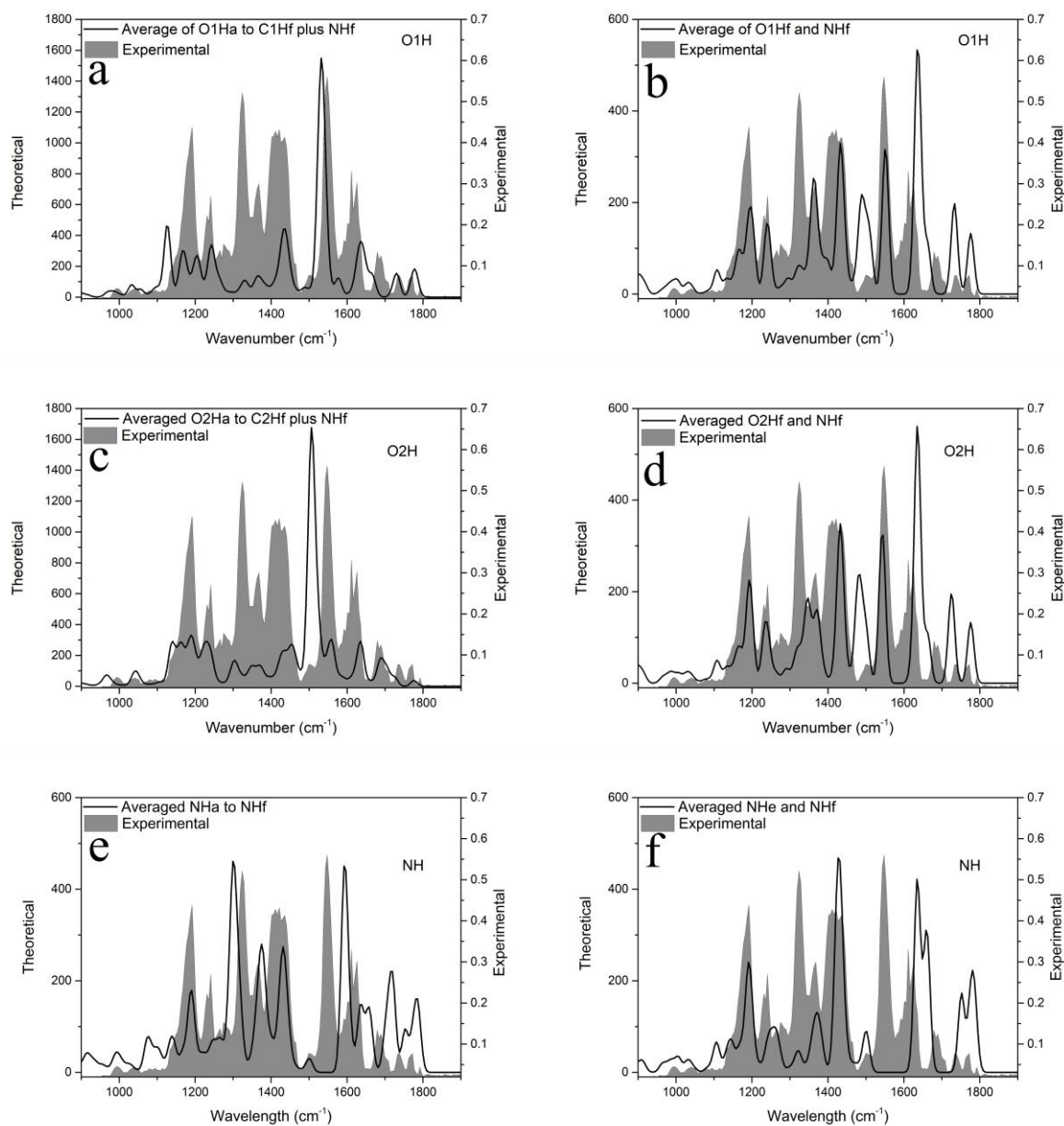


Figura 42. Espectro IRMPD (fundo cinza) comparado com a média dos espectros de cada sistema (linhas pretas) em relação ao local da protonação. O espectro do isômero NHf foi adicionado a todas as médias. Os diagramas à esquerda referem-se às médias de todos os espectros de um determinado local de protonação, enquanto à direita a média foi calculada usando apenas os dois isômeros com menor energia.

3.5.5. ESPECTROSCOPIA UVPD DOS ISÔMEROS DO DASA1 PROTONADO

A Figura 43a mostra a variação do espectro UVPD do $[DASA1+H]^+$ em função do tempo, considerando-se o tempo 0 h como o momento em que a amostra é diluída em MeOH. Na Figura 43b está a comparação entre o espectro UVPD a 0 h, o espectro de absorção em

solução e as excitações verticais calculadas ($S_0 \rightarrow S_1$) de todos os isômeros do caminho de reação.

A competição que o [DASA1+H] sofre entre fotodissociação e fotoisomerização resulta em baixas eficiências de fotodissociação, mesmo quando altas potências são utilizadas, gerando vários fragmentos com baixa intensidade, como pode ser observado na Figura 43.

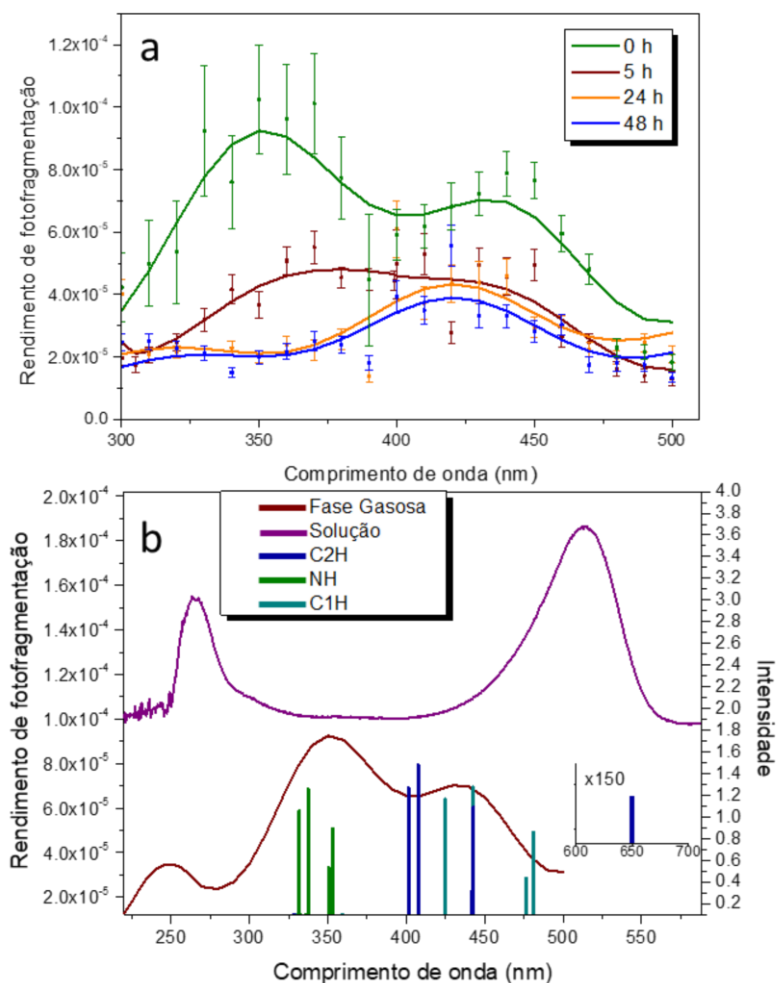


Figura 43. a) Evolução do espectro UV (300-400 nm) do DASA1 em relação ao tempo de amostra, sendo tempo 0 a dissolução da amostra em MeOH a partir da solução estoque em ACN. A linha é usada como guia e foi atenuada usando um *Smoothing* (FFT com 2 pontos) no software Origin. b) excitações verticais ($S_0 \rightarrow S_1$) dos isômeros contidos no caminho de reação (RI-B2PLYP(D3BJ)/aug-cc-pVDZ). As barras verdes são excitações verticais dos isômeros NH, barras azuis dos isômeros O2H e barras ciano dos isômeros O1H. A curva vinho é o espectro do DASA1 em fase gasosa e a curva roxa o espectro do DASA1 em MeOH.

No espectro UVPD do [DASA1+H]⁺, pode-se observar uma banda com pico em 450 nm (Figura 43a), deslocado para o azul com relação à banda do DASA1 em solução. Isso é esperado porque o DASA1 está protonado e desprovido de efeitos de solvatação na fase gasosa. A banda experimental é larga, o que pode ser causado pela fotoconversão em fase gasosa e pela presença

de uma mistura complexa em solução. Uma banda experimental em 240 nm também é observada e, assim como no caso anterior, está deslocada para o azul em relação à banda em solução, que possui pico em 280 nm.

No entanto, a região entre 300-400 nm do espectro UVPD do DASA1 protonado apresenta uma banda intensa, que não é observável em solução. Além disso, a intensidade desta banda muda consideravelmente com o avanço da reação, como mostra a Figura 43a.

Cabe ressaltar que para a obtenção das excitações verticais de cada uma das espécies que participam da reação, foi feita uma avaliação dos métodos a serem utilizados para esse tipo de cálculo, comparando-se as excitações calculadas com aquelas obtidas experimentalmente (Figura 44). Os cálculos foram feitos para o isômero O2Hb, visto que este é o isômero de menor energia entre os isômeros lineares em fase gasosa e pode ser comparado ao espectro UVPD a 0h, quando majoritariamente ocorre a presença de isômeros lineares.

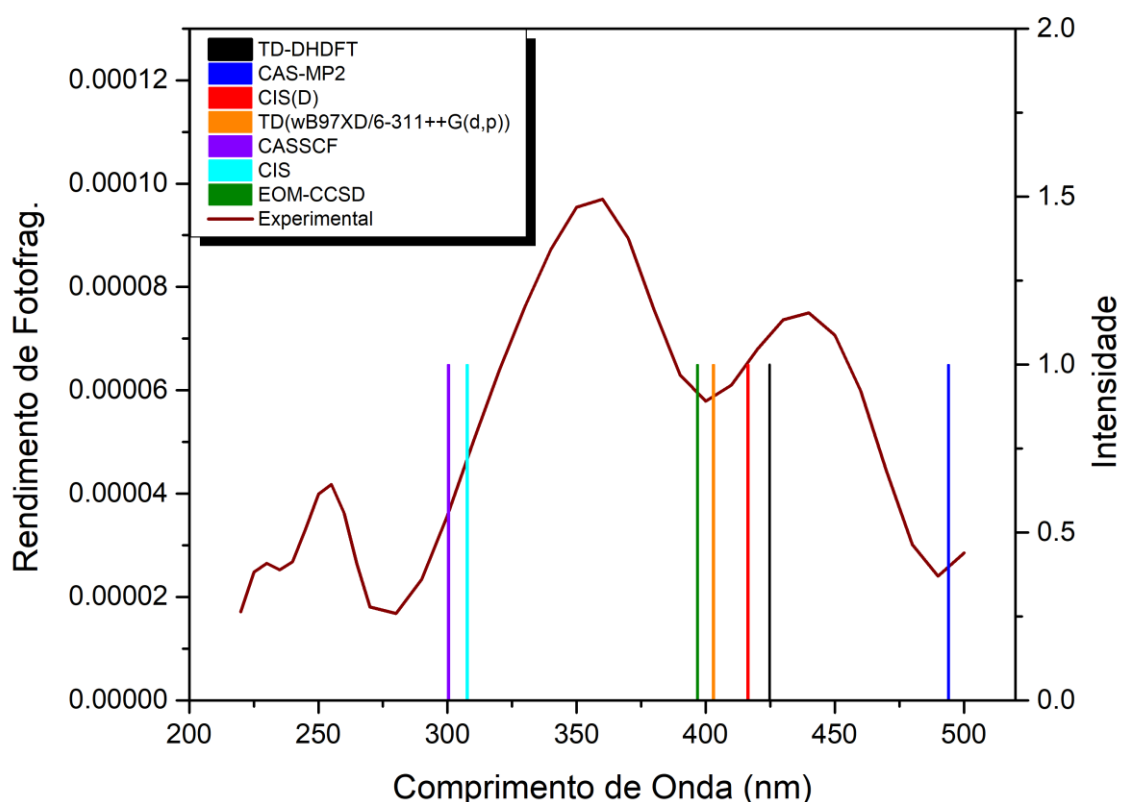


Figura 44. Benchmarking das excitações verticais ($S_0 \rightarrow S_1$) do O2Hb calculados usando diferentes níveis de teoria, comparados ao espectro de absorção em fase gasosa.

Os cálculos de NBO e CASSCF(12,12)/auc-ccpVDZ mostram que a excitação se trata de uma transição $\pi \rightarrow \pi^*$ (a visualização gráfica dos orbitais e a matriz simbólica de densidade de um elétron - que atesta a qualidade do cálculo de CASSCF - podem ser encontradas no apêndice). Neste nível de teoria, a excitação vertical calculada é de 300 nm, distante de qualquer uma das bandas experimentais. No entanto, quando a correção por MP2 (CAS-MP2) é aplicada, a excitação vertical calculada é 494 nm, indicando que a banda experimental próximo à 450 nm é referente à absorção do DASA1 protonado na carboxila.

Embora a excitação vertical calculada por CAS-MP2 descreva bem a transição eletrônica realizada pelo DASA1, o tempo demandado por este método é muito grande, o que inviabiliza seu uso para todos os isômeros da reação. Por isso, outros métodos foram avaliados para aliar boa descrição do primeiro estado excitado e custo computacional acessível.

O cálculo de excitação vertical por CIS, que apresenta uma transição em 308 nm, subestima o valor experimental esperado. A absorção calculada por EOM-CCSD (397) e TD- ω B97D/6-311++G** (403 nm) estão entre as bandas experimentais a 450 e 350 nm, o que faz destes métodos inconclusivos na determinação dos isômeros do DASA1. Além disso, EOM-CCSD é computacionalmente dispendioso, tal como CAS-MP2, e TD-DFT é conhecido por fornecer uma má descrição de estados excitados que apresentem transferência de carga.

A melhor concordância ente absorção teórica e experimental foi obtida utilizando CIS(D)/cc-pVDZ (416 nm) e TD-DH-DFT (RI-B2PLYP(D3BJ)/aug-cc-pVDZ) (425 nm), que forneceram resultados ligeiramente deslocados para o azul, com relação à banda experimental de 450 nm. Além de fornecer os melhores resultados, Goerigk e Grimme²³² mostraram que TD-DH-DFT pode ser um bom funcional para descrever excitações verticais com um custo computacional significativamente baixo quando comparado com os outros métodos testados. Por isso, a excitação vertical para os outros isômeros foi calculada utilizando este funcional duplo-híbrido (Figura 43a e Tabela 17).

Tabela 17. Energias relativas em fase gasosa (kJ/mol) e excitações verticais ($S_0 \rightarrow S_1$) (E.V.), em nanômetros, de todos os isômeros do caminho de reação, considerando-se as protonações nos sítios O1H, O2H e NH no nível de teoria RI-B2PLYP(D3BJ)/aug-cc-pVDZ. Seção de choque cruzado (CCS) em Å².

Espécie	Isômero	O1H			O2H			NH		
		ΔE (kJ/mol)	E.V. (nm)	CCS (Å ²)	ΔE (kJ/mol)	E.V. (nm)	CCS (Å ²)	ΔE (kJ/mol)	E.V. (nm)	CCS (Å ²)
a	<i>EantiZ</i>	37	407	122	37	442	121	71	337	122
b	<i>EsynZ</i>	45	401	120	31	425	120	62	332	120
c	<i>EantiE</i>	53	442	121	64	481	122	95	353	120
d	<i>EsynE</i>	59	441	112	76	476	119	101	351	116
e	<i>Cyclic</i>	109	328	103	70	330	100	42	335	106
f	<i>Cyclic</i>	21	650	105	14	359	103	0	332	107
g	<i>ZantiZ</i>	66	408	118	38	353	117	70	338	122
h	<i>ZsynZ</i>	83	430	107	43	446	114	39	343	117
i	<i>ZantiE</i>	82	429	119	106	516	115	80	347	119
j	<i>ZsynE</i>	86	468	110	75	492	107	89	330	109

Os cálculos mostram que as formas lineares do DASA1 protonado nas carboxilas (**O1H** e **O2H**, isômeros **a** até **d**) têm absorção entre 407 a 481 nm (Tabela 17), em boa concordância com a banda experimental em 450 nm. Também é possível observar que todos os isômeros lineares protonados no nitrogênio apresentam absorção entre 330 e 350 nm, o que explica a forte banda experimental em 350 nm e atesta a presença destes protômeros. O deslocamento para o azul das espécies protonada no nitrogênio em relação às espécies protonada nas carboxilas pode ser explicada pelo fato de que a protonação no nitrogênio acontece no par de elétrons livres, impedindo que o mesmo tome parte na ressonância da molécula, diminuindo a extensão da estrutura de conjugação.

Verifica-se que os cálculos para os isômeros cíclicos (**e** e **f**) apresentam transição $S_0 \rightarrow S_1$ entre 328 e 360 nm independentemente do sítio de protonação, porém com uma intensidade muito baixa. A exceção é o isômero **O1Hf** que absorve em 650 nm. A banda experimental em 420 nm, aparente quando a análise atinge mais que 24 h da adição ao metanol, é possivelmente causada pela absorção de um ou mais subprodutos não reativos.

O espectro UVPD corrobora a proposta de que a ionização do DASA1 gera espécies protonadas em todos os sítios básicos: **O1H**, **O2H** e **NH**.

3.5.6. ACOMPANHAMENTO DA EVOLUÇÃO DA REAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MOBILIDADE IÔNICA

A separação dos isômeros do DASA1 protonados foi realizada por FAIMS/MS, como mostrado na Figura 45. A reação foi acompanhada de 0 a 48 h e ao menos cinco picos foram observados, além de picos minoritários.

