

**ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM BOMBARDEAMENTO POR ÁTOMOS RÁPIDOS ("FAB"):
CONSIDERAÇÕES TÉCNICAS E APLICAÇÕES**

Débora de A. Azevedo e Francisco R. de Aquino Neto
Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Ilha do Fundão, CT, Bloco A, Sala 607, 21945 - Rio de Janeiro, RJ

Recebido em 1/11/90; cópia revisada em 29/5/91

Detailed introduction to Fast Atom Bombardment (FAB), an ionization technique for mass spectrometry, illustrated by several applications.

Keywords: FAB, mass spectrometry

I. INTRODUÇÃO

Desde seu primeiro uso na análise orgânica, a espectrometria de massas tem se baseado amplamente na ionização por impacto de elétrons (IE) para obter íons de moléculas neutras vaporizadas. Em 1965, Munson e Field descobriram que íons, além de elétrons, podiam ser utilizados como agentes de ionização e chamaram a técnica de ionização química (IQ). Tanto IE quanto IQ requerem que o processo de ionização ocorra com as moléculas a analisar na fase gasosa. A vaporização dos compostos é um pré-requisito. Para substâncias não voláteis ou termolábeis, o aquecimento para a vaporização leva normalmente à degradação. Várias estratégias alternativas foram desenvolvidas para tornar possível a análise desses compostos. Uma técnica que passou a ser utilizada foi a de dessorção de íons diretamente de fase condensada (líquida ou sólida). O termo geral utilizado é de ionização por dessorção (ID). Na sua essência, na ionização por dessorção, energia sob várias formas é transferida para a amostra, levando moléculas ou íons preexistentes da fase condensada para a gasosa.

Os vários tipos de métodos baseados na ionização por dessorção, diferem entre si na velocidade de transferência de energia, volume de amostra analisada e uso de campos elétricos para auxiliarem a dessorção. Entretanto, essas técnicas apresentam desempenho semelhante e por isso geram espectros semelhantes.

O precursor dessa família de métodos de ionização foi a dessorção por campo (DC), desenvolvido por Beckey em 1969.

Este foi seguido pela dessorção por plasma, desenvolvido por Macfarlane e colaboradores em 1974, no qual são empregados fragmentos decorrentes da fissão do elemento califórnio ($^{252}\text{Cf} \rightarrow ^{142}\text{Ba}^{+18} + ^{106}\text{Tc}^{+22}$) para ionizar compostos termolábeis.

Algumas respostas às limitações das duas técnicas acima citadas (dificuldades experimentais; originam espectro transitente; não atingiram o nível de operação rotineira e pouca disponibilidade de equipamentos), foram obtidas com o desenvolvimento da espectrometria de massas de íons secundários EMIS - por Benninghoven em 1977 ("SIMS - Secondary Ion Mass Spectrometry"). Estes íons são gerados pelo impacto, sobre a amostra a analisar, de um feixe de íons primários, p.ex. Cs^+ , ou um feixe de átomos rápidos, p.ex. Ar. Por essa técnica, amostras no estado sólido ou misturadas com uma matriz sólida, são bombardeadas por íons energizados.

Seguiram-se a essas, as técnicas de dessorção por laser (1978) e dessorção térmica (1979).

Tendo como base todas essas técnicas, Barber e colaboradores^{1,2} desenvolveram a espectrometria de massas com bombardeamento por átomos rápidos ("FAB-Fast Atom Bombardment") e a tornaram comercialmente útil. As amostras, normalmente em solução (glicerol), são bombardeadas por átomos em alta velocidade (energia 2-8 keV). Essa técnica já tinha sido utilizada por Oliphant em 1929³, o primeiro a estudar o bombardeamento de uma superfície metálica (molibdênio) por um fluxo neutro, assim como por Devienne e colaboradores (1966) estudando a projeção de metais por fluxo molecular, quando descobriram que o bombardeamento de uma amostra sólida por partículas neutras energizadas, gerava sinais de íons secundários. Entretanto, o fenômeno de projeção já havia sido reportado em 1852 por Grove⁴.

Dentre essas técnicas, a de bombardeamento por átomos rápidos (BAR), tem se mostrado a de maior utilidade e se desenvolvido grandemente nos últimos anos, sendo que sua absorção no Brasil também já se inicia⁵.

Essa técnica possibilita a análise de muitos compostos antes impossíveis ou difíceis de serem investigados por espectrometria de massas: oligossacarídeos, peptídeos, antibióticos, sais orgânicos e inorgânicos, compostos organometálicos, vitaminas, glicolipídios, dentre outros.

II. MECANISMO E INSTRUMENTAÇÃO

O fenômeno de projeção de moléculas pode ser descrito de um modo simples: se um sólido é bombardeado por partículas com alta velocidade (por exemplo, íons de gás raro de aproximadamente 8 keV de energia) algumas moléculas serão transferidas para a fase gasosa⁴. Essa dessorção deve ocorrer a monocamada superficial⁶, como resultado da transferência de momento da partícula em movimento ao colidir com a amostra alvo. Algumas das moléculas projetadas estarão na forma de íons carregados (positivos ou negativos), e serão analisados espectrometricamente.

A fonte de átomos rápidos consiste em uma fonte de íons de descarga de um catodo frio e uma câmara de colisão. A fonte de íons de descarga produz um feixe de íons de gás raro de energia controlada na faixa de 2-10 keV. Este feixe de íons é focalizado para a câmara de colisão contendo o gás raro neutro em alta pressão, 10^{-3} - 10^{-4} Torr. Nessa câmara ocorre a troca de carga ressonante, com pouca ou nenhuma perda de momento, que resulta num feixe de átomos do gás raro neutros e ionizados, estes últimos escapando sem sofrer troca de carga e ambos os componentes apresentando a mesma energia cinética do feixe de íons original (Eq. 1).

tro de um peptídeo, contém informações necessárias para se sugerir sua sequência de aminoácidos, através de picos correspondentes a íons derivados de algumas fragmentações de ligações peptídicas.

Sais de metais alcalinos formam espécies estáveis, em alta abundância, pela adição ou perda do cátion do metal pesado. Espécies cationizadas podem também ser formadas de misturas de moléculas orgânicas com sais presentes como impurezas. Essa característica pode ser usada deliberadamente pela dopagem da amostra com sais de metais alcalinos, os quais estabilizam a espécie "molecular", gerando um íon intenso $(M+Na)^+$, como nos casos de carboidratos. O mesmo pode ser obtido pela adição de ácidos, o que favorece a formação do íon $(M+H)^+$, aumentando sua intensidade em até 20 vezes, ou pela adição de uma base, que aumenta a intensidade do íon $(M-H)^-$.

O processo de ionização por dessorção pode ser descrito da seguinte maneira: a energia transferida para a amostra aparece como energia vibracional, particularmente intermolecular, levando à dessorção de moléculas ou agrupamentos ("clusters") da fase condensada. As espécies podem ser ionizadas ou neutralizadas ao atravessarem a região próxima à superfície da amostra. Quando o íon deixa essa região, sua energia interna determinará o grau de fragmentação que o íon sofrerá, o qual é dependente do método de ionização e das condições empregadas. Entretanto, as reações de fragmentação são função da estrutura do íon e independentes do processo de ionização.

