

Estudo da Foto-Fragmentação do Aminoácido Alanina nos Estados de Valência usando Espectroscopia de Multi-Coincidência

João Augusto Sobral da Silva e Alexandra Mocellin
Universidade de Brasília UnB, Instituto de Física, 70919-970,
Caixa Postal 04455 Brasília, Distrito Federal, Brazil

Apresentamos o estudo e caracterização dos padrões de fragmentação do aminoácido alanina através de espectros obtidos com espectroscopia de multi-coincidência por tempo de voo em uma faixa de energia entre 11.20 e 18.15 eV. Os fragmentos mais significativos, junto de seus respectivos canais de dissociação mais prováveis foram determinados através das energias de aparição e cálculos *Ab initio* presentes na literatura.

I. INTRODUÇÃO

Espectroscopia de Multi-Coincidência e Conceitos Básicos

A Espectrometria de Massa é uma técnica analítica que nos permite medir diferentes massas moleculares de compostos individuais de forma precisa, convertendo esses em íons carregados - que de maneira geral são mais fáceis de serem manipulados através de um campo elétrico, por exemplo. A partir dos espectros de massa obtidos, toda a estrutura química de um composto, junto com diversas propriedades físicas, pode, então, ser determinada [1].

A estrutura e o funcionamento básico de um espectrômetro de massa podem ser observados através das Figuras 1 e 2. Inicialmente, a amostra é transferida para a fonte de íons com atenção quanto à integridade da mesma. Em seguida, as amostras neutras são convertidas em íons de fase gasosa: esse processo é feito através da remoção ou adição de um elétron. O excesso de energia durante um evento de ionização pode causar a quebra de moléculas em fragmentos característicos. Essas duas etapas iniciais são todas feitas sob um sistema em alto vácuo: os íons podem viajar livremente nessa região, de forma que colisões podem produzir diferentes fragmentos através de reações entre íons e moléculas. Os íons moleculares são, então, separados, e seus fragmentos carregados são analisados através de um analisador de massas. A corrente produzida pelo movimento desses íons é medida em um detector, amplificada e exibida em forma de um espectro de massa. A parte eletrônica da estrutura é responsável por controlar diversas unidades responsáveis pela construção e visualização desse espectro.

O analisador de massa constitui a chave principal de um espectrômetro de massa, e existem diferentes tipos com suas respectivas vantagens e desvantagens. Os espectrômetros por tempo de voo (*time of flight* ou *TOF*) são constituídos por um longo tubo (tubo de voo), livre da ação do campo elétrico responsável por controlar os íons, em que as moléculas são separadas com base em suas diferentes velocidades.

Espectrômetros de massa TOFs lineares são geralmente o modelo mais simples para esse tipo de analisador

de massa. Em outros modelos, campos elétricos adicionais podem ser utilizados com o intuito de mudar a direção do feixe de íons, aumentando assim a chamada resolução de massa, representada por $\Delta M/M$, e a distribuição de energia cinética K_E desses íons [2].

Partículas carregadas, como os íons em um analisador de massa, experimentam uma aceleração ao andarem na direção de um campo elétrico. Dessa forma, a energia cinética desses íons é dada por

$$K_E = qV = \frac{mv^2}{2}, \quad (1)$$

onde q , v e m representam a carga, velocidade e massa do íon em consideração, e V a diferença de potencial fornecida para o campo elétrico na fonte de íons.

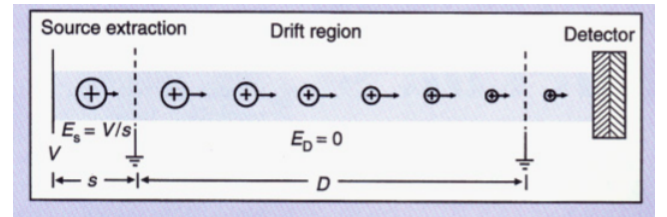


Figura 3: Representação de um tubo de voo, com comprimento D , em um espectrômetro de massa por tempo de voo. Fonte: [2].