Todos os picos foram separados em voltagens de compensação (CVs) positivas, o que indica que os íons separados são dos tipos A ou B (ver tópico 2.3) e, portanto, menos prováveis de serem separados na forma de agregados ou dímeros.⁵⁸

Como discutido anteriormente, a separação por FAIMS pode ser aprimorada com o uso de modificadores aplicados ao gás carreador, como solventes (MeOH, ACN), gases como H₂ e He, ou até mesmo a substituição total do gás carreador de N₂ para He. Neste estudo, não foram utilizados modificadores. Entretanto, pode-se argumentar que o MeOH utilizado como solvente da solução atue como modificador, devido à proximidade da agulha do ESI à entrada do equipamento FAIMS. Embora esta influência não tenha sido investigada, foi obtida uma boa reprodutibilidade na posição dos picos mesmo que a posição da agulha tenha mudado entre análises. Como diferentes distâncias e ângulos entre a agulha do ESI e a entrada do FAIMS poderia afetar a quantidade de metanol que entra no aparelho do FAIMS, considerou-se que o solvente da amostra não interferiu nas análises ao ponto que alguma mudança fosse observada.

Além disso, a técnica de FAIMS é conhecida por causar aquecimento dos íons, devido aos altos campos elétricos utilizados no processo de separação.⁷⁰ Este aquecimento poderia ser responsável pelo aumento na população de diferentes estados. A relevância disto é que a geração de espécies durante o a separação por FAIMS poderia levar a conclusões errôneas, já que o observado experimentalmente não refletiria o instante da reação presente na solução. Todavia, as proporções entre as intensidades dos picos mudavam de acordo com o avanço no tempo de reação, o que evidencia que os espectros FAIMS refletem o conteúdo na solução.

Como observado na Figura 45, o pico **B** (CV 6,94 V) é o mais intenso em tempo 0 h, diminuindo de intensidade conforme o tempo de reação avança. Por outro lado, as intensidades dos picos **C** (CV 8,53 V), **D** (CV 9,81 V) e **E** (CV 12,48 V) aumentam conforme a reação avança no tempo. Um primeiro pico, pico **A** (CV 5,38 V), só é detectável quando as voltagens dos funis de íons são diminuídas. Após 24 h, o pico **C** é o mais intenso em voltagens de funis baixas, no passo que o pico **D** é o mais intenso em altas voltagens de funil. Um sexto pico começa a ser observado em ~CV 14 V em 48 h.

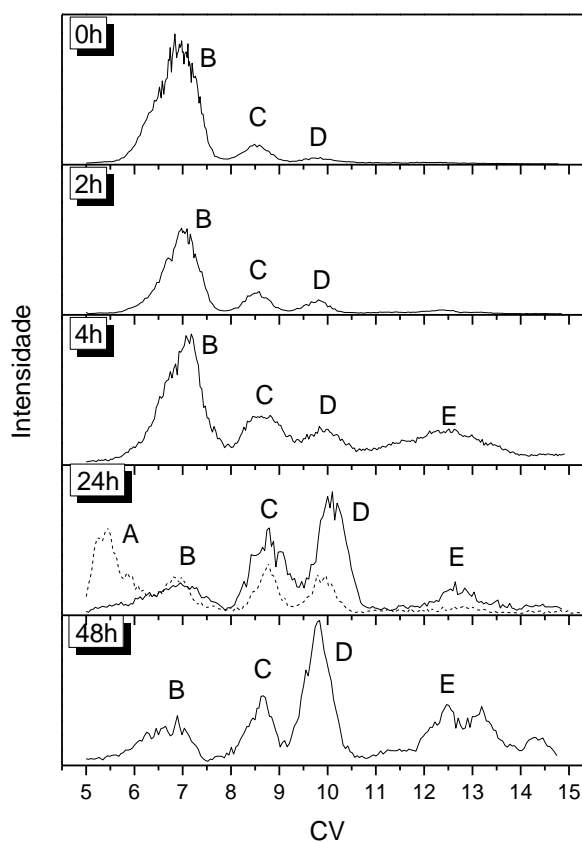


Figura 45. Variação da proporção dos picos em espectros FAIMS do DASA1 em uma solução contendo diferentes tempos de preparação: 0 h; 2 h; 4 h; 24 h; 48 h. As análises foram feitas utilizando altas voltagens de funil, exceto pela curva tracejada a 24h, obtida com baixas voltagens de funil. A intensidade da curva tracejada foi aumentada 2,5 vezes para melhor visualização.

Cabe ressaltar que uma das características negativas da técnica de FAIMS é a queda na intensidade dos íons causada pela perda de íons por dispersão. Por esta razão, pode-se optar por trocar-se os funis padrão do espectrômetro de massas por um funil de estágio duplo, a fim de aumentar-se a transferência de íons, que é o caso do equipamento utilizado neste estudo. No caso do DASA1, o uso do FAIMS aliado ao funil de íons de estágio duplo diminuiu a intensidade dos íons em quatro ordens de magnitude nas condições padrão, que são as baixas voltagens de funil. As voltagens foram, então, otimizadas ao ponto que se obtivesse um ganho de uma a duas vezes na intensidade utilizando-se voltagens de funil de íons mais altas.

Para avaliar a natureza das espécies correspondentes a cada pico observado, os íons foram isolados fixando-se as CVs de cada pico (Figura 46).

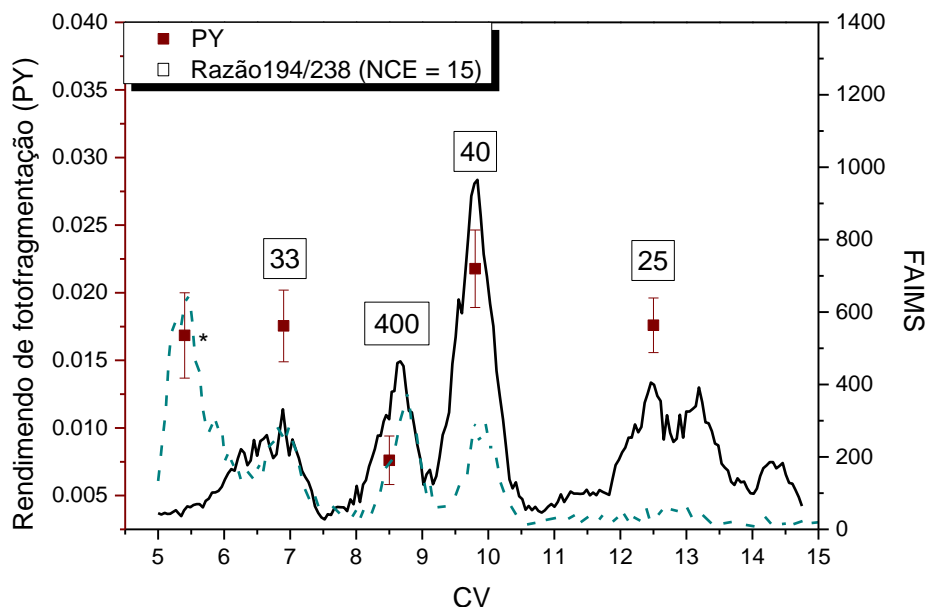


Figura 46. Espectro FAIMS do DASA1 após 24h: a linha contínua é referente ao espectro obtido com altas voltagens de funil e a linha tracejada é referente ao espectro obtido com baixas voltagens de funil. Os pontos são referentes ao rendimento de fotofragmentação obtido pela incidência de um laser a 450 nm (24 mW) a voltagens de compensação (CV) fixas. As caixas contêm o valor da razão das intensidades dos fragmentos m/z 194/238, após dissociação por CID (energia de NCE 15, janela de isolamento iônico 3). A fotofragmentação do pico A, marcado com asterisco, foi obtida reduzindo as voltagens dos funis.

As espécies isoladas foram submetidas a dissociação via CID e PID (450 nm). Pode-se observar na Figura 46 que a eficiência de fotofragmentação do pico C é aproximadamente a metade da eficiência dos demais picos. Além disso, a razão dos fragmentos m/z 194/238 foi uma ordem de magnitude menor no pico C em relação aos demais picos. Esses resultados são indícios de que este pico é formado por isômeros cíclicos do DASA1.

O DASA1 protonado também foi analisado por DTIMS/MS (Figura 47). Tais análises acusam a presença de dois picos majoritários com seções de choque (CCSs) de 107 \AA^2 (pico A) e 119 \AA^2 (pico B). Cálculo conduzidos pelo software Mobcal (Tabela 17) atestam que o pico A é formado pela junção das formas cíclicas do $[\text{DASA1+H}]^+$ e o pico B por suas formas lineares. O resultado é similar ao publicado por Bull et al.²²⁸ para outro tipo de DASA, onde duas populações também foram identificadas.

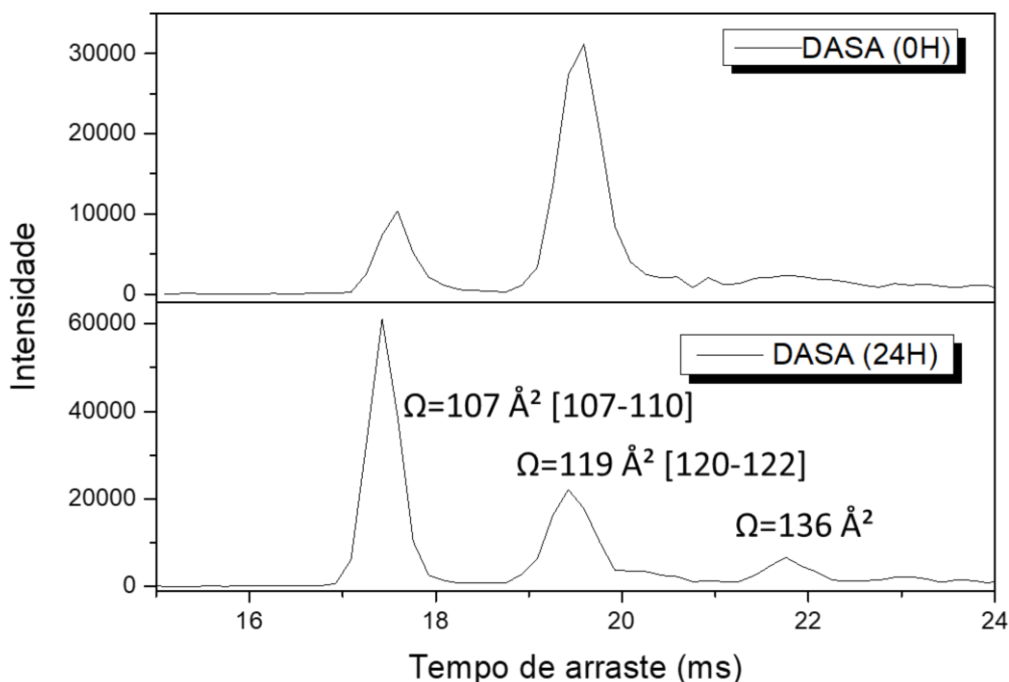


Figura 47. Espectro DTIMS do DASA1 utilizado soluções com tempo de a) 0 h e b) 24h. Os CCSs (Ω) dos dois picos principais concordam com os calculados para o DASA1 linear e cíclico [Valores teórico em colchetes].

Como esperado, no tempo 0 h a amostra contém majoritariamente isômeros lineares, embora a banda de isômeros cíclicos já possa ser observada. Esta observação vai ao encontro do trabalho de Zulfikri et al.,¹⁹⁵ que mostra que em poucos segundos a presença de diferentes isômeros, lineares ou cíclicas, já é observável.

Após 24 h, pode-se observar um crescimento na intensidade do pico gerado pelos isômeros cíclicos, se tornando no pico mais intenso do espectro DTIMS/MS. Contudo, nota-se a presença de um terceiro pico, pico C, menos intenso e com CCS 136 \AA^2 , que não corresponde a nenhuma conformação calculada para o $[\text{DASA1}+\text{H}]^+$. No entanto, as análises de MS do DASA1 protonado apresentam picos com alta intensidade com razão m/z que correspondem a agregados do DASA1, principalmente com sódio (m/z 318) Figura 48. Por exemplo, os picos B e C, quando isolados, apresentam maior intensidade de $[\text{DASA1}+\text{Na}]^+$ que $[\text{DASA1}+\text{H}]^+$. Ressalta-se que a abundância de $[\text{M}+\text{Na}]^+$ é diferente entre picos e que os isômeros lineares do DASA1 aparentemente interagem mais fortemente com o sódio que os isômeros cíclicos. No entanto, uma troca de Na^+ por H^+ não é provável devido às baixas pressões encontradas no equipamento de DTIMS.

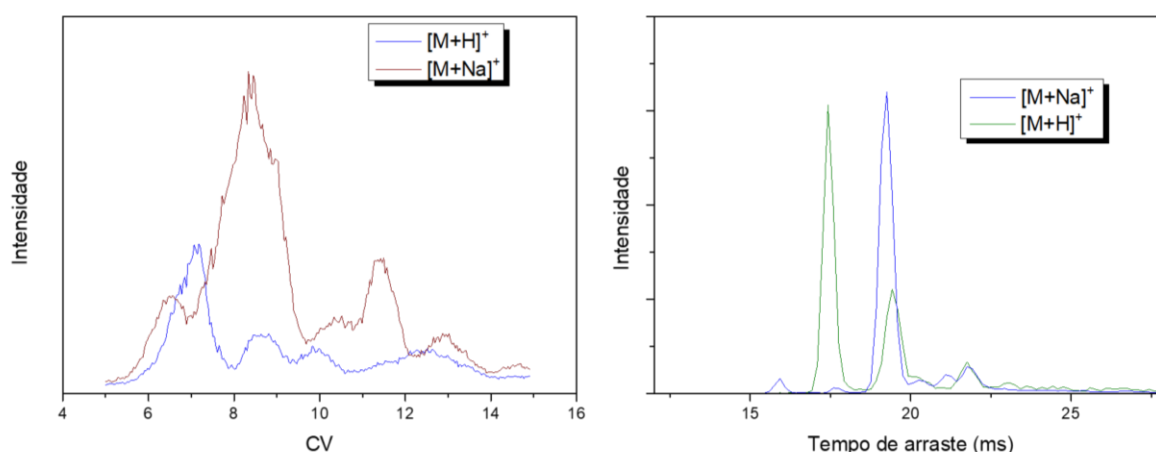


Figura 48. Separação das populações de DASA via FAIMS (à esquerda) e DTIMS (à direita). A proporção entre intensidades do $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ varia em função da espécie.

Ainda que o pico **C** possa ser gerado pela dissociação do íon $[DASA1+Na]^+$, a hipótese mais provável é que este pico tenha sido formado pela dissociação de dímeros do DASA1 durante a separação no tubo de arraste. Um potencial dímero de DASA1, formado pela adição de duas moléculas via reação de Diels-Alder, teria um CCS de 180 \AA^2 . A dissociação durante a passagem pelo tubo de arraste poderia gerar um pico de menor CCS, como é o caso do pico **C**.

No trabalho de Bull et al.,²²⁸ foi demonstrado que o DASA estudado apresentava interconversão em fase gasosa de todas os isômeros isolados quando os mesmos eram ativados por colisão. Isso indicaria que as reações reversas e diretas poderiam ser ativadas por aquecimento, em fase gasosa. O mesmo comportamento foi avaliado nesse trabalho, como apresentando na Figura 49.

No caso do DASA1, experimentos similares (Figura 49) mostraram que a ativação por colisão do pico **B** gera o pico **A**. Com o aumento na energia de colisão, o pico **B**, no tempo 19,5 ms decresce, enquanto o pico **A**, no tempo 17,5 ms, aumenta. Isto é esperado, uma vez que os isômeros cíclicos, componentes do pico **A** são espécies com menor energia relativa. A energia de ativação, portanto, eleva a energia dos íons lineares ao ponto que eles superem a barreira energética e sejam levados à ciclização. Todavia, a ativação do pico **A** não gera o pico **B**, como observado no caso do DASA estudado por Bieske. É interessante notar que o pico **C**, em 22 ms, quando ativado, gera o pico **A** e uma pequena quantidade de pico **B**, mesmo quando baixas energias de ativação são utilizadas. Logo, esta observação nos dá indícios que este pico é, de fato, referente a algum aduto ou agregado formado a partir do DASA1.

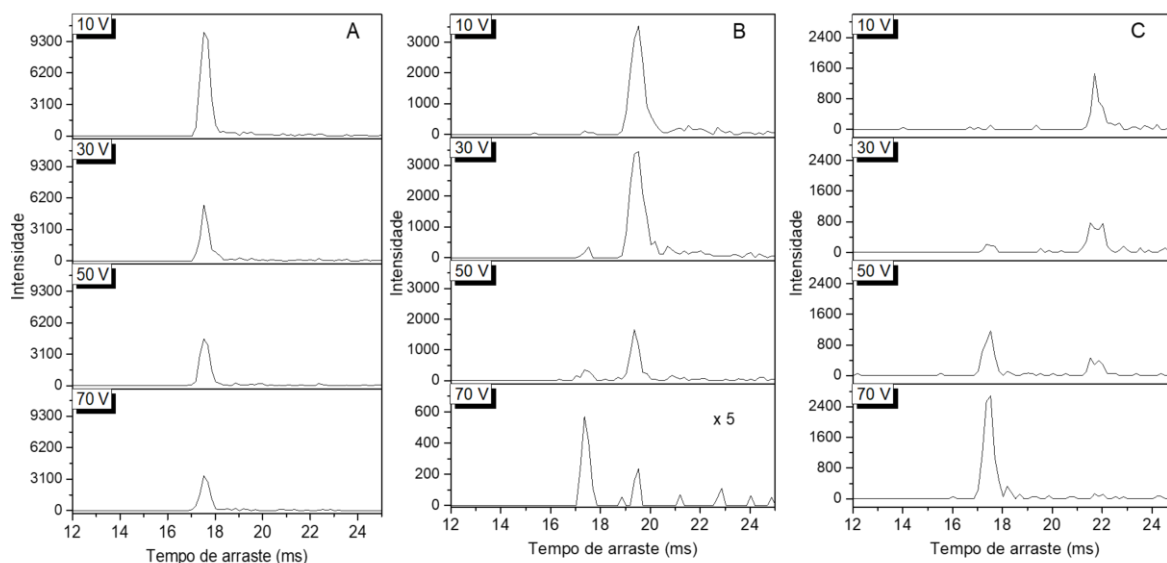


Figura 49. Efeito da variação da voltagem de ativação dos picos A, B e C nos espectros de DTIMS.

