TÉCNICAS AVANÇADAS PARA A DIFERENCIAÇÃO DE ISÔMEROS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Tatiana C. Penna^{a,*} e Thiago C. Correra^{a,*}^aDepartamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 05508-000 São Paulo – SP, Brasil

Recebido em 26/02/2020; aceito em 14/05/2020; publicado na web em 30/06/2020

Revisão

ADVANCED TECHNIQUES FOR THE DIFFERENTIATION OF ISOMERS BY MASS SPECTROMETRY. Mass spectrometry (MS) is a powerful and widespread technique but is inherently incapable to differentiate species with same m/z ratio. For this reason, many classical approaches were developed based on differential fragmentation patterns in *tandem* MS. More recently, new techniques for isomer identification in MS were developed, and we highlight the photodissociation techniques that will be discussed in this review. This photodissociation techniques explore the selective activation of isomers to induce isomer specific dissociations in the gas-phase that depend on the spectroscopic features of the isomers. If tunable radiation sources are available, this selective activation may be monitored as a function of the radiation wavelength, allowing the acquisition of vibrational or UV-Vis spectra of the isolated ions, making it possible to evaluate different isomers, protomers and even conformers by MS. These photodissociation techniques are even more powerful when coupled to ion mobility techniques, that will be briefly discussed. Because these techniques enhance the fields and analytical applications where MS can be used, this review will discuss the classical MS methods for isomer differentiation that lead to the fundamentals of ion spectroscopy and selective ion activation, with emphasis on the vibrational ion spectroscopy.

Keywords: tandem MS; ion activation; ion spectroscopy; UVPD; ion mobility.

INTRODUÇÃO

A espectrometria de massas (MS) tem se mostrado uma ferramenta fundamental com utilização ampla em áreas de conhecimento diversas, partindo da análise de matérias-primas na indústria,^{1,2} passando pela química forense^{3,4} e ciências da vida^{5,6} e culminando com seu uso em sondas espaciais que permitem afirmar que os espectrômetros de massas se fazem presentes até no espaço sideral.⁷

São inúmeras as razões que fazem da espectrometria de massas uma técnica ideal para essas diversas aplicações, das quais se destacam a versatilidade e grande universalidade de fontes de íons que permitem a utilização de virtualmente qualquer tipo de amostra,^{8–10} e o grande intervalo dinâmico de detecção e elevada sensibilidade da técnica.^{11,12}

Por estes motivos, essa ferramenta tem sido utilizada para diversos fins, sobretudo na área da Química, onde a relação massa/carga (m/z) dos analitos pode ser utilizada para identificá-los, permitindo, por exemplo, a identificação de espécies envolvidas em mecanismos de reação como intermediários de baixa abundância,^{13–16} na caracterização de fármacos, metabólitos e outras espécies biológicas,^{17–19} ou na detecção de drogas e explosivos por análise direta e em tempo real.^{20–22}

Apesar das vantagens da espectrometria de massas, ela não permite, a princípio, a separação e diferenciação de isômeros, dado que eles possuem a mesma m/z . Como a capacidade de diferenciar estas espécies de mesma m/z é fundamental para o entendimento dos processos químicos e biológicos, diversas técnicas foram desenvolvidas para permitir a diferenciação de isômeros, isotopômeros e conformômeros por meio da espectrometria massas, conforme será discutido a seguir.

DIFERENCIAÇÃO DE ISÔMEROS NA ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A diferenciação de espécies químicas sempre foi um assunto que atraiu o interesse humano. Desde os primeiros experimentos de

Pasteur para a separação de diastereoisômeros do ácido tartárico,^{23,24} até os recentes experimentos para a identificação de espécies fundamentais da matéria,²⁵ grande esforço foi despendido para permitir a separação e identificação das mais variadas espécies. No contexto das ciências da vida, a espectrometria de massas acoplada a métodos de separação é, certamente, o método de escolha de diversos campos de estudo, sobretudo pela grande sensibilidade e universalidade da técnica,^{10,26,27} além das suas vantagens diretas em relação à ressonância magnética nuclear.²⁸ Através do acoplamento da espectrometria de massas à sistemas cromatográficos, tanto em fase gasosa, quanto condensada, é possível fracionar e analisar uma grande gama de espécies, o que amplia ainda mais o potencial desta técnica como ferramenta analítica.^{29,30}

Essa abordagem é poderosa e, portanto, utilizada para uma série de espécies que possuem características cromatográficas e que sejam detectadas como espécies com m/z suficientemente diferentes, o que irá depender, em última análise, da resolução da separação cromatográfica e da resolução de massas do espectrômetro, respectivamente. Entretanto, essa abordagem não é universal, já que algumas espécies não podem ser facilmente separadas, nem por sistemas cromatográficos, seja por possuírem características químicas muito semelhantes ou por serem espécies de alta reatividade, como intermediários de reação,^{13,31,32} nem pela sua relação m/z , quando tratam-se de isômeros, tautômeros, isotopômeros ou conformômeros que possuem a mesma massa exata.

Uma das formas inicialmente utilizadas para identificar espécies isoméricas por espectrometria de massas foi pela utilização do padrão de fragmentação das espécies em fase gasosa quando analisadas por fontes de ionização por elétrons. Essa abordagem é utilizada especialmente quando acoplada a técnicas de separação por cromatografia na fase gasosa,^{33,34} dado que o acoplamento a fonte de ionização por elétrons é extremamente facilitado nesses instrumentos, apesar de também poder ser usada acoplada à cromatografia em fase líquida.³⁵

A formação de cátions radicais de alta energia induz a fragmentação das espécies, que é extremamente seletiva e reprodutível, permitindo a identificação da natureza dos íons presentes pelo padrão de fragmentação observado.^{36,37} Apesar de poderosa, essa técnica

*e-mail: tcorrera@iq.usp.br

também enfrenta dificuldades para a diferenciação de isômeros, sobretudo quando a natureza química destas espécies não é tão distinta. Para minimizar esse problema, os fragmentos gerados podem ser sucessivamente fragmentados e avaliados no que é chamado de espectrometria de massas sequencial ou *tandem* (MSⁿ), aumentando a capacidade elucidativa da técnica.³⁸

Entretanto, sistemas de cromatografia em fase líquida se utilizam, na maioria das vezes, de fontes de ionização por eletrospray (ESI), ou outras fontes a pressão ambiente.³⁹ Nesse caso, a carga das espécies analisadas, se não for nativa, pode ser obtida pela protonação/desprotonação, coordenação com alguma espécie carregada, ou, ainda, induzida pela presença de aditivos na amostra.¹⁰

A utilização destas outras fontes em pressão ambiente permite uma ionização mais branda dos analitos, o que resulta na formação de poucos fragmentos ou na completa ausência de quebras nesses processos de ionização suaves, quando comparado a processos de ionização por elétrons.¹⁰

Essa ausência de fragmentação impede, em um primeiro momento, que as identidades das espécies formadas sejam confirmadas pelo padrão de fragmentação. Mesmo nos casos onde essas fragmentações ocorrem, os padrões de fragmentação obtidos raramente são reprodutíveis entre diferentes equipamentos e laboratórios devido às condições de operação das fontes em pressão ambiente e à natureza dos espectrômetros, dificultando a construção de um banco de dados universal para a identificação de analitos.³⁸

Dessa forma, diversos modos de diferenciação de espécies tiveram de ser desenvolvidos baseados nas propriedades intrínsecas dos isômeros, como propriedades Físico-Químicas que se refletem nas suas reatividades e propriedades espectroscópicas. As próximas seções discutem mais detalhadamente as formas corriqueiras de diferenciar isômeros pela espectrometria de massas *tandem* e pelo padrão de reatividades, assim como as técnicas mais atuais que são os objetos dessa revisão.

Espectrometria de massas tandem e reatividade

A presença de isômeros é comum em espectrometria de massas, seja qual for a fonte de íons utilizada. Em alguns casos, íons de mesma *m/z* nominal, ou seja, com *m/z* aproximadamente iguais, mas valores de massas exatas distintas, podem ser resolvidos por detectores de massas de alta resolução, como os espectrômetros por transformada de Fourier (FT-MS) ou por tempo de voo (TOF-MS).^{11,40} Entretanto, caso o sistema não possua resolução suficiente, ou caso as espécies de mesma fórmula molecular necessitem ser diferenciadas, outros métodos precisam ser encontrados.

Uma forma de diferenciar isômeros é a partir da avaliação da reatividade dessas espécies. Essa abordagem foi muito utilizada para diferenciar fragmentos formados por ionização por elétrons e contribuiu bastante para a determinação da identidade e propriedade dos íons característicos formados por esse modo de ionização.^{41,42}

O princípio desse método é expor um conjunto de íons a um reagente por meio de uma região enriquecida com essa espécie. Isso pode ser feito utilizando triplo quadrupolos (ou múltiplos quadrupolos)³⁸ através da utilização de uma pressão relativa maior do neutro em um determinado quadrupolo, que é chamado, por esse motivo, de célula de colisão. Outra possibilidade é aplicar uma pressão do reagente neutro em armadilhas iônicas como armadilhas de Paul – 3D ou lineares, ou, até mesmo, quadrupolos atuando como *traps* – e armadilhas de Penning como os FT-ICR.^{14,43,44}

Independentemente do arranjo experimental, a reação íon-molécula apresentará características dependentes do isômero específico e do reagente neutro.³⁷ Por exemplo, isômeros iônicos com basicidade distintas podem ser diferenciados com a utilização de neutros com afinidades

protônicas variadas.³⁸ O isômero com maior afinidade protônica terá maior tendência a ser protonado, permitindo diferenciar entre a existência desses isômeros pelo seu comportamento frente aos neutros.⁴⁵

Essas técnicas deram origem a diversos dados termodinâmicos de íons em fase gasosa⁴⁶ e foram utilizadas para entender uma série de sistemas, como processos atmosféricos e no espaço,⁴⁷ e modelar a reatividade de espécies por reações íon-molécula em um ambiente controlado.^{14,48}

Entretanto, caso as espécies a serem diferenciadas não apresentem distintos padrões de reatividade, tal técnica não é efetiva.

Uma outra maneira para diferenciar isômeros por MS é a promoção de etapas subsequentes de fragmentação dos íons, chamadas de espectrometria de massas *tandem*.