A descrição fenomenológica do processo de ionização reconhece três mecanismos: i - dessorção direta de espécies pré-carregadas; ii - cationização ou anionização, pela qual uma molécula neutra é observada como um aduto $(C+M)^+$ ou $(A-M)^-$ com o cátion C^+ ou o anion A^- ; iii - processo de ionização por elétrons levando à formação dos íons radicais M^+ e M^- .

Na descrição do processo de ionização por dessorção pode-se observar duas zonas de atividade: a zona próxima à superfície da amostra e a região do vácuo. Na primeira, ligações são geradas e quebradas e reações íon-molécula levam à formação de adutos, como as espécies cationizadas. Na região de vácuo as colisões não ocorrem e somente ocorrem as reações de fragmentação.

O melhor guia para se prever as fragmentações na ionização por dessorção é o conhecimento da dissociação unimolecular que ocorre na ionização química.

Algumas reações não se assemelham à processos ocorridos na fase gasosa e por isto devem ocorrer na superfície antes da dessorção¹².

V. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

V.1. GASES UTILIZADOS

Os gases utilizados para ionizar a amostra na espectrometria com massas de bombardeamento por átomos rápidos (EMBAR) apresentam um papel importante ao determinar a corrente de íons totais da amostra.

Para gases monoatômicos, a eficiência da ionização de uma amostra específica é diretamente proporcional a massa da partícula neutra incidente. Para os gases geralmente utilizados na ionização, xenônio é o mais efetivo, seguido de argônio e depois neônio¹³.

V.2. CALIBRAÇÃO

Os espectros de massas obtidos são calibrados em relação a padrões como o perfluoroquerosene, trisperfluoroheptiltriaquina, trisperfluorononiltriaquina, fomblin⁶. O CsI, que produz agrupamentos ("clusters") de íons do tipo $Cs(CsI)_n^+$ e $(CsI)_nI^-$, tem sido o padrão mais utilizado¹³.

Para pesos moleculares elevados, o registro oscilográfico tem sido o procedimento padrão, assinalando-se as massas pela comparação dos picos da amostra em relação aos obtidos de fosfazinos ou agrupamentos de haletos, ou contando manualmente, utilizando uma das características dos espectros de massas com bombardeamento por átomos rápidos: a ocorrência de pequenos picos a quase todas as massas em um tipo de espectro de fundo de baixa intensidade. Existem também picos mais intensos derivados do glicerol e seus oligômeros adicionados ou não de cátions.

VI. APLICAÇÕES

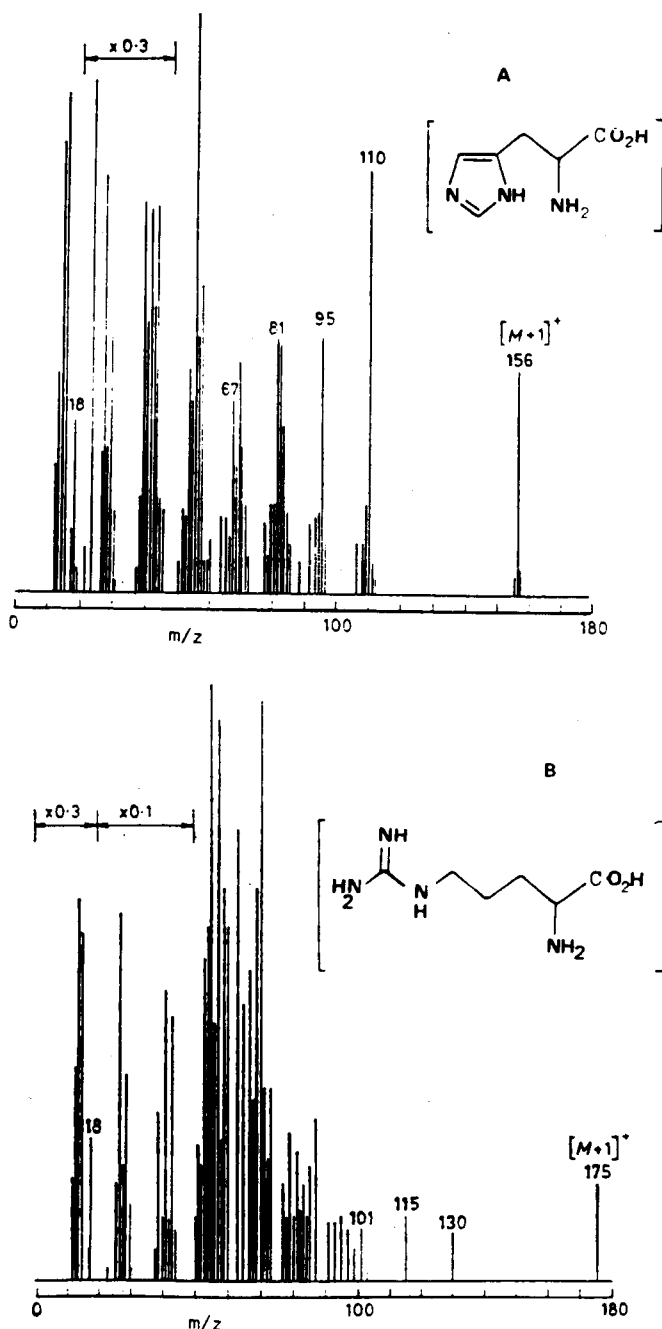


Figura 2: Espectro de massas da L-Histidina (A) e da L-Arginina (B) obtidos por EMBAR (Reimpresso com permissão da referência 2. Copyright 1981 Royal Society of Chemistry).

