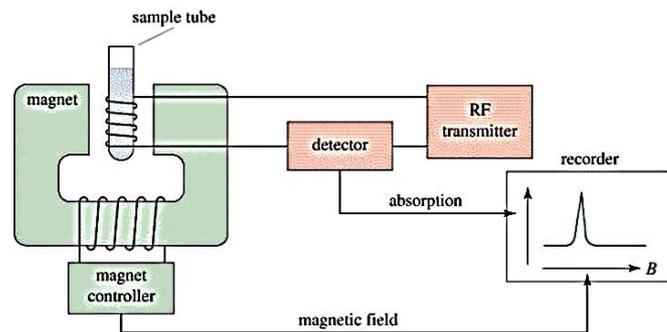


- *RMN e espectrometria de massas.*
- *Análise de PHA por RNM e CG-MS.*

## O espectrómetro de RMN



- **Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

A Ressonância Magnética Nuclear (1945) é um fenômeno que ocorre para átomos com núcleos que possuem momentos angulares e magnéticos,  $J$  e  $\mu$  respectivamente, diferentes de zero.

$$I \neq 0 \quad \text{é} \quad \mu \neq 0$$

$J$  (momento angular) está relacionado com o número quântico de spin  $I$ ;

$$J = hI$$

cujos valores somente podem ser números inteiros ou semi-inteiros  $0, 1/2, 1, 3/2, 2, \dots$

Núcleo	H <sup>1</sup>	C <sup>12</sup>	C <sup>13</sup>	N <sup>14</sup>	O <sup>16</sup>	O <sup>17</sup>
Spin, $I$	1/2	0	1/2	1	0	5/2

$\mu$  (momento magnético) está relacionado ao spin nuclear;

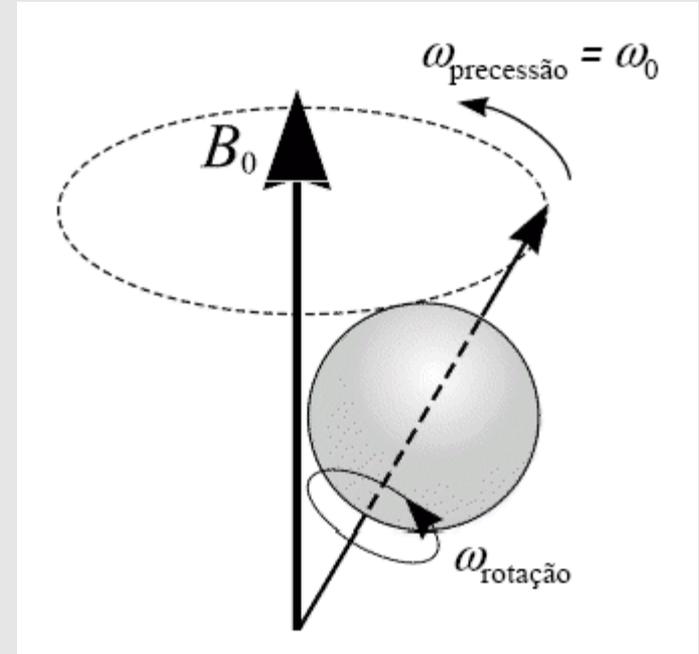
$$\mu = (h\gamma/2\pi)I$$

$h$  e  $\gamma$  são as constantes de Planck e giromagnética respectivamente.

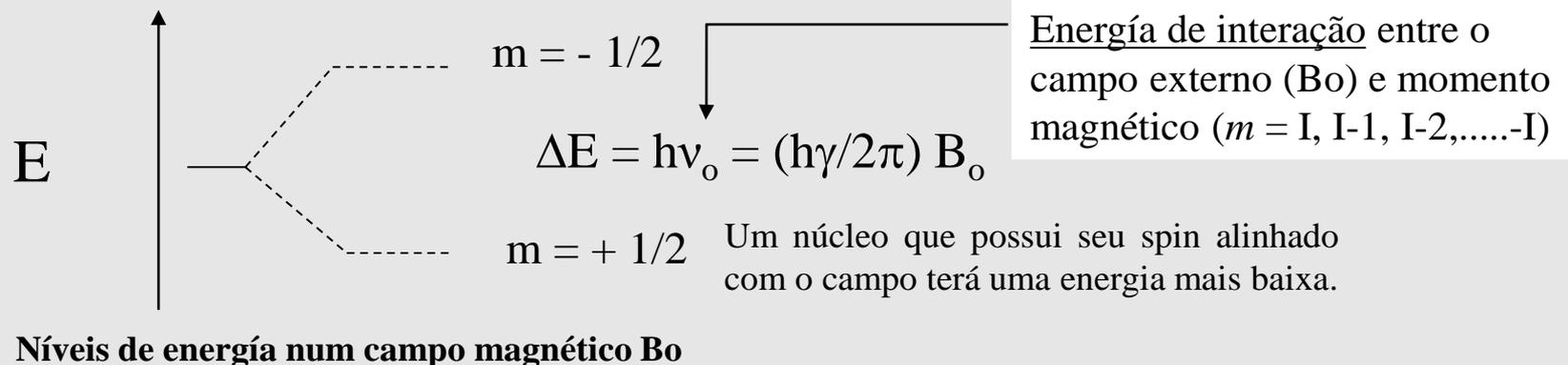
Quando um núcleo é submetido a um campo magnético ( $B_0$ ), seu momento magnético  $\mu$  tende a se alinhar com o campo e este núcleo sofre um movimento de precessão;

**Esta precessão**, chamada de Larmor, tem uma frequência radial  $\omega$  (radian/sec) e uma frequência  $\nu_0$  (Hertz) relacionada pela equação;

$$\omega_0 = 2\pi\nu_0$$



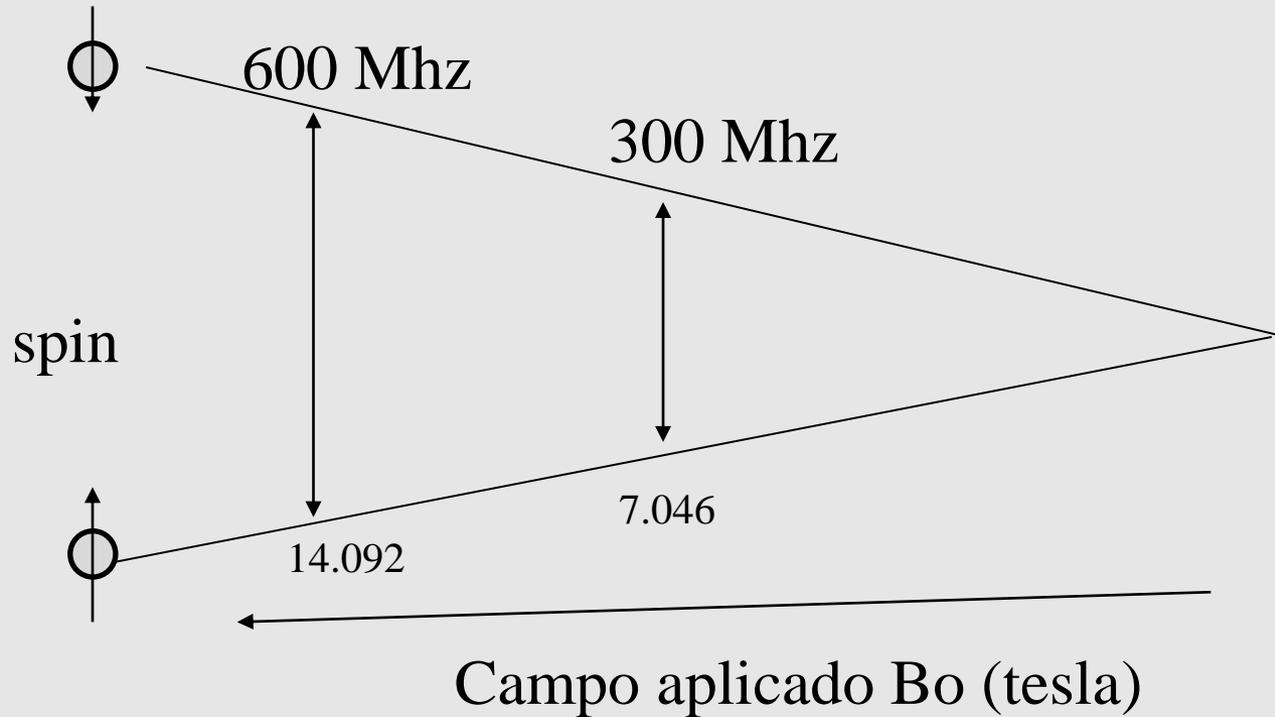
No caso dos átomos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  que apresentam **momento angular de spin nuclear**  $I = 1/2$  temos  $m = +1/2$  e  $-1/2$  que são orientações possíveis na presença de um campo magnético  $B_0$ .