Um curto pulso de íons com uma energia cinética definida pela expressão (1) é disperso em relação ao tempo à medida em que esse atravessa um tubo de voo linear de comprimento D - vide Figura 3. As velocidades dos íons são determinadas, então, pela expressão

$$v = \sqrt{\frac{2qV}{m}}. \quad (2)$$

O tempo de chegada t de cada íon no detector é obtido diretamente da expressão (2):

$$t = \frac{D}{v} = D\sqrt{\frac{m}{2qV}}. \quad (3)$$

A coleção de todos os tempos de chegada de todos os íons formam um espectro temporal da molécula em análise que pode ser facilmente convertido para um espectro

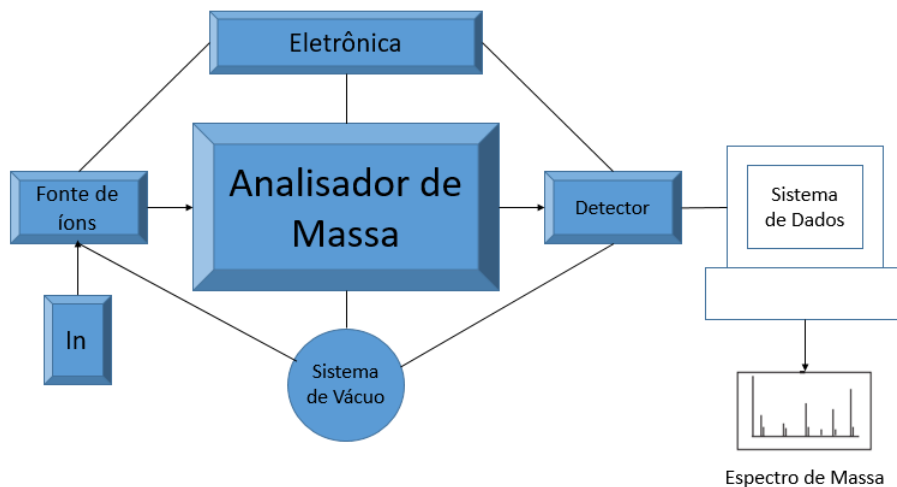


Figura 1: Estrutura básica de um espectrômetro de massa. Adaptado e traduzido de C. Dass, *Principles and Practice of Biological Mass Spectrometry*, Wiley - Interscience, 2001.

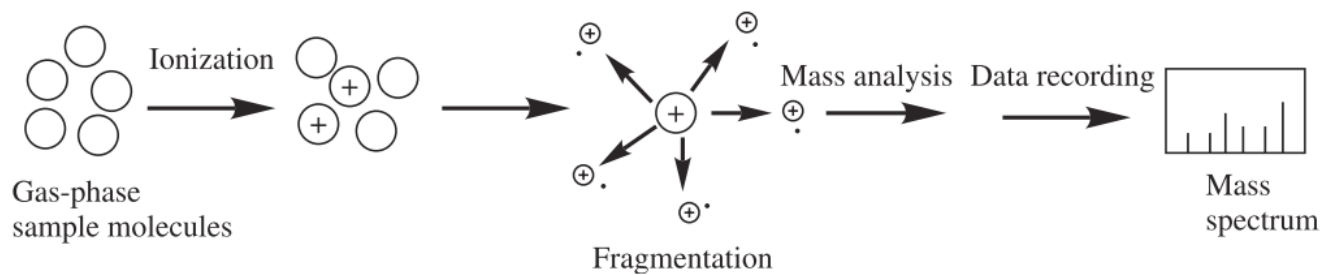


Figura 2: Conceitos básicos para a análise de um espectrômetro de massa. Fonte: C. Dass, *Principles and Practice of Biological Mass Spectrometry*, Wiley-Interscience, 2007.

de massa através de uma calibração instrumental. Uma equação de calibração empírica geralmente aceita [1][2] é dada por

$$\frac{m}{q} = at^2 + b, \quad (4)$$

onde b é uma constante que surge pela diferença de tempo entre a extração do íon na fonte de íons e a aquisição de dados do pulso inicial. Ambas as constantes a e b podem ser determinadas por dois diferentes íons com razão m/q conhecida.

Através das expressões (2), (3) e (4) é possível observar que íons com menor razão *carga/massa* atravessam o tubo de voo mais rapidamente que os íons mais pesados. Dessa forma, o pulso inicial gerado é disperso em pacotes de mesma razão *carga/massa*.