ENCEFALIN LEUCINA

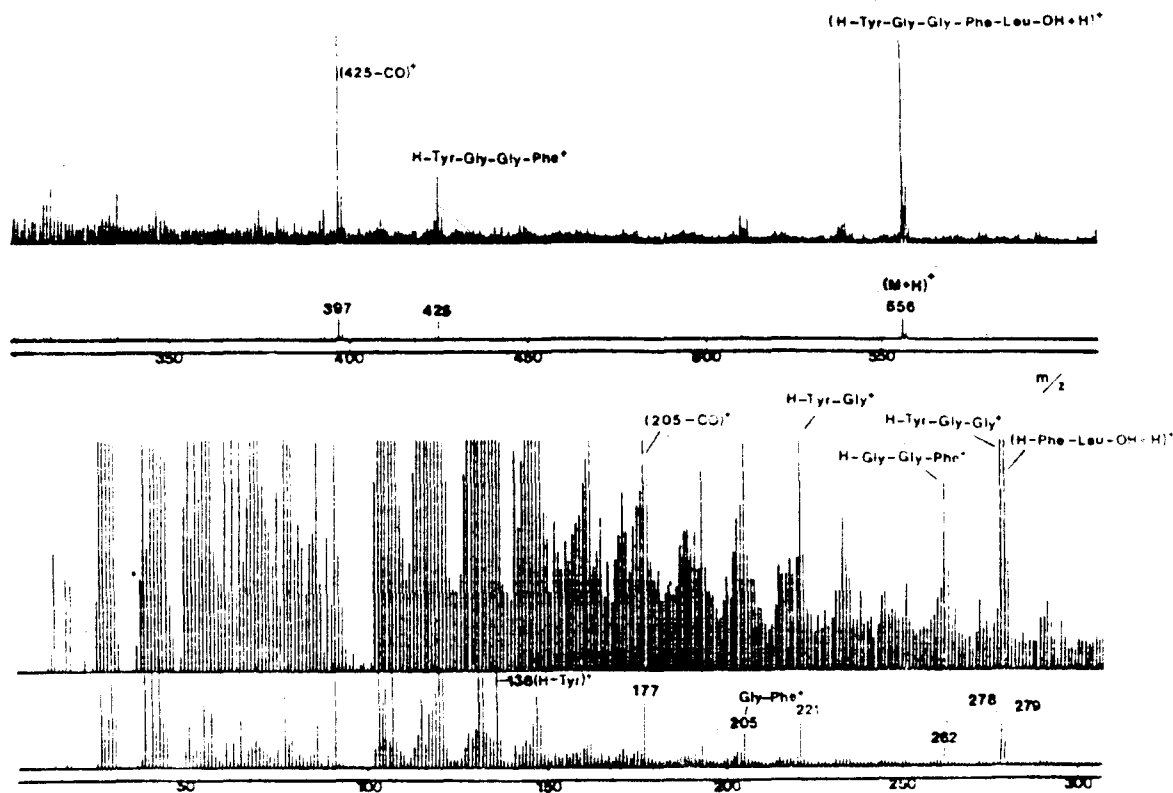


Figura 3: Espectro de massas de íons positivos por EMBAR do oligopeptídeo encefalin-leucina (Reimpresso com permissão da referência 14. Copyright 1981 Macmillan Magazines Ltd.).

As aplicações da espectrometria de massas com bombardeamento por átomos rápidos ampliaram-se significativamente nos últimos anos. O seqüenciamento de polímeros biológicos (peptídeos, proteínas) aparece como uma das áreas de maior utilização. Crescimento rápido também tem sido observado na análise de compostos organometálicos e os de coordenação. Oligossacarídeos, aminoácidos, lipídios, sulfatos esteroidais, pesticidas, dentre outros, têm sido amplamente analisados por essa técnica (Figuras 2 e 3).

Outras operações realizadas em espectrômetros de massas modernos também podem ser executadas utilizando-se a EMBAR. O estudo de íons metaestáveis, pelo qual se pode racionalizar o mecanismo e definir caminhos de fragmentação de íons, pode ser realizado, assim como os experimentos com dissociação ativada por colisão ("CAD - Collisionally Activated Dissociation") para aumentar as fragmentações⁶. Tem-se também a possibilidade de acoplamento da cromatografia líquida de alta eficiência com a EMBAR (CLAE-EMBAR) ou mesmo a gasosa (CG-EMBAR).

VI.1. ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM BOMBARDEAMENTO POR ÁTOMOS RÁPIDOS ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (EMBAR/EM)

A análise de biomoléculas pela EMBAR pode se tornar difícil algumas vezes, devido a certas desvantagens da técnica: i- poucas fragmentações são observadas; ii- o uso de uma matriz pode ocultar picos correspondentes a íons da amostra analisada (pode ser superada pela obtenção de espectro com outra matriz); iii- quando se analisa uma mistura, freqüentemente

torna-se difícil obter a relação íons pais/íons filhos, a qual é importante para uma determinação estrutural¹⁵.

A EMBAR/EM oferece um meio de se contornar estes problemas. Algumas vantagens desta técnica são: i- obtêm-se novas informações estruturais derivadas dos processos de fragmentação, freqüentemente insuficientes no espectro de EMBAR; ii- permite o estudo de misturas²²; iii- fornece novas informações de reações de fragmentação seqüenciais atenuadas na EMBAR¹⁶.

De uma maneira simplista, na espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas (EM-EM) se tem um ou mais analisadores de massas acoplados em série. Com esta técnica um composto presente em uma mistura complexa pode ser separado através de seu íon pai no primeiro analisador de massas (EM-I) seguido de fragmentação deste íon por colisão com um gás (argônio, hélio, nitrogênio) em uma câmara de colisão, sendo que os fragmentos resultantes, íons filhos, são separados pelo segundo analisador de massas (EM-II)¹⁷.

Uma análise por EM-EM requer pouco pré-tratamento ou preparação da amostra. Essa técnica fornece um nível de sensibilidade ainda não obtida por outros instrumentos¹⁸.

A possibilidade para identificar estruturalmente compostos selecionados presentes em misturas complexas, é uma das maiores contribuições da EM-EM¹⁶.

VI.1.1 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE ÁCIDOS GRAXOS POR EMBAR/EM

A análise dos ácidos graxos pelos métodos clássicos de ionização (IE, IQ) não tem se mostrado eficiente, às vezes não apresentando o peso molecular dos compostos analisados (IE)

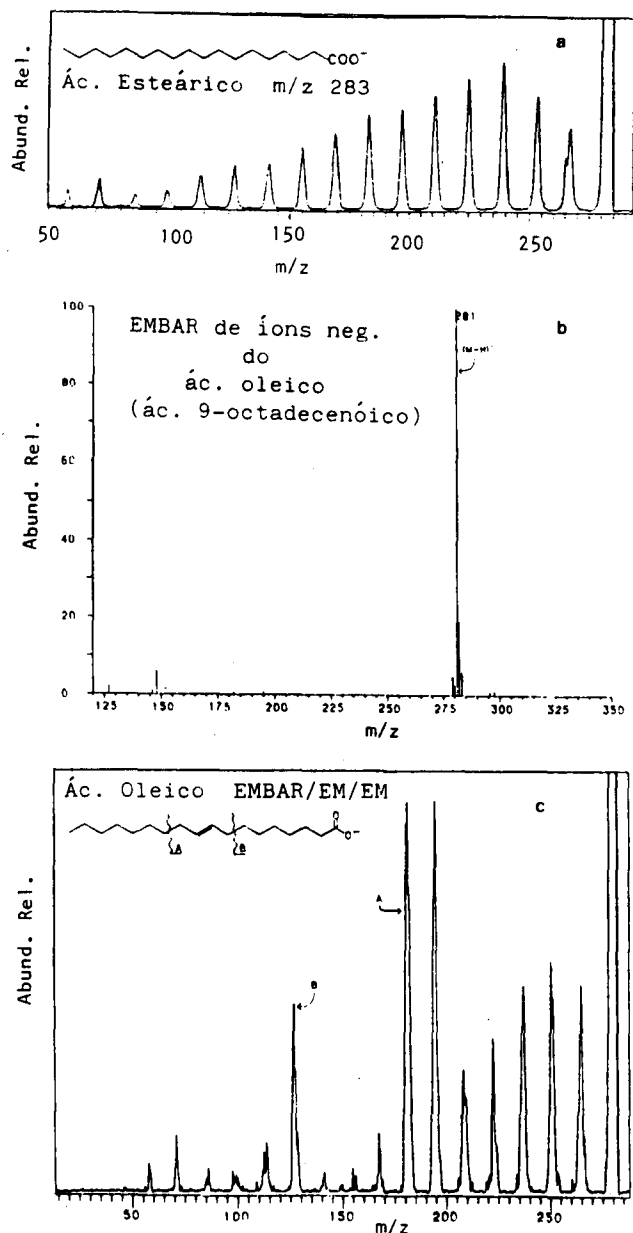


Figura 4: (a) Espectro dos íons filhos produzidos por ativação por colisão do íon $(M - H)^-$ do ácido esteárico (Reimpresso com a permissão da referência 19. Copyright 1985 American Chemical Society); (b) espectro de massas de íons negativos do ácido oléico (ác. 9-octadecenóico); (c) espectro dos íons filhos obtidos por ativação por colisão do íon m/z 281 $(M - H)^-$ do ácido oléico (Reimpresso com a permissão da referência 20. Copyright 1983 American Chemical Society).