A diferença entre estas populações é muito pequena (20 num milhão de protons) mas suficiente para originar o **fenomeno de ressonância**.

$$\nu_0 = (\gamma/2\pi) B_0$$

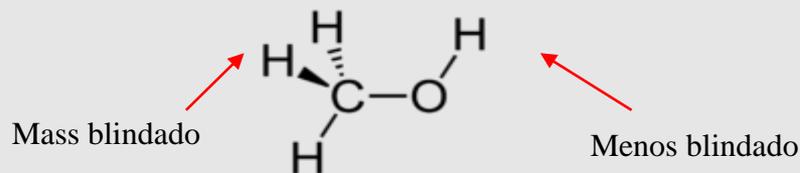
Quando a amostra é submetida a um pulso de radiação é esta corresponde a  $\Delta E$  o núcleo no estado de menor energia passa ao de maior (excitação) e posteriormente ao relaxar (retornar ao nível menor) emite esta energia com uma frequência característica originando a sinal do espectro.



Quanto maior é a frequência operacional melhor será a resolução ou seja separação das sinais no espectro.

Todos os núcleos não absorvessem a mesma quantidade de energia num dado campo magnético.

Os prótons (núcleos) são rodeados de elétrons (os quais criam um campo magnético que se opõe ao campo externo) que os protegem do campo externo (blindagem) e esta proteção depende de seu ambiente químico.



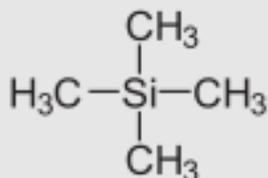
## • Sinais no Espectro $H^1$

- O **deslocamento (localização)** mostra a natureza do ambiente ou seja si o núcleo esta mas ou menos protegido.
- A **intensidade** o número de hidrogênio com o mesmo ambiente químico.
- O **numero de sinais** os hidrogênios com ambiente químico diferentes.
- A **multiplicidade** nos diz o número de hidrogênios presentes nos

## • Deslocamento químico

O deslocamento químico,  $\delta$ , é definido como a blindagem do núcleo pelos elétrons dividido pelo campo aplicado e sempre medido a partir de uma referência.

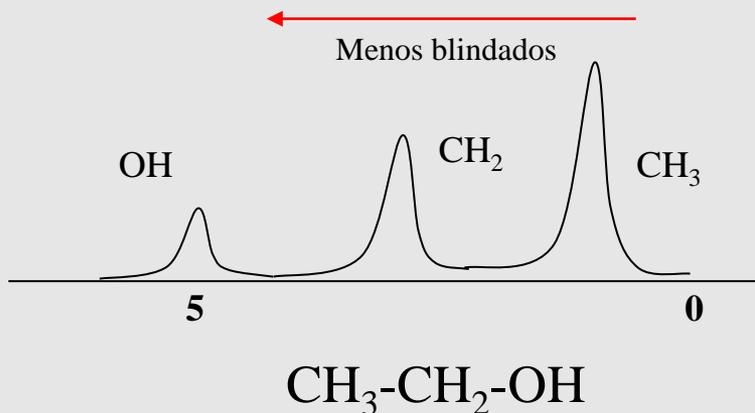
$$\delta = [(v_{\text{amostra}} - v_{\text{referencia}}) / \text{frequência do espectrômetro (Hz)}] 10^6 \text{ ppm}$$



O Si é menos eletronegativo que o C o que torna os hidrogênios mais protegidos e sua sinal é definida como zero na escala (0-10).

Dependendo do ambiente químico do núcleo sua frequência de absorção varia:

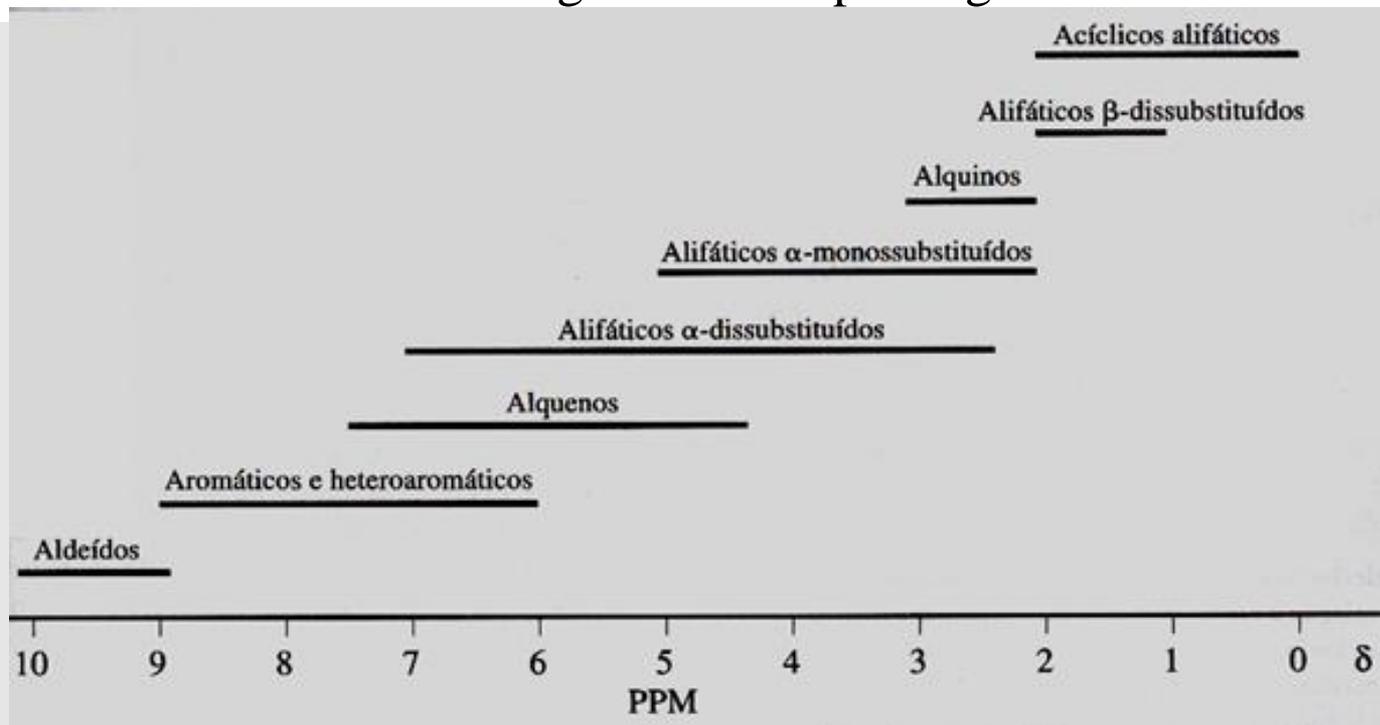
### DESLOCAMENTO QUÍMICO ( $\delta$ ).



A presença de grupos eletronegativos "retiradores de elétrons" (+ electronegativos...), **menos blindado** estará o próton.

A **deslocalização dos elétrons** também contribui para a **desblindagem** do próton. Prótons aromáticos de anéis benzênicos praticamente não são blindados, absorvem energia num campo magnético de baixa intensidade.

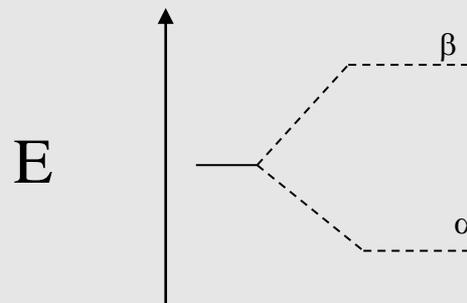
Prótons ligados a carbonos de **duplas e triplas ligações** apresentam uma **blindagem** relativamente alta, devido à densidade eletrônica das ligações  $\pi$ , e os prótons ligados a estas absorvem energia num campo magnético mais alto.