Essa abordagem considera que íons na fase gasosa, independentemente de suas origens, podem ser ativados por processos que depositam energia nos íons, induzindo sua fragmentação (Figura 1).⁴⁹

Figura 1. Representação esquemática dos métodos mais comuns para a ativação de íons. Ver texto para significado das siglas

Desses métodos de fragmentação, um dos mais comuns é o de dissociação induzida por colisão (CID).^{50,51} Nesse processo, íons selecionados colidem com espécies não reativas, normalmente He ou Ar, em células de colisão, de forma semelhante ao que foi descrito anteriormente para as reações íon-molécula. Cada colisão deposita uma pequena quantia de energia nos íons que, após múltiplas colisões, podem exibir energia suficiente para superar a barreira de dissociação da coordenada de reação ou modo normal mais lábil do íon.⁵²

Outras muitas formas de ativar os íons existem e sua disponibilidade depende do tipo de analisador de massas e outros detalhes do instrumento em questão.⁴⁹ Alguns métodos consistem na deposição de grande quantidade de energia em apenas uma etapa, que é o caso da fragmentação induzida por colisão de alta energia (HCD)^{53,54} e a fragmentação induzida por colisão com superfície (SID),⁵⁵ onde cada evento de colisão é suficiente para induzir fragmentação.^{49,56} Em outros casos, a ativação é induzida pela aplicação de um pulso de radiofrequência ressonante (SORI)^{57,58} ou pela transferência de elétrons para o analito como a dissociação induzida por elétrons térmicos (ETD)⁵⁹ e a dissociação por captura de elétrons (ECD).^{49,56}

Em essência, esses métodos exploram a reatividade dos íons, dado que tal deposição de energia revelará a rota mais favorável de fragmentação da espécie ativada, que é simplesmente o caminho de reação unimolecular mais favorável, constituindo também uma medida da reatividade relativa das espécies sob estudo.

Sendo assim, tais técnicas são relevantes para a análise qualitativa em diversas aplicações por meio do padrão de fragmentação dos íons e para análises fundamentais da termoquímica das espécies em fase

gasosa,⁵⁰ com sucesso para a diferenciação de isômeros em diversos casos como, por exemplo, na diferenciação de isômeros de posição,¹⁹ sendo muitas vezes utilizadas de forma conjunta.⁶⁰⁻⁶² Entretanto, para alguns casos, essas abordagens não possuem êxito para diferenciar todos os isômeros em fase gasosa, dado que muitas vezes os fragmentos formados por diferentes isômeros são idênticos. Isso ocorre, pois, uma vez que a energia é depositada nos isômeros em análise, o mesmo tipo de quebra pode ser induzido em isômeros semelhantes, gerando fragmentos indistinguíveis.

Por essa razão, métodos de ativação seletiva dos íons se fazem necessários, nos quais apenas uma população de isômero possa ser excitada e exclusivamente dissociada. Dessa forma, mesmo que os fragmentos gerados por dois isômeros sejam os mesmos, estes ainda assim podem ser diferenciados. Uma das maneiras mais elegantes de se realizar a ativação seletiva é por meio da deposição de energia em isômeros específicos pela excitação de bandas de absorção exclusivas para cada uma das espécies, o que é chamado de fragmentação por fotodissociação (PID). Como cada isômero terá geometrias moleculares distintas, os seus níveis vibracionais e eletrônicos também serão distintos. Se uma radiação monocromática em ressonância com uma absorção apresentada exclusivamente por um dos isômeros for utilizada para induzir dissociação, apenas fragmentos desses isômeros específicos serão formados, permitindo diferenciá-los independentemente da natureza dos fragmentos formados, mesmo que eles também possuam a mesma m/z (Figura 2).⁶³

Figura 2. Esquema ilustrando a ativação diferencial obtida por IRMPD dos isômeros $P_1^{+/-}$ e $P_2^{+/-}$ ao se utilizar uma frequência no IR ressonante apenas com absorção apresentada pela espécie $P_1^{+/-}$, produzindo o fragmento F_1 que não seria específico para a diferenciação dos isômeros como ilustrado para os outros métodos de ativação

Equipamentos comerciais mais recentes começaram a possibilitar o uso da PID induzida por lasers no ultravioleta (UV), normalmente operando em 193 nm.⁶⁴ Dessa forma, a radiação incidida nos íons irá excitar as espécies que absorvem nesse comprimento de onda para estados eletrônicos dissociativos, ou estados metaestáveis que cruzam com curvas dissociativas, promovendo a fragmentação das espécies. Nessa técnica, chamada de fotodissociação induzida por UV (UVPD), a dissociação seletiva se comporta de maneira semelhante a colisões de alta energia (HCD), onde apenas um evento de colisão com moléculas ou de absorção de fótons, leva à dissociação do íon.

Espectrômetros de massas por ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier (FT-ICR) comercializados possuem a opção de serem adquiridos com lasers de CO_2 operando na linha de 10,6 μm para realizarem experimentos similares, mas na faixa do infravermelho. No caso das transições nessa faixa espectral, que são muito menos energéticas que as transições entre estados eletrônicos localizadas no UV, diversos fótons devem ser absorvidos para que os íons atinjam o limiar de dissociação, justificando a técnica ser conhecida como IRMPD, do inglês *Infrared Multiple Photon Dissociation* (Figura 2).

Nesse processo, que será detalhado na próxima seção, a ativação por fótons no infravermelho compete pela desativação com colisão dos íons por conta da pressão de fundo do espectrômetro. Por essa razão, somente os FT-ICRs, por trabalharem em uma faixa de pressão extremamente baixa (10^{-9} – 10^{10} Torr) capaz de diminuir a influência dos processos de desativação, eram comercialmente equipados com este meio de ativação.

Independentemente da faixa de radiação utilizada, esses métodos PID permitem que isômeros sejam diferenciados por suas propriedades espectroscópicas. Esses métodos de ativação, em conjunto com os métodos descritos anteriormente, aumentam a quantidade de informação para possibilitar a identificação estrutural dos analitos. Por exemplo, tais técnicas possibilitam explorar novas rotas de dissociação permitindo uma maior cobertura da estrutura secundária de proteínas por análises *top-down*, reduzindo o custo desses estudos quando comparados com técnica de digestão enzimáticas clássicas,⁶⁵⁻⁶⁷ ou ainda a identificação da posição de modificações pós-traducionais que seriam facilmente perdidas mediante outras técnicas de ativação.⁶⁸

Os isômeros, ainda assim, podem não ter propriedades espectroscópicas distintas na única linha de emissão do laser presente no instrumento. Por esse motivo, a espectroscopia de íons foi desenvolvida, permitindo que a fragmentação dos isômeros em uma faixa contínua de radiação fosse obtida, fornecendo um espectro vibracional ou eletrônico dos íons isolados na fase gasosa, o que aumenta de forma considerável a possibilidade de diferenciação destas espécies.

É nesse campo, que será descrito de forma detalhada na próxima seção, que se concentra grande parte dos estudos de fotofragmentação de isômeros por espectrometria de massas.

Espectroscopia de íons

Como descrito anteriormente, a espectroscopia de íons se dedica principalmente à obtenção de espectros vibracionais ou eletrônicos de íons isolados na fase gasosa,⁶⁹ apesar de estudos em outras faixas espectrais, como, por exemplo, as produzidas por radiação síncrotron, também poderem ser realizados.⁷⁰⁻⁷³

Os princípios básicos desses métodos, entretanto, são os mesmos descritos anteriormente e dependem da verificação da extensão de dissociação de espécies em função do comprimento de onda de radiação incidido nos íons. Dessa forma, é necessária a utilização de diversas fontes sintonizáveis que permitam a seleção contínua de comprimentos de onda no intervalo de análise desejado.

Dado que as bandas no UV-Vis costumam ser mais largas e menos informativas do que no infravermelho, com exceção de experimentos em condições criogênicas,^{74,75} a espectroscopia no infravermelho costuma ser preferencialmente explorada, já que permite acessar diretamente o equilíbrio conformacional e de protonação/desprotonação das espécies químicas. Por esse motivo, iremos detalhar apenas esse tipo de espectroscopia nos próximos capítulos.

Espectroscopia vibracional de íons

A espectroscopia vibracional de íons na fase gasosa é uma abordagem desenvolvida para permitir diferenciar espécies iônicas

isoladas em fase gasosa por meio das suas respectivas assinaturas vibracionais.^{63,76} Diferentemente da espectroscopia vibracional de absorção realizada em solução, a espectroscopia de íons na fase gasosa é realizada através do que é conhecido como espectroscopia de ação, dado que a quantidade de íons armazenados nas armadilhas do espectrômetro de massas ($\sim 10^5$ íons) é demasiadamente baixa para permitir a determinação da intensidade de radiação absorvida.

A espectroscopia de ação consiste em mensurar o efeito produzido pela radiação no sistema em estudo que, nesse caso, consiste na dissociação dos íons irradiados. Esse efeito é, por sua vez, proporcional à absorção e permite a obtenção de um espectro similar ao de absorção, como representado esquematicamente na Figura 3.

Supondo que íons $P^{+/-}$ isolados no interior do espectrômetro de massas sejam irradiados por um feixe de radiação infravermelha, tal radiação será absorvida na forma de energia vibracional pelos íons $P^{+/-}$ e, posteriormente, redistribuída nos demais graus de liberdade vibracional, evento conhecido como redistribuição de energia vibracional intramolecular (IVR). Esse processo se repete através da absorção de múltiplos fótons de forma a aumentar, sucessivamente, a energia interna do íon até que o limiar de dissociação seja atingido e o íon se fragmente.⁶³

Dado que o processo de ativação por múltiplos fótons compete com a perda de energia por colisões, a diminuição de pressão tende a favorecer o processo de dissociação.⁶³

Por meio da eficiência da dissociação medida em diversas frequências monocromáticas, é possível determinar o espectro vibracional do íon $P^{+/-}$ (Figura 3), uma vez que a extensão da dissociação é proporcional à energia absorvida naquela frequência.

Já que o processo de fotodissociação pode ser entendido como um processo de primeira ordem e que a quebra de ligação após a energia interna atingir o limiar de dissociação é normalmente entendida como instantânea pela aproximação da “morte súbita”,⁷⁸ a eficiência de dissociação para cada comprimento de onda pode ser calculada como a constante de fotofragmentação em certo comprimento de onda.⁷⁹

Cabe ressaltar que a nomenclatura “*InfraRed MultiPhotonic Dissociation*” foi inicialmente utilizada ao invés da expressão “*InfraRed Multiple Photon Dissociation*” mais aceita atualmente, já que a expressão “multiphotonic” representaria a absorção simultânea de diversos fótons, quando o processo descrito se trata da absorção de apenas um fóton em diversos eventos subsequentes, fazendo com que a nomenclatura atual deixe esse processo mais claro.

Essa natureza de ativação por múltiplos fótons faz com que sejam observadas bandas não tão estreitas no espectro adquirido, com largura à meia altura de, tipicamente, 20 cm^{-1} , podendo atingir até valores maiores.^{63,69}

Assim como os espectros vibracionais em solução, os espectros em fase gasosa permitem elucidar a estrutura e, até mesmo, o equilíbrio conformacional na fase gasosa,⁶³ com a vantagem de serem prontamente comparados com cálculos de estrutura eletrônica no vácuo.

Dessa forma, no exemplo da Figura 3, podemos perceber a existência de duas bandas intensas em região de frequência alta, em 3550 e 3661 cm^{-1} , relativas aos estiramentos OH do grupo carboxílico e do grupo fosfato. Por sua vez, as bandas em menor frequência são relativas aos estiramentos do NH_3^+ da fosfotirosina protonada, permitindo averiguar o sítio exato de protonação nessa espécie.