Além da calibração relacionada ao parâmetro massa m obtida ao se determinar ambas as constantes a e b em (4), existem calibrações relacionadas ao tempo, necessárias para uma melhor resolução dos espectros obtidos. Podemos considerar, por exemplo, dois íons de mesma massa m e energia cinética K_E , formados em diferen-

tes instantes t_1 e t_2 . Sendo a velocidade desses íons (ao atravessarem o tubo de voo) igual, o intervalo de tempo entre os dois é sempre constante. Dessa forma, podemos ver através das expressões anteriores que a resolução de massa

$$\frac{\Delta m}{m} = 2 \frac{\Delta t}{t}, \quad (5)$$

pode ser aprimorada, desde que permaneça constante, se extendermos o tempo de voo t dos íons. Isso pode ser efetuado reduzindo-se a tensão de aceleração desse íons, e por consequência suas velocidades, ou incrementando o comprimento do tubo de voo do espectrômetro.

Nesse cenário, a espectroscopia de multi-coincidência, que utiliza a espectrometria de massa por tempo de voo, tem por princípio a coincidência entre um elétron produzido na excitação ou ionização da molécula e os fragmentos iônicos resultantes desse processo. Desse modo, pode-se correlacionar os íons formados aos estados eletrônicos acessados na excitação ou ionização. Desde a década de 50 tem havido um grande interesse em se utilizar essas técnicas para a análise estrutural de macromoléculas biológicas como proteínas e carboidratos [1][2], e

mais recentemente, aminoácidos. A espectroscopia de multi-coincidência, por exemplo, tem sido utilizada para o estudo da dinâmica de fragmentação [3][4] e também da seletividade de quebra de ligações em função da energia do fóton que ioniza a molécula [5][6][7].

Aminoácido Alanina

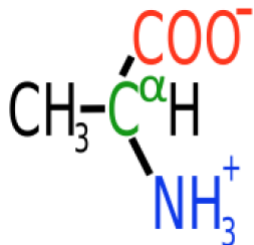


Figura 4: *Estrutura química do aminoácido alanina em sua forma neutra. O carbono do ácido carboxílico está representado em vermelho, e a letra alfa perto do carbono em verde representa o carbono alfa. O grupo amina está representado em azul e a cadeia lateral característica de cada aminoácido está em preto, nesse caso o CH_3 .*

Todos os aminoácidos contêm (pelo menos) uma amina (aqui $-NH_2$) e um grupo ácido carboxílico ($-COOH$), dando as propriedades anfipróticas dos aminoácidos. Em um meio aquoso em um pH intermediário, ou em fase gasosa, os aminoácidos apresentam um carboxilato negativo e um grupo amida positivo, ficando na forma zwitteriônica com carga total zero, como mostrado na Figura 4. Além disso, apresentam uma cadeia lateral que é característica de cada aminoácido, no caso da alanina é o CH_3 .

Aminoácidos, os pedaços da constituição das proteínas, são de importância fundamental em biointerfaces, mas também desempenham um papel em aerossóis atmosféricos, onde ocorrem devido a decomposição de material biológicos. A demanda por informações de fase gasosa de aminoácidos resulta da antecipação de que muitos fenômenos biológicos podem ser rastreados pelas propriedades fundamentais da forma molecular. As propriedades intrínsecas de biomoléculas, difíceis de racionalizar no meio complexo de sistemas biológicos, podem ser compreendidas em ambientes isolados, como em fase gasosa. O estudo de tais sistemas moleculares na ausência de solventes fornece uma compreensão detalhada de sua estrutura geométrica e eletrônica, permitindo a distinção entre propriedades intrínsecas e aquelas devido à interação com o ambiente. A espectroscopia de moléculas biológicas em fase gasosa leva à informação da origem químico-física de suas propriedades. Outra área importante para a presente discussão é o campo de pesquisa com o objetivo de apresentar hipóteses sobre como uma

mistura de moléculas pré-bióticas simples mais uma fonte de energia produz moléculas mais complexas; como aminoácidos ou bases de DNA. Este campo, chamado origem molecular da vida, tem suas experiências pioneiras feitas por Miller [8].

De acordo com o que foi apresentado, o trabalho em questão teve como objetivo principal a análise de espectros do aminoácido Alanina (Figura 4) obtidos com espectroscopia de multi-coincidência, com o objetivo de se determinar os canais de dissociação em função da energia do fóton incidente sobre a molécula.