- Intensidade da sinal**

A população relativa de estados pode ser calculado a partir da distribuição de Boltzmann:

$$\frac{N^\alpha}{N^\beta} = e^{\frac{(E^\beta - E^\alpha)}{kT}}$$



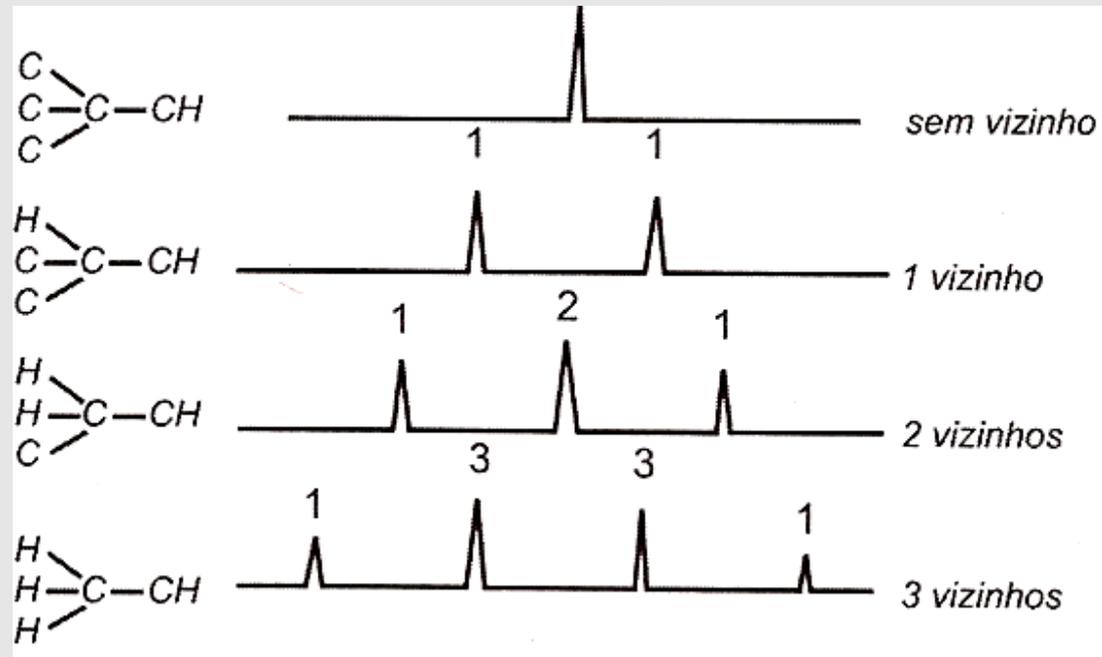
nucleus	$I_N$	Nat. Abd. [%]
$^1\text{H}$	1/2	99.98
$^{13}\text{C}$	1/2	1.11
$^{19}\text{F}$	1/2	100
$^{15}\text{N}$	1/2	0.37
$^{31}\text{P}$	1/2	100

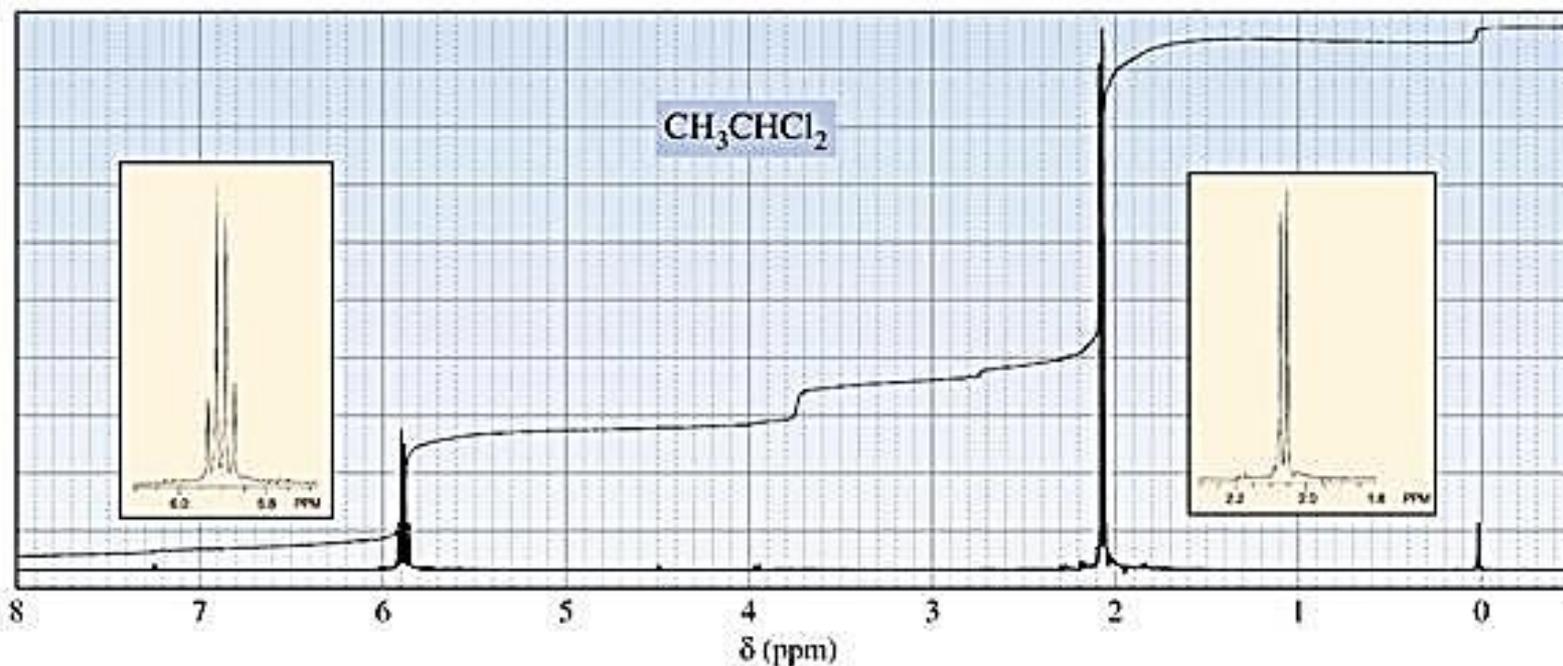
A intensidade do sinal é proporcional à diferença de população dos dois estados e bem dada pela área do pico que será proporcional ao número de hidrogênios equivalentes (igual ambiente químico).

- Acoplamentos:** spin-spin (J)

**Desdobramento das sinais** em número previsível de linhas, distancia entre linhas (constante de acoplamento) e intensidades relativas.

Linha no triângulo	$n+1$	Relação entre a intensidade dos sinais	Multiplicidade	Multiplete
0	1	1	1	Singlete
1	2	1 1	2	Dubleto
2	3	1 2 1	3	Triplete
3	4	1 3 3 1	4	Quarteto
4	5	1 4 6 4 1	5	Quinteto
5	6	1 5 10 10 5 1	6	Sexteto





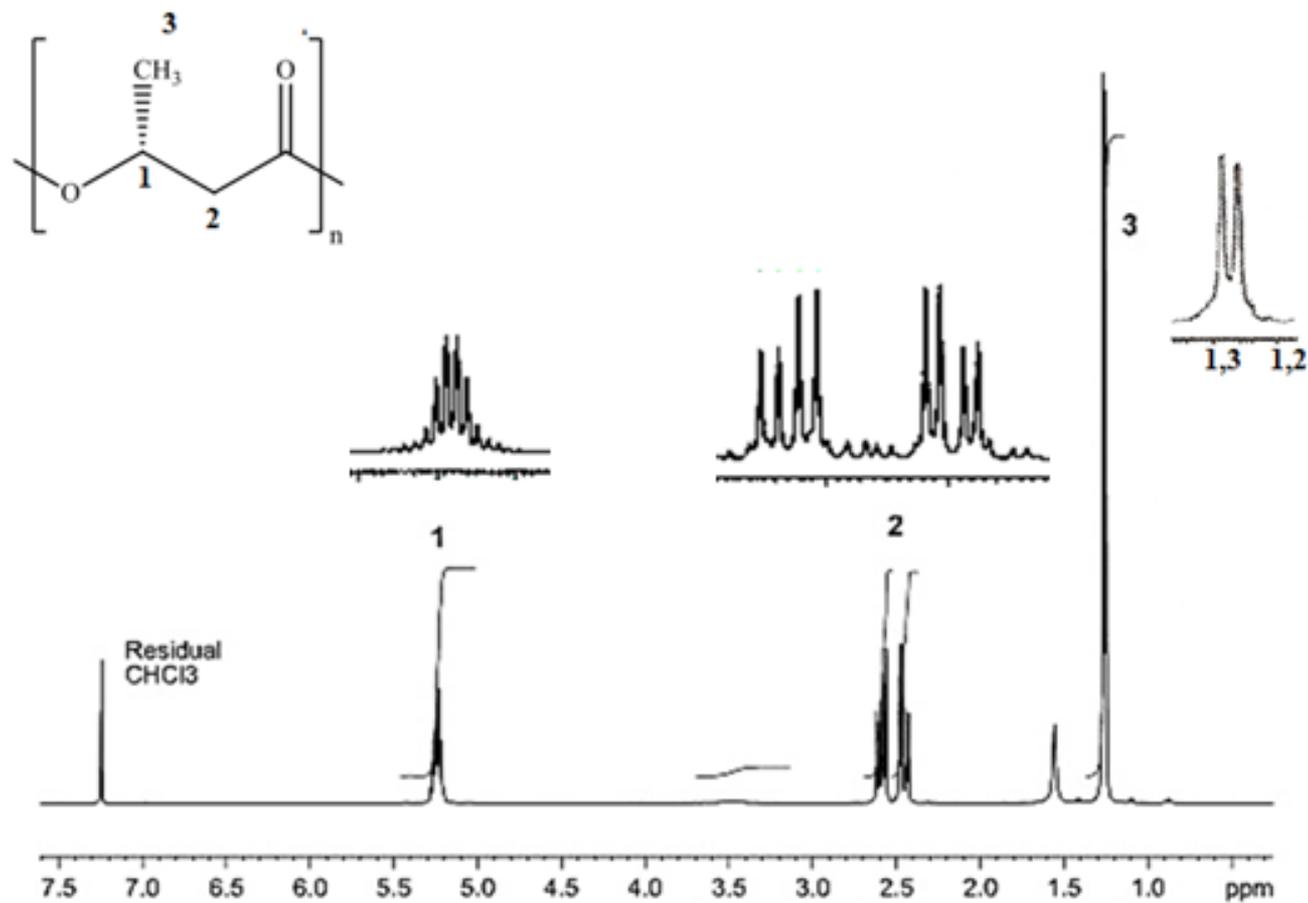
Hidrogênios vizinhos com a mesma constante de acoplamento (ou muito próxima) se acoplam (multiplete)..