Já que os espectrômetros de massas comerciais são plataformas otimizadas para a realização de análises químicas de rotina, a realização dos experimentos de espectroscopia de íons exige a modificação dos instrumentos existentes para permitir o acoplamento a fontes de radiação sintonizáveis e a adequação dos sistemas de aquisição e controle dos experimentos.

Fontes de radiação infravermelha

A fonte de radiação necessária para a realização de espectroscopia IRMPD deve ser capaz de gerar pulsos de frequência monocromática de potência considerável e sintonizável na faixa de 800 a 4000 cm^{-1} , condições que são atingidas de forma complementar pelos lasers de elétrons livres (FEL) e por osciladores paramétricos do tipo OPO/OPA.

Os lasers de elétrons livres funcionam através da aplicação de campos magnéticos oscilantes a um feixe de elétrons em velocidades relativísticas (Figura 4).⁸⁰ Tais sistemas operam tipicamente na faixa de 800 a 2000 cm^{-1} com alto brilho e em frequência de dezenas de Hz. Pela complexidade do sistema, somente dois centros de pesquisa no mundo oferecem acesso constante para pesquisadores externos às linhas de laser de elétrons livres para realização de espectroscopia IRMPD: FELIX,⁸¹ na Holanda, e CLIO,⁸² na França. Recentemente, o novo laser de elétrons livres do Instituto Fritz-Haber na Alemanha, FHI-FEL,⁸³ também vem sendo utilizado para experimentos de espectroscopia vibracional de íons.^{84–86}

Diferentemente de outros FELs que necessitam alterar a energia do feixe de elétrons para ajuste da frequência emitida, processo que demanda algumas horas para estabilização do sinal, os sistemas mencionados possuem a capacidade de alternar a distância entre um par de magnetos móvel, o que interfere na interação dos campos magnéticos com o feixe de elétrons e causa a mudança do comprimento de onda de forma praticamente instantânea, permitindo a variação rápida do comprimento de onda para a realização de espectroscopia.

Para uma cobertura completa da faixa do espectro vibracional, também se faz necessária a utilização de sistemas de osciladores paramétricos do tipo OPO/OPA. Esses sistemas são capazes de gerar

Figura 3. a) Espectroscopia de múltiplos fótons no infravermelho do íon isolado $P^{+/-}$. b) Espectro de massas da fosfotirosina protonada, $P^{+/-}$ e após a irradiação em dois comprimentos de onda distintos. c) Eficiência de fotodissociação calculada a partir do espectro de massas para a fosfotirosina protonada e estrutura da fosfotirosina protonada. Figura adaptada de Penna e colaboradores⁷⁷ com permissão de John Wiley and Sons - Copyright © 2020

Figura 4. a) Representação esquemática dos sistemas OPO/OPA tipicamente utilizados para realização de espectroscopia vibracional de íons. KTP = KTiOPO_4 , KTA = KTiOAsO_4 . b) Representação do ondulador de um laser de elétrons livres. As cores vermelho e azul representam polos distintos de magnetos que são alterados em determinada frequência para induzir emissão de radiação (feixe roxo) ao perturbar o feixe de elétrons relativísticos representados em amarelo

radiação complementar na faixa entre 2300 e 4400 cm^{-1} por meio de um complexo conjunto de cristais birrefringentes bombeados por um laser de Nd:YAG pulsado conforme ilustrado na Figura 4.

O sistema de cristais birrefringentes funciona gerando dois fótons a partir de um fóton incidente, utilizando as propriedades de óptica não-linear que se manifestam frente ao alto campo elétrico emitido pelas fontes pulsadas de radiação laser. Ao variar o ângulo dos cristais que compõem o sistema, os coeficientes lineares da função de onda de polarização podem ser ajustados, permitindo controlar a interação entre os feixes de radiação. Isso permite favorecer processos de adição ou subtração de comprimentos de onda. Sendo assim, um feixe de radiação de 1064 nm emitido por um laser de Nd:YAG é enviado para um cristal dobrador, o qual converte o feixe de 1064 nm em seu primeiro harmônico – 532 nm. O feixe de 532 nm atinge os dois cristais de KTP que compõe o OPO, cujos ângulos, em relação ao feixe, podem ser alterados. Dependendo do ângulo do feixe em relação aos dois cristais, os dois feixes gerados, um na região do infravermelho próximo (710 a 880 nm) e outro na região do infravermelho intermediário (1,35-2,13 μm), podem ter seus comprimentos de onda ajustados. Em seguida, a radiação produzida no OPO é combinada com outro feixe de radiação de 1064 nm enviada para o OPA (constituído de um conjunto de quatro cristais de KTA) produzindo, por diferença, a radiação no infravermelho no intervalo desejado de 2300 a 4400 cm^{-1} .

É possível adicionar, ainda, mais um estágio ao OPO/OPA constituído por um cristal de AgGaSe_2 , o que expande o limite inferior da faixa de utilização do equipamento até 800 cm^{-1} , permitindo, a princípio, a avaliação de importantes vibrações da faixa do *fingerprint*.⁸⁷ Entretanto, como o limite de dano e a eficiência do cristal de AgGaSe_2 são baixos, a radiação utilizada para bombear este módulo deve apresentar baixa potência, fazendo com que o feixe final na região de 600 a 2000 cm^{-1} seja incapaz de induzir dissociação dos íons.

Uma forma de contornar esse problema e permitir a utilização do sistema OPO/OPA nessa faixa do *fingerprint* é utilizando a técnica de espectroscopia criogênica de íons. Essa técnica, ao resfriar os íons em temperaturas de 4 a 40 K, permite que espécies neutras como He, Ar ou N_2 interajam com os íons de interesse.⁸⁷ Como a energia de ligação desses gases pouco reativos com os íons é muito baixa, a dissociação pode ser promovida por apenas um fóton, em oposição ao que ocorre para a quebra das ligações covalentes dos íons, tornando possível a quebra mesmo em baixa potência do laser. Para realizar esse tipo de experimento, são necessárias baixas temperaturas obtidas por meio do uso de armadilha de íons criogênicas ou por fontes de expansão em jato supersônico.⁸⁸ Dessa forma, a resolução espectral desse tipo de experimento também é reduzida para cerca de 5 cm^{-1} , facilitando a interpretação quando comparadas com técnicas IRMPD não criogênicas.⁸⁸

Instrumentos para a realização de espectroscopia de íons

Para que a radiação infravermelha possa induzir dissociação dos íons, é necessário que ocorra a sobreposição desta à nuvem de íons no interior do espectrômetro de forma efetiva e por um determinado período de tempo controlado, de forma que o processo de absorção de fótons possa excitar as espécies até o limiar de dissociação antes da desativação do íon.

Dois pontos relevantes para tanto são: i) a introdução da radiação na câmara de vácuo do equipamento para que esta atinja os íons no interior do espectrômetro, ii) o controle do momento de disparo e duração do período de fotodissociação.

Uma forma viável utilizada por alguns grupos de pesquisa,⁸⁹⁻⁹² é a modificação de um espectrômetro de massas do tipo *ion trap* 3D para incluir, na câmara de vácuo, janelas transparentes à radiação infravermelha, alinhadas com furos localizados no eletrodo anel, conforme ilustrado na Figura 5.

Figura 5. Esquema da geometria de irradiação de íons em um a) ion trap 3D e b) FT-ICR

Apesar da inerente perda da capacidade de armazenamento de íons ocasionada pelos orifícios presentes no eletrodo, é possível operar o sistema de forma usual e obter um desempenho próximo ao do sistema não modificado. Dessa forma, tanto a realização de experimentos de MS^n , promovendo as dissociações por colisão (CID) ou por elétrons térmicos (ETD), como o acompanhamento de reações íon-molécula ou a realização de espectroscopia, podem ser conduzidos nesse tipo de instrumentação.^{93,94} Além disso, essa modificação não interfere em outros componentes do sistema, como a fonte de ionização, permitindo a utilização de outras fontes comerciais ou o desenvolvimento de novas fontes de ionização, caso necessário.

A câmara de vácuo do instrumento também pode ser modificada para permitir a inserção de espelhos que permitem que o feixe introduzido na câmara de vácuo possa ser medido na saída, além de permitir a introdução de múltiplos feixes por ambas as janelas, incluindo feixes provenientes de lasers de CO_2 ou outras fontes de radiação. Dessa forma, é possível realizar espectroscopia de duas cores, onde o fóton do laser de CO_2 auxilia na dissociação, ou técnicas de dupla ressonância do tipo IR-IR, UV-IR ou outras combinações.^{74,95-97}

De forma similar, aparelhos de FT-ICR também podem ser utilizados. Alguns desses instrumentos já possuem uma entrada para a radiação na câmara de vácuo utilizada tipicamente para dissociação com lasers de CO_2 em 10.6 μm , o que possibilita que seja apenas realizada a substituição da fonte de radiação com uso de óticas externas ao espectrômetro. Nos instrumentos mais recentes, essa aplicação pode não estar implementada na câmara de vácuo, que precisa ser modificada para a montagem de uma janela para entrada da radiação. Alguns sistemas possuem a parte eletrônica, sobretudo do pré-amplificador de sinal, montadas na parte posterior da câmara de vácuo e o mais próximo possível da geração do sinal. Nesse caso, tal eletrônica necessita ser reposicionada, o que pode prejudicar a qualidade do espectro adquirido. Outros problemas podem ocorrer com sistemas de FT-ICR que utilizem fontes de elétron para realização de dissociação por ECD. Nesse caso, emissores ociosos ou descentralizados para a realização de ECD podem ser utilizados, permitindo a passagem do feixe de laser pelo interior ou ao lado da fonte de elétrons.

Uma grande vantagem do sistema do FT-ICR, além de permitir uma modificação mais simples do instrumento para realização de espectroscopia de íons é o fato da pressão ser extremamente baixa, o que reduz a perda de energia por colisão. Apesar dos *ion traps* operarem em faixas de pressão cerca de 3 ordens de grandeza maior que os FT-ICRs, a sobreposição do feixe de radiação aos íons aprisionados naqueles instrumentos é mais efetiva por conta da concentração da nuvem no centro do *ion trap*, enquanto nos FT-ICRs a nuvem é mais difusa (Figura 5), compensando a perda de energia por colisão. Entretanto, estudos mostram que apesar da perda inerente de sinal, a eficiência de dissociação é elevada em *ion traps* trabalhando em condições de pressão mais reduzida, fornecendo espectros vibracionais

de íons virtualmente idênticos aos obtidos nos FT-ICRs.⁹⁸ Ademais, o tempo de aquisição dos *ion traps* é sensivelmente menor do que dos FT-ICRs, além de permitirem a formação de sucessivas etapas de fragmentação por MS^n , não implementadas nos FT-ICRs comerciais.