ou apresentando um número reduzido de fragmentações (IQ). A derivatização dessas substâncias para se obter um espectro de massas mais informativo torna sua análise mais laboriosa. Ácidos graxos isolados de uma fonte natural aparecem usualmente como mistura. É possível trabalhar com essas misturas utilizando EM-EM através da EMBAR para dessorver os ânions carboxilatos. Os ácidos graxos livres são facilmente dessorvidos como íons $(M^+ - H)^+$ sem que ocorram fragmentações (Figura 4b). Entretanto, se ativado por colisão, o íon $(M - H)^-$ sofre a perda dos fragmentos CH_4 , C_2H_6 , C_3H_8 ,... pela eliminação-1,4 altamente específica de H_2 (Figura 4a). Essa perda começa pela extremidade não carboxílica e se processa ao longo de toda a cadeia, a não ser que haja uma ligação dupla ou outra modificação estrutural da cadeia. O pa-

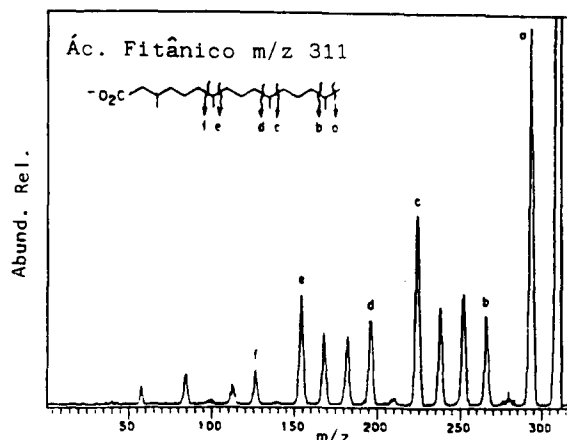


Figura 5: Espectro dos íons filhos obtidos por ativação do íon m/z 311 $(M - H)^-$ do ácido fitânico (Reimpresso com a permissão da referência 21. Copyright 1986 American Chemical Society).

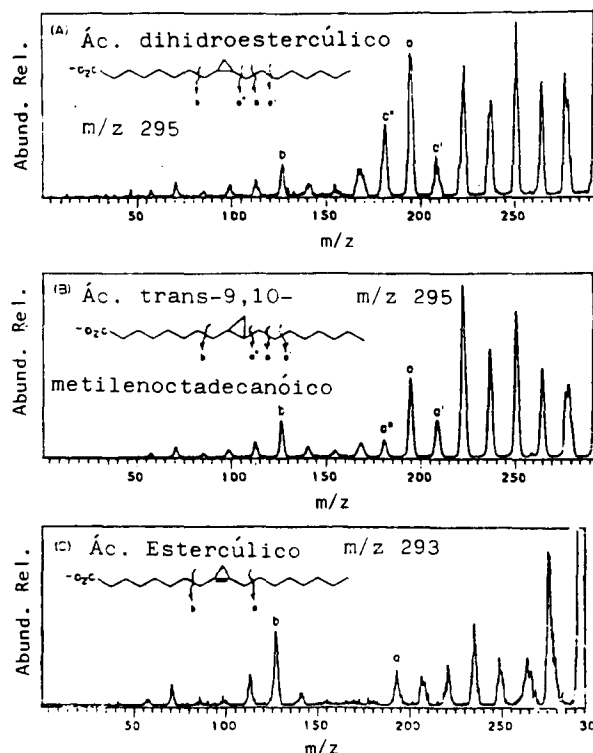


Figura 6: Espectro dos íons filhos obtidos por ativação por colisão do íon $(M - H)^-$ dos ácidos graxos contendo anéis ciclopropano e ciclopropeno. (A) ácido dihidroestercúlico (cis-9,10-metilenoctadecanóico), $(M - H)^- = m/z$ 295; (B) ácido trans-9,10-metilenoctadecanóico, $(M - H)^- = m/z$ 295; (C) ácido estercúlico, $(M - H)^- = m/z$ 293 (Reimpresso com a permissão da referência 21. Copyright 1986 American Chemical Society).

drão de fragmentação resultante pode ser interpretado para identificar e localizar as modificações estruturais dos ácidos graxos²¹.

A técnica EMBAR/EM tem sido usada na localização da posição de ligações duplas em ácidos graxos insaturados. Dois picos intensos correspondentes a fragmentos formados por clivagens alílicas, intermediados de três picos bem menores, revelam-se como uma característica geral de ácidos graxos monoinsaturados e podem ser usados para identificar inequivocamente a localização da ligação dupla (Figura 4c). Não foi observada diferença para os isômeros cis e trans²⁰.

Observa-se o mesmo padrão de clivagem alílica quando mais de uma ligação dupla se encontra presente, mas as suas

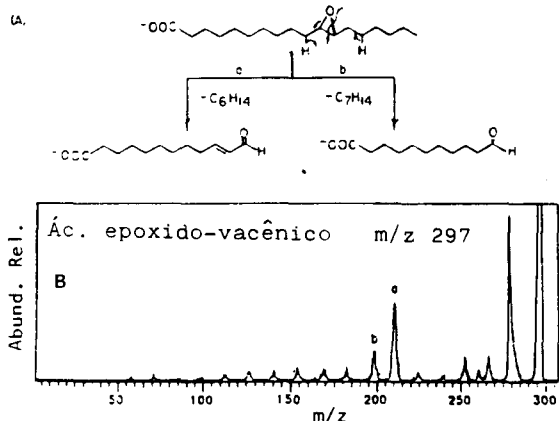


Figura 7: Fragmentações características do ácido graxo com função epoxi. (A) fragmentações que geram íons filhos chaves; (B) espectro dos íons filhos produzidos por ativação do ácido vacênico, $(M - H)^- = m/z$ 297. (Reimpresso com a permissão da referência 21. Copyright 1986 American Chemical Society).

respectivas posições não se revelam tão bem como para os monoinsaturados. Pode-se contudo, modificar os ácidos poliinsaturados pela redução com hidrazina deuterada (N_2D_4) e submeter ao EMBAR/EM os produtos saturados (deuterados) obtidos, para se determinar as posições das ligações dupla¹⁹. As estruturas de ácidos graxos modificados pela existência

de anéis epoxi, ciclopropano e ciclopropeno e grupos hidroxila, podem ser determinadas também por EMBAR/EM. Nos espectros de massas de ácidos graxos ramificados observa-se a presença de picos mais intensos correspondentes a fragmentação nos pontos de ramificação, ocorrendo a quase total supressão das fragmentações envolvendo a perda simultânea da metila e alquila (Figura 5).

Anéis ciclopropano e ciclopropeno em ácidos graxos são identificados e localizados por um grupo de quatro picos juntos, representantes de íons de baixa intensidade no espectro ativado por colisão destes compostos, quando comparados com ácidos graxos saturados análogos (Figura 6).