O numero de picos é determinado pelo número de hidrogênios vizinhos ( $n+1$ ).  
As intensidades relativas dos picos dependem de ( $n$ )

**Para  $n=1$  se tem 1:1 (triângulo de pascal)**

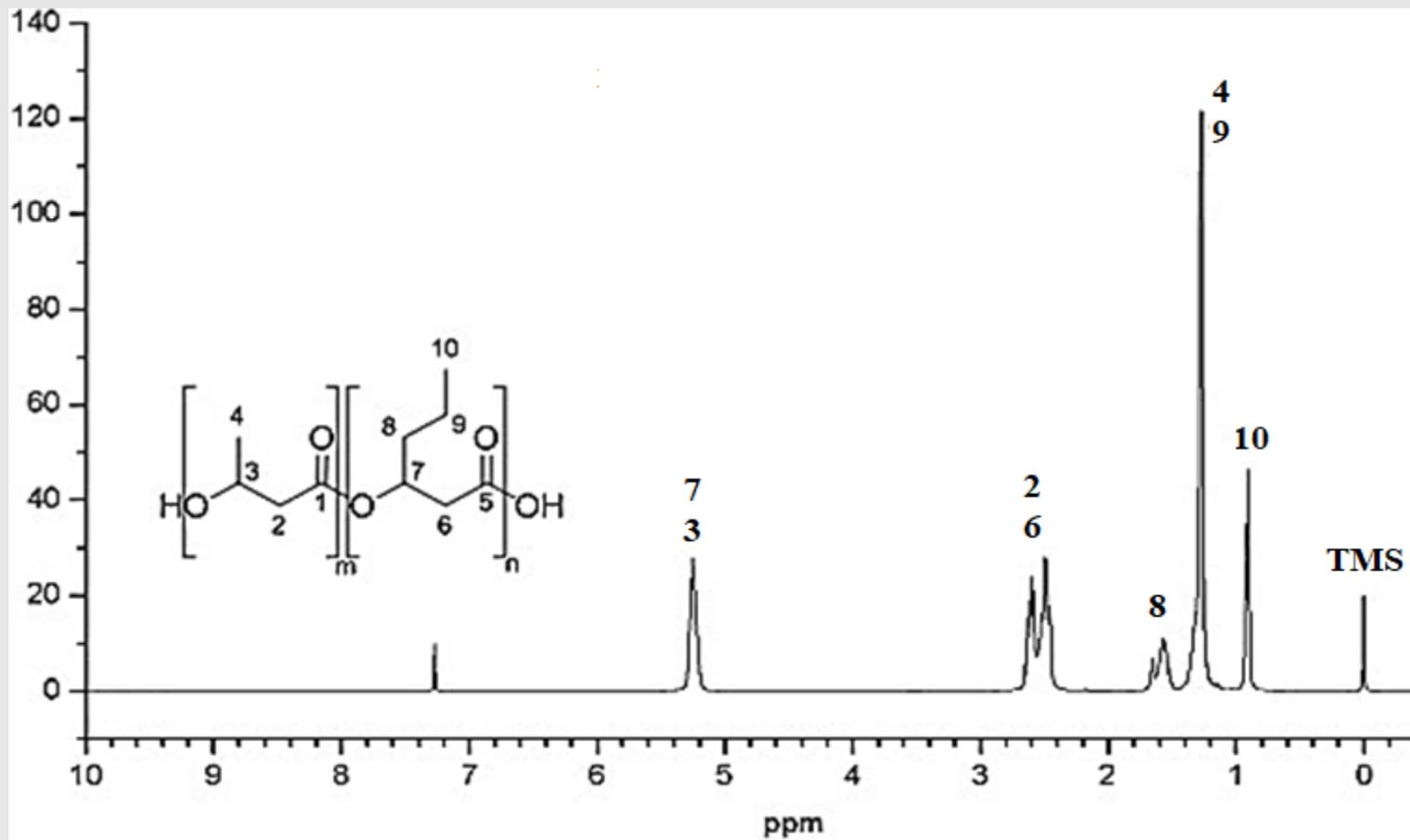
**$n=3$       1:2:2:1**

# Espectro H<sup>1</sup> P3HB



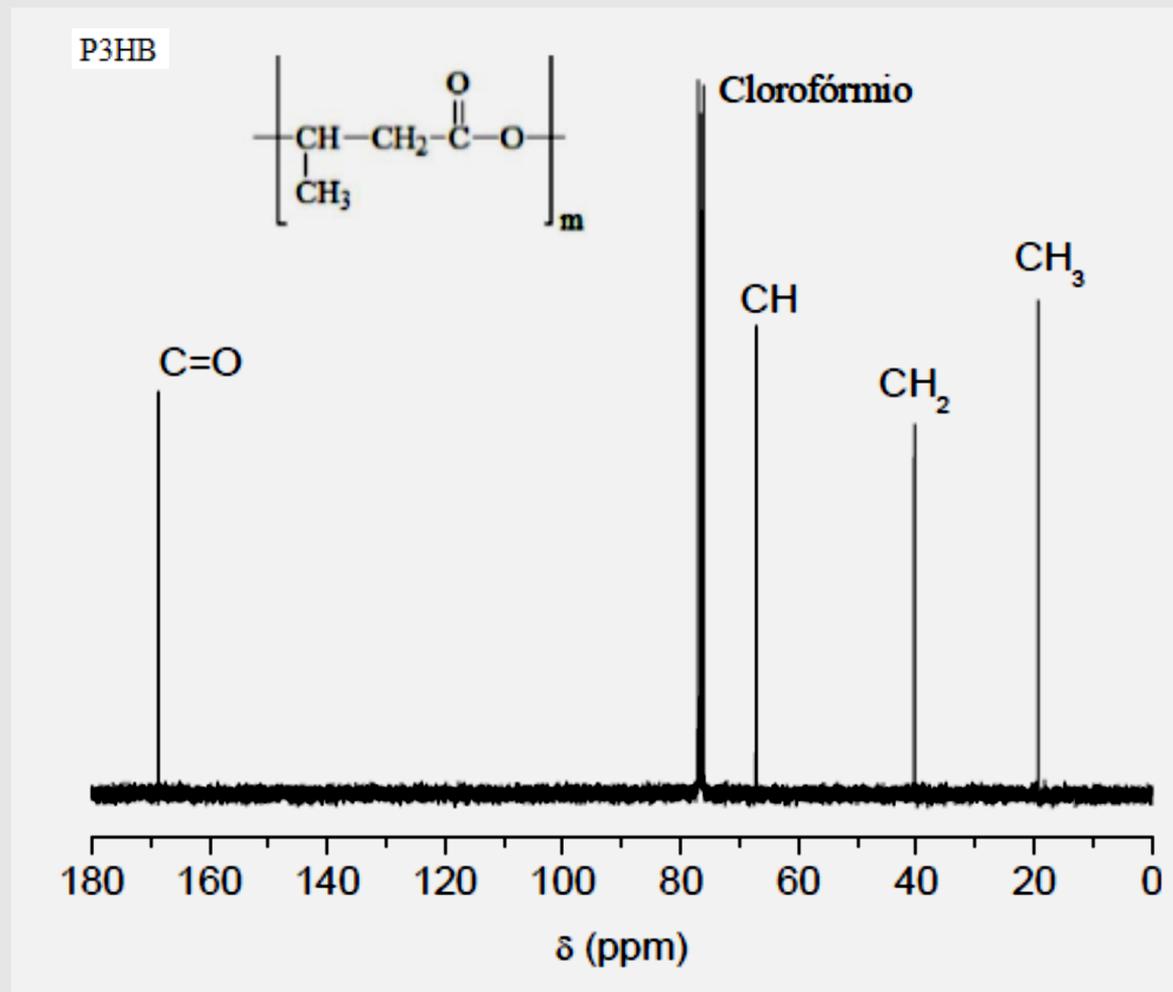
$\delta_1$ CH	$\delta_2$ CH <sub>2</sub>	$\delta_3$ CH <sub>3</sub>
5,26	2,61-2,47	1,27