II. SEÇÃO EXPERIMENTAL

Os espectros de massa do aminoácido alanina foram obtidos em um intervalo de energia entre 11.20 e 18.15 eV na linha de luz denominada D05A-TGM (Thoroidal Grating Monochromator) no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas. Essa linha fornece fótons de 12 a 310 eV com poder de resolução $\Delta E/E$ entre 500 – 700 para as energias utilizadas.

O espectrômetro TOF, que pode ser girado em torno da direção de propagação da luz, foi desenvolvido no Laboratório de Espectroscopia Eletrônica - LEE do Instituto de Física da UnB. As amostras de *alanina* foram adquiridas da empresa Sigma-Aldrich com pureza de 99%. A amostra pura de alanina, um sólido cristalino, foi aquecida até o ponto de evaporação em um forno resistivo que é diretamente conectado com a câmara experimental através de uma agulha, com um sistema de admissão de amostras. Esse aquecimento foi efetuado lentamente até temperaturas em torno de 100°C, tomando-se o cuidado de não aquecer demais para não degradar a amostra. Com o aquecimento lento também eliminamos a água que pode estar presente na amostra.

III. ANÁLISE DE DADOS

Os espectros de massa (TOFs) medidos se encontram na Figura 6. Os espectros são apresentados de forma crescente (da parte inferior para a superior) de acordo com a energia do fóton incidente sobre a molécula, com um passo de 1 eV para cada espectro, até alcançarmos o último valor em 18.15 eV.

Com o intuito de se observar o potencial de surgimento de fragmentos menores, mas ainda relevantes (de acordo com a classificação de suas intensidades relativas - ver Tabela I), traçamos os PIY (*Partial Ion Yield*) no intervalo de energias iniciais, i.e., entre 11.20 e 15.00 eV - Figura 7. Finalmente, as intensidades relativas de cada fragmento foram calculados através da expressão

$$I_{rel} = \frac{\text{Área}}{\text{Área Total}} \cdot 100, \quad (6)$$

m/z	Fragmentos	AE_{exp} (eV)	I_{rel} ($\pm 0, 1\%$)							
			11.20 eV	12.20 eV	13.20 eV	14.20 eV	15.20 eV	16.20 eV	17.20 eV	18.15 eV
18	NH_4^+, H_2O^+	12.45 ± 0.05	-	-	0.87	4.24	12.68	19.36	23.91	24.41
28	CH_2N^+, CO^+	13.00 ± 0.05	-	-	3.19	7.29	10.39	12.71	14.32	15.40
42	$C_2H_4N^+$	12.60 ± 0.10	-	-	-	1.64	3.65	5.39	6.12	6.00
44	$C_2H_6N^+, CO_2^+$	< 11.20	100	100	95.93	86.83	73.27	62.53	55.65	50.25

Tabela I: *Intensidades relativas para os fragmentos mais relevantes no espectro PEPICO do aminoácido alanina para diferentes energias dos fótons incidentes, junto com os valores obtidos para as energias de aparição (AE_{exp}) dos fragmentos. Apesar de outros fragmentos serem observados no TOF (Figura 6), apenas fragmentos com $I_{rel} > 4\%$ foram considerados.*

onde as áreas de cada fragmento foram obtidas através de ajustes gaussianos dos picos correspondentes em cada espectro com o auxílio do software *Igor Pro* (WaveMetrics, Inc., Lake Oswego, OR, USA). As incertezas associadas, sendo independentes e aleatórias, foram determinadas pela fórmula geral para propagação de erros - ver [9], seção 3.11.

A diferença de intensidade entre os picos reflete a abundância deles no processo de fragmentação. É possível ver na Figura 6 que em todos os espectros o pico mais intenso aparece em $m/q = 44$. Nos espectros de menor energia, entre 11.20 e 13.20 eV, ele domina a dinâmica de fragmentação. Essa fragmentação pode resultar na carga sendo atribuída à dois possíveis fragmentos, como é possível observar na Tabela I:

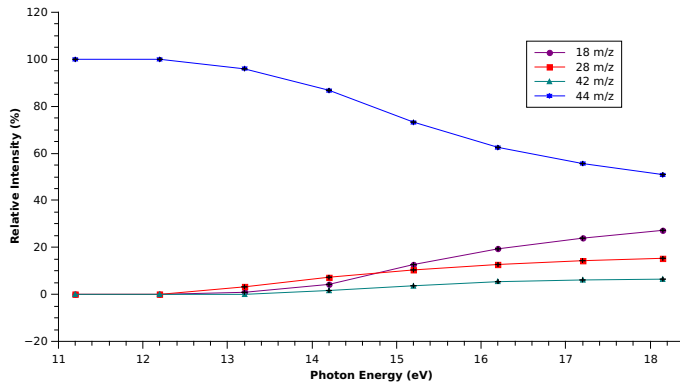
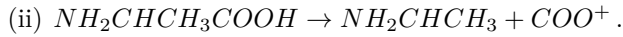
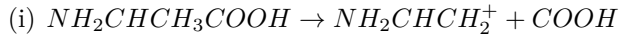


Figura 5: *Representação gráfica das intensidades relativas para fragmentos mais significativos no processo de fragmentação da Alanina.*

A técnica apresentada não nos permite discernir em qual dos dois fragmentos a carga se encontra, porém, estudos recentes na literatura [10][11] apontam que exista

uma preferência para que a carga seja depositada no fragmento com sua cadeia lateral característica, ou seja, o fragmento $C_2H_6N^+$. Dessa forma, a fragmentação mais provável da molécula é dada pelo canal (i), seguindo o princípio de que as moléculas se fragmentam de forma a gastar a menor quantidade de energia possível.

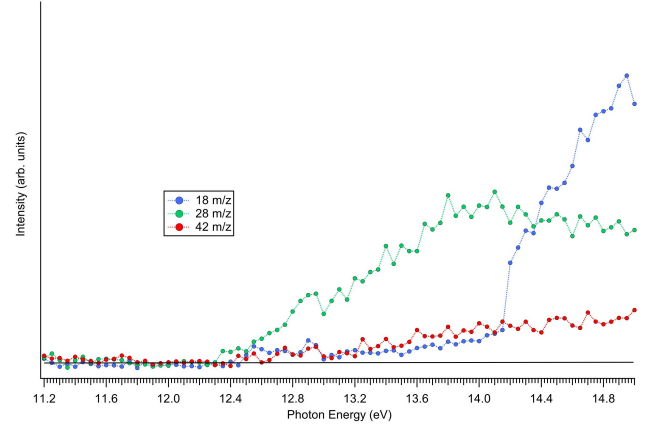
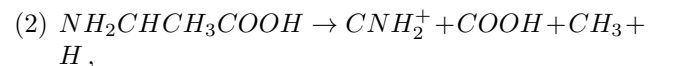
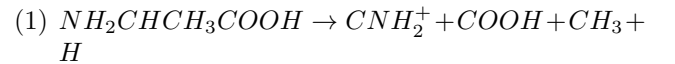
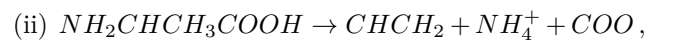
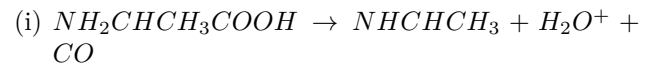


Figura 7: *Espectro PIY (Partial Ion Yield) para 3 fragmentos principais da alanina na região de energia dos fótons incidentes entre 11.20 e 15.0 eV. O traço escuro representa o valor de mínima intensidade (ou ruído) para cada fragmento, apenas acima desse limite inicial observamos o surgimento dos fragmentos.*

Nas regiões próximas a $m/q = 18, 28$ e 42 , teríamos os possíveis canais de fragmentação, respectivamente:



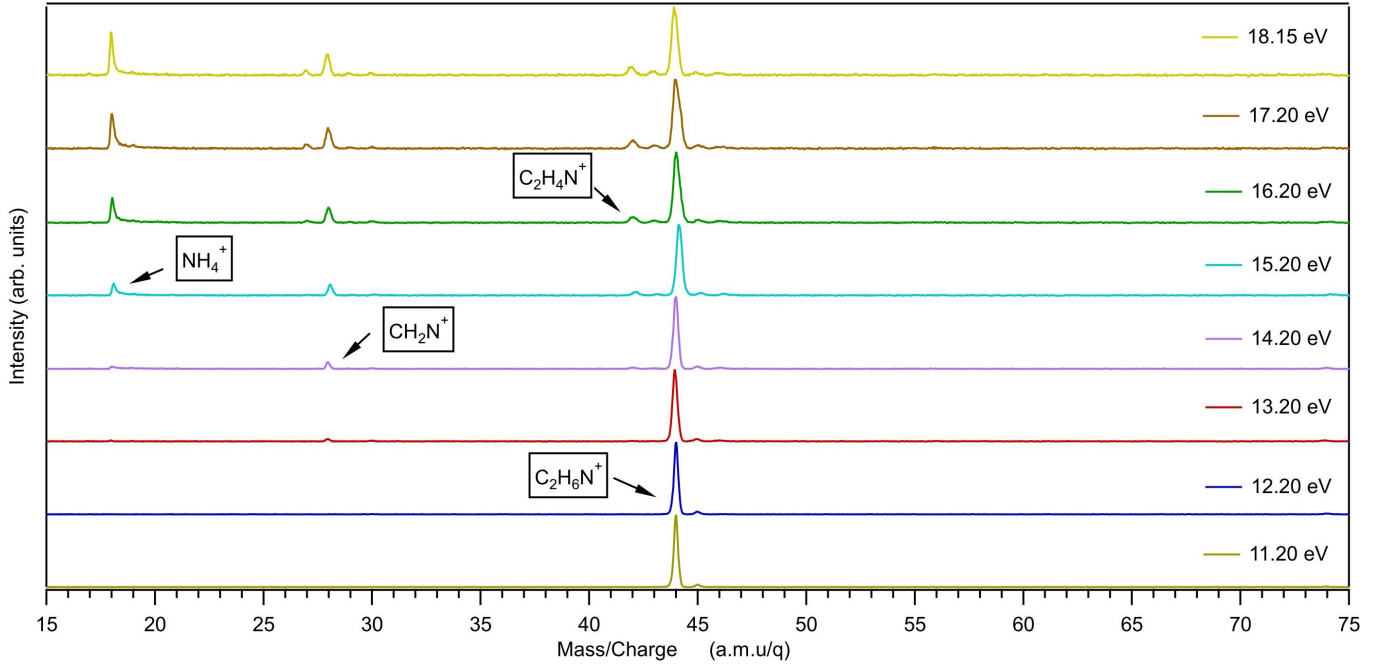
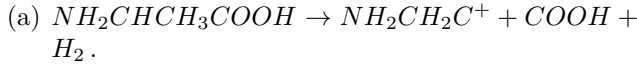


Figura 6: TOFs para energias entre 11.20 e 18.15 eV. Os fragmentos indicados representam os mais significativos, conforme a intensidade relativa - Tabela I, provindos dos canais de dissociação mais prováveis por motivos energéticos.

e



Comparando com valores *Ab initio* obtidos em outros trabalhos [12], percebemos que haveria uma preferência para os primeiros fragmentos indicados na Tabela I, i.e., para os canais de dissociação (ii) e (1) para os picos em $m/z = 18$ e 28 , respectivamente, seguindo o princípio de mínima energia discutido anteriormente.

Dada uma energia de incidência dos fótons mais alta, outras fragmentações podem ocorrer - como observado nos espectros entre 14.20 e 18.15 eV da Figura 6 -, porém, uma probabilidade maior é sempre atribuída às fragmentações que necessitam menor energia para serem realizadas. Através das intensidades relativas dos 4 fragmentos principais (Figura 5), por exemplo, observamos que apesar de o fragmento com $44 \text{ } m/z$ ser o mais intenso para energias iniciais, os outros fragmentos ocorrem cada vez com mais frequência, a medida que aumentamos a energia de incidência dos fótons, até que o fragmento correspondente a $18 \text{ } m/z$ represente aproximadamente 1/4 da intensidade total do espectro em 18.15 eV - vide valores na Tabela I.

Um aspecto interessante obtido através do espectro PIY (Figura 7) é a energia de surgimento dos fragmentos em consideração. Para nossa menor energia o fragmento em $44 \text{ } m/z$ já estava presente, de forma que podemos

apenas afirmar que sua $EA_{exp} < 11.20 \text{ eV}$ - o valor exato se encontra em $9.05 \pm 0.10 \text{ eV}$ [13]. Para os fragmentos em 18 , 28 e $42 \text{ } m/z$ obtemos os valores apresentados na coluna de energias de aparição na Tabela I, confirmando alguns valores obtidos anteriormente na literatura [12] e que de fato, os canais de dissociação (ii) e (1) para os picos 18 e 28 são os que necessitam de menor energia para ocorrer.