3.5.7. CONCLUSÃO

Foi proposto um mecanismo de fragmentação para o DASA1 e observado que seus isômeros cíclicos e lineares podem ser diferenciados pela taxa de ramificação entre os fragmentos de m/z 194 e m/z 238.

Apresentamos uma separação bem resolvida de isômeros DASA1 protonados na fase gasosa. A separação foi realizada por FAIMS e o conteúdo do pico foi estudado por colisão e fotodissociação. Foi possível distinguir uma forma cíclica entre 4 formas lineares devido à sua menor absorção a 450 nm, à sua maior proporção entre os fragmentos m/z 194/238 e à evolução da intensidade de pico ao longo do tempo.

O sítio de protonação do DASA1 foi investigado por cálculos computacionais e espectroscopia UVPD e os resultados sugerem que o DASA1 não possui sítio de protonação preferencial na fase gasosa, sendo o espectro UV da fase gasosa a mistura de diferentes protômeros.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A espectrometria de massas, uma técnica poderosa para identificação de substâncias devido sua alta abrangência e sensibilidade, possui como limitação a detecção de espécies unicamente baseando-se em sua razão massa-carga, o que não permite com que esta técnica forneça informações diretas acerca da estrutura conformacional e a configuração dos íons analisados. A limitação é especialmente importante para a diferenciação de isômeros, em que a espectrometria de massas pode se valer de diferenças no padrão de fragmentação, sendo que tais diferenças são frequentemente inexistentes. O acoplamento de fontes de radiação com a espectrometria de massas é uma estratégia elegante para a determinação estrutural de íons que tem sido desenvolvida nos últimos anos. Mais recentemente, as técnicas de mobilidade iônica surgem como métodos rápidos de separação de íons, sendo muitas vezes ortogonais entre si e a outros métodos de separação. Pode-se dizer que a espectroscopia de ação e mobilidade iônica – e até mesmo o acoplamento destas duas – são o estado da arte na caracterização estrutural de íons em fase gasosa.

Nesta tese, foram apresentadas aplicações das técnicas supracitadas à caracterização estrutural de biomoléculas ou compostos com potencial aplicação biológica, aqui denominados compostos bioativos. Para tal, foi feita a validação do aparato instrumental utilizado em nosso grupo no Brasil, visto que o equipamento era novo e não haviam publicações demonstrando sua eficácia. Foi demonstrado que o equipamento reproduzia os resultados encontrados na literatura, a saber os espectros da biotina e do triptofano, de forma eficiente, possuindo, em alguns casos, melhor sensibilidade em certas regiões do espectro infravermelho.

Discutiu-se, também, acerca dos métodos de cálculo de espectros vibracionais mais comuns na literatura. Verificou-se que os pesquisadores ainda utilizam em larga escala o método B3LYP, visto que se trata de um método já estabelecido que é conhecido por fornecer resultados razoáveis em de forma relativamente rápida. No entanto, observa-se uma redução em sua utilização, motivada pelo acesso a maior poder de processamento, o que possibilita o uso de métodos mais sofisticados em tempos mais curtos, além do desenvolvimento de novos métodos mais precisos e que corrijam efeitos negligenciados pelo B3LYP, como as interações de longo alcance. Verificou-se que o uso de métodos de cálculo de vibrações anarmônicas ainda não é prático por demandar uma grande quantidade de tempo. No caso das moléculas estudadas nesta tese, definiu-se que M06-2X/6-31+G(d,p) seria o método que forneceria o melhor custo benefício entre tempo de cálculo e qualidade do espectro.

Além disso, a partir de dados experimentais do espectro do triptofano protonado em meio gasoso, e dados da literatura sobre o espectro das fenilalquilaminas protonada, de 1 a 4 carbonos alquílicos, foi possível averiguar a natureza de interações $N^+-H\cdots\pi$ nessas moléculas modelo. Essas interações foram sugeridas na literatura, no entanto eram sempre comparadas a interações do tipo cátion- π , envolvendo metais alcalinos e alcalinos terrosos como centro contendo densidade de carga positiva. Foi feito uso de cálculos de NBO, QTAIM e NCI. No caso do triptofano, a interação estudada possui energia semelhante à já conhecida ligação $N^+-H\cdots O=C$. No caso das fenilalquilaminas, a energia desta ligação aumenta com o aumento do número de carbonos na cadeia lateral, o que pode ser explicado pela maior liberdade de torção da cadeia, permitindo um distanciamento do nitrogênio e uma aproximação do próton em relação ao sistema π . Uma interação fraca $H\cdots H$ foi identificada no triptofano, no PPA e no PBA, se tratando de uma interação de van der Waals fraca.

A estrutura conformacional da biocitina protonada em meio gasoso foi investigada, sendo possivelmente formada por duas populações de confôrmeros. Interessantemente, tais confôrmeros não são os de menor energia calculada. Diferentemente da biotina, a biocitina é protonada na amina do aminoácido terminal, e não no oxigênio carbonílico do grupamento ureido.

A tiamina também foi analisada por IRMPD, porém, por possuir uma estrutura rígida, formada por dois ciclos e uma cadeia alquílica pequena, não foi possível diferenciar os confôrmeros desta espécie. A formação do aduto de tiamina com água foi atingida utilizando-se uma fonte de nanospray. Através da análise de IRMPD pode-se inferir que há presença de duas populações na fase gasosa, uma em que a água se localiza proximalmente ao grupo hidroxila e uma próxima à região que contém a carga positiva. Os resultados acerca da estrutura da biotina, biocitina e tiamina podem ser o ponto de partida para estudos mais aprofundados acerca das reações em que estas moléculas participam.

A reação de fotoisomerização de uma molécula do tipo DASA foi monitorada por CID, UVPD, IRMPD, DTIMS/MS e FAIMS/MS. A partir da análise do padrão de fragmentação da solução contendo maior proporção de formas lineares (solução colorida) ou cíclicas (solução transparente) de DASA, foi possível sugerir uma técnica de diferenciação das duas formas desta molécula pela simples razão entre seus fragmentos diagnóstico.

Assim como publicado na literatura para outro tipo de DASA, foi possível utilizar o DTIMS/MS para separar as formas lineares das cíclicas do DASA1. Diferentemente de outros

DASAs avaliados, a reação direta de ciclização foi atingida por aquecimento dos íons em fase gasosa, enquanto a reação inversão não foi observada.

A técnica de FAIMS/MS se mostrou capaz de separar, com boa resolução, pelo menos cinco isômeros do DASA1. Através da análise da razão dos fragmentos diagnósticos e da eficiência de fotofragmentação, foi possível distinguir um isômero cíclico linear entre quatro isômeros lineares.

As técnicas de IRMPD e UVPD foram empregadas para avaliar o sítio de protonação preferencial do DASA1. Ambas as técnicas sugerem que não há sítio de protonação preferencial, mas sim, uma mistura dos três protômeros possíveis, evidenciando a complexidade deste sistema.

Os estudos ajudarão os demais pesquisadores do grupo nos projetos subsequentes e podem auxiliar no entendimento de mecanismos de reações relevantes do ponto de vista biológico, visto que as vitaminas e o triptofano participam de processos bioquímicos e os DASAs têm a possibilidade de ser empregados em *drug delivery*. Através de diferentes sistemas, foram respondidas questões como sítios de protonação, efeitos de microssolvatação, determinação conformacional, caracterização de interações intramoleculares e mecanismos de reação, demonstrando a eficiência, relevância e abrangência das técnicas utilizadas.

5. BIBLIOGRAFIA

- (1) Watson, J. T.; Sparkman, O. D. *Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications, and Strategies for Data Interpretation*; John Wiley & Sons Ltd: Chichester, 2007.
 - (2) Thomson, J. J. XIX. Further Experiments on Positive Rays. *London, Edinburgh, Dublin Philos. Mag. J. Sci.* **1912**, *24* (140), 209–253.
 - (3) Thomson, J. J. LXXXIII. Rays of Positive Electricity. *London, Edinburgh, Dublin Philos. Mag. J. Sci.* **1910**, *20* (118), 752–767.
 - (4) Thomson, J. J. LIV. Positive Rays. *London, Edinburgh, Dublin Philos. Mag. J. Sci.* **1908**, *16* (94), 657–691.
 - (5) Gross, J. H. *Mass Spectrometry*; Springer International Publishing: Cham, 2017.
 - (6) Vessecchi, R.; Lopes, N. P.; Gozzo, F. C.; Dörr, F. A.; Murgu, M.; Lebre, D. T.; Abreu, R.; Bustillos, O. V.; Riveros, J. M. Nomenclaturas de Espectrometria de Massas Em Língua Portuguesa. *Quim. Nova* **2011**, *34* (10), 1875–1887.
 - (7) Hoffmann, E.; Stroobant, V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, 3rd ed.; John Wiley & Sons Ltd.: West Sussex, 2007.
 - (8) Fenn, J. B. Electrospray Wings for Molecular Elephants (Nobel Lecture). *Angew. Chemie Int. Ed.* **2003**, *42* (33), 3871–3894.
 - (9) Uetrecht, C.; Rose, R. J.; van Duijn, E.; Lorenzen, K.; Heck, A. J. R. Ion Mobility Mass Spectrometry of Proteins and Protein assemblies. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (5), 1633–1655.
 - (10) Feider, C. L.; Krieger, A.; DeHoog, R. J.; Eberlin, L. S. Ambient Ionization Mass Spectrometry: Recent Developments and Applications. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (7), 4266–4290.
 - (11) Kuo, T.-H.; Dutkiewicz, E. P.; Pei, J.; Hsu, C.-C. Ambient Ionization Mass Spectrometry Today and Tomorrow: Embracing Challenges and Opportunities. *Anal. Chem.* **2020**, *92* (3), 2353–2363.
 - (12) Takats, Z.; Takáts, Z.; Wiseman, J. M.; Gologan, B.; Cooks, R. G. Mass Spectrometry Sampling Under Ambient Conditions with Desorption Electrospray Ionization. *Science* (80-.). **2004**, *306* (5695), 471–473.
 - (13) Cody, R. B.; Laramée, J. A.; Durst, H. D. Versatile New Ion Source for the Analysis of Materials in Open Air under Ambient Conditions. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (8), 2297–2302.
 - (14) Correra, T. C.; Fernandes, A. S.; Reginato, M. M.; Ducati, L. C.; Berden, G.; Oomens, J. Probing the Geometry Reorganization from Solution to Gas-Phase in Putrescine Derivatives by IRMPD, 1H-NMR and Theoretical Calculations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19* (35), 24330–24340.
 - (15) Correra, T. C.; Riveros, J. M. Sequential Methyl–Fluorine Exchange Reactions of Siloxide Ions in the Gas Phase. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (34), 8632–8635.
 - (16) Eller, K.; Schwarz, H. Organometallic Chemistry in the Gas Phase. *Chem. Rev.* **1991**, *91* (6), 1121–1177.
 - (17) Eberlin, M. N. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Major Tool to Investigate Reaction Mechanisms in Both Solution and the Gas Phase. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2007**, *13* (1), 19–28.
 - (18) M. Ribeiro, F. W.; Rodrigues-Oliveira, A. F.; C. Correra, T. Benzoxazine Formation Mechanism Evaluation by Direct Observation of Reaction Intermediates. *J. Phys. Chem. A* **2019**, *123* (38), 8179–8187.
 - (19) Iacobucci, C.; Lebon, A.; De Angelis, F.; Memboeuf, A. CuAAC Click Reactions in the Gas Phase: Unveiling the Reactivity of Bis-Copper Intermediates. *Chem. - A Eur. J.*
-

- 2016, 22 (52), 18690–18694.
- (20) Iacobucci, C.; Reale, S.; De Angelis, F. Elusive Reaction Intermediates in Solution Explored by ESI-MS: Reverse Periscope for Mechanistic Investigations. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2016**, 55 (9), 2980–2993.
- (21) McLafferty, F. M. Mass Spectrometry in Chemical Research and Production. *Appl. Spectrosc.* **1957**, 11 (4), 148–156.
- (22) Gohlke, R. S. Time-of-Flight Mass Spectrometry and Gas-Liquid Partition Chromatography. *Anal. Chem.* **1959**, 31 (4), 535–541.
- (23) Arpino, P.; Baldwin, M. A.; McLafferty, F. W. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. II—continuous Monitoring. *Biol. Mass Spectrom.* **1974**, 1 (1), 80–82.
- (24) MAPA. *Manual de Métodos Oficiais Para Análise de Alimentos de Origem Animal*; Brasil, 2018; p 140.
- (25) ABNT. *NBR 16712*; Brasil, 2018; p 17.
- (26) ANVISA. *RDC N° 166*; Brasil, 2017; p 12.
- (27) Pirttilä, K.; Videhult Pierre, P.; Haglöf, J.; Engskog, M.; Hedeland, M.; Laurell, G.; Arvidsson, T.; Pettersson, C. An LCMS-Based Untargeted Metabolomics Protocol for Cochlear Perilymph: Highlighting Metabolic Effects of Hydrogen Gas on the Inner Ear of Noise Exposed Guinea Pigs. *Metabolomics* **2019**, 15 (10), 138.
- (28) Ghosh, P. K. *Introduction to Protein Mass Spectrometry*; Elsevier: London, 2016.
- (29) Lydic, T. A.; Goo, Y.-H. Lipidomics Unveils the Complexity of the Lipidome in Metabolic Diseases. *Clin. Transl. Med.* **2018**, 7 (1), 4.
- (30) Nair, H.; Clarke, W. *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory*; Nair, H., Clarke, W., Eds.; Elsevier: London, 2017.
- (31) Cardozo, K. H. M.; Lebkuchen, A.; Okai, G. G.; Schuch, R. A.; Viana, L. G.; Olive, A. N.; Lazari, C. dos S.; Fraga, A. M.; Granato, C.; Carvalho, V. M. Fast and Low-Cost Detection of SARS-CoV-2 Peptides by Tandem Mass Spectrometry in Clinical Samples PREPRINT Version 1. *Res. Sq.* **2020**.
- (32) Armirotti, A.; Millo, E.; Damonte, G. How to Discriminate between Leucine and Isoleucine by Low Energy ESI-TRAP MSn. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, 18 (1), 57–63.
- (33) Xiao, Y.; Vecchi, M. M.; Wen, D. Distinguishing between Leucine and Isoleucine by Integrated LC-MS Analysis Using an Orbitrap Fusion Mass Spectrometer. *Anal. Chem.* **2016**, 88 (21), 10757–10766.
- (34) Roithova, J. Characterization of Reaction Intermediates by Ion Spectroscopy. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41 (2), 547–559.
- (35) 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* **2006**, 110 (27), 8316–8326.
- (36) Anderson, A. C. The Process of Structure-Based Drug Design. *Chem. Biol.* **2003**, 10 (9), 787–797.
- (37) Kubinyi, H. Chance Favors the Prepared Mind - From Serendipity to Rational Drug Design. *J. Recept. Signal Transduct.* **1999**, 19 (1–4), 15–39.
- (38) Moghadam, H.; Ghalami-Choobar, B.; Shafaghat-Lonbar, M. Molecular Docking-Based Virtual Screening, Molecular Dynamics and Atoms in Molecules (AIM) Studies to Identify Potential Inhibitor against the Extracellular Region of Human Epidermal Receptor 2. *Phys. Chem. Res.* **2020**, 8 (1), 61–90.
- (39) Penna, T. C.; Cervi, G.; Rodrigues-Oliveira, A. F.; Yamada, B. D.; Lima, R. Z. C.; Menegon, J. J.; Bastos, E. L.; Correra, T. C. Development of a Photoinduced Fragmentation Ion Trap for Infrared Multiple Photon Dissociation Spectroscopy. *Rapid*
-