# RMN H<sup>1</sup> P(3HB-co-3HHx)



# Espectroscopia de RMN 13C

- O número de sinais reflete o número de **diferentes tipos de carbono**.
- A intensidade do sinal de 13C é, em geral, 6400 vezes **menor do que a intensidade de um sinal de 1H**
- **Os deslocamentos químicos** varia acima de 220 ppm, enquanto o de próton, somente 10 ppm



# Destaques da técnica de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$

## As análise de RMN $^1\text{H}$

- Apresentam uma maior sensibilidade que os de  $^{13}\text{C}$ .
- Sinais de  $\text{OH}$  e  $\text{NH}$  são detectadas.
- Os prótons de estruturas olefínicas (4,8-6,8 ppm) aparecem em região diferente dos aromáticos ou que não acontece com os respectivos carbonos em  $^{13}\text{C}$ .
- Análises quantitativas relativamente fácil.

## As análise de RMN $^{13}\text{C}$

- Os deslocamento químicos estão espalhados numa faixa de 200 ppm (no  $^1\text{H}$  apenas em 10 ppm).
- Os espectros são menos complexos devido a baixa abundância do isótopo  $^{13}\text{C}$ . (o acoplamento spin-spin é baixo pelo que resulta um espectro menos complexo).

## Instrumental

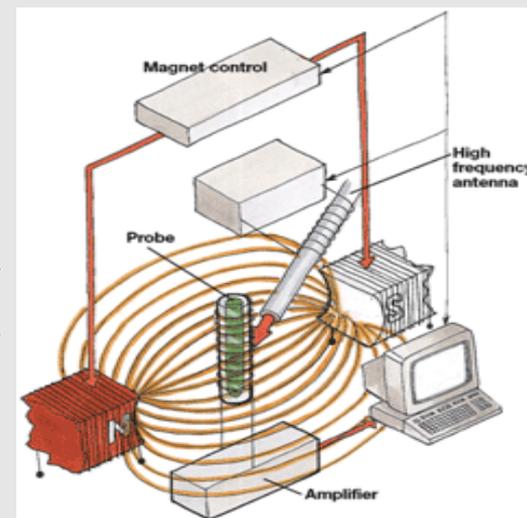
Existem dois tipos de espectrômetros de NMR: de **onda contínua e de pulso** ou de Transformada de Fourier (**FT-NMR**).

Os espectrômetros de transformada de Fourier usam radiação de pulso de radio frequências.

O pulso é de 1-10  $\mu\text{s}$  e é suficientemente largo como para excitar os núcleos em todos os entorno químicos simultaneamente.

O intervalo entre pulsos é normalmente de 1 a vários segundos . Durante o intervalo entre pulsos, é emitida um sinal de domínio de tempo RF chamado sinal de decaimento livre (FID) à medida que os núcleos voltam a seu estado original

O sinal FID é digitalizado e posteriormente processado. Os sinais de decaimento de domínio de tempo de numerosos pulsos sucessivos podem ser somados e agregados para melhorar a relação sinal-ruído. O resultado se converte em sinal de domínio de frequência por uma transformada de Fourier.



# Espectrometria de Massas (MS)

*Energia de ligação covalente  $\approx 200 - 600 \text{ kJ mol}^{-1}$*

Si uma amostra orgânica passa por um “feixe de elétrons” acelerados por um campo (ex. 70 eV).

$$E = 70 \text{ eV} \approx 7 \times 10^3 \text{ kJ mol}^{-1}$$

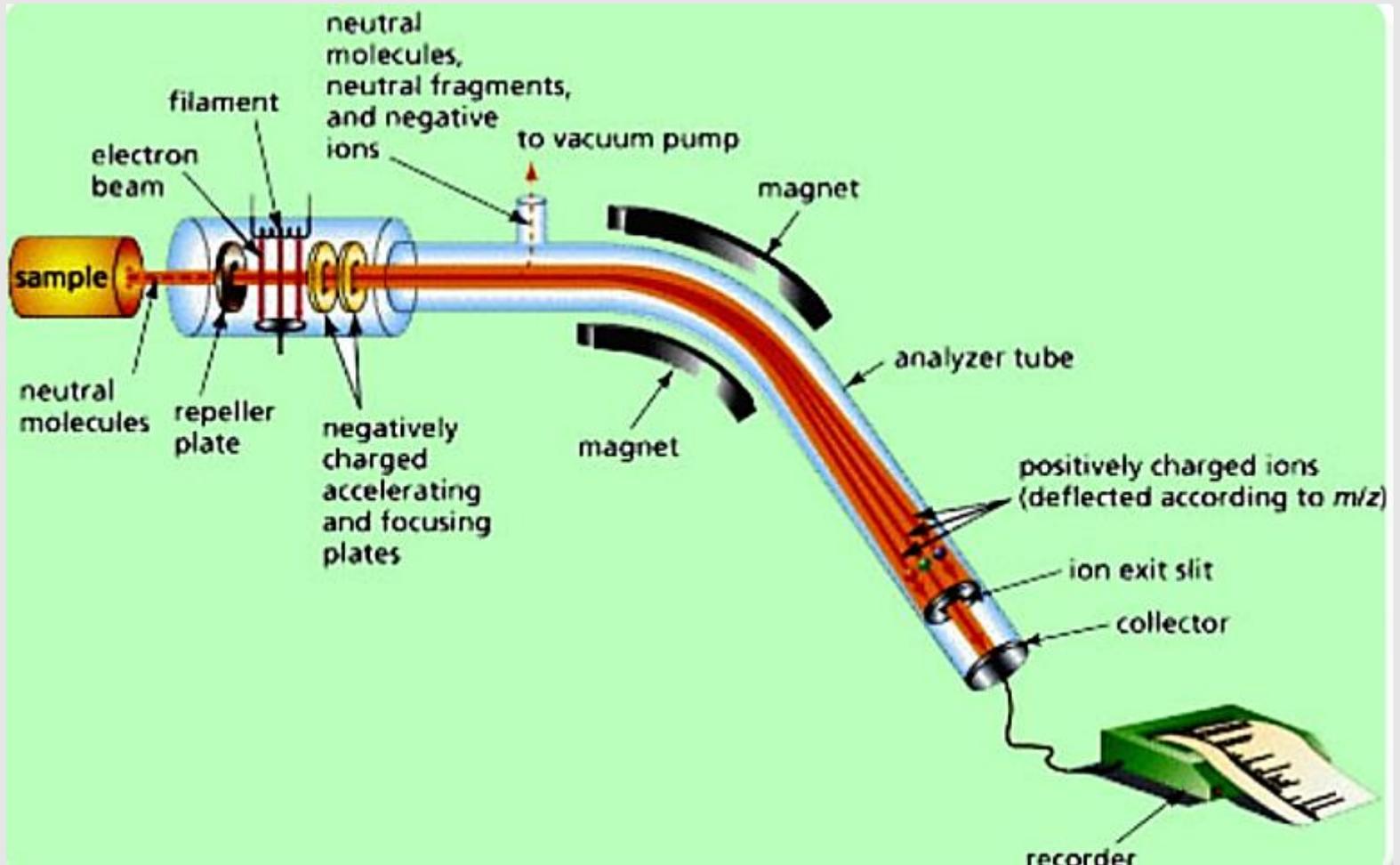


*Fragmentação*

Estes fragmento apresentam cargas e são desviados por campos elétricos e magnéticos de acordo com sua relação massa/carga o que permite sua identificação.

A análise realizado com esta técnica de espectrometria de massas pode ser simplificado em quatro etapas:

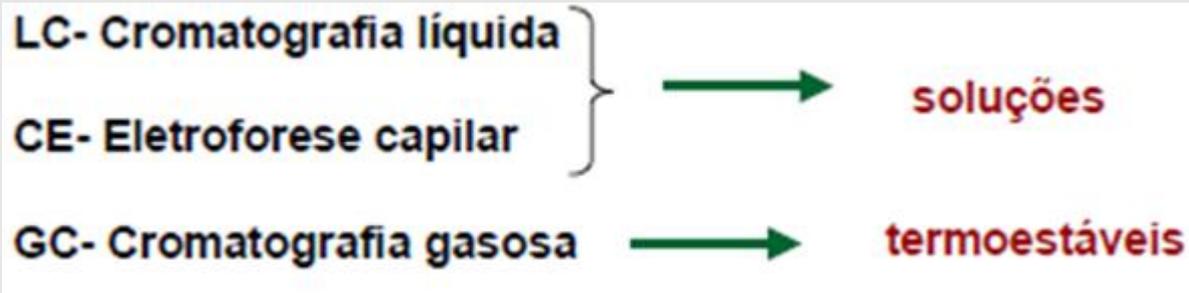
- Ionização da amostra.
- Aceleração dos ions por um campo elétrico.
- Dispersão dos ions de acordo a sua massa/carga.
- Detecção dos ions e registro da sinal.