IV. CONCLUSÃO

O espectro da Alanina através da técnica de espectroscopia por multi-coincidência pode ser completamente caracterizado. Apesar de pequenos fragmentos aparecem em 27 , 30 , 43 , 45 e $74 \text{ } m/z$, através dos resultados obtidos observamos que os fragmentos mais significantes estão situados em 18 , 28 , 42 e $44 \text{ } m/z$. Todos esses fragmentos obtidos concordam com os já obtidos na literatura através de outros métodos ou aparatos experimentais [12][13][14].

A não aparição do pico correspondente ao *íon pai* em $m/z = 89$ no espectro de massa corrobora com resultados anteriores sobre o estudo de fragmentação da α -alanina [15].

Por fim, ressaltamos a completa determinação dos canais de dissociação mais prováveis para os fragmentos mais relevantes - primeiros fragmentos na Tabela I -, através da energia de aparição obtida nos PIY e cálculos *Ab*

initio[12].

-
- [1] C. Dass, *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry* (Wiley-Interscience, 2007).
- [2] R. J. Cotter, *Analytical Chemistry* **64**, 1027A (1992), pMID: 1443622, <https://doi.org/10.1021/ac00045a002>.
- [3] A. N. de Brito, R. Feifel, A. Mocellin, A. Machado, S. Sundin, I. Hjelte, S. Sorensen, and O. Björneholm, *Chemical Physics Letters* **309**, 377 (1999).
- [4] A. Mocellin, R. Marinho, L. Coutinho, F. Burmeister, K. Wiesner, and A. N. de Brito, *Chemical Physics* **289**, 163 (2003), decay Processes in Core-excited Species.
- [5] A. Mocellin, K. Wiesner, S. L. Sorensen, C. Miron, K. L. Guen, D. Céolin, M. Simon, P. Morin, A. B. Machado, O. Björneholm, and A. N. de Brito, *Chemical Physics Letters* **435**, 214 (2007).
- [6] A. Mocellin, M. Mundim, L. Coutinho, M. Homem, and A. N. de Brito, *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* **156-158**, 245 (2007), electronic Spectroscopy and Structure: ICESS-10.
- [7] A. Lago, L. Coutinho, R. Marinho, A. N. de Brito, and G. de Souza, *Chemical Physics* **307**, 9 (2004).
- [8] S. L. Miller, *Science* **117**, 528 (1953), <https://science.sciencemag.org/content/117/3046/528.full.pdf>.
- [9] J. R. Taylor, *Introdução à Análise de Erros: O Estudo de Incertezas em Medições Físicas* (Bookman, 2012).
- [10] A. Gil, S. Simon, L. Rodríguez-Santiago, J. Bertrán, and M. Sodupe, *Journal of Chemical Theory and Computation* **3**, 2210 (2007), pMID: 26636213, <https://doi.org/10.1021/ct700055p>.
- [11] S. Simon, A. Gil, M. Sodupe, and J. Bertrán, *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **727**, 191 (2005), dedicated to Ramon Carbot-Dorca on the Occasion of his 65th Birthday.
- [12] I. Ipolyi, P. Cicman, S. Denifl, V. Matejcik, P. Mach, J. Urban, P. Scheier, T. Märk, and S. Matejcik, *International Journal of Mass Spectrometry* **252**, 228 (2006).
- [13] H.-W. Jochims, M. Schwell, J.-L. Chotin, M. Clemeno, F. Dulieu, H. Baumgärtel, and S. Leach, *Chemical Physics* **298**, 279 (2004).
- [14] S. Bari, P. Sobocinski, J. Postma, F. Alvarado, R. Hoekstra, V. Bernigaud, B. Manil, J. Rangama, B. Huber, and T. Schlathölter, *The Journal of Chemical Physics* **128**, 074306 (2008), <https://doi.org/10.1063/1.2830032>.
- [15] P. Sobocinski, S. Bari, J. Postma, F. Alvarado, R. Hoekstra, B. Manil, J. Rangama, V. Bernigaud, B. A. Huber, and T. Schlathölter, *Journal of Physics: Conference Series* **101**, 012006 (2008).