- Commun. Mass Spectrom.* **2019**, rcm.8635.
- (40) Coletti, C.; Re, N.; Scuderi, D.; Maître, P.; Chiavarino, B.; Fornarini, S.; Lanucara, F.; Sinha, R. K.; Crestoni, M. E. IRMPD Spectroscopy of Protonated S-Nitrosocaptopril, a Biologically Active, Synthetic Amino Acid. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12* (41), 13455.
- (41) Simon, A. L.; Chirot, F.; Choi, C. M.; Clavier, C.; Barbaire, M.; Maurelli, J.; Dagany, X.; MacAleese, L.; Dugourd, P. Tandem Ion Mobility Spectrometry Coupled to Laser Excitation. *Rev. Sci. Instrum.* **2015**, *86* (9).
- (42) Douberly, G. E.; Ricks, A. M.; Ticknor, B. W.; McKee, W. C.; Schleyer, P. v. R.; Duncan, M. A. Infrared Photodissociation Spectroscopy of Protonated Acetylene and Its Clusters. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112* (9), 1897–1906.
- (43) Marshall, A. G.; Hendrickson, C. L.; Jackson, G. S. Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry: A Primer. *Mass Spectrom. Rev.* **1998**, *17* (1), 1–35.
- (44) Polfer, N. C.; Dugourd, P. *Laser Photodissociation and Spectroscopy of Mass-Separated Biomolecular Ions*; Springer: Cham, 2013.
- (45) Downard, K. *Mass Spectrometry: A Foundation Course*; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2004.
- (46) 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.* **2016**, *87* (10).
- (47) Penna, T.; Correra, T. TÉCNICAS AVANÇADAS PARA A DIFERENCIAÇÃO DE ISÔMEROS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS. *Quim. Nova* **2020**, *43* (8), 1125–1137.
- (48) Zabuga, A. V.; Kamrath, M. Z.; Boyarkin, O. V.; Rizzo, T. R. Fragmentation Mechanism of UV-Excited Peptides in the Gas Phase. *J. Chem. Phys.* **2014**, *141* (15), 154309.
- (49) Bouakil, M.; Kulesza, A.; Daly, S.; MacAleese, L.; Antoine, R.; Lyon, U.; Claude, U.; Lyon, B.; Matière, I. L.; Dugourd, P. Visible Multiphoton Dissociation of Chromophore-Tagged Peptides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2017**, *28* (10), 2181–2188.
- (50) Polfer, N. C. Infrared Multiple Photon Dissociation Spectroscopy of Trapped Ions. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (5), 2211–2221.
- (51) Power, B.; Haldys, V.; Salpin, J.-Y.; Fridgen, T. D. Structures of Bare and Singly Hydrated $[M(\text{Ura-H})(\text{Ura})]^+$ ($M = \text{Mg}, \text{Ca}, \text{Sr}, \text{Ba}$) Complexes in the Gas Phase by IRMPD Spectroscopy in the Fingerprint Region. *Int. J. Mass Spectrom.* **2015**, *378*, 328–335.
- (52) Prell, J. S.; O'Brien, J. T.; Williams, E. R. IRPD Spectroscopy and Ensemble Measurements: Effects of Different Data Acquisition and Analysis Methods. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, *21* (5), 800–809.
- (53) Gabelica, V.; Shvartsburg, A. A.; Afonso, C.; Barran, P.; Benesch, J. L. P.; Bleiholder, C.; Bowers, M. T.; Bilbao, A.; Bush, M. F.; Campbell, J. L.; et al. Recommendations for Reporting Ion Mobility Mass Spectrometry Measurements. *Mass Spectrom. Rev.* **2019**, *38* (3), 291–320.
- (54) Shvartsburg, A. A. *DIFFERENTIAL ION MOBILITY SPECTROMETRY: Nonlinear Ion Transport and Fundamentals of FAIMS*; Taylor & Francis Group, LLC: Boca Raton, FL, 2009.
- (55) Garabedian, A.; Baird, M. A.; Porter, J.; Jeanne Dit Fouque, K.; Shliaha, P. V.; Jensen, O. N.; Williams, T. D.; Fernandez-Lima, F.; Shvartsburg, A. A. Linear and Differential Ion Mobility Separations of Middle-Down Proteoforms. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (4), 2918–2925.
- (56) Räsänen, R.-M.; Dwivedi, P.; Fernández, F. M.; Kauppila, T. J. Desorption Atmospheric
-

- Pressure Photoionization and Direct Analysis in Real Time Coupled with Travelling Wave Ion Mobility Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2014**, 28 (21), 2325–2336.
- (57) Campbell, J. L.; Le Blanc, J. Y.; Kibbey, R. G. Differential Mobility Spectrometry: A Valuable Technology for Analyzing Challenging Biological Samples. *Bioanalysis* **2015**, 7 (7), 853–856.
- (58) Shvartsburg, A. A.; Li, F.; Tang, K.; Smith, R. D. High-Resolution Field Asymmetric Waveform Ion Mobility Spectrometry Using New Planar Geometry Analyzers. *Anal. Chem.* **2006**, 78 (11), 3706–3714.
- (59) Gabelica, V.; Marklund, E. Fundamentals of Ion Mobility Spectrometry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2018**, 42, 51–59.
- (60) Poyer, S.; Comby-Zerbino, C.; Choi, C. M.; MacAleese, L.; Deo, C.; Bogliotti, N.; Xie, J.; Salpin, J.-Y.; Dugourd, P.; Chirof, F. Conformational Dynamics in Ion Mobility Data. *Anal. Chem.* **2017**, 89 (7), 4230–4237.
- (61) Prell, J. S.; Donald, W. A. *Advances in Ion Mobility-Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications*; Elsevier: Amsterdam, Netherlands, 2019.
- (62) Dugourd, P.; Hudgins, R. R.; Clemmer, D. E.; Jarrold, M. F. High-Resolution Ion Mobility Measurements. *Rev. Sci. Instrum.* **1997**, 68 (2), 1122–1129.
- (63) Picache, J. A.; Rose, B. S.; Balinski, A.; Leaptrot, K. L.; Sherrod, S. D.; May, J. C.; McLean, J. A. Collision Cross Section Compendium to Annotate and Predict Multi-Omic Compound Identities. *Chem. Sci.* **2019**, 10 (4), 983–993.
- (64) Larriba, C.; Hogan, C. J. Ion Mobilities in Diatomic Gases: Measurement versus Prediction with Non-Specular Scattering Models. *J. Phys. Chem. A* **2013**, 117 (19), 3887–3901.
- (65) Gonzales, G. B.; Smagghe, G.; Coelus, S.; Adriaenssens, D.; De Winter, K.; Desmet, T.; Raes, K.; Van Camp, J. Collision Cross Section Prediction of Deprotonated Phenolics in a Travelling-Wave Ion Mobility Spectrometer Using Molecular Descriptors and Chemometrics. *Anal. Chim. Acta* **2016**, 924, 68–76.
- (66) D’Atri, V.; Porrini, M.; Rosu, F.; Gabelica, V. Linking Molecular Models with Ion Mobility Experiments. Illustration with a Rigid Nucleic Acid Structure. *J. Mass Spectrom.* **2015**, 50 (5), 711–726.
- (67) Schneider, B. B.; Nazarov, E. G.; Londry, F.; Vouros, P.; Covey, T. R. Differential Mobility Spectrometry/Mass Spectrometry History, Theory, Design Optimization, Simulations, and Applications. *Mass Spectrom. Rev.* **2016**, 35 (6), 687–737.
- (68) Zrodnikov, Y.; Davis, C. E. The Highs and Lows of FAIMS: Predictions and Future Trends for High Field Asymmetric Waveform Ion Mobility Spectrometry. *J. Nanomed. Nanotechnol.* **2012**, 3 (5).
- (69) Berthias, F.; Maatoug, B.; Glish, G. L.; Moussa, F.; Maitre, P. Resolution and Assignment of Differential Ion Mobility Spectra of Sarcosine and Isomers. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2018**, 29, 752–760.
- (70) Shvartsburg, A. A.; Haris, A.; Andrzejewski, R.; Entwistle, A.; Giles, R. Differential Ion Mobility Separations in the Low-Pressure Regime. *Anal. Chem.* **2018**, 90 (1), 936–943.
- (71) Molano-Arevalo, J. C.; Gonzalez, W.; Jeanne Dit Fouque, K.; Miksovská, J.; Maitre, P.; Fernandez-Lima, F. 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.* **2018**, 20 (10), 7043–7052.
- (72) Choi, C. M.; Simon, A. L.; Chirof, F.; Kulesza, A.; Knight, G.; Daly, S.; MacAleese, L.; Antoine, R.; Dugourd, P. Charge, Color, and Conformation: Spectroscopy on Isomer-

- Selected Peptide Ions. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120* (4), 709–714.
- (73) Carrascosa, E.; Petermayer, C.; Scholz, M. S.; Bull, J. N.; Dube, H.; Bieske, E. J. Reversible Photoswitching of Isolated Ionic Hemiindigos with Visible Light. *ChemPhysChem* **2020**, *21* (7), 680–685.
- (74) Prazeres, R.; Glotin, F.; Insa, C.; Jaroszynski, D. A. A.; Ortega, J. M. M. Two-Colour Operation of a Free-Electron Laser and Applications in the Mid-Infrared. *Eur. Phys. J. D* **1998**, *3* (1), 87–93.
- (75) Aleese, L. Mac; Simon, A.; McMahon, T. B.; Ortega, J.-M.; Scuderi, D.; Lemaire, J.; Maître, P. Mid-IR Spectroscopy of Protonated Leucine Methyl Ester Performed with an FTICR or a Paul Type Ion-Trap. *Int. J. Mass Spectrom.* **2006**, *249–250*, 14–20.
- (76) Bellina, B.; Antoine, R.; Broyer, M.; Gell, L.; Sanader, Ž.; Mitrić, R.; Bonačić-Koutecký, V.; Dugourd, P. Formation and Characterization of Thioglycolic Acid–silver Cluster Complexes. *Dalt. Trans.* **2013**, *42* (23), 8328.
- (77) Revercomb, H. E.; Mason, E. A. Theory of Plasma Chromatography/Gaseous Electrophoresis. Review. *Anal. Chem.* **1975**, *47* (7), 970–983.
- (78) Shao, Y.; Molnar, L. F.; Jung, Y.; Kussmann, J.; Ochsenfeld, C.; Brown, S. T.; Gilbert, A. T. B.; Slipchenko, L. V.; Levchenko, S. V.; O’Neill, D. P.; et al. Advances in Methods and Algorithms in a Modern Quantum Chemistry Program Package. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8* (27), 3172–3191.
- (79) Halgren, T. A. Merck Molecular Force Field. I. Basis, Form, Scope, Parameterization, and Performance of MMFF94. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17* (5–6), 490–519.
- (80) Kohn, W.; Sham, L. J. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Phys. Rev.* **1965**, *140* (4A), A1133–A1138.
- (81) M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. S.; M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. M.; G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. H.; A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. H.; M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. N.; Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, J.; J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. B.; K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. N.; K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. T.; M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. C.; et al. Gaussian 09, Revision D.01. Gaussian, Inc.: Wallingford CT 2013.
- (82) Grimme, S. Accurate Description of van Der Waals Complexes by Density Functional Theory Including Empirical Corrections. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25* (12), 1463–1473.
- (83) Zhurko, G. A. Chemcraft - Graphical Program for Visualization of Quantum Chemistry Computations.
- (84) Mesleh, M. F.; Hunter, J. M.; Shvartsburg, A. A.; Schatz, G. C.; Jarrold, M. F. Structural Information from Ion Mobility Measurements: Effects of the Long-Range Potential. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100* (40), 16082–16086.
- (85) Glendening, E. D.; Badenhoop, J. K.; Reed, A. E.; Carpenter, J. E.; Bohmann, J. A.; Morales, C. M.; Karafiloglou, P.; Landis, C. R.; Weinhold, F. NBO 7.0. 2018.
- (86) Keith, T. A. AIMAll (Version 17.11.14). TK Gristmill Software: Overland Park KS, USA, USA 2017.
- (87) Contreras-García, J.; Johnson, E. R.; Keinan, S.; Chaudret, R.; Piquemal, J.-P.; Beratan, D. N.; Yang, W. NCIPLOT: A Program for Plotting Noncovalent Interaction Regions. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7* (3), 625–632.
- (88) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14* (1), 33–38.
- (89) Pople, J. A.; Seeger, R.; Krishnan, R. Variational Configuration Interaction Methods and Comparison with Perturbation Theory. *Int. J. Quantum Chem.* **2009**, *12* (S11), 149–163.
-

- (90) Roos, B. O.; Taylor, P. R.; Sigbahn, P. E. M. A Complete Active Space SCF Method (CASSCF) Using a Density Matrix Formulated Super-CI Approach. *Chem. Phys.* **1980**, *48* (2), 157–173.
- (91) McDouall, J. J. W.; Peasley, K.; Robb, M. A. A Simple MC SCF Perturbation Theory: Orthogonal Valence Bond Møller-Plesset 2 (OVBP2). *Chem. Phys. Lett.* **1988**, *148* (2–3), 183–189.
- (92) Glendening, E. D.; Badenhoop, J. K.; Reed, A. E.; Carpenter, J. E.; Bohmann, J. A.; Morales, C. M.; Landis, C. R.; Weinhold, F. NBO 6.0. 2013.
- (93) Neese, F. The ORCA Program System. *Wiley Interdiscip. Rev. - Comput. Mol. Sci.* **2012**, *2* (1), 73–78.
- (94) Grimme, S. Semiempirical Hybrid Density Functional with Perturbative Second-Order Correlation. *J. Chem. Phys.* **2006**, *124* (3), 034108.
- (95) Feyereisen, M.; Fitzgerald, G.; Komornicki, A. Use of Approximate Integrals in Ab Initio Theory. An Application in MP2 Energy Calculations. *Chem. Phys. Lett.* **1993**, *208* (5–6), 359–363.
- (96) Dutta, A. K.; Neese, F.; Izsák, R. Towards a Pair Natural Orbital Coupled Cluster Method for Excited States. *J. Chem. Phys.* **2016**, *145* (3), 034102.
- (97) Weigend, F. Accurate Coulomb-Fitting Basis Sets for H to Rn. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8* (9), 1057.
- (98) Weigend, F.; Köhn, A.; Hättig, C. Efficient Use of the Correlation Consistent Basis Sets in Resolution of the Identity MP2 Calculations. *J. Chem. Phys.* **2002**, *116* (8), 3175–3183.
- (99) 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* **2018**, *3* (8), 9075–9085.
- (100) Rodrigues-Oliveira, A. F.; Batista, P. R.; Ducati, L. C.; Correra, T. C. Analyzing the N–H+... π Interactions of Protonated Tryptophan and Phenylalkylamines Using QTAIM, NCI, and NBO. *Theor. Chem. Acc.* **2020**, *139* (8), 130.
- (101) Medvedev, M. G.; Bushmarinov, I. S.; Sun, J.; Perdew, J. P.; Lyssenko, K. A. Density Functional Theory Is Straying from the Path toward the Exact Functional. *Science* (80-.). **2017**, *355* (6320), 49–52.
- (102) Cohen, A. J.; Mori-Sanchez, P.; Yang, W. Insights into Current Limitations of Density Functional Theory. *Science* (80-.). **2008**, *321* (5890), 792–794.
- (103) Irikura, K. K.; Johnson, R. D.; Kacker, R. N. Uncertainties in Scaling Factors for Ab Initio Vibrational Frequencies. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109* (37), 8430–8437.
- (104) Russell D. Johnson III. NIST Computational Chemistry Comparison and Benchmark Database <http://cccbdb.nist.gov/%0A>.
- (105) Yanai, T.; Tew, D. P.; Handy, N. C. A New Hybrid Exchange–correlation Functional Using the Coulomb-Attenuating Method (CAM-B3LYP). *Chem. Phys. Lett.* **2004**, *393* (1–3), 51–57.
- (106) Zhao, Y.; Truhlar, D. 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 Function. *Theor. Chem. Acc.* **2008**, *120* (1–3), 215–241.
- (107) Johnson, R. D.; Irikura, K. K.; Kacker, R. N.; Kessel, R. K. Uncertainties in Scaling Factors for Ab Initio Anharmonic Vibrational Frequencies. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **2009**, *238* (2), 2822–2828.
- (108) Polfer, N. C.; Oomens, J.; Dunbar, R. C. Alkali Metal Complexes of the Dipeptides
-

- PheAla and AlaPhe: IRMPD Spectroscopy. *ChemPhysChem* **2008**, *9* (4), 579–589.
- (109) Grégoire, G.; Gaigeot, M. P.; Marinica, D. C.; Lemaire, J.; Schermann, J. P.; Desfrancois, C. Resonant Infrared Multiphoton Dissociation Spectroscopy of Gas-Phase Protonated Peptides. Experiments and Car–Parrinello Dynamics at 300 K. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9* (24), 3082–3097.
- (110) Hernandez, O.; Pulay, P.; Maître, P.; Paizs, B. Zundel-Type H-Bonding in Biomolecular Ions. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2014**, *25* (9), 1511–1514.
- (111) Galimberti, D. R.; Milani, A.; Tommasini, M.; Castiglioni, C.; Gaigeot, M. P. Combining Static and Dynamical Approaches for Infrared Spectra Calculations of Gas Phase Molecules and Clusters. *J. Chem. Theory Comput.* **2017**, *13* (8), 3802–3813.
- (112) 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.* **2016**, *27* (5), 757–766.
- (113) Frascchetti, C.; Filippi, A.; Guarcini, L.; Steinmetz, V.; Speranza, M. Structure and Conformation of Protonated D-(+)-Biotin in the Unsolvated State. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119* (20), 6198–6203.
- (114) 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.* **2011**, *2* (4), 299–304.
- (115) Pereverzev, A. Y.; Cheng, X.; Nagornova, N. S.; Reese, D. L.; Steele, R. P.; Boyarkin, O. V. Vibrational Signatures of Conformer-Specific Intramolecular Interactions in Protonated Tryptophan. *J. Phys. Chem. A* **2016**, *120* (28), 5598–5608.
- (116) Kashinski, D. O.; Chase, G. M.; Nelson, R. G.; Di Nallo, O. E.; Scales, A. N.; Vanderley, D. L.; Byrd, E. F. C. Harmonic Vibrational Frequencies: Approximate Global Scaling Factors for TPSS, M06, and M11 Functional Families Using Several Common Basis Sets. *J. Phys. Chem. A* **2017**, *121* (11), 2265–2273.
- (117) Kieninger, M.; Ventura, O. N. Calculations of the Infrared and Raman Spectra of Simple Thiols and Thiol-Water Complexes. *Int. J. Quantum Chem.* **2011**, *111* (7–8), 1843–1857.
- (118) Sandorfy, C. Anharmonicity and Hydrogen Bonding. *J. Mol. Struct.* **2002**, *614* (1–3), 365–366.
- (119) Sándorfy, C. Hydrogen Bonding: How Much Anharmonicity? *J. Mol. Struct.* **2006**, *790* (1–3), 50–54.
- (120) Shi, Y.; Zhang, Z.; Jiang, W.; Wang, Z. Theoretical Study on Electronic and Vibrational Properties of Hydrogen Bonds in Glycine-Water Clusters. *Chem. Phys. Lett.* **2017**, *684*, 53–59.
- (121) Schwabe, T.; Grimme, S. Double-Hybrid Density Functionals with Long-Range Dispersion Corrections: Higher Accuracy and Extended Applicability. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9* (26), 3397.
- (122) Buczek, A.; Kupka, T.; Broda, M. A. Extrapolation of Water and Formaldehyde Harmonic and Anharmonic Frequencies to the B3LYP/CBS Limit Using Polarization Consistent Basis Sets. *J. Mol. Model.* **2011**, *17* (8), 2029–2040.
- (123) Young, V. R. Adult Amino Acid Requirements: The Case for a Major Revision in Current Recommendations. *J. Nutr.* **1994**, *124* (suppl_8), 1517S–1523S.
- (124) Platten, M.; Nollen, E. A. A.; Röhrig, U. F.; Fallarino, F.; Opitz, C. A. Tryptophan Metabolism as a Common Therapeutic Target in Cancer, Neurodegeneration and Beyond. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2019**, *18* (5), 379–401.
- (125) Duarte, C. J.; Cormanich, R. A.; Ducati, L. C.; Rittner, R. ¹H NMR and Theoretical Studies on the Conformational Equilibrium of Tryptophan Methyl Ester. *J. Mol. Struct.*
-