## Sistemas de entrada da amostra.

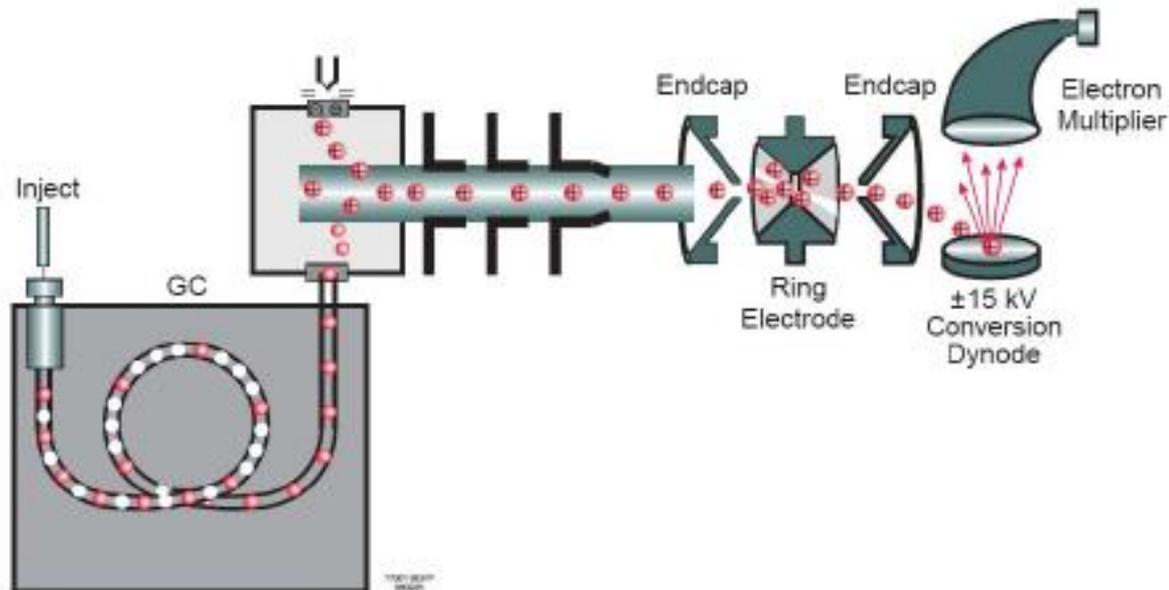
- **Sistemas indiretos:** A metodologia mais simple, na qual a amostra é volatilizada externamente e se introduz na zona de ionização a baixa pressão.
- **Entrada por sonda:** Líquidos e sólidos no voláteis se introduzem na câmara de ionização mediante un soporte ou sonda.
- **Sistemas acoplados:** A entrada é realizada utilizando uma unidad cromatográfica (de gases (CG) ou de líquidos (HPLC) o columnas de electroforesis capilar) que permitem a separação dos componentes de misturas complexas antes de serem ionizados .

# Sistemas acoplados



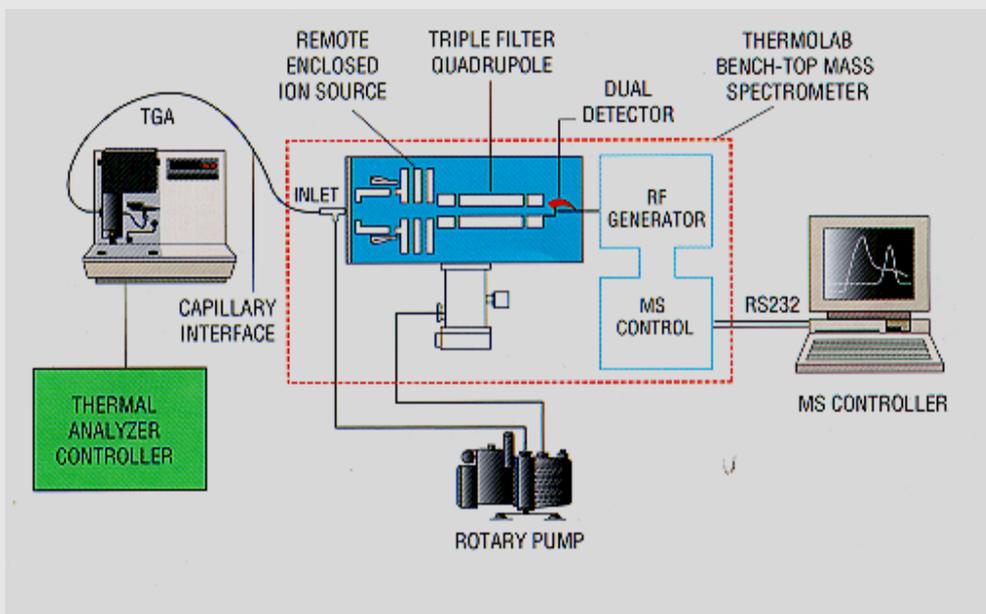
## GC- Cromatografia gasosa

(Compostos voláteis e termoestáveis)



## *Outras alternativas de sistemas acoplados: SDT- MS*

*- Estudo do processo de degradação térmica de amostras não voláteis (polímeros).*



# Métodos de ionização

<b>Nome</b>	<b>Tipo de ionização</b>
<b>Impacto eletrônico(EI)</b>	<b>Elétrons</b>
<b>Ionização química (CI)</b>	<b>Íons gasosos reativos</b>
<b>Ionização por campo (FI)</b>	<b>Eletrodo com alto potencial</b>
<b>Dessorção por campo (FD)</b>	<b>Eletrodo com alto potencial</b>
<b>Ionização por eletronebulização (ESI)</b>	<b>Campo elétrico elevado</b>
<b>Dessorção-ionização com laser auxiliada por matriz (MALDI)</b>	<b>Feixe de laser</b>
<b>Dessorção por plasma (PD)</b>	<b>Fragmentos de fissão</b>
<b>Bombardeio com átomos rápidos (FAB)</b>	<b>Feixe atômico energético</b>
<b>Espectrometria de massas de íons secundários (SIMS)</b>	<b>Feixe de íons energéticos</b>
<b>Ionização por termonebulização (TS)</b>	<b>Alta temperatura</b>

- **Impacto eletrônico (EI)**
- **Ionização química (CI)**
- **Ionização por eletronebulização (ESI)**
- **Dessorção-ionização com laser auxiliada por matriz (MALDI)**

**EI**

**CI**

**Métodos agressivos de ionização  
(fragmentos podem não ser detectados)**

**ESI**

**MALDI**

**Métodos suaves de ionização**

### **Ionização por impacto de elétrons.**

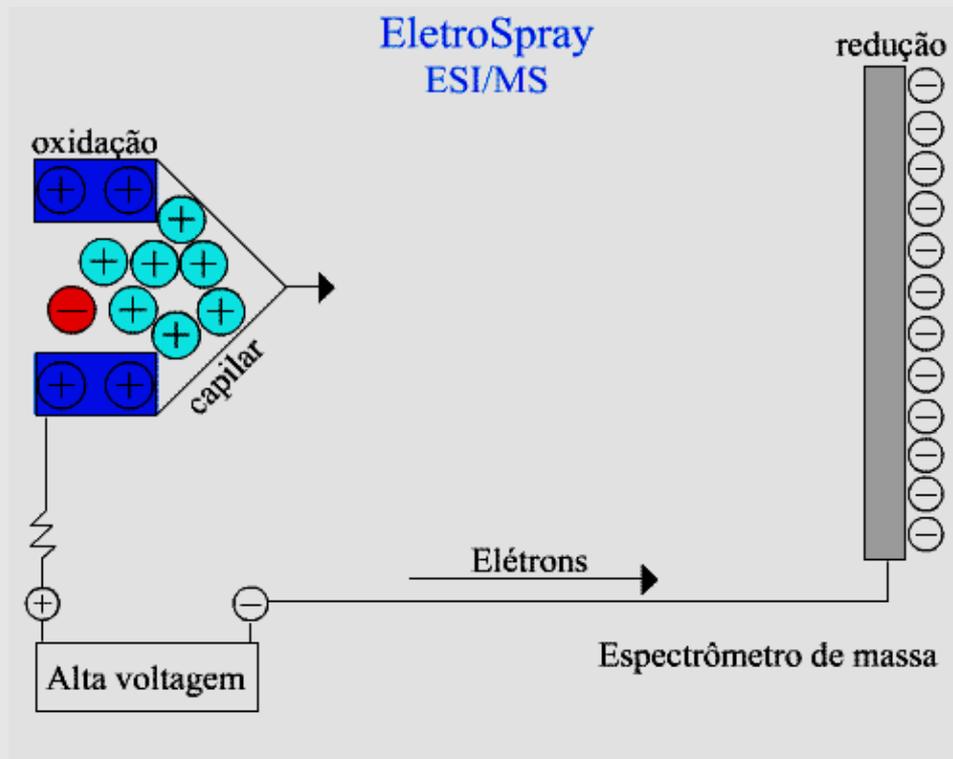
O impacto eletrônico é o método de ionização mais usado. Um fecho gerado por um filamento de tungstênio ou de rênio ioniza as moléculas da amostra.