Nos ácidos com função epoxi se observa o rearranjo e clivagem no anel heterocíclico, obtendo-se fragmentos que caracterizam a sua localização (Figura 7)²¹.

VI.1.2. OUTRAS APALICAÇÕES DA TÉCNICA EMBAR/EM

VI.1.2.1. DIFERENCIAÇÃO DE ISÔMEROS

O esteroide β -estradiol-17- β -D-glicoronídeo é facilmente distinguível do β -estradiol-3- β -glicoronídeo pelos espectros de EM/EM dos seus ânions $(M - H)^-$ (Figura 8)²².

A diferenciação dos estereoisômeros glicoronídeos 3α -hidroxi-5 β -androstan-11,17-diona e 3α -hidroxi-5 α -androstan-11,17-diona pode também ser obtida pelos espectros de EM/EM dos seus íons $(M + H)^+$ (Figura 9)²².

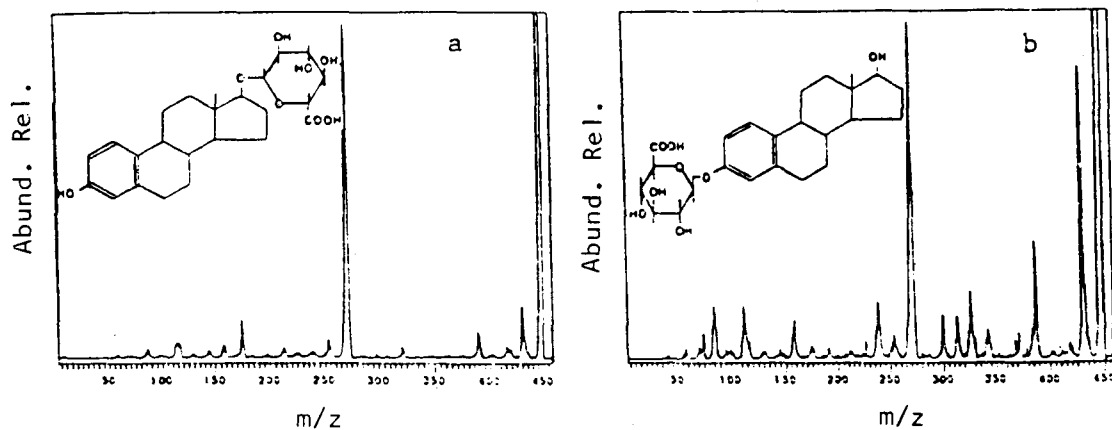


Figura 8: Espectro dos íons filhos obtidos por ativação por colisão do íon $(M - H)^-$ do (a) β -estradiol-17- β -D-glicoronídeo e (b) β -estradiol-3- β -D-glicoronídeo (Reimpresso com a permissão da referência 22. Copyright 1985 John Wiley & Sons Ltd.).

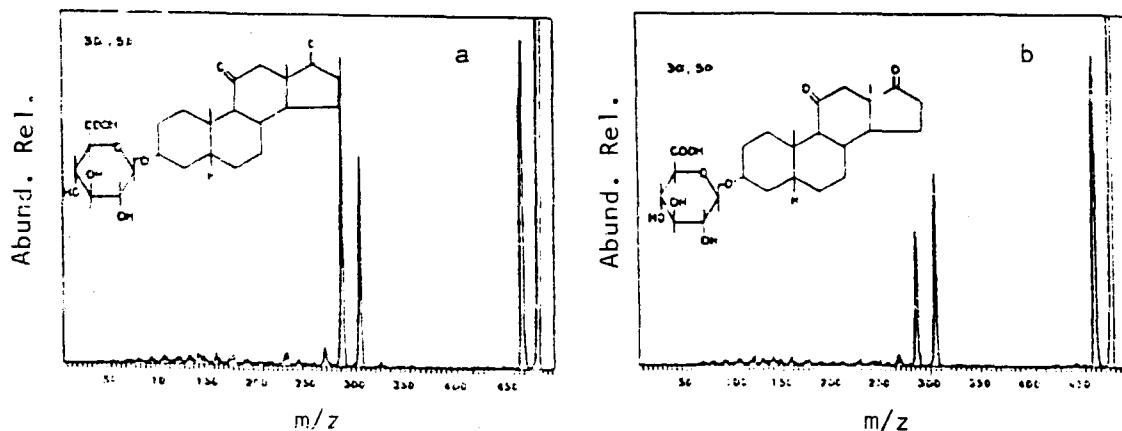


Figura 9: Espectros dos íons filhos obtidos por ativação por colisão do íon $(M - H)^+$ dos glicoronídeos (a) 3α -hidroxi-5 β -androstan-11,17-diona; (b) 3α -hidroxi-5 α -androstan-11,17-diona (Reimpresso com a permissão da referência 22. Copyright 1985 John Wiley & Sons Ltd.).

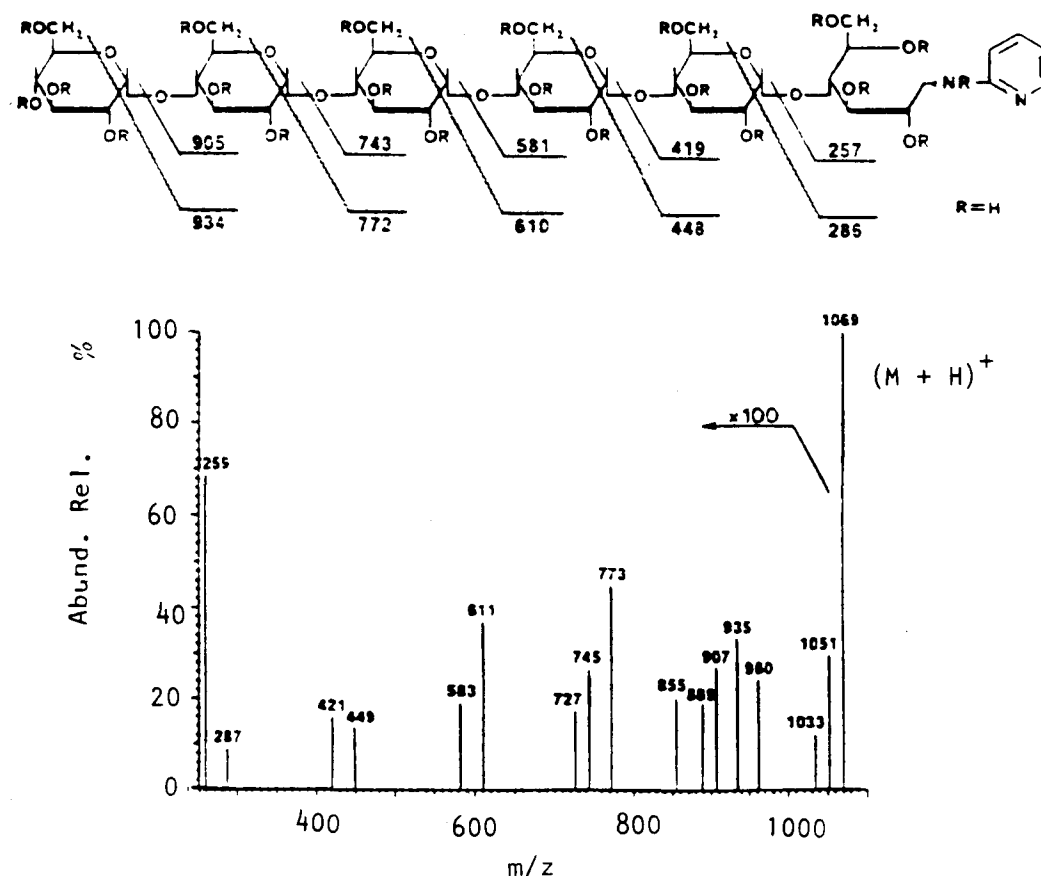


Figura 10: Espectro dos íons filhos obtidos por ativação por colisão do íon $(M - H)^+$ do hexassacarídeo derivado presente em mistura complexa (Reimpresso com a permissão da referência 16. Copyright 1985 John Wiley & Sons Ltd.).