- 2013**, 1050, 174–179.
- (126) Anderson, J. S.; Bowitch, G. S.; Brewster, R. L. Influence of Conformation on the Fluorescence of Tryptophan-Containing Peptides. *Biopolymers* **1983**, 22 (11), 2459–2476.
- (127) Kowalska-Baron, A. Theoretical Study of the Complexes of Tyrosine and Tryptophan with Biologically Important Metal Cations in Aqueous Solutions. *Comput. Theor. Chem.* **2015**, 1057, 7–14.
- (128) Lioe, H.; O’Hair, R. A. J.; Reid, G. E. Gas-Phase Reactions of Protonated Tryptophan. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, 15 (1), 65–76.
- (129) Rizzo, T. R.; Park, Y. D.; Levy, D. H. Dispersed Fluorescence of Jet-cooled Tryptophan: Excited State Conformers and Intramolecular Exciplex Formation. *J. Chem. Phys.* **1986**, 85 (12), 6945–6951.
- (130) Chiavarino, B.; Crestoni, M. E.; Schu, M.; Bouchet, A.; Piccirillo, S.; Steinmetz, V.; Dopfer, O.; Fornarini, S.; La, R.; Moro, P. A.; et al. Cation– π Interactions in Protonated Phenylalkylamines. *J. Phys. Chem. A* **2014**, 118 (34), 7130–7138.
- (131) Bader, R. F. W. A Quantum Theory of Molecular Structure and Its Applications. *Chem. Rev.* **1991**, 91 (5), 893–928.
- (132) Johnson, E. R.; Keinan, S.; Mori-Sánchez, P.; Contreras-García, J.; Cohen, A. J.; Yang, W. Revealing Noncovalent Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132 (18), 6498–6506.
- (133) Reed, A. E.; Curtiss, L. A.; Weinhold, F. Intermolecular Interactions from a Natural Bond Orbital, Donor-Acceptor Viewpoint. *Chem. Rev.* **1988**, 88 (6), 899–926.
- (134) Masson, M. A. C.; Karpfenstein, R.; Oliveira-silva, D.; Teuler, J.; Archirel, P.; Maître, P.; Corraera, T. C. Evaluation of Ca 2+ Binding Sites in Tacrolimus by Infrared Multiple Photon Dissociation Spectroscopy. **2018**.
- (135) Salehi, S.; Mashmool Moghaddam, S. M.; Tarin, M.; Shokooh Saljooghi, A. Pharmaceutical Nickel(II) Chelation Properties of 3-Hydroxyflaven, Deferiprone and Maltol Metal Chelators: A Density Functional Study. *Phys. Chem. Res.* **2020**, 8 (1), 91–110.
- (136) Potla, K. M.; Poojith, N.; Osório, F. A. P.; Valverde, C.; Chinnam, S.; Suchetan, P. A.; Vankayalapati, S. An Analysis of Spectroscopic, Computational and Biological Activity Studies of L-Shaped Sulfamoylbenzoic Acid Derivatives: A Third Order Nonlinear Optical Material. *J. Mol. Struct.* **2020**, 1210, 128070.
- (137) Allal, H.; Belhocine, Y.; Rahali, S.; Damous, M.; Ammouchi, N. Structural, Electronic, and Energetic Investigations of Acrolein Adsorption on B36 Borophene Nanosheet: A Dispersion-Corrected DFT Insight. *J. Mol. Model.* **2020**, 26 (6), 128.
- (138) Likhitha, U.; Narayana, B.; Sarojini, B. K.; Madan Kumar, S.; Lobo, A. G.; Karthick, T. A Study on Interwoven Hydrogen Bonding Interactions in New Zidovudine-Picric Acid (1:1) Cocrystal through Single Crystal XRD, Spectral and Computational Methods. *J. Mol. Struct.* **2020**, 1211, 128052.
- (139) Niu, X.; Huang, Z.; Ma, L.; Shen, T.; Guo, L. Density Functional Theory, Natural Bond Orbital and Quantum Theory of Atoms in Molecule Analyses on the Hydrogen Bonding Interactions in Tryptophan-Water Complexes. *J. Chem. Sci.* **2013**, 125 (4), 949–958.
- (140) Su, P.; Chen, Z.; Wu, W. An Energy Decomposition Analysis Study for Intramolecular Non-Covalent Interaction. *Chem. Phys. Lett.* **2015**, 635, 250–256.
- (141) Schütz, M.; Bouchet, A.; Dopfer, O. Infrared Spectrum of the Cold Ortho-Fluorinated Protonated Neurotransmitter 2-Phenylethylamine: Competition between $\text{NH}^+ \cdots \pi$ and $\text{NH}^+ \cdots \text{F}$ Interactions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, 18 (38), 26980–26989.
- (142) Bouchet, A.; Schütz, M.; Dopfer, O. Competing Insertion and External Binding Motifs in Hydrated Neurotransmitters: Infrared Spectra of Protonated Phenylethylamine
-

- Monohydrate. *ChemPhysChem* **2016**, *17* (2), 232–243.
- (143) Kumar, M.; Balaji, P. V. C-H... π Interactions in Proteins: Prevalence, Pattern of Occurrence, Residue Propensities, Location, and Contribution to Protein Stability. *J. Mol. Model.* **2014**, *20* (2), 2136.
- (144) Gallivan, J. P.; Dougherty, D. A. Cation- π Interactions in Structural Biology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96* (17), 9459–9464.
- (145) Mahadevi, A. S.; Sastry, G. N. Cation- π Interaction: Its Role and Relevance in Chemistry, Biology, and Material Science. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (3), 2100–2138.
- (146) Jabłoński, M.; Palusiak, M. Basis Set and Method Dependence in Quantum Theory of Atoms in Molecules Calculations for Covalent Bonds. *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114* (47), 12498–12505.
- (147) Jabłoński, M.; Palusiak, M. Basis Set and Method Dependence in Atoms in Molecules Calculations. *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114* (5), 2240–2244.
- (148) Forni, A.; Pieraccini, S.; Franchini, D.; Sironi, M. Assessment of DFT Functionals for QTAIM Topological Analysis of Halogen Bonds with Benzene. *J. Phys. Chem. A* **2016**, *120* (45), 9071–9080.
- (149) Esrafil, M. D. Investigation of H-Bonding and Halogen-Bonding Effects in Dichloroacetic Acid: DFT Calculations of NQR Parameters and QTAIM Analysis. *J. Mol. Model.* **2012**, *18* (12), 5005–5016.
- (150) Rincón, D. A.; Cordeiro, M. N. D. S.; Mosquera, R. A. On the Effects of the Basis Set Superposition Error on the Change of QTAIM Charges in Adduct Formation. Application to Complexes between Morphine and Cocaine and Their Main Metabolites. *RSC Adv.* **2016**, *6* (112), 110642–110655.
- (151) Shameera Ahamed, T. K.; Rajan, V. K.; Sabira, K.; Muraleedharan, K. DFT and QTAIM Based Investigation on the Structure and Antioxidant Behavior of Lichen Substances Atranorin, Evernic Acid and Diffractaic Acid. *Comput. Biol. Chem.* **2019**, *80*, 66–78.
- (152) Fuster, F.; Grabowski, S. J. Intramolecular Hydrogen Bonds: The QTAIM and ELF Characteristics. *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115* (35), 10078–10086.
- (153) Rozas, I.; Alkorta, I.; Elguero, J. Behavior of Ylides Containing N, O, and C Atoms as Hydrogen Bond Acceptors. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (45), 11154–11161.
- (154) Sarkar, R.; Kundu, T. K. Nonbonding Interaction Analyses on PVDF/[BMIM][BF₄] Complex System in Gas and Solution Phase. *J. Mol. Model.* **2019**, *25* (5), 131.
- (155) Grabowski, S. J. Theoretical Studies of Strong Hydrogen Bonds. *Annu. Reports Sect. "C" (Physical Chem.* **2006**, *102*, 131.
- (156) Afonin, A. V.; Vashchenko, A. V.; Sigalov, M. V. Estimating the Energy of Intramolecular Hydrogen Bonds from 1 H NMR and QTAIM Calculations. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (47), 11199–11211.
- (157) Espinosa, E.; Molins, E.; Lecomte, C. Hydrogen Bond Strengths Revealed by Topological Analyses of Experimentally Observed Electron Densities. *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *285* (3–4), 170–173.
- (158) Batista, P. R.; Karas, L. J.; Viesser, R. V.; De Oliveira, C. C.; Gonçalves, M. B.; Tormena, C. F.; Rittner, R.; Ducati, L. C.; De Oliveira, P. R. Dealing with Hydrogen Bonding on the Conformational Preference of 1,3-Aminopropanols: Experimental and Molecular Dynamics Approaches. *J. Phys. Chem. A* **2019**, *123* (40), 8583–8594.
- (159) Iogansen, A. V. Direct Proportionality of the Hydrogen Bonding Energy and the Intensification of the Stretching $\nu(\text{XH})$ Vibration in Infrared Spectra. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **1999**, *55* (7–8), 1585–1612.
- (160) Fischer, K. C.; Sherman, S. L.; Voss, J. M.; Zhou, J.; Garand, E. Microsolvation Structures of Protonated Glycine and L-Alanine. *J. Phys. Chem. A* **2019**, *123* (15), 3355–

- 3366.
- (161) Voss, J. M.; Fischer, K. C.; Garand, E. Revealing the Structure of Isolated Peptides: IR-IR Predissociation Spectroscopy of Protonated Triglycine Isomers. *J. Mol. Spectrosc.* **2018**, *347*, 28–34.
- (162) Yurenko, Y. P.; Zhurakivsky, R. O.; Ghomi, M.; Samijlenko, S. P.; Hovorun, D. M. How Many Conformers Determine the Thymidine Low-Temperature Matrix Infrared Spectrum? DFT and MP2 Quantum Chemical Study. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111* (32), 9655–9663.
- (163) Afonin, A. V.; Sterkhova, I. V.; Vashchenko, A. V.; Sigalov, M. V. Estimating the Energy of Intramolecular Bifurcated (Three-Centered) Hydrogen Bond by X-Ray, IR and ¹H NMR Spectroscopy, and QTAIM Calculations. *J. Mol. Struct.* **2018**, *1163*, 185–196.
- (164) Koch, U.; Popelier, P. L. A. Characterization of C-H-O Hydrogen Bonds on the Basis of the Charge Density. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99* (24), 9747–9754.
- (165) El-Emam, A. A.; Saveeth Kumar, E.; Janani, K.; Al-Wahaibi, L. H.; Blacque, O.; El-Awady, M. I.; Al-Shaalan, N. H.; Percino, M. J.; Thamotharan, S. Quantitative Assessment of the Nature of Noncovalent Interactions in N-Substituted-5-(Adamantan-1-yl)-1,3,4-Thiadiazole-2-Amines: Insights from Crystallographic and QTAIM Analysis. *RSC Adv.* **2020**, *10* (17), 9840–9853.
- (166) Cukrowski, I.; Matta, C. F. Hydrogen–hydrogen Bonding: A Stabilizing Interaction in Strained Chelating Rings of Metal Complexes in Aqueous Phase. *Chem. Phys. Lett.* **2010**, *499* (1–3), 66–69.
- (167) Miranda, M. O.; Duarte, D. J. R.; Alkorta, I. Anion-Anion Complexes Established between Aspartate Dimers. *ChemPhysChem* **2020**.
- (168) Gilli, G.; Gilli, P. Towards a Unified Hydrogen-Bond Theory. *J. Mol. Struct.* **2000**, *552* (1–3), 1–15.
- (169) Gilli, G. *The Nature of the Hydrogen Bond: Outline of a Comprehensive Hydrogen Bond Theory*; IUCr monographs on crystallography; Oxford University Press: Oxford; New York, 2009.
- (170) Hilal, R.; Aziz, S. G.; Alyoubi, A. O.; Elroby, S. Quantum Topology of the Charge Density of Chemical Bonds. QTAIM Analysis of the C-Br and O-Br Bonds. *Procedia Comput. Sci.* **2015**, *51*, 1872–1877.
- (171) Cukrowski, I.; de Lange, J. H.; Adeyinka, A. S.; Mangondo, P. Evaluating Common QTAIM and NCI Interpretations of the Electron Density Concentration through IQA Interaction Energies and 1D Cross-Sections of the Electron and Deformation Density Distributions. *Comput. Theor. Chem.* **2015**, *1053*, 60–76.
- (172) Astani, E.; Heshmati, E.; Chen, C.-J.; Hadipour, N. L.; Shekarsaraei, S. A Study of Hydrogen Bond Effects on the Oxygen, Nitrogen, and Hydrogen Electric Field Gradient Tensors in the Active Site of Human Dehydroepiandrosterone Sulphotransferase: A Density-Functional Theory Based Treatment. *Chem. Phys. Lett.* **2016**, *653*, 78–84.
- (173) Attwood, P. V.; Wallace, J. C. Chemical and Catalytic Mechanisms of Carboxyl Transfer Reactions in Biotin-Dependent Enzymes. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35* (2), 113–120.
- (174) Tong, L. Structure and Function of Biotin-Dependent Carboxylases. *Cell. Mol. Life Sci.* **2013**, *70* (5), 863–891.
- (175) Adina-Zada, A.; Zeczycki, T. N.; Attwood, P. V. Regulation of the Structure and Activity of Pyruvate Carboxylase by Acetyl CoA. *Arch. Biochem. Biophys.* **2012**, *519* (2), 118–130.
- (176) Adina-Zada, A.; Zeczycki, T. N.; St Maurice, M.; Jitrapakdee, S.; Cleland, W. W.; Attwood, P. V. Allosteric Regulation of the Biotin-Dependent Enzyme Pyruvate
-

- Carboxylase by Acetyl-CoA. *Biochem. Soc. Trans.* **2012**, *40*, 567–572.
- (177) Depeint, F.; Bruce, W. R.; Shangari, N.; Mehta, R.; O'Brien, P. J. Mitochondrial Function and Toxicity: Role of the B Vitamin Family on Mitochondrial Energy Metabolism. *Chem. Biol. Interact.* **2006**, *163* (1–2), 94–112.
- (178) Jitrapakdee, S.; St Maurice, M.; Rayment, I.; Cleland, W. W.; Wallace, J. C.; Attwood, P. V. Structure, Mechanism and Regulation of Pyruvate Carboxylase. *Biochem. J.* **2008**, *413*, 369–387.
- (179) Kumar, A. B.; Tipton, J. D.; Manetsch, R. 3-Trifluoromethyl-3-Aryldiazirine Photolabels with Enhanced Ambient Light Stability. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (13), 2729–2732.
- (180) Pellizzoni, M.; Facchetti, G.; Gandolfi, R.; Fuse, M.; Contini, A.; Rimoldi, I. Evaluation of Chemical Diversity of Biotinylated Chiral 1,3-Diamines as a Catalytic Moiety in Artificial Imine Reductase. *ChemCatChem* **2016**, *8* (9), 1665–1670.
- (181) Shin, W. S.; Han, J.; Verwilt, P.; Kumar, R.; Kim, J. H.; Kim, J. S. Cancer Targeted Enzymatic Theranostic Prodrug: Precise Diagnosis and Chemotherapy. *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27* (5), 1419–1426.
- (182) Carita Correra, T.; Santos Fernandes, A.; Mota Reginato, M.; Ducati, L. C.; Berden, G.; Oomens, J. Probing the Geometry Reorganization from Solution to Gas Phase in Putrescine Derivatives by IRMPD, ¹H-NMR and Theoretical Calculations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**.
- (183) Prell, J. S.; Correra, T. C.; Chang, T. M.; Biles, J. A.; Williams, E. R. Entropy Drives an Attached Water Molecule from the C- to N-Terminus on Protonated Proline. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (42), 14733–14735.
- (184) Kluger, R. Decarboxylation, CO₂ and the Reversion Problem. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48* (11), 2843–2849.
- (185) Kluger, R.; Tittmann, K. Thiamin Diphosphate Catalysis: Enzymic and Nonenzymic Covalent Intermediates. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (6), 1797–1833.
- (186) Kerns, J. C.; Arundel, C.; Chawla, L. S. Thiamin Deficiency in People with Obesity. *Adv. Nutr.* **2015**, *6* (2), 147–153.
- (187) Kennedy, D. O. B Vitamins and the Brain: Mechanisms, Dose and Efficacy-A Review. *Nutrients* **2016**, *8* (2).
- (188) Jordan, F.; Nemeria, N. S. Progress in the Experimental Observation of Thiamin Diphosphate-Bound Intermediates on Enzymes and Mechanistic Information Derived from These Observations. *Bioorg. Chem.* **2014**, *57*, 251–262.
- (189) Procopio, E. Q.; Bonometti, V.; Panigati, M.; Mercandelli, P.; Mussini, P. R.; Benincori, T.; D'Alfonso, G.; Sannicolò, F. Dinuclear Rhenium Complexes as Redox-Active Pendants in a Novel Electrodeposited Polycyclopentadithiophene Material. *Inorg. Chem.* **2014**, *53* (20), 11242–11251.
- (190) Zhang, H.; Ma, S.; Li, D.; Wu, Y.; Ba, X. Synthesis and Characterization of Alternating Polymers Incorporating Boron-Chelated Heterochrysenene Units. *Polymers (Basel)*. **2015**, *7* (7), 1192–1204.
- (191) Tang, Y.; Cheng, Q.; Wang, S.; Zhang, J. One-Step Liquid-Phase Heterogeneous Synthesis of Phenytoin Using Modified Calcium Oxide as a Solid Basic Catalyst. *Monatshefte für Chemie - Chem. Mon.* **2014**, *145* (9), 1501–1506.
- (192) He, H.; Wang, W.; Zhou, Y.; Xia, Q.; Ren, Y.; Feng, J.; Peng, H.; He, H.; Feng, L. Rational Design, Synthesis and Biological Evaluation of 1,3,4-Oxadiazole Pyrimidine Derivatives as Novel Pyruvate Dehydrogenase Complex E1 Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24* (8), 1879–1888.
- (193) Masson, A.; Williams, E. R.; Rizzo, T. R. Molecular Hydrogen Messengers Can Lead to
-