### **Ionização química.**

Na ionização química uma pequena quantidade de gás é ionizada. Este gás reativo e bombardeado a amostra e origina por colisão a ionização desta. Alguns dos gases reativos mais utilizados são metano, oxigênio, amônia e hidrogênio.

## • Ionização por eletronebulização (ESI)

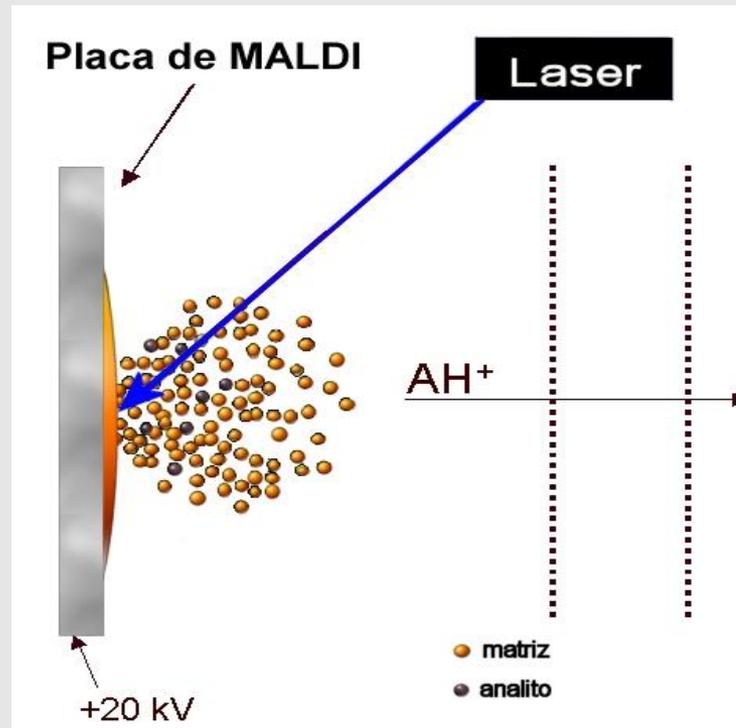
- Adequado para análise de moléculas termolábeis, como proteínas.
- Ionização ocorre pela nebulização de gotículas (nanolitros) de uma solução em um campo elétrico intenso, formando gotículas altamente carregadas.



- Permite a detecção de compostos de alta massa molar .
- Permite o controle de fragmentações.

# •Dessorção-ionização com laser auxiliada por matriz “MALDI”(Matrix Assisted Laser Desorption Ionization).

- A amostra é misturada com uma matriz que absorva a radiação UV.
- A matriz absorve energia do laser o que causa sua volatilização junto com a volatilização da amostra



## Analisadores de Massa

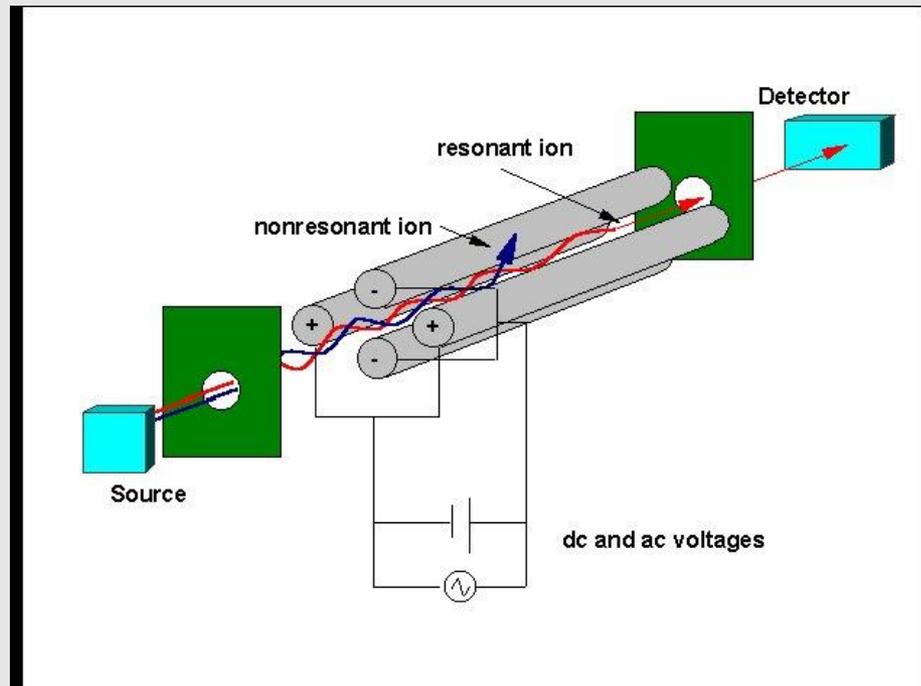
O objetivo do analisador de massas é separar os íons que são produzidos na fonte de acordo com as diferentes relações de massa/carga.

Alguns dos “designs” mais comuns de analisadores são;

- Quadrupolo.
- Setor magnético.
- Tempo de voo (TOF).

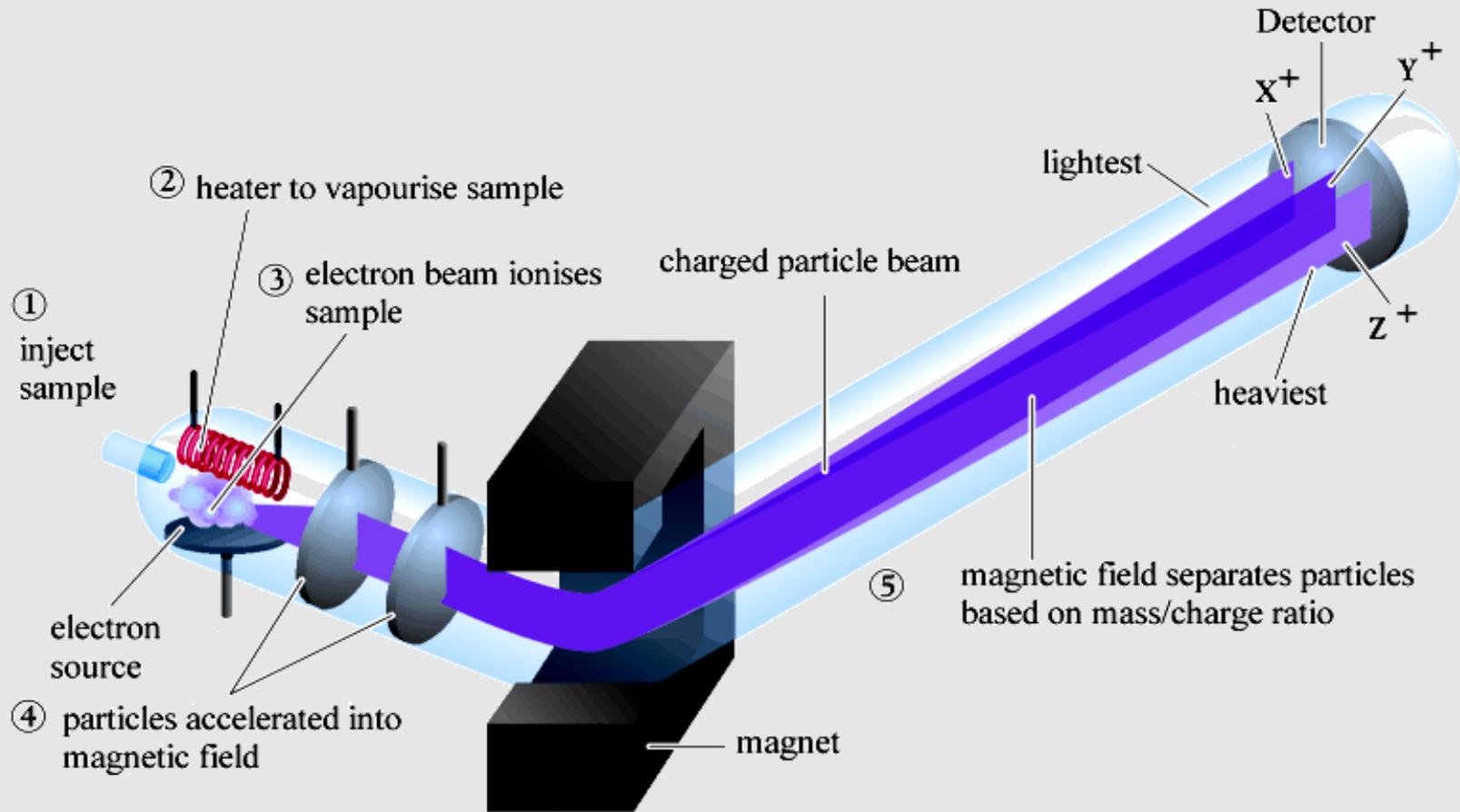
## •Analizador de massa: Quadrupolo.