VI.1.2.2. DETERMINAÇÃO SEQUENCIAL

A seqüência dos açúcares de um glicosídeo flavonoídico (homólogo do xanthorhammin) foi determinada pelo espectro de EM/EM do íon $(M + H)^+$ ²².

O seqüenciamento do derivado 2-aminopiridina de poliglucosídeo foi efetuado através da análise de espectro EM/EM (Figura 10)¹⁶.

Outras classes de compostos têm sido estudadas por EMBAR/EM, como: flavonóis²³, surfactantes aniônicos - sulfatos e sulfonatos de alquila e alquilarila, ácidos amílicos, ácidos N-acetilados, diésteres sulfossuccínicos¹⁸ ou catiônicos - aminas, sais de aminas, aminas quaternárias, compostos anfotéricos²⁴.

VI.2. ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM BOMBARDEAMENTO POR ÁTOMOS RÁPIDOS COM FLUXO CONTÍNUO (EMBAR/FC)

As amostras analisadas por EMBAR são usualmente introduzidas na câmara de ionização através da inserção de uma sonda. Este tipo de introdução é simples e de fácil manipulação, mas apresenta algumas desvantagens. Primeiro, não permite um acompanhamento fácil de processos dinâmicos, especialmente onde mudanças rápidas nos reagentes ou produtos são esperadas. Segundo, comparações das intensidades dos íons de amostra para amostra são difíceis e o resultado é incerto sem o uso de padrões internos. Terceiro, quantidade significativa de glicerol (ou outra matriz) é requerida²⁵, o que resulta em algumas desvantagens como: ruído de fundo elevado, efeito de supressão de íons, baixa sensibilidade e pre-

sença de agrupamentos ("clusters") de íons da matriz, interferindo na interpretação dos espectros²⁶.

Estas desvantagens podem ser contornadas pelo uso de uma sonda de fluxo contínuo de amostra na espectrometria de massas com bombardeamento por átomos rápidos (EMBAR/FC) ("Continuous-flow sample probe for FAB"). Uma solução da amostra de interesse pode ser injetada em um fluxo de solvente, o qual carrega o material para a fonte de íons ou, alternativamente, a solução da amostra pode alimentar diretamente a fonte de íons²⁷.

Uma área de desenvolvimento dessa técnica envolve a análise direta de soluções aquosas obtidas de reações bioquímicas.

VI.2.1. OPERAÇÃO DA INTERFACE EMBAR/FC

O princípio básico de operação envolve a introdução da solução aquosa da amostra no suporte e a remoção subsequente do líquido à mesma velocidade, deixando somente uma superfície fina do fluido para o bombardeamento. Um capilar de sílica fundida de diâmetro interno pequeno (75 μ m) é usado para introduzir o líquido. Os íons na fase gasosa são formados pelo bombardeamento, com um feixe de átomos rápidos, da superfície da amostra líquida. A renovação do líquido do suporte se processa de dois modos: i- evaporação por um leve aquecimento (-45°C); ii- atraindo o líquido contra um filtro pela ação da capilaridade. A evaporação do líquido envolve o balanço da velocidade do fluxo do líquido e a temperatura da sonda, para se obter condições de operação otimizadas.

A sonda da EMBAR/FC consiste em uma haste oca tampada em uma das extremidades com uma ponteira que apre-

sentado um orifício de 0.3 mm pelo qual passa o capilar de sílica fundida (D.I. - 75µm) que é levado à saída da haste, formando uma protuberância não mais que 0,2mm distante da ponta. A solução da amostra é introduzida por uma válvula de injeção (Figura 11).

VI.2.2. VANTAGENS DAS OPERAÇÕES DO EMBAR/FC

i- Ruído de fundo.

Os espectros obtidos de amostras introduzidas pela interface EMBAR/FC são caracterizados por um ruído de fundo significativamente menor se comparados com os produzidos pelo EMBAR padrão. Esse efeito é o resultado de um conteúdo maior de água nas soluções analisadas, onde somente 5-10% de glicerol é usado. Assim, maiores detalhes podem ser obtidos dos espectros (Figura 12).

ii- Alta sensibilidade

Um aumento significativo da sensibilidade pode ser alcançado, como resultado da diminuição do ruído de fundo e do aumento na porcentagem dos íons produzidos no bombardeamento (Figura 13).

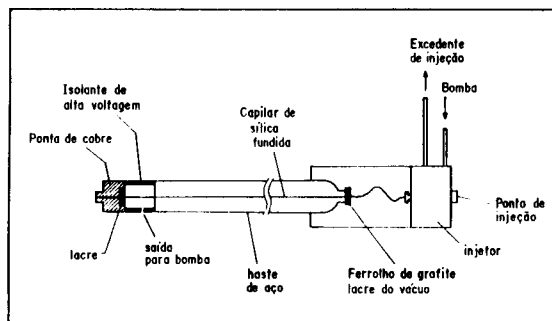


Figura 11: Diagrama esquemático da sonda de fluxo contínuo da EMBAR (Reimpresso com a permissão da referência 25. Copyright 1986 American Chemical Society).

iii- Diminuição no efeito de supressão

A natureza dinâmica da superfície líquida da amostra no suporte do EMBAR/FC leva à diminuição no efeito de supressão de íons normalmente verificado na análise pelo EMBAR padrão. Esta supressão é consequência da tendência de um composto mais hidrofílico, de uma mistura em análise, ocupar