Sistemas comerciais mais modernos equipados para dissociação por UVPD podem ser mais facilmente adaptados por já possuírem a câmara de vácuo modificada para introdução de radiação.⁴⁹

Para o controle do tempo de irradiação do laser no FT-ICR, é necessário apenas modificar a fonte de radiação utilizada para dissociação, dado que, nesses sistemas, a opção de dissociação por laser geralmente se encontra implementada no software nativo. Durante o período de dissociação, um sinal é enviado para algum tipo de obturador ou temporizador externo que controla o tempo de irradiação do laser.⁷⁷

Já no caso de *ion traps*, o experimento de espectroscopia se dá pela realização de um experimento de CID usual, mas com a amplitude de excitação zerada, conforme é utilizado para realização de reações íon-molécula em fase gasosa. Dessa forma, o íon selecionado é aprisionado no interior do analisador de massas por centenas de milissegundos, durante os quais, um pulso sincronizado é emitido pela interface do espectrômetro.

Dado que o sistema de controle original dos equipamentos não tem a capacidade de controlar a frequência de emissão do laser utilizado, um sistema de controle deve ser desenvolvido para associar os espectros de massas coletados ao comprimento de onda da radiação laser utilizada.

Durante a aquisição de um espectro IRMPD, este sistema faz com que o espectrômetro de massas colete um espectro em um determinado comprimento de onda em função do tempo. Isso pode ser feito através da varredura de um intervalo de comprimento de ondas em velocidade constante de forma que o sinal do espectrômetro coletado no tempo como um cromatograma seja prontamente transformado em valores de comprimento de onda, ou por meio de um sistema mais complexo que controle o laser e o espectrômetro de massas para ajustar o comprimento de onda e então disparar a aquisição do espectro de massas pelo espectrômetro.^{77,98,99}

Independentemente da forma como os espectros de massas são coletados em função do comprimento de onda da radiação laser, o conjunto de espectros permite avaliar a extensão da dissociação em função do comprimento de onda, permitindo o cálculo do espectro vibracional do íon. Geralmente a potência do laser é registrada com o espectro de fotodissociação para que variações na potência, típicas das fontes utilizadas, possam ser corrigidas e não influenciem na intensidade de bandas registradas.

No caso de aplicações onde abordagens criogênicas são utilizadas, existe a possibilidade de utilizar sistemas que não se baseiam em armadilhas de íons para a detecção das espécies, como espectrômetros de massa por tempo de voo (TOF). Nesses casos, como existe apenas a necessidade de um fóton para promover a dissociação, os íons não precisam ser armazenados por um grande período de tempo (centenas de ms) como nos outros sistemas e a sobreposição do feixe de íons com o feixe de laser em um único ponto da trajetória é suficiente para promover dissociação.¹⁰⁰

Estudos computacionais na espectroscopia vibracional de íons

Apesar da natureza multifotônica do processo de dissociação utilizado para a aquisição de espectros vibracionais dos íons, cálculos de estrutura eletrônica podem ser utilizados com bom grau de acurácia para simular os espectros teóricos de possíveis isômeros e conformêros para comparação direta com os resultados experimentais. Além disso, a simulação teórica dos isômeros permite determinar os modos vibracionais e as energias relativas das espécies a serem diferenciadas,

permitindo também avaliar a possibilidade de conversão entre essas espécies e outros aspectos energéticos, caso necessário.

Dado que não é o objetivo dessa revisão se estender no detalhamento teórico, que pode ser consultado na literatura,^{101,102} basta dizer que, de forma resumida, a avaliação teórica dos isômeros formados consiste em determinar a energia relativa de uma série de conformêros de cada um dos isômeros possíveis, para que os mais favoráveis possam ter o espectro vibracional teórico obtido, permitindo uma comparação com o resultado experimental. De posse do isômero e conformêro que mais se assemelham ao determinado experimentalmente, é possível realizar um estudo mais aprofundado da origem da estabilidade das espécies em questão, descrevendo as interações existentes pelo cálculo de orbitais naturais de ligação (NBO)¹⁰³ ou cálculos topológicos do tipo QTAIM (*Quantum Theory of Atoms in Molecules*).¹⁰⁴

É importante citar que o levantamento dos isômeros e sobretudo das conformações em que eles se encontram é uma tarefa demorada e, por esse motivo, deve ser feita por métodos de menor custo computacional. Assim, é comum modelar esta etapa por métodos semi-empíricos ou através do uso de campos de força, aliados à algoritmos de busca conformacional ou através de dinâmicas ou simulações do tipo Monte Carlo, gerando um conjunto de conformações a ser posteriormente investigado.¹⁰⁵

Sobretudo para sistemas maiores, que geram diversas conformações nessa avaliação, se faz necessário agrupar classes de conformações representativas utilizando algum algoritmo de agrupamento que considera a semelhança entre as espécies propostas.¹⁰⁶ Cada representante dessas classes pode ter, então, as propriedades de interesse, como o espectro infravermelho e os valores de energia, calculadas em uma metodologia mais rigorosa.

É sabido que métodos de cálculo que subestimam interações de longo alcance, ou não foram parametrizados para espécies específicas, como métodos DFT/B3LYP,^{107,108} podem gerar resultados questionáveis, sobretudo para osciladores altamente anarmônicos e espécies com interações de longo alcance. Entretanto, metodologias baseadas em função de onda, ou mesmo métodos que utilizam funcionais híbridos duplos, costumam ter custos computacionais elevados, justificando a procura de um método rápido com qualidade adequada.^{102,109}

Normalmente, cálculos utilizando o nível de teoria B3LYP e bases de Pople, costumam ser utilizados para a comparação de dados de espectroscopia IRMPD,¹⁰¹ tendo em vista que essa metodologia mostrou-se adequada para simular as frequências vibracionais dos osciladores, sobretudo quando fatores de correção duplos são utilizados.^{63,110,111} Entretanto, tanto esse nível de teoria quanto outros mais precisos não possuem acurácia suficiente para descrever a pequena diferença de energia entre os isômeros a serem diferenciados.^{112,113} Aliado a problemas para a obtenção da geometria correta de espécies mais complexas, dado que abordagens dinâmicas são muito custosas,^{114–116} tem-se o fato de que os isômeros avaliados na fase gasosa, apesar de serem gerados por processos brandos, podem sofrer interconversão durante o processo de ionização. Isso faz com que as espécies menos estáveis possam ser aprisionadas cineticamente, não correspondendo às espécies de menor energia calculadas.^{117–119} Nesses casos, recomenda-se avaliar a estabilidade relativa dos isômeros também em solução, inicialmente com métodos implícitos contínuos, seguido de métodos explícitos para a avaliação correta desse fenômeno.¹¹⁷

Além de não podermos depender apenas da diferença energética entre as espécies a serem diferenciadas, as metodologias de cálculo não são capazes de prever de forma exata o espectro vibracional dos íons avaliados, sobretudo por conta de efeitos de truncagem das funções base e de anarmonicidade,^{120–122} sendo comum o uso de

fatores de escala¹²³ e o ajuste de bandas por vários métodos empíricos,^{74,124–126} mesmo que não exista nenhuma interpretação física para muitas dessas correções.^{63,101,102}

IMPORTÂNCIA DA DIFERENCIAÇÃO DE ISÔMEROS POR ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL DE ÍONS

Um caso extremamente ilustrativo do poder da espectroscopia vibracional de íons desenvolvido por nosso grupo foi a elucidação do mecanismo de formação dos monômeros das polibenzoxazinas.¹²⁷

As polibenzoxazinas são importantes resinas de alta performance cujos monômeros podem ser facilmente sintetizados a partir de anilina, fenol e formaldeído.¹²⁸ Propostas iniciais do mecanismo de formação dessa espécie, que poderiam explicar a formação de subprodutos com efeitos nas propriedades finais do polímero, sugeriam dois caminhos de formação possíveis. Uma versão simplificada desses dois caminhos é apresentada na Figura 6a e b.^{129,130}

Os dois caminhos se iniciam com o ataque da anilina ao formaldeído, formando o intermediário de m/z 124 **B** (Figura 6). A partir dessa espécie, poderia ocorrer a desidratação e a formação do imínio **G** de m/z 106 (Figura 6b) ou o ataque de um segundo formaldeído, que formaria a espécie **D** de m/z 136 (Figura 6a).

Considerando apenas as análises de ESI-MS, a presença dos íons de m/z 106 e 200 sugeriria a ocorrência da reação pelo caminho *a*, enquanto a observação do íon de m/z 136 indicaria a presença do mecanismo *b* e ambas confirmariam diretamente a presença de intermediários imínio **D** e **G** (Figura 6), espécies elusivas que seriam de difícil caracterização.

Para verificar a identidade destes intermediários de reação e permitir a confirmação dos mecanismos observados, estas espécies foram avaliadas por espectroscopia IRMPD, conforme apresentado na Figura 6.

Ao comparar os espectros teóricos e experimentais para os íons de m/z 124 e 200, é possível notar uma grande concordância entre as bandas experimentais e calculadas, confirmando a natureza dos íons observados, como pode ser visto nas Figura 6e e f, respectivamente.

Entretanto, os espectros teóricos e experimentais para os íons de m/z 106 e 136 não são concordantes (Figura 6g e h) quando são consideradas as espécies **G** e **D**, respectivamente. A divergência observada no espectro do íon de m/z 106 pode ser explicada pela reação da anilina com o formaldeído, formando as espécies **G1** e **G2** (Figura 6c). Ou seja, a formação desses subprodutos, que podem ter papel na terminação das cadeias das polibenzoxazinas, mostra que os íons detectados no experimento com m/z 106 não são, de fato, os íons imínios, mas se relacionam com a presença de outras espécies isoméricas em solução que não seriam identificadas sem a espectroscopia vibracional IRMPD.

Conforme ilustrado na Figura 6d, os íons imínios de m/z 106 presentes na solução, por serem altamente reativos, atacam prontamente o formaldeído, formando as espécies de m/z 136 **J** e **M** (Figura 6d), que possuem espectros vibracionais calculados que concordam de forma muito adequada com o espectro experimental do íon de m/z 136 (Figura 6h). Ou seja, a espécie **D**, que seria o imínio que comprovaria a existência do mecanismo de reação *b*, foi descartada mediante realização de espectroscopia IRMPD. Entretanto, os subprodutos **J** e **M** detectados se relacionam com um subproduto advindo do ataque do imínio **G**, confirmando indiretamente a existência dessa espécie e permitindo confirmar a existência do caminho de reação *a*.

Em resumo, as espécies observadas apenas por ESI-MS, mostradas na Figura 6, podem levar a considerações erradas quanto ao mecanismo de reação se não forem avaliadas por outros métodos capazes de diferenciar isômeros, como é o caso da espectroscopia IRMPD.