- Structural Infidelity: A Cautionary Tale of Protonated Glycine. *J. Chem. Phys.* **2015**, *143* (10).
- (194) Bouas-Laurent, H.; Dürr, H. Organic Photochromism (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2001**, *73* (4), 639–665.
- (195) Zulfikri, H.; Koenis, M. A. J.; Lerch, M. M.; Di Donato, M.; Szymański, W.; Filippi, C.; Feringa, B. L.; Buma, W. J. Taming the Complexity of Donor-Acceptor Stenhouse Adducts: Infrared Motion Pictures of the Complete Switching Pathway. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (18), 7376–7384.
- (196) Nie, H.; Self, J. L.; Kuenstler, A. S.; Hayward, R. C.; Read de Alaniz, J. Multiaddressable Photochromic Architectures: From Molecules to Materials. *Adv. Opt. Mater.* **2019**, *7* (16), 1900224.
- (197) Durbeej, B.; Wang, J.; Oruganti, B. Molecular Photoswitching Aided by Excited-State Aromaticity. *Chempluschem* **2018**, *83* (11), 958–967.
- (198) Mallo, N.; Foley, E. D.; Iranmanesh, H.; Kennedy, A. D. W.; Luis, E. T.; Ho, J.; Harper, J. B.; Beves, J. E. Structure-Function Relationships of Donor-Acceptor Stenhouse Adduct Photochromic Switches. *Chem. Sci.* **2018**, *9* (43), 8242–8252.
- (199) Sortino, S. Photoactivated Nanomaterials for Biomedical Release Applications. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22* (2), 301–318.
- (200) Beauté, L.; McClenaghan, N.; Lecommandoux, S. Photo-Triggered Polymer Nanomedicines: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2019**, *138*, 148–166.
- (201) Boelke, J.; Hecht, S. Designing Molecular Photoswitches for Soft Materials Applications. *Adv. Opt. Mater.* **2019**, *7* (16), 1900404.
- (202) Hemmer, J. R.; Page, Z. A.; Clark, K. D.; Stricker, F.; Dolinski, N. D.; Hawker, C. J.; Read De Alaniz, J. Controlling Dark Equilibria and Enhancing Donor-Acceptor Stenhouse Adduct Photoswitching Properties through Carbon Acid Design. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (33), 10425–10429.
- (203) Wu, B.; Xue, T.; Wang, W.; Li, S.; Shen, J.; He, Y. Visible Light Triggered Aggregation-Induced Emission Switching with a Donor-Acceptor Stenhouse Adduct. *J. Mater. Chem. C* **2018**, *6* (31), 8538–8545.
- (204) Lerch, M. M.; Wezenberg, S. J.; Szymanski, W.; Feringa, B. L. Unraveling the Photoswitching Mechanism in Donor-Acceptor Stenhouse Adducts. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (20), 6344–6347.
- (205) Lerch, M. M.; Di Donato, M.; Laurent, A. D.; Medved', M.; Iagatti, A.; Bussotti, L.; Lapini, A.; Buma, W. J.; Foggi, P.; Szymański, W.; et al. Solvent Effects on the Actinic Step of Donor-Acceptor Stenhouse Adduct Photoswitching. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2018**, *57* (27), 8063–8068.
- (206) Helmy, S.; Leibfarth, F. A.; Oh, S.; Poelma, J. E.; Hawker, C. J.; Alaniz, J. R. De; De Alaniz, J. R. Photoswitching Using Visible Light: A New Class of Organic Photochromic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (23), 8169–8172.
- (207) Jia, S.; Du, J. D.; Hawley, A.; Fong, W. K.; Graham, B.; Boyd, B. J. Investigation of Donor-Acceptor Stenhouse Adducts as New Visible Wavelength-Responsive Switching Elements for Lipid-Based Liquid Crystalline Systems. *Langmuir* **2017**, *33* (9), 2215–2221.
- (208) Jia, S.; Fong, W. K.; Graham, B.; Boyd, B. J. Photoswitchable Molecules in Long-Wavelength Light-Responsive Drug Delivery: From Molecular Design to Applications. *Chem. Mater.* **2018**, *30* (9), 2873–2887.
- (209) Poelma, S. O.; Oh, S. S.; Helmy, S.; Knight, A. S.; Burnett, G. L.; Soh, H. T.; Hawker, C. J.; Read De Alaniz, J. Controlled Drug Release to Cancer Cells from Modular One-

- Photon Visible Light-Responsive Micellar System. *Chem. Commun.* **2016**, 52 (69), 10525–10528.
- (210) Yap, J. E.; Mallo, N.; Thomas, D. S.; Beves, J. E.; Stenzel, M. H. Comparing Photoswitching of Acrylate or Methacrylate Polymers Conjugated with Donor-Acceptor Stenhouse Adducts. *Polym. Chem.* **2019**, 10 (47), 6515–6522.
- (211) Jia, S.; Tan, A.; Hawley, A.; Graham, B.; Boyd, B. J. Visible Light-Triggered Cargo Release from Donor Acceptor Stenhouse Adduct (DASA)-Doped Lyotropic Liquid Crystalline Nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* **2019**, 548, 151–159.
- (212) Senthikumar, T.; Zhou, L.; Gu, Q.; Liu, L.; Lv, F.; Wang, S. Conjugated Polymer Nanoparticles with Appended Photo-Responsive Units for Controlled Drug Delivery, Release, and Imaging. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2018**, 57 (40), 13114–13119.
- (213) Boulmier, A.; Haouas, M.; Tomane, S.; Michely, L.; Dolbecq, A.; Vallée, A.; Brezová, V.; Versace, D. L.; Mialane, P.; Oms, O. Photoactive Polyoxometalate/DASA Covalent Hybrids for Photopolymerization in the Visible Range. *Chem. - A Eur. J.* **2019**, 25 (63), 14349–14357.
- (214) Mostafavi, S. H.; Li, W.; Clark, K. D.; Stricker, F.; Alaniz, J. R. De; Bardeen, C. J. Photoinduced Deadhesion of a Polymer Film Using a Photochromic Donor-Acceptor Stenhouse Adduct. *Macromolecules* **2019**, 52 (16), 6311–6317.
- (215) Nau, M.; Seelinger, D.; Biesalski, M. Independent Two Way Switching of the Wetting Behavior of Cellulose-Derived Nanoparticle Surface Coatings by Light and by Temperature. *Adv. Mater. Interfaces* **2019**, 6 (17), 1–5.
- (216) Zhao, H.; Wang, D.; Fan, Y.; Ren, M.; Dong, S.; Zheng, Y. Surface with Reversible Green-Light-Switched Wettability by Donor-Acceptor Stenhouse Adducts. *Langmuir* **2018**, 34 (50), 15537–15543.
- (217) Chen, C.-C.; Lin, P.-C. Monitoring of Chemical Transformations by Mass Spectrometry. *Anal. Methods* **2015**, 7 (17), 6947–6959.
- (218) Diaz, Y. J.; Page, Z. A.; Knight, A. S.; Treat, N. J.; Hemmer, J. R.; Hawker, C. J.; Read de Alaniz, J. A Versatile and Highly Selective Colorimetric Sensor for the Detection of Amines. *Chem. - A Eur. J.* **2017**, 23 (15), 3562–3566.
- (219) Balamurugan, A.; Lee, H. Il. A Visible Light Responsive On-Off Polymeric Photoswitch for the Colorimetric Detection of Nerve Agent Mimics in Solution and in the Vapor Phase. *Macromolecules* **2016**, 49 (7), 2568–2574.
- (220) Wang, D.; Zhao, L.; Zhao, H.; Wu, J.; Wagner, M.; Sun, W.; Liu, X.; Miao, M. sheng; Zheng, Y. Inducing Molecular Isomerization Assisted by Water. *Commun. Chem.* **2019**, 2 (1).
- (221) Cai, Y. De; Chen, T. Y.; Chen, X. Q.; Bao, X. Multiresponsive Donor-Acceptor Stenhouse Adduct: Opportunities Arise from a Diamine Donor. *Org. Lett.* **2019**, 21 (18), 7445–7449.
- (222) Li, M.; Yang, S.; Liang, W.; Zhang, X.; Qu, D. A Novel Multiphotochromic System with Orthogonal Light Excitations. *Dye. Pigment.* **2019**, 166 (February), 239–244.
- (223) García-Iriepa, C.; Marazzi, M.; Sampedro, D. From Light Absorption to Cyclization: Structure and Solvent Effects in Donor-Acceptor Stenhouse Adducts. *ChemPhotoChem* **2019**, 3 (9), 866–873.
- (224) Tonnelé, C.; Champagne, B.; Muccioli, L.; Castet, F. Second-Order Nonlinear Optical Properties of Stenhouse Photoswitches: Insights from Density Functional Theory. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, 20 (43), 27658–27667.
- (225) Lerch, M. M.; Medved, M.; Lapini, A.; Laurent, A. D.; Iagatti, A.; Bussotti, L.; Szymański, W.; Buma, W. J.; Foggi, P.; Di Donato, M.; et al. Tailoring Photoisomerization Pathways in Donor-Acceptor Stenhouse Adducts: The Role of the
-

- Hydroxy Group. *J. Phys. Chem. A* **2018**, *122* (4), 955–964.
- (226) Laurent, A. D.; Medved', M.; Jacquemin, D. Using Time-Dependent Density Functional Theory to Probe the Nature of Donor–Acceptor Stenhouse Adduct Photochromes. *ChemPhysChem* **2016**, 1846–1851.
- (227) Di Donato, M.; Lerch, M. M.; Lapini, A.; Laurent, A. D.; Iagatti, A.; Bussotti, L.; Ihrig, S. P.; Medved, M.; Jacquemin, D.; Szymański, W.; et al. Shedding Light on the Photoisomerization Pathway of Donor-Acceptor Stenhouse Adducts. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (44), 15596–15599.
- (228) Bull, J. N.; Carrascosa, E.; Mallo, N.; Scholz, M. S.; Da Silva, G.; Beves, J. E.; Bieske, E. J. Photoswitching an Isolated Donor-Acceptor Stenhouse Adduct. *J. Phys. Chem. Lett.* **2018**, *9* (3), 665–671.
- (229) Benassi, M.; Eberlin, M. N. Absolute Assignment of Constitutional Isomers via Structurally Diagnostic Fragment Ions: The Challenging Case of α - and β -Acyl Naphthalenes. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, *21* (12), 2041–2050.
- (230) Begala, M.; Tocco, G.; Meli, G.; Podda, G.; Urru, S. A. M. Formation of 2-Substituted Benzofuran Fragment Ions from 6-Alkyl- and 6-Aryldibenzo(d,f)(1,3)Dioxepine Derivatives under Electron Ionization-a Useful Precursor Ion for Isomeric Differentiation. *J. Mass Spectrom.* **2009**, *44* (2), 245–251.
- (231) Bull, J. N.; Carrascosa, E.; Mallo, N.; Scholz, M. S.; Silva, G.; Beves, J. E.; Bieske, E. J. Photoswitching an Isolated Donor – Acceptor Stenhouse Adduct. **2018**.
- (232) Goerigk, L.; Grimme, S. Assessment of TD-DFT Methods and of Various Spin Scaled CIS(D) and CC2 Versions for the Treatment of Low-Lying Valence Excitations of Large Organic Dyes. *J. Chem. Phys.* **2010**, *132* (18), 184103.
-

6. ÍNDICE REMISSIVO

- Absorção, 14, 17, 22, 30, 37, 38, 39, 41, 50, 59, 61, 72, 114, 115, 116, 119, 124, 126, 127, 128, 134
- Aprisionamento de íons, 24, 32
- Biotina, 8, 15, 17, 19, 24, 46, 51, 55, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 136
- Biotina, 59, 64, 66, 68, 89
- Cálculos computacionais, 24, 28, 54, 134
- Cálculos teóricos, 5, 55, 57, 59, 67, 70, 96
- Confômero, 16, 18, 19, 61, 68, 75, 77, 80, 83, 84, 88, 91, 92, 93, 95, 96, 100, 103, 104, 105, 106, 107, 109, 110, 111, 123, 166
- DASA, 10, 20, 22, 113, 114, 115, 131, 133, 136, 150
- DTIMS, 10, 17, 22, 30, 43, 44, 45, 46, 48, 49, 50, 52, 115, 123, 131, 132, 133, 134, 136
- Eficiência de fotofragmentação, 24, 41, 42, 131, 137
- Energia de ligação, 14, 15, 78, 108
- Espectroscopia de Ação, 12, 24, 37
- Espectroscopia de íons, 8, 28, 30, 32, 37, 74
- Estado, 10, 12
- Excitação, 17, 31, 32, 35, 36, 54, 103, 114, 127
- Excitação vertical, 31, 54, 127
- FAIMS, 11, 17, 22, 30, 43, 47, 48, 49, 50, 52, 115, 129, 130, 131, 133, 134, 136, 137, 140, 141
- Fator de Escala
SF. *Ver*
- Fotodissociação, 13, 17, 19, 24, 30, 32, 37, 38, 39, 41, 42, 50, 52, 94, 96, 125, 134
- Fotofragmentação
Fotodissociação. *Ver*
- FT-ICR, 11, 17, 30, 32, 34, 36
- IMS, 11, 28, 30, 43, 45, 50, 55
- Interação, 78, 85, 108
- Interações intramoleculares, 8, 14, 28, 55, 59, 60, 63, 64, 65, 73, 74, 91, 92, 111, 120, 137
- Ion Trap, 139, 140
- IRMPD, 8, 9, 11, 17, 18, 21, 24, 25, 30, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 50, 51, 55, 56, 58, 60, 65, 72, 90, 96, 111, 115, 122, 123, 124, 136, 137, 138, 139, 140, 144, 148, 154, 156, 169
- Isômeros, 25, 119, 122, 124
- Laser, 11, 51, 139, 140, 142
- Ligação, 10, 11, 12
- Ligação de Hidrogênio, 10, 11
- Microssolvatação, 55, 98, 101, 111, 137
- NCI, 5, 8, 9, 12, 19, 20, 24, 54, 73, 81, 82, 83, 85, 87, 109, 110, 111, 136, 143, 147, 167
- PAA, 12
- Photoswitching, 25, 119, 142, 149, 150, 151
- Protonação, 8, 19, 20, 21, 28, 61, 67, 90, 91, 92, 94, 114, 119, 120, 121, 124, 128, 137
- QTAIM, 5, 8, 9, 12, 14, 15, 19, 24, 54, 73, 74, 75, 76, 78, 79, 80, 81, 83, 84, 85, 87, 88, 107, 108, 109, 110, 111, 136, 143, 146, 147, 167
- SF, 12, 21, 62, 67, 68, 70, 122
- Sítio de protonação, 8, 15, 21, 55, 90, 91, 92, 96, 107, 119, 120, 121, 128, 134, 137
- Teoria, 10, 12, 13, 54
- Tiamina, 13, 25, 98, 101, 103
- Triptofano, 13, 18, 24, 59, 60, 64, 66, 68, 72, 74, 77, 80, 81, 84, 85, 87
- UVPD, 8, 9, 13, 24, 25, 30, 38, 42, 52, 55, 115, 124, 125, 126, 128, 134, 136, 137
- Vibracional, 8, 15, 19, 38, 41, 57, 61, 91, 95, 103, 106, 167, 169

7. APÊNDICE

Tabela 18. Métodos, conjunto de bases e fatores de escalas utilizados para cálculos de frequência nos 50 artigos mais citados durante os 10 últimos anos (2007-2017). (FT-DTCF é um acrônimo para *Fourier Transform of Dipole Time Correlation Function*; PLEF é um acrônimo para *Projection of Local Electric Field*)

Pesquisa: "IRMPD spectroscopy" Refinar: "Article"	Método	Conjunto de bases	Fator de escala	Referência
1	B3LYP	6-31+G(d,p)	0.975	10.1021/ja711343q
2	B3LYP	6-311+G(d,p) HW*/6-311+G(d,p)	0.9804	10.1021/jp710885a
3	B3LYP	hay-wadt ECP	0.98	10.1021/jp074935e
4	B3LYP	6-31++G(d,p)	0.98	10.1021/ja807615v
5	B3LYP	6-311+G(d,p) HW*/6-311+G(d,p)	0.9084	10.1021/jp711237g
6	B3LYP	6-31+G(d,p)	0.975	10.1002/cphc.200700700
7	B3LYP	6-31++G(d,p)	0.975	10.1021/jp071902q
8	B3LYP	6-31G(d)	0.914	10.1039/B618094A
9	B3LYP	6-311++G(d,p)	0.978	10.1021/ja8067929
10	B3LYP	1. 6-31+G(d) 2. 6-311++G(2d,2p)	-	10.1021/ja073868z
11	B3LYP	6-311+G(d,p)	0.995	10.1021/ja0734492
12	B3LYP	6-311+G(d,p)	0.98	10.1016/j.jasms.2008.10.012
13	B3LYP	6-31G(d,p)	0.965	10.1088/0004- 637X/706/1/L66
14	B3LYP	6-31+G(d,p)	0.98	10.1021/ja0662321
15	MP2 B3LYP	6-311++G(d,p)	0.986 - 0.943	10.1021/ja200849g
16	B3LYP	6- 31+G(d,p)/CRENBL	0.975	10.1021/ja808177z
17	B3LYP	TZVP	0.9167 - 0.9832	10.1039/B803492C
18	B3LYP	6-311+G(d,p)	0.985	10.1021/ja068715a
19	B3LYP	6-31+G(d,p)	0.98	10.1021/ja101556g
20	B3LYP	6-31+G(d,p)	0.975	10.1021/ja901870d
21	B3LYP	6-31G(d)	0.97	10.1021/jp800069n
22	B3LYP	6-31G(d)	0.96	10.1016/j.ijms.2007.10.004
23	B3LYP	6-311+G(d,p)	0.975	10.1021/jp9008064
24	PLEF	-	-	10.1021/ja108341t
25	B3LYP	6-31+G(d,p)/SDD	0.98	10.1021/jp905060n