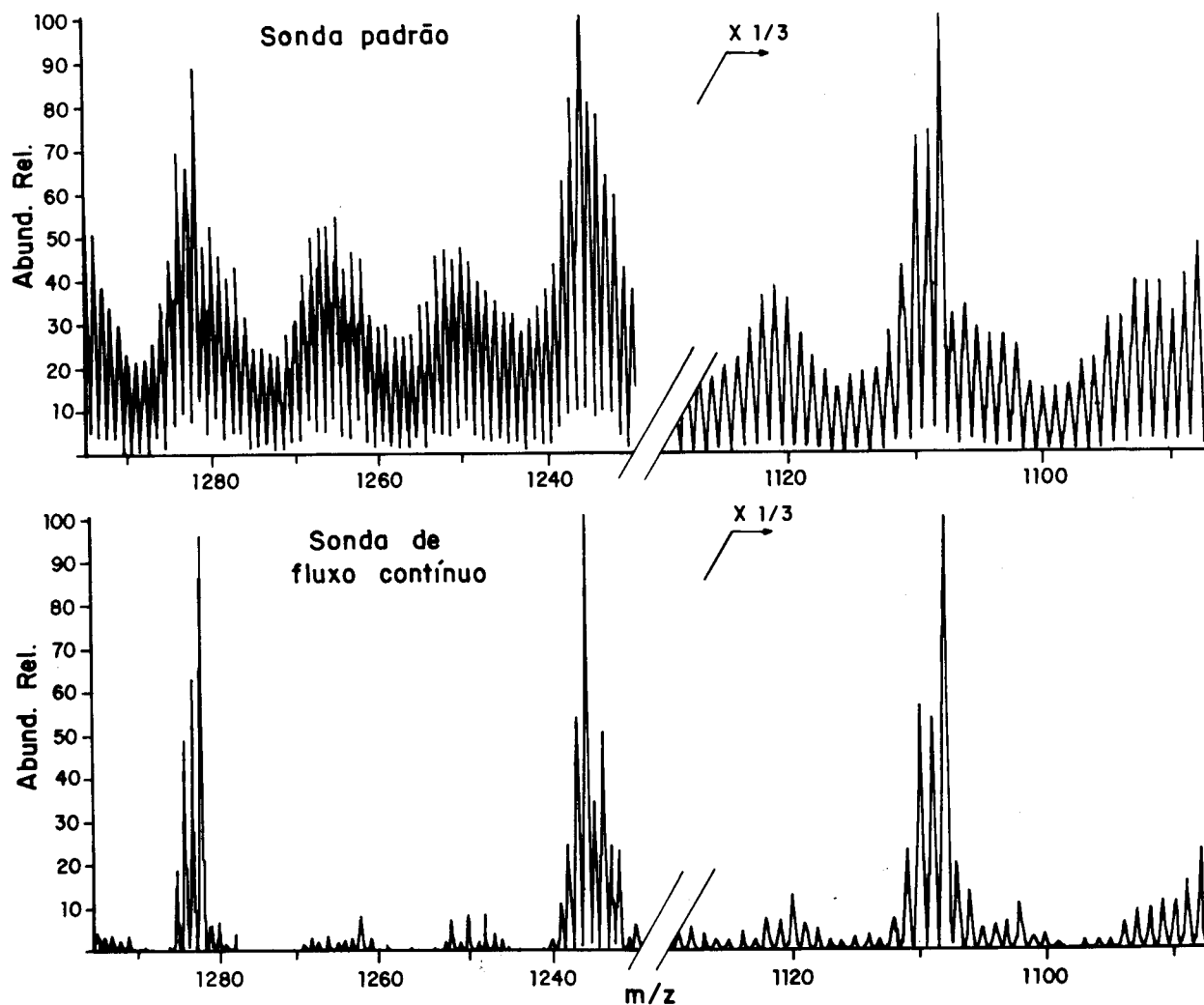


Figura 12: Região de ruído de fundo expandida de um espectro de massas por EMBAR utilizando uma sonda padrão (A) e uma sonda de fluxo contínuo (B) (Reimpresso com a permissão da referência 25. Copyright 1986 American Chemical Society).

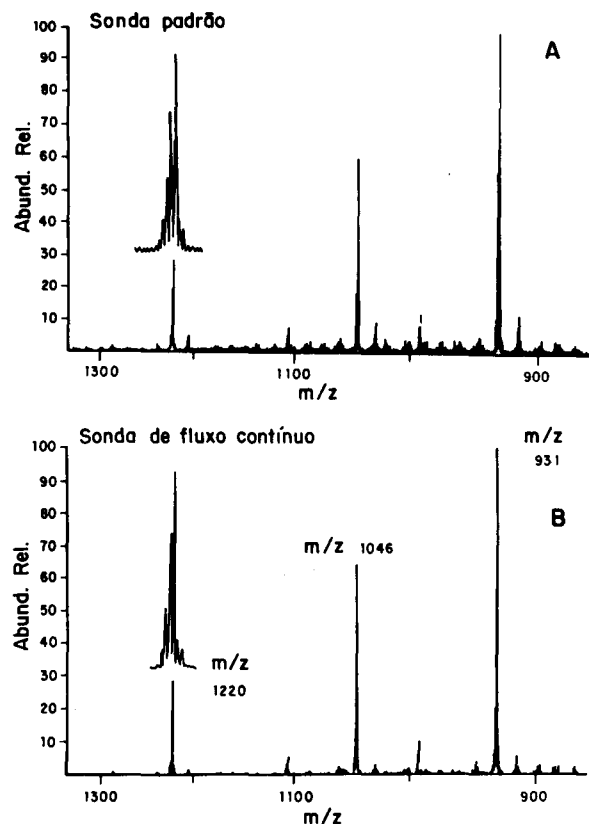


Figura 13: Comparação dos espectros de massas obtidos por EMBAR padrão (A) e utilizando a EMBAR/FC (B) de uma amostra contendo angiotensina III (PM = 930), angiotensina II (PM = 1045) e des-(Gln)-substrato P (PM = 1291) (Reimpresso com a permissão da referência 25. Copyright 1986 American Chemical Society).

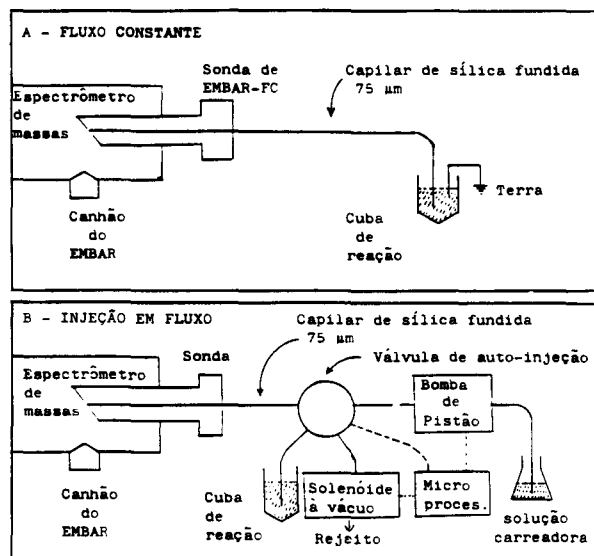


Figura 14: Uso da EMBAR/FC em aplicações que requerem (A) fluxo constante da amostra; (B) injeção em fluxo em intervalos constantes (Reimpresso com a permissão da referência 26. Copyright 1989).

a superfície do líquido independentemente de sua concentração. O aumento observado na EMBAR/FC do sinal de um composto suprimido na análise por EMBAR padrão, é provavelmente devido à contínua renovação da camada superficial da amostra.

iv- Quantificação sem padrão interno

Um dos problemas da EMBAR padrão é sua baixa repro-

duzibilidade dos sinais dos íons (em medidas quantitativas). Já EMBAR/FC, elimina muitas das variações na introdução da amostra, pois a orientação da sonda não é alterada de uma injeção para a outra e as válvulas de injeção atingem grande precisão nos volumes injetados.

VI.2.3. DESVANTAGENS DA EMBAR/FC

Uma dificuldade comumente encontrada envolve o fluxo de líquidos por tubos capilares de pequeno diâmetro interno. Outra é a necessidade de um tempo de estabilização do fluxo do solvente (10-15 min).