Figura 6. Mecanismos simplificado de formação das benzoxazinas baseados no a) no mecanismo de ataques sequenciais de formaldeído de Burke¹²⁹ e b) no mecanismo de desidratação de Ishida¹³⁰ c) Subprodutos G1 e G2 formados pelo ataque da anilina ao formaldeído. d) Subprodutos J1 e J2 formados pelo ataque do imínio G ao formaldeído. Espectros IRMPD para os íons e) m/z 124, f) m/z 200 acompanhados do espectro vibracional simulado para os íons propostos. Espectro experimental para os íons de g) m/z 106 e h) m/z 136 acompanhados de simulações no nível de cálculo M06-2X/aug-cc-pVTZ. As espécies destacadas nos quadrados vermelhos foram identificadas por IRMPD e demonstram a necessidade de métodos alternativos para diferenciação de isômeros. Figura adaptada Ribeiro e colaboradores¹²⁷ com permissão, American Chemical Society - Copyright © 2019

Muitos outros estudos de IRMPD relevantes permitiram a diferenciação e o estudo no nível molecular de espécies distintas, dos quais destacamos os mais citados conforme apresentado no levantamento disponível na literatura¹⁰¹ e também reproduzido nas informações suplementares.

MOBILIDADE IÔNICA ACOPLADA A ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL DE ÍONS

Apesar de ser uma técnica desenvolvida já há muitos anos,¹³¹ a mobilidade iônica (IMS), sobretudo acoplada a MS para detecção, apresentou uma nova onda de interesse mais recente, testemunhada pelo aparecimento de sistemas de IMS-MS comerciais e outras novas opções de IMS como acessórios para instrumentos de MS que estão sendo disponibilizadas.¹³² Apesar do foco desta revisão não ser a técnica de mobilidade iônica em si, que já foi abordada em excelentes publicações,^{131–133} o desenvolvimento de sistemas de IMS acoplados com a técnica de espectroscopia vibracional tem se mostrado uma área em franco crescimento e com imensos potenciais, sobretudo quando tais técnicas são utilizadas de forma conjunta, conforme iremos comentar a seguir.

Desta forma, uma breve descrição da técnica de mobilidade iônica se faz necessária, permitindo compreender a sinergia que existe entre esse método e a espectroscopia vibracional de íons.

Cabe também ressaltar que o nome mobilidade iônica representa diversos esquemas distintos de separação que permitem diferenciar os íons em fase gasosa pela interação destas espécies com um fluxo de gás, separando as espécies por suas formas, interações químicas e geometrias.^{131,132,134} Nesse texto trataremos apenas da mobilidade iônica por tubo de arraste (DT-IMS) e a mobilidade iônica diferencial (FAIMS), representados na Figura 7.¹³²

A técnica de mobilidade padrão e mais conhecida consiste na aceleração de íons por campos elétricos baixos, no que é chamado tubo de arraste do inglês “drift tube” (DT-IMS). A mobilidade em campos elétricos baixos, $K(0)$, dependerá das colisões dos íons com o gás de arraste em baixa pressão que é introduzido em fluxo oposto ao sentido dos íons ao longo do tubo de arraste que possui tipicamente 1 metro de comprimento (Figura 7a).

Íons com maior seção de choque experimentam mais colisões, demorando mais tempo para atravessar o dispositivo do que íons com menores seções de choque. Assim, pela distribuição de tempo de chegada (ATD) dos íons no detector do instrumento e mantidos os parâmetros instrumentais, a seção de choque, que é dependente da espécie isomérica específica, pode ser obtida e os isômeros diferenciados. Ainda assim, alguns fenômenos de ativação e isomerização durante o processo de separação por DT-IMS podem prejudicar a determinação precisa da espécie que se relaciona com cada população detectada.¹³⁵

Essa técnica permite adicionar uma nova dimensão para a análise de isômeros por espectrometria de massas, tendo sido utilizadas sobretudo para o estudo de biomoléculas.^{136,137}

Entretanto, sistemas comerciais de DT-IMS não costumam ser utilizados para realização de estudos de fotodissociação, e o grande tamanho destes aparatos não permite uma fácil adaptação, fazendo com que apenas instrumentos extensivamente modificados ou construídos sob demanda possam realizar estudos sinérgicos de DT-IMS e fotofragmentação ou espectroscopia de íons.^{138,139}

Uma alternativa que torna possível o acoplamento imediato de técnicas de mobilidade iônica diretamente em equipamentos comerciais é mobilidade iônica diferencial (FAIMS).^{131,140–142}

Em oposição às técnicas de arraste, FAIMS pode ser realizado em condições de pressão maiores, até pressão ambiente, e é composto por

Figura 7. a) Representação de um dispositivo drift tube e b) um dispositivo FAIMS e os parâmetros de separação mais relevantes

dois pequenos eletrodos (~ 50 mm) permitindo que seja implementado na fonte de ionização dos espectrômetros anteriormente ao cone de extração ou capilar de transmissão sem modificações na câmara de vácuo e, portanto, prontamente compatíveis com instrumentos de fotodissociação baseado em sistemas comerciais.¹⁴³ Esse acoplamento pode ser feito sem alterar o desempenho do equipamento a não ser pela perda de intensidade de sinal de uma a duas unidades de grandeza, também observadas em *drift tubes*, que podem ser contornadas com modificações instrumentais e nas condições de utilização para permitir a realização de experimentos de espectrometria *tandem* ou de espectroscopia de íons em espécies presentes em menor intensidade.^{131,144}

Essa técnica se diferencia da DT-IMS também por utilizar de forma combinada campos elétricos baixos e altos (maior que 2 Td), já que, no tubo de fluxo, campos elétricos baixos e constantes são utilizados. Além disso, o campo é aplicado perpendicularmente à direção de propagação dos íons, enquanto nos tubos de fluxo este é aplicado na direção axial do tubo. A unidade Townsend (Td) é relativa ao campo elétrico corrigido pela densidade do gás (E/N). Ou seja, uma maior pressão de gás, representada por uma maior densidade de gás N, promove mais desativações por colisão, de forma que um campo elétrico E maior seja necessário para promover a mesma excitação do íon.

Nesses aparatos FAIMS a mobilidade $K(E/N)$ é dependente do campo elétrico e irá mostrar desvios do comportamento de baixo campo $K(0)$, representado pelo fator de mobilidade α , como mostrado na Figura 7b.

O comportamento de íons com mesma m/z que são inseridos entre os eletrodos do aparato FAIMS é explicado pela mobilidade diferencial destes no campo elétrico assimétrico, cuja amplitude SV é chamada tensão de separação ou tensão de dispersão (Figura 7).

O comportamento mais comum (tipo A) ocorre quando os íons formam agregados iônicos com o fluxo de gás em condições de campo baixo. Quando esses clusters iônicos são expostos a um campo elétrico alto, a energia interna do agregado é elevada e o agregado

se desfaz, deixando o íon livre. Como a seção de choque do íon não agregado é menor do que o das espécies agregadas, sua mobilidade instantaneamente aumenta.¹³¹

Portanto, esta espécie terá maior mobilidade $K(E/N)$, o que é representado por um parâmetro de mobilidade positiva α ($\alpha > 0$). Este comportamento do tipo A é particularmente importante para moléculas pequenas (< 300 Da) com muitos locais de interação, sendo mais suscetíveis à formação de agregados. Para íons ditos maiores que exibem, relativamente, menos possibilidades de interações, o mecanismo tipo C geralmente domina. Como essas espécies não tendem a formar agregados com o gás de arraste (*buffer gas*), o aumento de energia promovido pelo alto campo elétrico acelera o íon e promove mais colisões com o gás de transporte, retardando o íon ($\alpha < 0$). Existe um mecanismo intermediário chamado de tipo B, no qual a mobilidade de íons é aumentada devido ao efeito de agregação/desagregação até que um certo valor do campo elétrico seja atingido e promova a desagregação permanente. Isso faz com que a colisão seja o principal mecanismo para diminuir a mobilidade de íons durante o período de campo elétrico elevado do campo assimétrico.¹³¹ A dificuldade em prever esses tipos de comportamento ainda impede que seções de choque sejam calculadas para esses métodos como é possível para os equipamentos de DT-IMS e de forma indireta em outros aparatos de mobilidade iônica.¹⁴⁵

Como pode ser visto na Figura 7, diferentes parâmetros de mobilidade α promovem a propagação radial dos íons a partir do eixo central em que foram injetados. Se uma tensão contínua de compensação CV é aplicada aos eletrodos, as trajetórias dos íons podem ser deslocadas na direção de um ou outro eletrodo. Portanto, para coletar um espectro de mobilidade iônica nesses aparatos, que é uma representação da intensidade de íons com determinado parâmetro de mobilidade α que atingem o detector (Figura 7b), a tensão de compensação é variada. Isso permite separar os íons com base em sua mobilidade antes da análise de MS ou fixar uma tensão de compensação para selecionar uma população de íons específica com um parâmetro de mobilidade

desejado para alcançar o detector, permitindo a seleção de uma certa população de isômeros.

Apesar do grande poder da espectroscopia IRMPD discutido anteriormente, grande esforço tem sido concentrado no uso das técnicas de espectroscopia e mobilidade iônica de forma conjunta.¹⁴⁶⁻¹⁴⁸

Algumas amostras podem exibir isômeros que possuem pequenas diferenças em suas assinaturas vibracionais ou a presença de uma espécie isomérica em quantidades muito reduzidas, impossibilitando a determinação e identificação destas espécies. Por outro lado, técnicas de mobilidade, por serem essencialmente técnicas que dependem da detecção pelo espectrômetro de massas, são capazes de separar essas populações de isômeros mesmo que em quantidades relativas muito distintas. Porém, as técnicas de mobilidade não permitem identificar a natureza dos isômeros por si só, sobretudo no caso da mobilidade iônica diferencial (FAIMS), em função de não haver, ainda, modelo para o cálculo da seção de choque nesses aparatos.

Por esse motivo, ao aliar as duas técnicas em um mesmo instrumento é possível identificar e selecionar populações de isômeros por mobilidade iônica e, então, avaliar a natureza dessas espécies por espectroscopia vibracional de íons.

Além disso, devemos lembrar que a realização da técnica de espectroscopia vibracional de íons por IRMPD é resolvida no tempo, impedindo que corridas cromatográficas sejam realizadas previamente à obtenção dos espectros IRMPD. Nesse caso, quando corridas cromatográficas são de fato necessárias, são realizadas etapas de cromatografia semipreparativa, em que o analito desejado é fracionado para que se obtenha uma quantidade que permita a injeção direta e seu fornecimento constante para a realização das análises de espectroscopia IRMPD.¹⁴⁹

Além das técnicas de IMS e IRMPD poderem ser utilizadas separadamente na mesma amostra, fornecendo informações relevantes para os sistemas químicos e biológicos,¹⁵⁰ o uso sinérgico das duas técnicas é ainda mais poderoso, não apenas por conta da IMS ser capaz de diminuir os efeitos de matriz, mas por permitir selecionar espécies por sua seção de choque para serem posteriormente avaliadas em uma etapa ortogonal de espectroscopia IRMPD.

Dessa forma, o futuro da detecção de isômeros se delineia pelo acoplamento das técnicas de espectroscopia vibracional a técnicas de mobilidade iônica diferencial para permitir que matrizes mais complexas sejam avaliadas.