26	B3LYP	6-311++G(d,p)	0.985	10.1002/cphc.200800543
27	FT-DTCF	-	-	10.1021/ct900057s
28	B3LYP	6-31+G(d,p)	0.96	10.1021/jp0736903
29	MPW1PW91	6-311++G(d,p) SDD (Sr, Ba)	0.965	10.1021/jp903064w
30	B3LYP	6-311++G(d,p)	0.9793	10.1021/ja077321w
31	B3LYP	6-31+G(d,p)/ 6-311++G(d,p)	0.98	10.1021/ja109045j
32	B3LYP	6-31+G(d,p) /CRENBL	0.975	10.1021/jp909366a
33	B3LYP	6-311+G(d,p)	0.99	10.1021/jp811468q
34	B3LYP	6- 31++G(d,p)/CRENBL	0.975	10.1021/jp803121w
35	B3LYP	6-31+G(d,p)	0.955	10.1021/ja304929h
36	B3LYP	6-31+G(d,p)	0.958	10.1021/jp809993k
37	B3LYP	6-31+G(d)	0.956 - 0.976	10.1039/b700805h
38	UB3LYP	6-311++G(d,p)	0.976 - 0.955	10.1039/c003576a
39	B3LYP	6-31+G(d,p) /sdd	0.975	10.1021/jp8087176
40	B3LYP	cc-pVDZ	0.98	10.1039/c0cp02133d
41	B3LYP	aug-cc-pVTZ / RSC	-	10.1016/j.jasms.2010.01.021
42	1. B3LYP 2. B3LYP	1. 6-311+G(d,P) 2. 6-31+G(d,p)/sdd	1. 0.98 2. 0.975	10.1021/ja200219q
43	B3LYP	6-311++G(2d,2p)/sdd	0.98	10.1016/j.ijms.2010.04.010
44	1. B3LYP 2. B3LYP	1. 6-311+G(d,p)/HW 2. def2-TZVP	1. 0.9804 2. 0.975	10.1039/b919039b
45	B3LYP	6-31+G(d,p)	0.955	10.1021/jp805514b
46	B3LYP	6-31+G(d)	0.956 - 0.976	10.1039/b716666d
47	1. B3LYP 2. B3LYP	1. 6-31+G(d) 2. 6-311+G(d,p)	1. 0.975 2. 0.952	10.1039/c1cp20987f
48	1. B3LYP 2. LDA 3. PW91	1. TZVP + RSC 2. TZVP + RSC or DNP +DSPP 3. TZVP + RSC	-	10.1039/b715337f
49	UB3LYP	6-311++G(d,p)	0.976	10.1002/anie.200804101
50	1. RI-B3LYP-D 2. RI-MP2	1. SVP 2. SVP	1. 0.96 2. 0.943	10.1016/j.jasms.2010.01.029

Tabela 19. Métodos, conjunto de bases e fatores de escalas utilizados para cálculos de frequência nos 50 artigos recentes (2017).

Pesquisa: "IRMPD spectroscopy" Refinar: "Article"	Método	Conjunto de bases	Fator de escala	Referência
1	-	-	-	10.1038/s41598-017-16831-2
2	B3LYP	6-311+G(d,p)	< 1350 cm-1 (no scale) 1350-2000 cm-1 (0.985) > 3300 cm-1 (0.958)	10.1039/C7CP05521H
3	M06-2x	6-311++G(d,p)	0.983	10.1021/acs.jpcclett.7b02140
4	-	-	-	10.1007/s12127-017-0225-8
5	B3LYP	cc-PVTZ	0.96	10.1002/jms.3975
6	B3LYP	TZVP + Stuttgart ECP (U)	0.985	10.1021/acs.inorgchem.7b01720
7	GGA-PBE	def2-TZVP	-	10.1002/chem.201704361
8	B3LYP	6-311+G(d,p)	0.978 (fingerprint) 0.954 (X-H stretch)	10.1007/s13361-017-1753-5
9	B3LYP	6-31G(d)	0.96	10.1007/s13361-017-1771-3
10	B3LYP	BS1 = Cobined Basis Set [6-311++(2df,2pd) + 6-311++(3df) + LANL2TZ-f] + VPT2	-	10.1039/c7cp05203k
11	B3LYP (anarmônico)	aug-cc-pVTZ	-	10.1021/acs.jpca.7b07990
12	-	-	-	10.1039/c7cp04068g
13	-	-	-	10.1021/acs.jpccb.7b05796
14	B3LYP-D2	TZVP	-	10.1039/c7cp04577h
15	CAM-B3LYP	6-311++(2df, 2pd)	0.947	10.1016/j.ijms.2017.05.005
16	B3LYP-D3	6-311++G(d,p)	0.970 (900 - 1700 cm-1) 0.955 (3000- 4000 cm-1)	10.1021/acs.jpca.7b06159
17	B3LYP	6-311+G(d,p)	0.98	10.1021/acs.jpca.7b05825
18	B3LYP	6-31G(d,p)	0.958	10.1002/cphc.201700732
19	B3LYP	6-31+G(d,p)	0.98	10.1039/C7CP04617K
20	B3LYP-D3-BJ	cc-pVTZ	0.97	10.1039/c7cp03843g
21	-	-	-	10.1021/acs.analchem.7b01461

22	B3LYP	6-311G(d,p) Metals - Los Alamos (ECP) +LACV3P**	0.974 (fingerprint) 0.957 (X-H)	10.1021/acs.inorgchem.7b 00570
23	1. B3LYP 2. B3LYP	1. 6-31++G(d,p) 2. cc-pVTZ	1. 0.975 2. 0.997	10.1039/c7cp02638b
24	B3LYP	6-311+G(d,p)	0.981 (fingerprint) 0.955 (X-H stretch)	10.1039/c7cp02377d
25	B3LYP	6-311+G(d,p)	no scale (<1350 cm-1) 0.98 (>1350 cm-1) 0.958 (X-H)	10.1007/s13361-017-1653- 8
26	B3LYP	cc-pVTZ	0.96	10.1016/j.ijms.2016.09.02 2
27	B3LYP	6-311++G(d,p)	0.976	10.1016/j.ijms.2016.09.01 2
28	B3LYP	6-31+G(d,p)	0.96	10.1016/j.ijms.2016.09.00 5
29	B3LYP	aug-cc-pVTZ	0.97	10.1016/j.ijms.2016.08.01 2
30	B3LYP	6-311++G(d,p) + LANL2DZ (Ru)	0.961	10.1016/j.ijms.2017.05.00 2
31	B3LYP	6-31+G(d,p)	0.965 and 0.970	10.1007/s13361-017-1659- 2
32	B3LYP	6-311++G(d,p)	0.97	10.1021/acs.jpca.7b01858
33	1. B3LYP 2. wB97X-D 3. CAM-B3LYP 4. M06-2X 5. LC-BLYP	1. def2-SVP and 6-31G(d,p) 1, 2, 3, 4, 5. 6-31+G(d,p) + LANL2DZ (Ru)	several	10.1002/chem.201700340
34	B3LYP (anarmônico)	6-311++G(d,p)	-	10.1039/c7cp01997a
35	wB97X-D	6-31G(d,p)	0.9789 and 0.9815	10.1039/c7cp01085k
36	B3LYP	6-311++G(d,p)	0.98	10.1002/cphc.201700281
37	1. B3LYP 2. B3LYP	1. 6-311+G(d,p) 2. def2-TZVP + EMSL (ECP) (Cd)	1. 0.975 2. 0.975	10.1039/c7cp01786c
38	B3LYP	aug-cc-pVTZ	0.98 (<2000) 0.95 (C-H/N- H/O-H) 0.948 (H-H)	10.1039/c6cp08553a
39	1. B3LYP 2. B3LYP	1. 6-311+G(d,p) 2. 6-31+G(d)	1. 0.98 2. 0.97	10.1016/j.jms.2017.02.014
40	B3LYP	6-311+G(d,p)	0.98 (fingerprint) 0.954 (X-H stretch)	10.1021/acs.jpca.7b02906

41	-	-	-	10.1007/s13361-016-1551-5
42	B3LYP	aug-cc-pVTZ + PP (Pt)	0.957	10.1039/c7ra01182b
43	CAM-B3LYP	6-311++G(2df,2pd)	0.947	10.1021/acs.jpca.6b11642
44	B3LYP	6-311+G(d,p)	0.985	10.1021/acs.jpcc.6b12638
45	B3LYP	6-31+G(d,p)	0.958	10.1007/s13361-016-1575-x
46	-	-	-	10.1007/s00894-017-3248-5
47	-	-	-	10.3847/1538-4357/836/1/28
48	-	-	-	10.1021/acs.jpcclett.7b00127
49	1. B3LYP 2. B3LYP (anarmônico)	1 and 2. aug-cc-pVTZ	-	10.1002/anie.201609437
50	B3LYP	6-311++(2d,p)	0.96	10.1039/c6cp08349h

Tabela 20. Comparação dos cálculos realizados com e sem uso da correção de dispersão empírica proposta por Grimme, aplicado ao triptofano. O uso desta correção piorou a descrição dos estiramentos N-H, indicado por um aumento na variação. Os cálculos feitos com M06-2X quase não são afetados.

B3LYP/6-31+G**						B3LYP -D3/6-31+G**					
Oscilador	σ N-H-- π	σ N-H--O	σ NH3 (assim.)	σ N-H (indol)	σ O-H	Oscilador	σ N-H-- π	σ N-H--O	σ NH3 (assim.)	σ N-H (indol)	σ O-H
Experimental	3059	3121	3335	3500	3553	Experimental	3059	3121	3335	3500	3553
Teórico	3208	3326	3503	3665	3724	Teórico	3211	3349	3505	3665	3726
Varição	149	205	168	165	171	Varição	152	228	170	165	173
B3LYP/6-311++G**						B3LYP-D3/6-311++G**					
Experimental	3059	3121	3335	3500	3553	Experimental	3059	3121	3335	3500	3553
Teórico	3203	3318	3492	3651	3725	Teórico	3205	3341	3493	3651	3727
Varição	144	196	157	151	172	Varição	146	220	158	151	174
B3LYP/6-311++G(3df,2pd)						B3LYP-D3/6-311++G(3df,2pd)					
Experimental	3059	3121	3335	3500	3553	Experimental	3059	3121	3335	3500	3553
Teórico	3209	3307	3493	3653	3726	Teórico	3209	3329	3495	3654	3728
Varição	150	186	158	153	173	Varição	150	208	160	154	175
B3LYP/augccpvdz						B3LYP-D3/augccpvdz					
Experimental	3059	3121	3335	3500	3553	Experimental	3059	3121	3335	3500	3553
Teórico	3188	3294	3491	3643	3707	Teórico	3189	3316	3493	3644	3709
Varição	129	172	156	143	154	Varição	130	195	158	144	156
M06-2X/6-31+G**						M06-2X-D3/6-31+G**					
Experimental	3059	3121	3335	3500	3553	Experimental	3059	3121	3335	3500	3553
Teórico	3280	3384	3518	3681	3779	Teórico	3280	3384	3518	3681	3779
Varição	221	262	183	181	226	Varição	221	262	183	181	226

M06-2X/6-311++G**						M06-2X-D3/6-311++G**					
Experimental	3059	3121	3335	3500	3553	Experimental	3059	3121	3335	3500	3553
Teórico	3272	3372	3509	3675	3789	Teórico	3271	3372	3509	3675	3789
Varição	213	250	174	175	236	Varição	213	250	174	175	236
M06-2X/6-311++G(3df,2pd)						M06-2X-D3/6-311++G(3df,2pd)					
Experimental	3059	3121	3335	3500	3553	Experimental	3059	3121	3335	3500	3553
Teórico	3266	3357	3496	3670	3792	Teórico	3267	3357	3495	3670	3792
Varição	207	235	161	170	239	Varição	208	236	160	170	239
M06-2X/augccpvdz						M06-2X-D3/augccpvdz					
Experimental	3059	3121	3335	3500	3553	Experimental	3059	3121	3335	3500	3553
Teórico	3270	3366	3496	3660	3766	Teórico	3270	3366	3495	3660	3766
Varição	211	244	161	160	213	Varição	211	245	160	160	213

Tabela 21. Comparação dos cálculos realizados com e sem uso da correção de dispersão empírica proposta por Grimme, aplicado à biotina. O uso desta correção melhorou a descrição da ligação de hidrogênio, no entanto piorou a descrição dos estiramentos N-H, indicado por um aumento na variação. Os cálculos feitos com M06-2X quase não são afetados.

B3LYP/6-31+G**					B3LYP-D3/6-31+G**				
Oscilador	$\sigma_{\text{O-H--O}}$	$\sigma_{\text{N-H}}$ (sym.)	$\sigma_{\text{N-H}}$ (assym.)	$\sigma_{\text{O-H}}$	Oscilador	$\sigma_{\text{O-H--O}}$	$\sigma_{\text{N-H}}$ (sym.)	$\sigma_{\text{N-H}}$ (assym.)	$\sigma_{\text{O-H}}$
Experimental	3183	3406	3480	3567	Experimental	3183	3406	3480	3567
Teórico	3356	3587	3654	3741	Teórico	3291	3606	3656	3741
Variação	173	181	174	174	Variação	108	200	176	174
B3LYP/6-311++G**					B3LYP-D3/6-311++G**				
Experimental	3183	3406	3480	3567	Experimental	3183	3406	3480	3567
Teórico	3387	3568	3640	3743	Teórico	3340	3586	3642	3742
Variação	204	162	160	176	Variação	157	180	162	175
B3LYP/6-311++G(3df,2pd)					B3LYP-D3/6-311++G(3df,2pd)				
Experimental	3183	3406	3480	3567	Experimental	3183	3406	3480	3567
Teórico	3352	3576	3641	3745	Teórico	3292	3595	3644	3745
Variação	169	170	161	178	Variação	109	189	164	178
B3LYP/augecpvdz					B3LYP-D3/augecpvdz				
Experimental	3183	3406	3480	3567	Experimental	3183	3406	3480	3567
Teórico	3351	3560	3635	3728	Teórico	3287	3581	3637	3727
Variação	168	154	155	161	Variação	104	175	157	160
M06-2X/6-31+G**					M06-2X-D3/6-31+G**				
Experimental	3183	3406	3480	3567	Experimental	3183	3406	3480	3567
Teórico	3415	3592	3664	3803	Teórico	3415	3592	3664	3803
Variação	232	186	184	236	Variação	232	186	184	236

M06-2X/6-311++G**					M06-2X-D3/6-311++G**				
Experimental	3183	3406	3480	3567	Experimental	3183	3406	3480	3567
Teórico	3442	3582	3659	3809	Teórico	3442	3582	3659	3808
Variação	259	176	179	242	Variação	259	176	179	241
M06-2X/6-311++G(3df,2pd)					M06-2X-D3/6-311++G(3df,2pd)				
Experimental	3183	3406	3480	3567	Experimental	3183	3406	3480	3567
Teórico	3372	3584	3658	3812	Teórico	3372	3584	3658	3812
Variação	189	178	178	245	Variação	189	178	178	245
M06-2X/augccpvdz					M06-2X-D3/augccpvdz				
Experimental	3183	3406	3480	3567	Experimental	3183	3406	3480	3567
Teórico	3403	3577	3648	3787	Teórico	3403	3577	3648	3787
Variação	220	171	168	220	Variação	220	171	168	220

Tabela 22. Fatores de escala para biotina e triptofano obtidos pela minimização do RMSD/ajuste por uma banda.