VI.2.4. INSTRUMENTAÇÃO

VI.2.4.1. EMBAR/FC

Para o monitoramento de reações, a sonda da EMBAR/FC pode ser operada no modo de injeção em fluxo intermitente ou injeção em fluxo constante.

O modo de injeção em fluxo intermitente é bom para se acompanhar reações enzimáticas, onde um acompanhamento contínuo não é essencial e quando as condições reacionais não são críticas para a formação do íon. O modo de fluxo constante é utilizado quando reagentes de reações que estão sendo monitoradas podem ser introduzidos diretamente ou podem ser previamente misturados com alguma solução carreadora, pouco antes de entrar na fonte da EMBAR. Esse caso é útil se o tempo reacional do processo analisado é muito curto ou mudanças rápidas nas concentrações são esperadas (Figura 14)²⁶.

VI.2.4.2. CLAE/EMBAR/FC

O acoplamento da cromatografia líquida de alta eficiência à espectrometria de massas (CLAE/EM) assume bastante interesse e pode ser realizado, dentre muitas outras técnicas estudadas, pela interface EMBAR/FC.

A mistura é separada pela cromatografia líquida (normalmente CLAE com coluna de pequeno diâmetro interno), utilizando uma fase móvel à qual foi previamente adicionada a matriz e levada à fonte de ionização da EMBAR por um capilar de sílica fundida. O solvente da fase móvel é evaporado imediatamente e o soluto com a matriz é deixado na superfície do suporte e submetido ao bombardeamento com um feixe de átomos energizados (Figura 15).

CONCLUSÕES

A espectrometria de massas com bombardeamento por átomos rápidos tem se mostrado uma técnica muito útil na análise de compostos polares, termolábeis e de alto peso molecular, pois a passagem dos compostos do estado sólido ou lí-

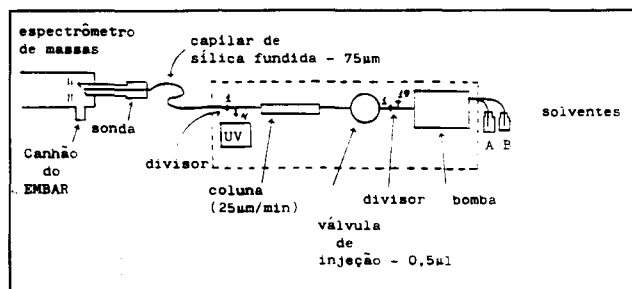


Figura 15: Esquema do instrumental necessário para a ligação CLAE/EM usando a interface EMBAR/FC (Reimpresso com a permissão da referência 28. Copyright 1988 Preston Publications).

quido para o gasoso não é feita por aquecimento e sim pelo mecanismo de ionização por dessorção. O uso de uma matriz é de particular importância, pois permite a obtenção de bons espectros.

O espectro gerado pela EMBAR fornece principalmente o peso molecular do composto, com poucas informações estruturais. Essa desvantagem é contornada pelo acoplamento da EMBAR com a espectrometria de massas. Essa técnica amplia também a faixa das amostras passíveis de serem analisadas, pois permite a análise de misturas, enquanto na EMBAR padrão se faz uso de compostos o mais puros possível.

A EMBAR se desenvolveu rapidamente pois permite a análise de qualquer tipo de composto, mesmo os não polares. Tem se mostrado de particular interesse na área bioquímica, pois permite a análise seqüencial de peptídeos, proteínas, oligossacarídeos e outras biomoléculas.

Outras áreas como a geoquímica e a fitoquímica já começam a fazer uso dessa nova técnica.

REFERÊNCIAS

1. Barber, M.; Bordoli, R. S.; Sedgwick, R. D.; Tyler, A. N.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1981), 325.
2. Surman, D. J.; Vickerman, J. C.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1981) 324.
3. Devienne, F. M.; Roustan, J-C.; *Org. Mass Spectrom.* (1982), 17, 173.
4. Barber, M.; Bordoli, R. S.; Elliott, G. J.; Sedgwick, R. D.; Tyler, A. N.; *Anal. Chem.* (1982), 54, 645A.
5. Lavorenti, A.; Hudson, H. R.; Pianka, M.; *Quimica Nova* (1990), 13, 24.
6. Rinehart Jr., K. L.; *Science* (1982), 218, 254.
7. Cook, K. D.; Todd, P. J.; Friar, D. H.; *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* (1989), 18, 492.
8. Goad, L. J.; Prescott, M. C.; Rose, M. E.; *Org. Mass Spectrom.* (1984), 19, 101.
9. Meili, J.; Seibl, J.; *Org. Mass Spectrom.* (1984), 19, 581.
10. Caldwell, K. A.; Gross, M. L.; *Anal. Chem.* (1989), 61, 494.
11. Baczynskyj, L.; *Adv. Mass Spectrom.* (1985), 10, 1611.
12. Busch, K. L.; Cooks, R. G.; *Science* (1982), 218, 247.
13. Barber, M.; Bordoli, R. S.; Elliott, G. J.; Sedgwick, R. D.; Tyler, A. N.; Green, B. N.; *J. Chem. Soc., Chem Commun.* (1982), 936.
14. Barber, M.; Bordoli, R. S.; Sedgwick, R. D.; Tyler, A. N.; *Nature* (1981), 293, 270.
15. Tomer, K. B.; Guenat, C.; Dino Jr., J. J.; Deterding, L. J.; *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* (1988), 16, 473.
16. Carr, S. A.; Reinhold, V. N.; *Adv. Mass Spectrom.* (1985), 10, 1431.
17. De Grande, S. M. B.; Aquino Neto, F. R.; *Quimica Nova* (1990), 13, 191.
18. Lyon, P. A.; Stebbings, W. L.; Crow, F. W.; Tomer, K. B.; Lippstreu, D. L.; Gross, M. L.; *Anal. Chem.* (1984), 56, 8.
19. Jensen, J. N.; Tomer, K. B.; Gross, M. L.; *Anal. Chem.* (1985), 57, 2018.
20. Tomer, K. B.; Crow, F. W.; Gross, M. L.; *J. Amer. Chem. Soc.* (1983), 105, 5487.
21. Tomer, K. B.; Jensen, N. J.; Gross, M. L.; *Anal. Chem.* (1986), 58, 2429.
22. Tomer, K. B.; Cerny, R. L.; Gross, M. L.; *Adv. Mass Spectrom.* (1985), 10, 1449.
23. Heerna, W.; Koster, C. G.; Dijkstra, G.; Niemann, G. J.; *Adv. Mass Spectrom.* (1985), 10, 1509.
24. Lyon, P. A.; Crow, F. W.; Tomer, K. B.; Gross, M. L.; *Anal. Chem.* (1984), 56, 2278.
25. Caprioli, R. M.; Fan, T.; Cottrell, J. S.; *Anal. Chem.* (1986), 58, 2949.
26. Caprioli, R. M.; *Spectra - A Finnigan MAT publication* (1989), 12, 4.
27. Barber, M.; Tetler, L. W.; Bell, D.; Ashcroft, A. E.; Brown, R. S.; Moore, C.; *Org. Mass Spectrom.* (1987), 22, 647.
28. Caprioli, R. M.; Dague, B. B.; Wilson, K.; *J. Chromatogr. Sci.* (1989), 26, 640.