Um exemplo desse uso sinérgico de técnicas de FAIMS e espectroscopia IRMPD foi relatado por Berthias e colaboradores para a diferenciação dos aminoácidos isoméricos sarcosina, α -alanina e β -alanina nas suas formas protonada, de m/z 90, dada a relevância da

diferenciação de α -aminoácidos de seus derivados para a detecção de doenças e a descoberta de biomarcadores.¹⁵¹

Nesse sistema, as abordagens tradicionais de espectrometria de massas não são bem sucedidas pelas espécies possuírem a mesma massa exata e os fragmentos majoritários gerados por CID serem os mesmos para a sarcosina e a α -alanina protonada (Tabela 1). Sendo assim, uma mistura desses isômeros foi avaliada por FAIMS e apresentou apenas 2 sinais principais quando N_2 foi utilizado como gás de análise, sendo uma população resolvida relativo apenas à sarcosina protonada e a outra a uma mistura de α -alanina e β -alanina protonadas. Com o acoplamento de uma etapa de dissociação por IRMPD em números de onda distintos, nos quais ocorre a absorção e a consequente ativação seletiva dos isômeros, foi possível resolver as populações de α -alanina e β -alanina protonadas.

Ao se utilizar o comprimento de onda de 1810 cm^{-1} , relativo aos estiramentos da carbonila e absorvido por todas as espécies presentes exceto a β -alanina protonada, é possível simplificar as distribuições observadas por FAIMS para revelar apenas a população desse isômero ao se monitorar a m/z 90 relativa aos íons pais, dado que os outros isômeros se fragmentam nesse comprimento de onda. De forma similar, ao se utilizar o comprimento de onda de 1720 cm^{-1} , em ressonância com o estiramento da carbonila da β -alanina, apenas as outras espécies são observadas.

Assim, o uso do IRMPD permite revelar a natureza das populações de isômeros detectadas por FAIMS e a consequente diferenciação da α -alanina e β -alanina protonadas, não obtida apenas por mobilidade iônica.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises corriqueiras de espectrometria de massas são extremamente poderosas e permitiram o avanço da ciência nas mais variadas áreas do conhecimento. O limite natural da espectrometria de massas se encontra na diferenciação de isômeros, dado que o princípio de funcionamento desta técnica depende de diferenças de m/z entre espécies. Métodos *tandem* (MS^n) podem auxiliar nessa tarefa, mas são dependentes do padrão de fragmentação das espécies que costumam ser semelhantes para espécies correlatas. Por esses motivos, uma série de métodos alternativos se faz necessária para suprir essa insuficiência, como a espectroscopia de íons e a mobilidade iônica.

A técnica de IRMPD tem a capacidade de diferenciar isômeros em fase gasosa e fornecer uma descrição clara da natureza, geometria e conformação da espécie na fase gasosa, seja qual for a sua origem, sobretudo quando considerados os métodos de ionização alternativos

Tabela 1. Representação dos resultados observados para as técnicas de diferenciação de isômeros aplicadas para sarcosina, α -alanina e β -alanina protonada como reportado por Berthias *et al.*¹⁵¹ Destaque em negrito mostra a etapa que permite diferenciar cada espécie de forma inequívoca a partir de uma mistura equimolar das três espécies isoméricas

Espécie	Sarcosina+H ⁺	α -Alanina+H ⁺	β -Alanina+H ⁺
Fórmula estrutural			
Massa exata	90,05495	90,05495	90,05495
m/z do fragmento majoritário por CID	44	44	72
Voltagem de compensação / V	-14,5	-11.1	-10.9
População detectada por FAIMS sem IRMPD?	sim	sim	sim
População detectada por FAIMS + IRMPD em 1810 cm^{-1} ?	não	não	sim
População detectada por FAIMS + IRMPD em 1720 cm^{-1} ?	sim	sim	não

compatíveis com plataformas de espectroscopia vibracionais de íons desenvolvidas a partir de instrumentos comerciais.

Essa técnica pode ser utilizada para a identificação de isômeros nos mais variados casos onde experimentos tradicionais de espectrometria de massas são incapazes de permitir a determinação inequívoca das espécies de interesse.

Cabe ressaltar que nosso grupo de pesquisa desenvolveu recentemente um projeto para implementação e gerenciamento de um centro multiusuários FAPESP para a disponibilização dessa técnica para uma série de instituições e grupos de pesquisa. Tal uso pode ser requisitado no site do nosso grupo de pesquisa em www.iq.usp.br/mcpl.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Lista dos 50 artigos na área de espectroscopia IRMPD entre 2007 e 2017 incluindo os sistemas estudados estão disponíveis em <http://quimicanova.s bq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer especialmente à FAPESP pelo apoio no desenvolvimento da técnica de espectroscopia vibracional de íons no Brasil na forma dos auxílios Jovem Pesquisador 2014/15962-5 e Multiusuários 2015/08539-1 e agradecer também à CAPES pelos projetos 23038.006960/2014-65 e 001 para aplicação da espectroscopia vibracional de íons. TCP agradece a bolsa de pós-doutoramento FAPESP 2017/20262-0.

REFERÊNCIAS

- Yang, L.; Wang, S.; Peng, X.; Zheng, M.; Yang, Y.; Xiao, K.; Liu, G.; *Sci. Total Environ.* **2019**, *664*, 107.
- Russo, R.; Valletta, M.; Rega, C.; Marasco, R.; Muscariello, L.; Pedone, P. V.; Sacco, M.; Chambery, A.; *Food Chem.* **2019**, *285*, 111.
- Assis, C.; Pereira, H. V.; Amador, V. S.; Augusti, R.; de Oliveira, L. S.; Sena, M. M.; *Food Chem.* **2019**, *281*, 71.
- Chajistamatiou, A. S.; Bakeas, E. B.; *Talanta* **2019**, *195*, 456.
- Omenn, G. S.; Lane, L.; Overall, C. M.; Corrales, F. J.; Schwenk, J. M.; Paik, Y.-K.; Van Eyk, J. E.; Liu, S.; Snyder, M.; Baker, M. S.; Deutsch, E. W.; *J. Proteome Res.* **2018**, *17*, 4031.
- Wang, R.; Feng, F.; Chai, Y.; Meng, X.; Sui, Q.; Chen, M.; Wei, Y.; Qi, K.; *Sci. Total Environ.* **2019**, *660*, 1542.
- Hässig, M.; Altwegg, K.; Balsiger, H.; Bertheliet, J. J.; Bieler, A.; Calmonte, U.; Dhooche, F.; Fiethe, B.; Fuselier, S. A.; Gasc, S.; Gombosi, T. I.; Le Roy, L.; Luspai-Kuti, A.; Mandt, K.; Rubin, M.; Tzou, C.-Y.; Wampfler, S. F.; Wurzel, V. S.; *Astron. Astrophys.* **2017**, *605*, A50.
- Espy, R. D.; Wlekinski, M.; Yan, X.; Cooks, R. G.; *TrAC -- Trends Anal. Chem.* **2014**, *57*, 135.
- Takats, Z.; *Science* **2004**, *306*, 471.
- Weston, D. J.; *Analyst* **2010**, *135*, 661.
- McKenna, A. M.; Williams, J. T.; Putman, J. C.; Aeppli, C.; Reddy, C. M.; Valentine, D. L.; Lemkau, K. L.; Kellermann, M. Y.; Savory, J. J.; Kaiser, N. K.; Marshall, A. G.; Rodgers, R. P.; *Energy Fuels* **2014**, *28*, 2454.
- Rummel, J. L.; McKenna, A. M.; Marshall, A. G.; Eyler, J. R.; Powell, D. H.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 784.
- Jašíková, L.; Anania, M.; Hybelbauerová, S.; Roithová, J.; *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 13647.
- Correra, T. C.; Riveros, J. M.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 8632.
- Basher, M. M.; Corilo, Y. E.; Sparrapan, R.; Benassi, M.; Augusti, R.; Eberlin, M. N.; Riveros, J. M.; *J. Mass Spectrom.* **2012**, *47*, 1526.
- Zhu, W.; Yuan, Y.; Zhou, P.; Zeng, L.; Wang, H.; Tang, L.; Guo, B.; Chen, B.; *Molecules* **2012**, *17*, 11507.
- Righetti, L.; Fenclova, M.; Dellafiora, L.; Hajslova, J.; Stranska-Zachariasova, M.; Dall'Asta, C.; *Food Chem.* **2018**, *245*, 768.
- Bruns, K.; Mönnikes, R.; Lackner, K. J.; *Clin. Chem. Lab. Med.* **2016**, *54*, 1193.
- Wang, Y.; Liu, S.; Hu, Y.; Li, P.; Wan, J.-B.; *RSC Adv.* **2015**, *5*, 78728.
- Ferreira, C. R.; Yannell, K. E.; Jarmusch, A. K.; Pirro, V.; Ouyang, Z.; Cooks, R. G.; *Clin. Chem.* **2016**, *62*, 99.
- Pavlovich, M. J.; Musselman, B.; Hall, A. B.; *Mass Spectrom. Rev.* **2018**, *37*, 171.
- John, H.; van der Schans, M. J.; Koller, M.; Spruit, H. E. T.; Worek, F.; Thiermann, H.; Noort, D.; *Forensic Toxicol.* **2018**, *36*, 61.
- Gal, J.; *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 604.
- Kahr, B.; Shtukenberg, A. G.; *Isr. J. Chem.* **2017**, *57*, 31.
- Alekhn, S.; Altmannshofer, W.; Asaka, T.; Batell, B.; Bezrukov, F.; Bondarenko, K.; Boyarsky, A.; Choi, K.-Y.; Corral, C.; Craig, N.; Curtin, D.; Davidson, S.; de Gouvêa, A.; Dell'Oro, S.; DeNiverville, P.; Bhupal Dev, P. S.; Dreiner, H.; Drewes, M.; Eijima, S.; Essig, R.; Fradette, A.; Garbrecht, B.; Gavela, B.; Giudice, G. F.; Goodsell, M. D.; Gorbunov, D.; Gori, S.; Grojean, C.; Guffanti, A.; Hambye, T.; Hansen, S. H.; Helo, J. C.; Hernandez, P.; Ibarra, A.; Ivashko, A.; Izaguirre, E.; Jaeckel, J.; Jeong, Y. S.; Kahlhoefer, F.; Kahn, Y.; Katz, A.; Kim, C. S.; Kovalenko, S.; Krnjaic, G.; Lyubovitskij, V. E.; Marocci, S.; McCullough, M.; McKeen, D.; Mitsuakher, G.; Moch, S.-O.; Mohapatra, R. N.; Morrissey, D. E.; Ovchinnikov, M.; Paschos, E.; Pilaftsis, A.; Pospelov, M.; Reno, M. H.; Ringwald, A.; Ritz, A.; Roszkowski, L.; Rubakov, V.; Ruchayskiy, O.; Schienbein, I.; Schmeier, D.; Schmidt-Hoberg, K.; Schwaller, P.; Senjanovic, G.; Seto, O.; Shaposhnikov, M.; Shchutka, L.; Shelton, J.; Shrock, R.; Shuve, B.; Spannowsky, M.; Spray, A.; Staub, F.; Stolarski, D.; Strassler, M.; Tello, V.; Tramontano, F.; Tripathi, A.; Tulin, S.; Vissani, F.; Winkler, M. W.; Zurek, K. M.; *Reports Prog. Phys.* **2016**, *79*, 124201.
- Sabino, B. D.; Romão, W.; Sodré, M. L.; Correa, D. N.; Pinto, D. B. R.; Alonso, F. O. M.; Eberlin, M. N.; *Am. J. Anal. Chem.* **2011**, *02*, 658.
- Grigorean, G.; Ramirez, J.; Ahn, S. H.; Lebrilla, C. B.; *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 4275.
- Bingol, K.; Brüsweiler, R.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **2017**, *43*, 17.
- Campane, L.; Piccinelli, A. L.; Celano, R.; Pagano, I.; Russo, M.; Rastrelli, L.; *Food Chem.* **2018**, *244*, 128.
- Gómez-Ojeda, A.; Jaramillo-Ortiz, S.; Wrobel, K.; Wrobel, K.; Barbosa-Sabanero, G.; Luevano-Contreras, C.; de la Maza, M. P.; Uribarri, J.; del Castillo, M. D.; Garay-Sevilla, M. E.; *Food Chem.* **2018**, *243*, 11.
- Brown, T. A.; Chen, H.; Zare, R. N.; *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 7274.
- Yan, X.; Sokol, E.; Li, X.; Li, G.; Xu, S.; Cooks, R. G.; *Angew. Chemie, Int. Ed.* **2014**, *53*, 5931.
- Chauhan, A.; *J. Anal. Bioanal. Tech.* **2014**, *5*, 1.
- Medina, S.; Perestrelo, R.; Silva, P.; Pereira, J. A. M.; Câmara, J. S.; *Trends Food Sci. Technol.* **2019**, *85*, 163.
- Rigano, F.; Tranchida, P. Q.; Dugo, P.; Mondello, L.; *TrAC -- Trends Anal. Chem.* **2019**, *118*, 112.
- Dass, C. *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*; 2006.
- John L. Holmes, Christiane Aubry, P. M. M. *Assigning Structures to Ions in Mass Spectrometry*; 1st ed.; CRC Press.
- Kind, T.; Tsugawa, H.; Cajka, T.; Ma, Y.; Lai, Z.; Mehta, S. S.; Wohlgenuth, G.; Barupal, D. K.; Showalter, M. R.; Arita, M.; Fiehn, O.; *Mass Spectrom. Rev.* **2018**, *37*, 513.
- Venter, A.; Nefliu, M.; Graham Cooks, R.; *TrAC -- Trends Anal. Chem.* **2008**, *27*, 284.
- McKenna, A. M.; Purcell, J. M.; Rodgers, R. P.; Marshall, A. G.; *Energy Fuels* **2010**, *24*, 2929.
- Tanabe, F. K. J.; Morgon, N. H.; Riveros, J. M.; *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 2862.
- Morgon, N. H.; Custódio, R.; Riveros, J. M.; *Chem. Phys. Lett.* **1995**, *235*, 436.