Íon	Método/CB	6-31+G(d,p)	6-311++G(d,p)	6-311++G(3df, 2pd)	aug-cc-pVDZ	aug-cc-pVTZ
Biotina	B3LYP	0.951/0.954	0.951/0.953	0.953/0.952	0.956/0.959	0.956/0.958
	CAM-B3LYP	0.944/0.943	0.945/0.943	0.946/0.943	0.948/0.947	0.949/0.948
	M06-2X	0.942/0.938	0.941/0.937	0.945/0.936	0.942/0.941	0.949/0.942
	MP2	0.938/0.945	0.942/0.943		0.956/0.959	
Triptofano	B3LYP	0.951/0.954	0.953/0.954	0.953/0.953	0.957/0.958	0.955/0.959
	CAM-B3LYP	0.942/0.945	0.945/0.945	0.945/0.944	0.948/0.949	0.947/0.950
	M06-2X	0.939/0.940	0.941/0.938	0.943/0.937	0.944/0.944	0.946/0.945
	MP2	0.935/0.947	0.943/0.945		0.958/0.966	

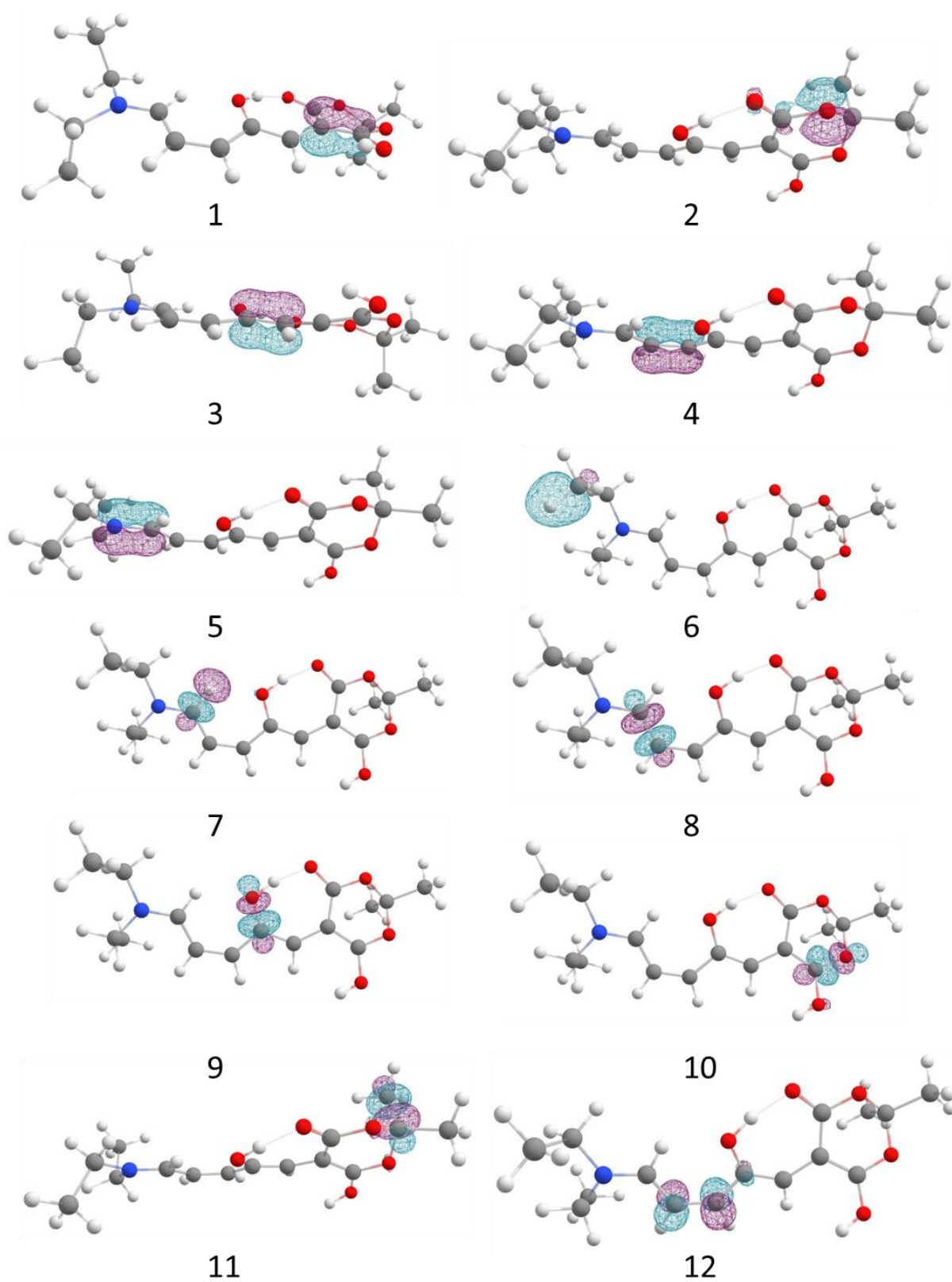


Figura 50. Orbitais naturais de ligação calculados para o O₂Hb (HF/6-31+G**). O espaço ativo é composto majoritariamente por π e π^* .

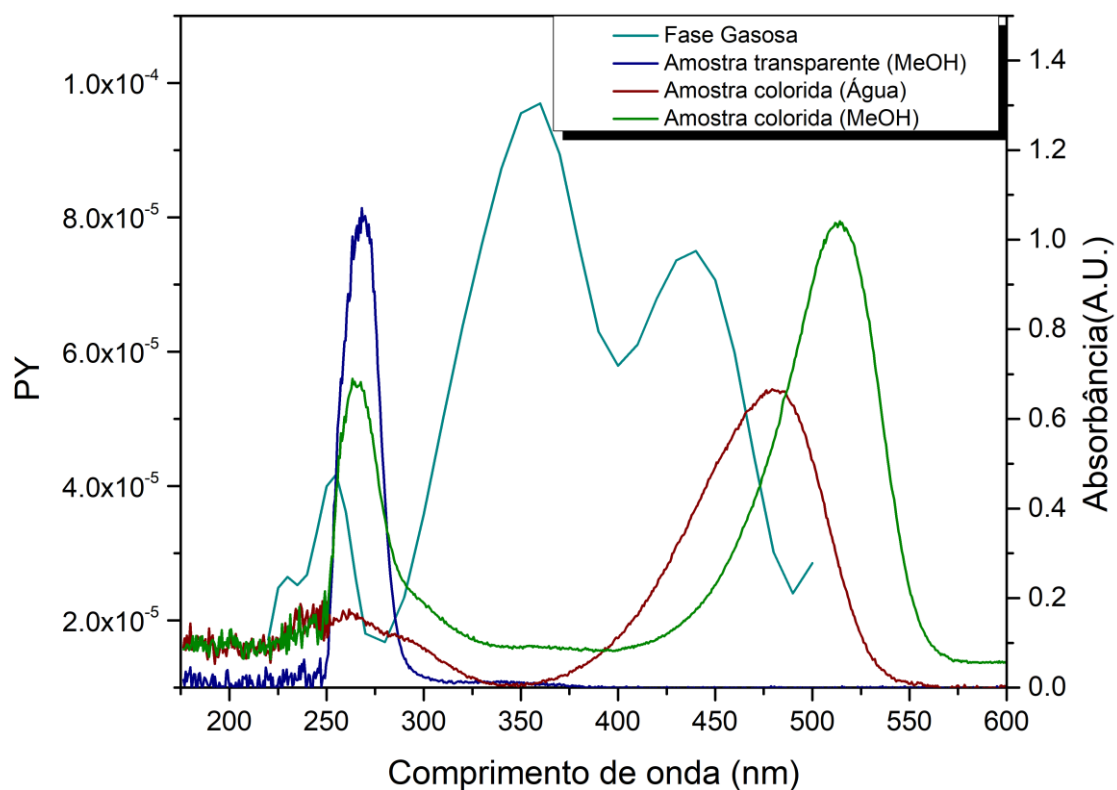


Figura 51. Comparação entre os espectros experimentais do DASA1 em fase gasosa e em solução. O espectro em fase gasosa está em ciano. Os espectros em solução são: espectro do DASA1 cíclico (solução transparente) em metanol (curva azul), espectro do DASA1 linear (amostra colorida) em água (curva vinho); espectro do DASA1 linear em metanol (curva verde).

Tabela 23. *Final one electron symbolic density matrix* gerada pelo cálculo de CASSCF do confômero O2Hb. A ocupação orbitalar, apresentada nos elementos da diagonal, é indício do caráter multireferencial deste íon.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	1.9285E+00											
2	2.4672E-08	1.9812E+00										
3	2.3312E-07	3.0387E-08	1.9595E+00									
4	1.0031E-07	-8.9463E-08	1.0903E-06	1.8933E+00								
5	3.4078E-07	-7.1265E-08	-2.9845E-07	1.2436E-07	1.9492E+00							
6	-7.6614E-07	-3.5385E-04	-4.5500E-08	5.5273E-07	2.4980E-07	1.9821E+00						
7	1.0382E-06	-2.9623E-07	3.5821E-06	-3.6021E-06	2.1435E-06	1.6444E-06	6.5038E-02					
8	2.0749E-06	-3.4536E-09	-1.0764E-07	-1.0867E-06	-1.3413E-06	-4.8051E-07	1.9471E-06	1.8025E-02				
9	2.3179E-07	-2.9770E-07	-1.8156E-06	2.1407E-06	8.8575E-07	2.1859E-07	-4.2943E-07	-7.9915E-07	4.4987E-02			
10	-1.1351E-07	2.2360E-07	2.2531E-07	1.7933E-06	-7.1799E-07	4.2502E-07	6.0973E-08	-2.3213E-07	-2.9973E-08	4.0559E-02		
11	-3.2509E-07	1.1019E-07	1.2169E-07	9.0996E-08	8.9937E-08	3.6225E-08	1.3980E-08	3.1333E-04	7.5638E-08	1.1033E-07	1.8698E-02	
12	-8.0892E-06	1.2284E-07	-2.5305E-06	-1.3121E-05	2.9624E-07	2.3352E-06	1.8113E-07	1.0544E-06	4.1264E-07	1.1135E-07	-3.2181E-07	1.1882E-01

SÚMULA CURRICULAR

Nome: André Filipe Rodrigues de Oliveira

Data de Nascimento: 03/06/1992 Naturalidade: São Paulo

1) Formação

Ano	Título ou atividade	Instituição
2009	Técnico em Química	ETEC Getúlio Vargas
2014	Bacharel em Química	Universidade Federal de São Paulo
2016	Mestre em Ciências	Universidade Federal de São Paulo
2016- Presente	Doutorado em Química	Instituto de Química – Universidade de São Paulo
2018-2019	Doutorado Sanduíche	Institut Lumière Matière – Université Claude Bernard Lyon 1/CNRS

2) Histórico profissional.

- **Especialista LC-MS**

IonMedicine Laboratório Clínico

Julho de 2020 - Presente

- **Estágio doutoral no exterior**

Institut Lumière Matière (Université Claude Bernard Lyon 1 / CNRS)

Agosto de 2018 - Outubro de 2019

Estudos envolvendo análises de espectroscopia de ação na região de UV/Vis, espectrometria de mobilidade iônica e espectroscopia de ação de fotoisomerização.

- **Doutorando em Química**

Universidade de São Paulo

Agosto de 2016 - Presente

Estudo estrutural e de reatividade de espécies de interesse sintético e biológico por espectrometria de massas e espectroscopia vibracional de íons na fase gasosa.

- **Mestrando em Ciências**

Universidade Federal de São Paulo

Abril de 2014 - Junho de 2016

Síntese e modificação de Biomoléculas e quantificação de fármacos, metabólitos e derivados. Experiência em síntese orgânica, LC-MS, HPLC, GCMS, técnicas cromatográficas e espectroscópicas.

- **Iniciação Científica**

Universidade Federal de São Paulo

Abril de 2011 - Abril de 2014

Síntese e modificação de Biomoléculas e quantificação de fármacos, metabólitos e derivados. Experiência em LC-MS.

3) Produção Acadêmica

Artigos

- Rodrigues-Oliveira, André F.; Batista, Patrick R.; Ducati, Lucas C.; Correra, Thiago C. Analyzing the N-H+ π interactions of protonated tryptophan and phenylalkylamines using QTAIM, NCI, and NBO. THEORETICAL CHEMISTRY ACCOUNTS, v. 139, p. 130, 2020.

- 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.
 - Pompeu Raminelli, Ana Claudia ; Rodrigues-Oliveira, Andre Felipe ; Yokota, Rodrigo; Sumita, Juliana Mayumi ; Oliveira-Silva, Diogo ; Wambier, Carlos Gustavo ; Bagatin, Edileia ; Leonardi, Gislaine Ricci. Cutaneous absorption of tretinoin in 0.05% cream and 5% chemical peel formulas. *JOURNAL OF THE AMERICAN ACADEMY OF DERMATOLOGY*, v. 20, p. 30465, 2020.
 - Oliveira, Isadora M.; Esteves, Henrique A.; Darbem, Mariana P.; Sartorelli, Arthur; Correra, Thiago C.; Rodrigues'oliveira, André F.; Pimenta, Daniel C.; Zukerman'schpector, Julio; Manarin, Flávia; Stefani, Hélio A. Stereo- and Regioselective Cu-Catalyzed Hydroboration of Alkynyl Chalcogenoethers. *ChemCatChem*, v. 12, p. cctc.202000395, 2020.
 - Penna, Tatiana C. ; Cervi, Gustavo ; Rodrigues'oliveira, André F.; Yamada, Bruno D. ; Lima, Rafael Z.C. ; Menegon, Jair J. ; Bastos, Erick L. ; Correra, Thiago C. Development of a photoinduced fragmentation ion trap for infrared multiple photon dissociation spectroscopy. *RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY*, v. e8635, p. 1, 2020.
 - M. Ribeiro, Francisco W.; Rodrigues-Oliveira, André F.; C. Correra, Thiago Benzoxazine Formation Mechanism Evaluation by Direct Observation of Reaction Intermediates. *The Journal of Physical Chemistry A*, v. 123, p. 8179-8187, 2019.
 - Oliveira, Enedina Maria Lobato De ; Montani, Daniela Antunes ; Oliveira-Silva, Diogo; Rodrigues-Oliveira, André Filipe; Matas, Sandro Luiz De Andrade; Fernandes, Gustavo Bruniera Peres; Silva, Ismael Dale Cotrim Guerreiro Da; Lo Turco, Edson Guimarães. Multiple sclerosis has a distinct lipid signature in plasma and cerebrospinal fluid. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria (Online)*, v. 77, p. 696-704, 2019.
 - Princival, Cleverson R.; Archilha, Marcos V. L. R.; Dos Santos, Alcindo A.; Franco, Maurício P.; Braga, Atualpa A. C.; Rodrigues-Oliveira, André F.; Correra, Thiago C.; Cunha, Rodrigo L. O. R.; Comasseto, João V. Stability Study of Hypervalent Tellurium Compounds in Aqueous Solutions. *ACS Omega*, v. 2, p. 4431-4439, 2017.
 - De Á. Santos, Luciana; Cavalheiro, Alberto; Tempone, Andre; Correa, Daniela; Alexandre, Tatiana; Quintiliano, Natalia; Rodrigues-Oliveira, André; Oliveira-Silva, Diogo; Martins, Roberto; Lago, João. Antitrypanosomal Acetylene Fatty Acid Derivatives from the Seeds of *Porcelia macrocarpa* (Annonaceae). *Molecules (Basel. Online)*, v. 20, p. 8168-8180, 2015.
 - Montani, D.A.; Camillo, J.; Rodrigues-Oliveira, A.; Oliveira-Silva, D.; Lo Turco, E.G.; Fraietta, R. Metabolomic profile of follicular fluid as a predictive tool for pregnancy outcomes. *FERTILITY AND STERILITY*, v. 106, p. e312-e313, 2016.
 - Moriyama, D.F.; Montani, D.A.; Rodrigues-Oliveira, A.; Oliveira-Silva, D.; Fraietta, R.; Lo Turco, E.G. The lipid profile of murine blastocyst cells originated from in vitro fertilization and natural fertilization as a quality control tool for embryo culture. *FERTILITY AND STERILITY*, v. 108, p. e163-e164, 2017.
 - Montani, D.A.; Rodrigues-Oliveira, A.; Silva, D.O.; Fraietta, R.; Lo Turco, E.G. Intrafollicular metabolite compounds and their influence on embryo development. *FERTILITY AND STERILITY*, v. 110, p. e354, 2018.
-

Apresentação de trabalho

- Rodrigues-Oliveira, A. F.; M. Ribeiro, Francisco W.; Cervi, Gustavo; Correra, T. C. Validation of an IRMPD experimental setup and theoretical methods for IRMPD assignment. (XXII International Mass Spectrometry Conference, 2018).
- Rodrigues-Oliveira, A. F.; Correra, T. C. IRMPD spectroscopy as a tool for conformational determination of biotin in the gas phase. (46th World Chemistry Congress 2017).
- Rodrigues-Oliveira, A. F.; M. Ribeiro, Francisco W.; Cervi, Gustavo; Correra, T. C. Benchmarking DFT methods to predict IRMPD spectra of systems containing H-Bond. (Virtual Winter School on Computational Chemistry 2019).
- Rodrigues-Oliveira, A. F.; Oliveira-Silva, D. Síntese de probes fluorescentes visando o desenvolvimento analítico alternativo para microcistinas. (38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2015).
- Rodrigues-Oliveira, A. F.; Oliveira-Silva, D. Síntese de padrões internos para microcistinas através de adição de Michael. 2013. (36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química).
- Rodrigues-Oliveira, A. F.; Oliveira-Silva, D. Novas estratégias analíticas para microcistinas. 2013. (XXI Congresso de Iniciação Científica - PIBIC, UNIFESP)
- Rodrigues-Oliveira, A. F.; Finazzi-Porto, N. F. ; Oliveira-Silva, D. Microcystins derivatization: an alternative approach to provide internal standard for toxin determinations. 2013. (1º Workshop do Setor de Química, UNIFESP).
- Rodrigues-Oliveira, A. F.; Finazzi-Porto, N. F. ; Oliveira-Silva, D. Microcystins derivatization: an alternative approach to provide internal standard for toxin determinations. 2013. (5º BRMASS).
- Rodrigues-Oliveira, A. F.; Oliveira-Silva, D. Novas estratégias para microcistinas. 2012. (XX Congresso de iniciação científica - PIBIC 2012, UNIFESP).

4) Financiamento de agências de fomento.

- Projeto: Estudo estrutural e de reatividade de espécies de interesse sintético e biológico por espectrometria de massas e espectroscopia vibracional de íons na fase gasosa. – Coordenador: Prof. Dr. Thiago Carita Correra. Bolsa nível doutorado, concedida pelo CNPq, vigência de 01/08/2016 – 31/07/2020 (Processo 142342/2016-5)

6) Indicadores quantitativos.

Artigos publicados: 12

Quantidade de citações (Web of Science): 29

Fator h (Web of Science): 3

Apresentações de trabalhos em congressos: 9

8) Outras informações

- Agraciado com DSM Fellowship (Fundo para a participação de estudantes e jovens cientistas na *International Mass spectrometry conference*) - Division of Mass Spectrometry (DSM) da Italian Chemical Society. 2018.
 - Recebeu menção honrosa no XXVII Prêmio Pereira Barreto, UNIFESP. 2013.
 - Vencedor do XXVI Prêmio Pereira Barreto, UNIFESP. 2013.
 - Avaliador da 16ª e 17ª FEBRACE. 2018.
 - Estágio docência (monitoria) - Introdução à química orgânica. 2014.
 - Monitoria - Introdução à espectroscopia e métodos espectroscópicos. 2017.
-

- Programa de aperfeiçoamento de ensino – PAE (monitoria) - Físico-química Experimental. 2017
-