43. Gronert, S.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1998**, *9*, 845.
44. Girolardo, T.; Xavier, L. A.; Riveros, J. M.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 3588.
45. Notario, R.; Dávalos, J. Z.; Guzmán-Mejía, R.; Juaristi, E.; *J. Phys. Chem. A* **2018**, *122*, 383.
46. Bartmess, J. E. In *NIST Chemistry webBook, NIST Standard Reference Database Number 69, "Negative Ion Energetics Data"*; Linstrom, P. J., Mallard, W.G., eds.; National Institute of Standards and Technology: Gaithersburg, 2005 MD, 20899.
47. Viggiano, A. A.; Midey, A. J.; Ehlerding, A.; *Int. J. Mass Spectrom.* **2006**, *255–256*, 65.
48. Tripodi, G. L.; Correra, T. C.; Angolini, C. F. F.; Ferreira, B. R. V.; Maître, P.; Eberlin, M. N.; Roithová, J.; *European J. Org. Chem.* **2019**, *2019*, 3560.
49. Brodbelt, J. S.; *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 30.
50. Demarque, D. P.; Crotti, A. E. M.; Vessecchi, R.; Lopes, J. L. C.; Lopes, N. P.; *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 432.
51. Maroto, A.; Jeanne Dit Fouque, D.; Memboeuf, A.; *J. Mass Spectrom.* **2020**, e4478.
52. Mayer, P. M.; Poon, C.; *Mass Spectrom. Rev.* **2009**, *28*, 608.
53. Olsen, J. V.; Macek, B.; Lange, O.; Makarov, A.; Horning, S.; Mann, M.; *Nat. Methods* **2007**, *4*, 709.
54. S. Boja, E.; *Curr. Proteomics* **2011**, *8*, 31.
55. Stiving, A. Q.; Gilbert, J. D.; Jones, B. J.; Wysocki, V. H.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2020**, *31*, 458.
56. Bayat, P.; Lesage, D.; Cole, R. B.; *Mass Spectrom. Rev.* **2020**, mas. 21623.
57. Yan, C.; Liu, S.; Zhou, Y.; Song, F.; Cui, M.; Liu, Z.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18*, 2127.
58. Mortensen, D. N.; Jones, C. A.; Dearden, D. V.; *Int. J. Mass Spectrom.* **2012**, *330–332*, 241.
59. McAlister, G. C.; Huttlin, E. L.; Haas, W.; Ting, L.; Jedrychowski, M. P.; Rogers, J. C.; Kuhn, K.; Pike, I.; Grothe, R. A.; Blethrow, J. D.; Gygi, S. P.; *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 7469.
60. Kailemia, M. J.; Ruhaak, L. R.; Lebrilla, C. B.; Amster, I. J.; *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 196.
61. Zhang, Y.; Fonslow, B. R.; Shan, B.; Baek, M.-C.; Yates, J. R.; *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 2343.
62. Liu, F.; Rijkers, D. T. S.; Post, H.; Heck, A. J. R.; *Nat. Methods* **2015**, *12*, 1179.
63. Polfer, N. C.; *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2211.
64. Shaw, J. B.; Malhan, N.; Vasil'ev, Y. V.; Lopez, N. I.; Makarov, A.; Beckman, J. S.; Voinov, V. G.; *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 10819.
65. Halim, M. A.; Girod, M.; MacAleese, L.; Lemoine, J.; Antoine, R.; Dugourd, P.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2016**, *27*, 1435.
66. Madsen, J. A.; Gardner, M. W.; Smith, S. I.; Ledvina, A. R.; Coon, J. J.; Schwartz, J. C.; Stafford, G. C.; Brodbelt, J. S.; *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 8677.
67. Raspopov, S. A.; El-Faramawy, A.; Thomson, B. A.; Siu, K. W. M.; *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4572.
68. Kim, M.-S.; Zhong, J.; Pandey, A.; *Proteomics* **2016**, *16*, 700.
69. Dunbar, R. C.; *Int. J. Mass Spectrom.* **2000**, *200*, 571.
70. Milosavljević, A. R.; Nicolas, C.; Gil, J.-F. F.; Canon, F.; Réfrégiers, M.; Nahon, L.; Giuliani, A.; *J. Synchrotron Radiat.* **2012**, *19*, 174.
71. Ickert, S.; Beck, S.; Linscheid, M. W.; Riedel, J.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2019**, *30*, 2114.
72. Giuliani, A.; Milosavljevic, A.; Canon, F.; Nahon, L.; Refregiers, M.; Milosavljević, A. R.; Canon, F.; Nahon, L.; Refregiers, M.; *J. Phys. Conf. Ser.* **2013**, *425*, 122001.
73. Aloui, I.; Legros, V.; Giuliani, A.; Buchmann, W.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2020**, rcm. 8773.
74. Pereverzev, A. Y.; Cheng, X.; Nagornova, N. S.; Reese, D. L.; Steele, R. P.; Boyarkin, O. V.; *J. Phys. Chem. A* **2016**, *120*, 5598.
75. Stearns, J. A.; Mercier, S.; Seaiby, C.; Guidi, M.; Boyarkin, O. V.; Rizzo, T. R.; *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11814.
76. Lemaire, J.; Boissel, P.; Heninger, M.; Mauclair, G.; Bellec, G.; Mestdag, H.; Simon, A.; Caer, S. Le; Ortega, J. M.; Glotin, F.; Maitre, P.; *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *89*, 273002.
77. 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.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2020**, rcm. 8635.
78. Baldwin, A. C.; Barker, J. R.; *Chem. Phys. Lett.* **1982**, *86*, 55.
79. Prell, J. S.; O'Brien, J. T.; Williams, E. R.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, *21*, 800.
80. Murdin, B. N.; *Contemp. Phys.* **2011**, *50*, 391.
81. van Amersfoort, P. W. W.; Bakker, R. J. J.; Bekkers, J. B. B.; Best, R. W. B. W. B.; van Buuren, R.; Delmee, P. F. M. F. M.; Faatz, B.; van der Geer, C. A. J. A. J.; Jaroszynski, D. A. A.; Manintveld, P.; Mastop, W. J. J.; Meddens, B. J. H. J. H.; van der Meer, A. F. G. F. G.; Nijman, J. P. P.; Oepts, D.; Pluygers, J.; van der Wiel, M. J. J.; Gillespie, W. A. A.; Martin, P. F. F.; Kimmitt, M. F. F.; Pidgeon, C. R. R.; Poole, M. W. W.; Saxon, G.; *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A* **1992**, *318*, 42.
82. Prazeres, R.; Berset, J. M. M.; Glotin, F.; Jaroszynski, D.; Ortega, J. M. M.; *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A* **1993**, *331*, 15.
83. Schöllkopf, W.; Gewinner, S.; Junkes, H.; Paarmann, A.; von Helden, G.; Bluem, H.; Todd, A. M. M.; *Proceedings of SPIE*, vol. 9512; Biedron, S. G., ed.; p. 95121L, 2015, doi: 10.1117/12.218228
84. Mucha, E.; Marianski, M.; Xu, F.-F.; Thomas, D. A.; Meijer, G.; von Helden, G.; Seeberger, P. H.; Pagel, K.; *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 4174.
85. Mucha, E.; González Flórez, A. I.; Marianski, M.; Thomas, D. A.; Hoffmann, W.; Struwe, W. B.; Hahm, H. S.; Gewinner, S.; Schöllkopf, W.; Seeberger, P. H.; von Helden, G.; Pagel, K.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, *56*, 11248.
86. Mucha, E.; Lettow, M.; Marianski, M.; Thomas, D. A.; Struwe, W. B.; Harvey, D. J.; Meijer, G.; Seeberger, P. H.; von Helden, G.; Pagel, K.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57*, 7440.
87. Wolk, A. B.; Leavitt, C. M.; Garand, E.; Johnson, M. A.; *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 202.
88. Cismesia, A. P.; Bailey, L. S.; Bell, M. R.; Tesler, L. F.; Polfer, N. C.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2016**, *27*, 757.
89. Sagoo, S. K.; Jockusch, R. A.; *J. Photochem. Photobiol., A* **2011**, *220*, 173.
90. Newsome, G. A.; Glish, G. L.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, *20*, 1127.
91. Correia, C. F.; Balaj, P. O.; Scuderi, D.; Maitre, P.; Ohanessian, G.; *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3359.
92. Hamlow, L. A.; Zhu, Y.; Devereaux, Z. J.; Cunningham, N. A.; Berden, G.; Oomens, J.; Rodgers, M. T.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2018**, *29*, 2125.
93. Vachet, R. W.; Hartman, J. A. R.; Callahan, J. H.; *J. Mass Spectrom.* **1998**, *33*, 1209.
94. Gronert, S.; *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 329.
95. Altinay, G.; Metz, R. B.; *Int. J. Mass Spectrom.* **2010**, *297*, 41.
96. Leavitt, C. M.; Wolk, A. B.; Fournier, J. A.; Kamrath, M. Z.; Garand, E.; Van Stipdonk, M. J.; Johnson, M. A.; *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 1099.
97. Robertson, E. G.; Hockridge, M. R.; Jelfs, P. D.; Simons, J. P.; *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 11714.
98. Martens, J.; Berden, G.; Gebhardt, C. R.; Oomens, J.; *Rev. Sci. Instrum.* **2016**, *87*, 103108.
99. Dang, A.; Korn, J. A.; Gladden, J.; Mozzone, B.; Tureček, F.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2019**, *30*, 1558.
100. Menges, F. S.; Perez, E. H.; Edington, S. C.; Duong, C. H.; Yang, N.; Johnson, M. A.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2019**, *30*, 1551.
101. Rodrigues-Oliveira, A. F.; M. Ribeiro, F. W.; Cervi, G.; C. Correra, T.; *ACS Omega* **2018**, *3*, 9075.

102. Katari, M.; Nicol, E.; Steinmetz, V.; van der Rest, G.; Carmichael, D.; Frison, G.; *Chem.: Eur. J.* **2017**, *23*, 8414.
103. Weinhold, F.; *J. Comput. Chem.* **2012**, *33*, 2363.
104. Oliveira, B. G.; Araújo, R. C. M. U.; Ramos, M. N.; *Quim. Nova* **2010**, *33*, 1155.
105. Masson, M. A. C.; Karpfenstein, R.; de Oliveira-Silva, D.; Teuler, J.-M. M.; Archirel, P.; Maître, P.; Corraera, T. C.; *J. Phys. Chem. B* **2018**, *122*, 9860.
106. Meslamani, J. E.; André, F.; Petitjean, M.; *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 330.
107. Grimme, S.; Steinmetz, M.; Korth, M.; *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 2118.
108. Schreiner, P. R.; Fokin, A. A.; Pascal, R. A.; de Meijere, A.; *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3635.
109. Rodrigues-Oliveira, A. F.; M. Ribeiro, F. W.; Cervi, G.; C. Corraera, T.; *ACS Omega* **2018**, *3*, 9075.
110. Andersson, M. P.; Uvdal, P.; *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 2937.
111. Polfer, N. C.; Oomens, J.; Dunbar, R. C.; *ChemPhysChem* **2008**, *9*, 579.
112. Yanai, T.; Tew, D. P.; Handy, N. C.; *Chem. Phys. Lett.* **2004**, *393*, 51.
113. Zhao, Y.; Truhlar, D.; *Theor. Chem. Acc.* **2008**, *120*, 215.
114. Grégoire, G.; Gaigeot, M. P.; Marinica, D. C.; Lemaire, J.; Schermann, J. P.; Desfrancois, C.; *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 3082.
115. Hernandez, O.; Pulay, P.; Maître, P.; Paizs, B.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2014**, *25*, 1511.
116. Galimberti, D. R.; Milani, A.; Tommasini, M.; Castiglioni, C.; Gaigeot, M. P.; *J. Chem. Theory Comput.* **2017**, *13*, 3802.
117. C. Corraera, T.; S. Fernandes, A.; M. Reginato, M.; C. Ducati, L.; Berden, G.; Oomens, J.; Carita Corraera, T.; Santos Fernandes, A.; Mota Reginato, M.; Colucci Ducati, L.; Berden, G.; Oomens, J.; C. Corraera, T.; S. Fernandes, A.; M. Reginato, M.; C. Ducati, L.; Berden, G.; Oomens, J.; Carita Corraera, T.; Santos Fernandes, A.; Mota Reginato, M.; Colucci Ducati, L.; Berden, G.; Oomens, J.; *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 24330.
118. Patrick, A. L.; Cismesia, A. P.; Tesler, L. F.; Polfer, N. C.; *Int. J. Mass Spectrom.* **2017**, *418*, 148.
119. Chang, T. M.; Prell, J. S.; Warrick, E. R.; Williams, E. R.; *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 15805.
120. Laury, M. L.; Boesch, S. E.; Haken, I.; Sinha, P.; Wheeler, R. A.; Wilson, A. K.; *J. Comput. Chem.* **2011**, *32*, 2339.
121. Kaczmarek, A.; Sadlej, A. J.; Leszczynski, J.; *Mol. Phys.* **2006**, *104*, 395.
122. Kashinski, D. O.; Chase, G. M.; Nelson, R. G.; Di Nallo, O. E.; Scales, A. N.; Vanderley, D. L.; Byrd, E. F. C.; *J. Phys. Chem. A* **2017**, *121*, 2265.
123. Russell D. Johnson III; Johnson III, R. D. *NIST Computational Chemistry Comparison and Benchmark Database, NIST Standard Reference Database Number 101 Release 14*; 2006.
124. Shi, R.; Huang, X.; Su, Y.; Lu, H. G.; Li, S. D.; Tang, L.; Zhao, J.; *J. Phys. Chem. A* **2017**, *121*, 3117.
125. Škríba, A.; Jašík, J.; Andris, E.; Roithová, J.; *Organometallics* **2016**, *35*, 990.
126. Doemer, M.; Guglielmi, M.; Athri, P.; Nagornova, N. S.; Rizzo, T. R.; Boyarkin, O. V.; Tavernelli, I.; Rothlisberger, U.; *Int. J. Quantum Chem.* **2013**, *113*, 808.
127. M. Ribeiro, F. W.; Rodrigues-Oliveira, A. F.; C. Corraera, T.; *J. Phys. Chem. A* **2019**, *123*, 8179.
128. Han, L.; Salum, M. L.; Zhang, K.; Froimowicz, P.; Ishida, H.; *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2017**, *55*, 3434.
129. Burke, W. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 609.
130. Ishida, H.; Agag, T. In *Handbook of Benzoxazine Resins*; Ishida, H., Agag, T., eds.; 1st ed., Elsevier: Oxford, 2011.
131. Schneider, B. B.; Nazarov, E. G.; Londry, F.; Vourois, P.; Covey, T. R.; *Mass Spectrom. Rev.* **2016**, *35*, 687.
132. 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.; Campuzano, I. D. G.; Causon, T.; Clowers, B. H.; Creaser, C. S.; De Pauw, E.; Far, J.; Fernandez-Lima, F.; Fjeldsted, J. C.; Giles, K.; Groessl, M.; Hogan, C. J.; Hann, S.; Kim, H. I.; Kurulugama, R. T.; May, J. C.; McLean, J. A.; Pagel, K.; Richardson, K.; Ridgeway, M. E.; Rosu, F.; Sobott, F.; Thalassinos, K.; Valentine, S. J.; Wyttenbach, T.; Fernandez-Lima, F.; Fjeldsted, J. C.; Giles, K.; Groessl, M.; Hogan, C. J.; Hann, S.; Kim, H. I.; Kurulugama, R. T.; May, J. C.; McLean, J. A.; Pagel, K.; Richardson, K.; Ridgeway, M. E.; Rosu, F.; Sobott, F.; Thalassinos, K.; Valentine, S. J.; Wyttenbach, T.; *Mass Spectrom. Rev.* **2019**, *38*, 291.
133. Gabelica, V.; Marklund, E.; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2018**, *42*, 51.
134. Souza Pessôa, G. de; Pilau, E. J.; Gozzo, F. C.; Zezzi Arruda, M. A.; *J. Anal. At. Spectrom.* **2011**, *26*, 201.
135. Merenbloom, S. I.; Flick, T. G.; Williams, E. R.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2012**, *23*, 553.
136. Wyttenbach, T.; Bowers, M. T.; *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 12266.
137. Bohrer, B. C.; Merenbloom, S. I.; Koeniger, S. L.; Hilderbrand, A. E.; Clemmer, D. E.; *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2008**, *1*, 293.
138. Simon, A.-L.; Chirot, F.; Choi, C. M.; Clavier, C.; Barbaire, M.; Maurelli, J.; Dagany, X.; MacAleese, L.; Dugourd, P.; *Rev. Sci. Instrum.* **2015**, *86*, 094101.
139. Bull, J. N.; Coughlan, N. J. A.; Bieske, E. J.; *J. Phys. Chem. A* **2017**, *121*, 6021.
140. Feider, C. L.; Elizondo, N.; Eberlin, L. S.; *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 11533.
141. Li; Yun; Du; Guo; Zeng; Jiang; Chen; *Micromachines* **2019**, *10*, 286.
142. Brown, L. J.; Toutoungi, D. E.; Devenport, N. A.; Reynolds, J. C.; Kaur-Atwal, G.; Boyle, P.; Creaser, C. S.; *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 9827.
143. Dharmasiri, U.; Isenberg, S. L.; Glish, G. L.; Armistead, P. M.; *J. Proteome Res.* **2014**, *13*, 4356.
144. Winter, D. L.; Wilkins, M. R.; Donald, W. A.; *Trends Biotechnol.* **2019**, *37*, 198.
145. Auerbach, D.; Aspenleiter, J.; Volmer, D. A.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2014**, *25*, 1610.
146. Khanal, N.; Masellis, C.; Kamrath, M. Z.; Clemmer, D. E.; Rizzo, T. R.; *Analyst* **2018**, *143*, 1846.
147. Lee, S.-S.; Lee, J.; Oh, J. H.; Park, S.; Hong, Y.; Min, B. K.; Lee, H. H. L.; Kim, H. I.; Kong, X.; Lee, S.; Oh, H. B.; *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20*, 30428.
148. Depraz Depland, A.; Renois-Predelus, G.; Schindler, B.; Compagnon, I.; *Int. J. Mass Spectrom.* **2018**, *434*, 65.
149. van Outersterp, R. E.; Houthuijs, K. J.; Berden, G.; Engelke, U. F.; Kluijtmans, L. A. J.; Wevers, R. A.; Coene, K. L. M.; Oomens, J.; Martens, J.; *Int. J. Mass Spectrom.* **2019**, *443*, 77.
150. Seo, J.; Hoffmann, W.; Warnke, S.; Bowers, M. T.; Pagel, K.; von Helden, G.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, *55*, 14173.
151. Berthias, F.; Maatoug, B.; Glish, G. L.; Moussa, F.; Maitre, P.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2018**, *29*, 752.