- **Quatro eletrodos**, dois positivos e dois negativos.
- A voltagem aplicada afeta a trajetória de íons passando através dos eletrodos. Para uma dada condição de corrente e voltagem, **somente íons com uma determinada razão massa/carga** seguem o trajeto entre os tubos, e todos os outros são **desviados** para fora.
- O espectro de massas se obtém variando gradualmente a corrente e voltagem para detectar-se todos os íons presentes.



**Resolução: separa íons com diferenças de 0.3 m/z**

## •Analizador de setor magnético.



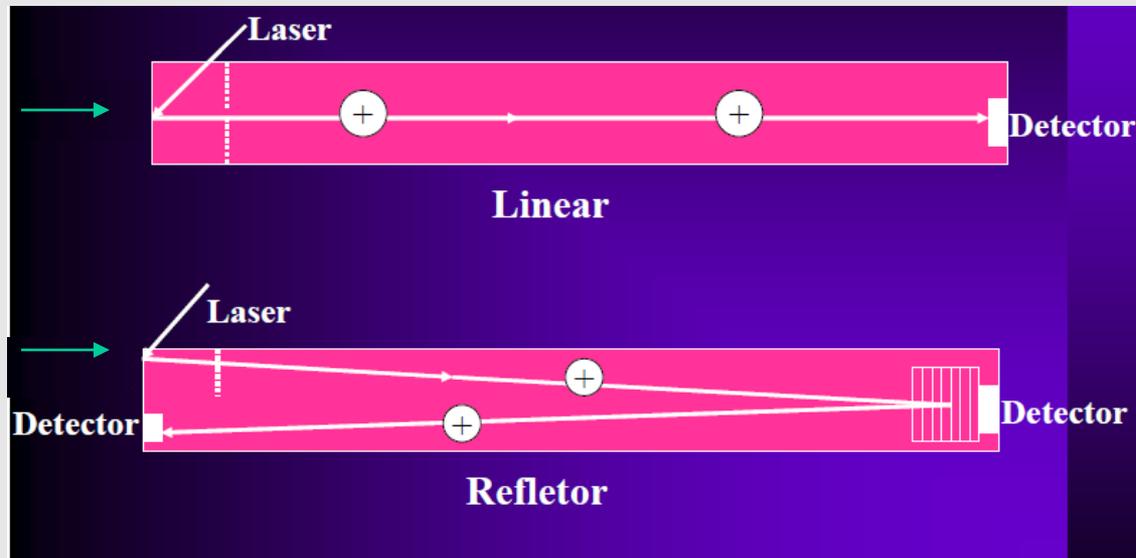
Os íons de diferentes massas são focalizados, formando um feixe, acelerados através de um campo magnético, sendo defletidos (desviados) de acordo com as massas dos íons.

## •Analizador Tempo de Vôo (TOF).

Mede o tempo que íons de diferentes massas levam desde a fonte de íons até o detector.

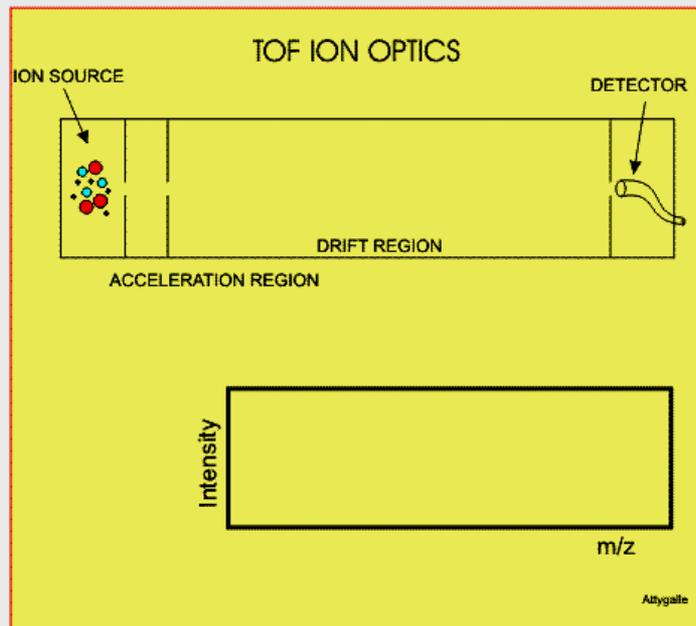
Íons menores chegarão primeiro ao detector.

Existem **dois tipos de analisadores TOF: linear e refletor.**



O princípio da espectrometria de massa por tempo de vôo é que **todos os íons são acelerados com a mesma energia.** Sendo **suas velocidades inversamente proporcionais às raízes quadradas de suas massas.**

Os íons da fonte são acelerados por um pulso de campo elétrico. As partículas aceleradas passam através de um tubo de vôo de um metro de comprimento.



A equação que governa a separação de íons por TOF é:

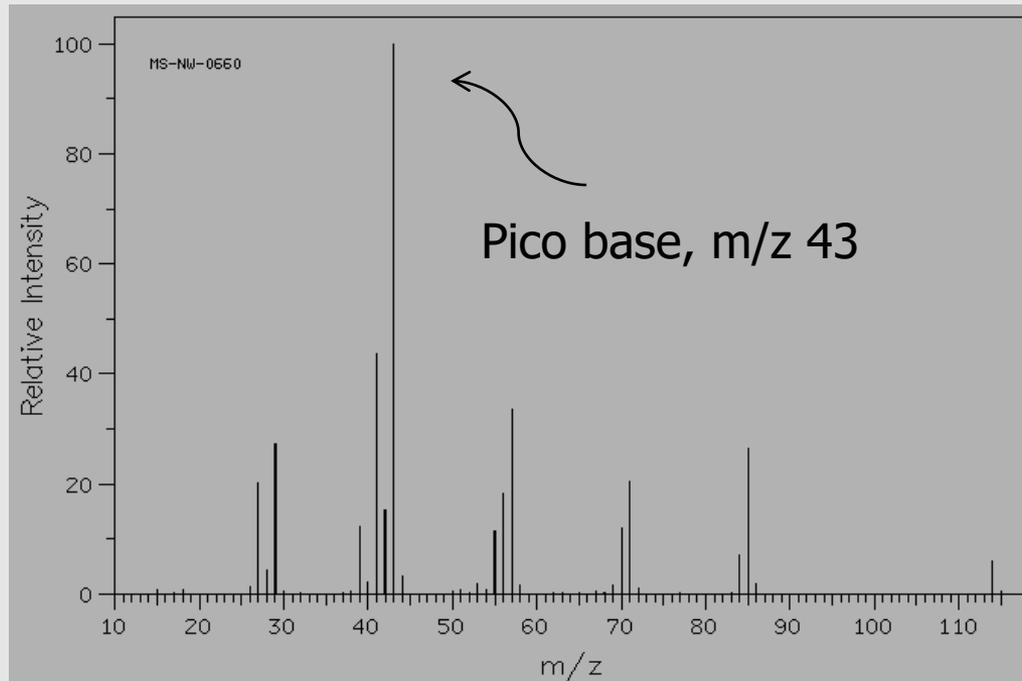
$$\frac{m}{z} = 2eEs \left( \frac{t}{d} \right)^2$$

$m/z$  razão massa/carga do íon  
 $E$  potencial do pulso de extração  
 $s$  comprimento do setor em que  $E$  é aplicado  
 $d$  comprimento do tubo de vôo  
 $t$  tempo de vôo do íon

- Ao contrário de outros analisadores não há limite superior de detecção de  $m/z$ .
- Élevada precisão, permitindo análise elementar.
- Pode fazer até 100 espectros por segundo.

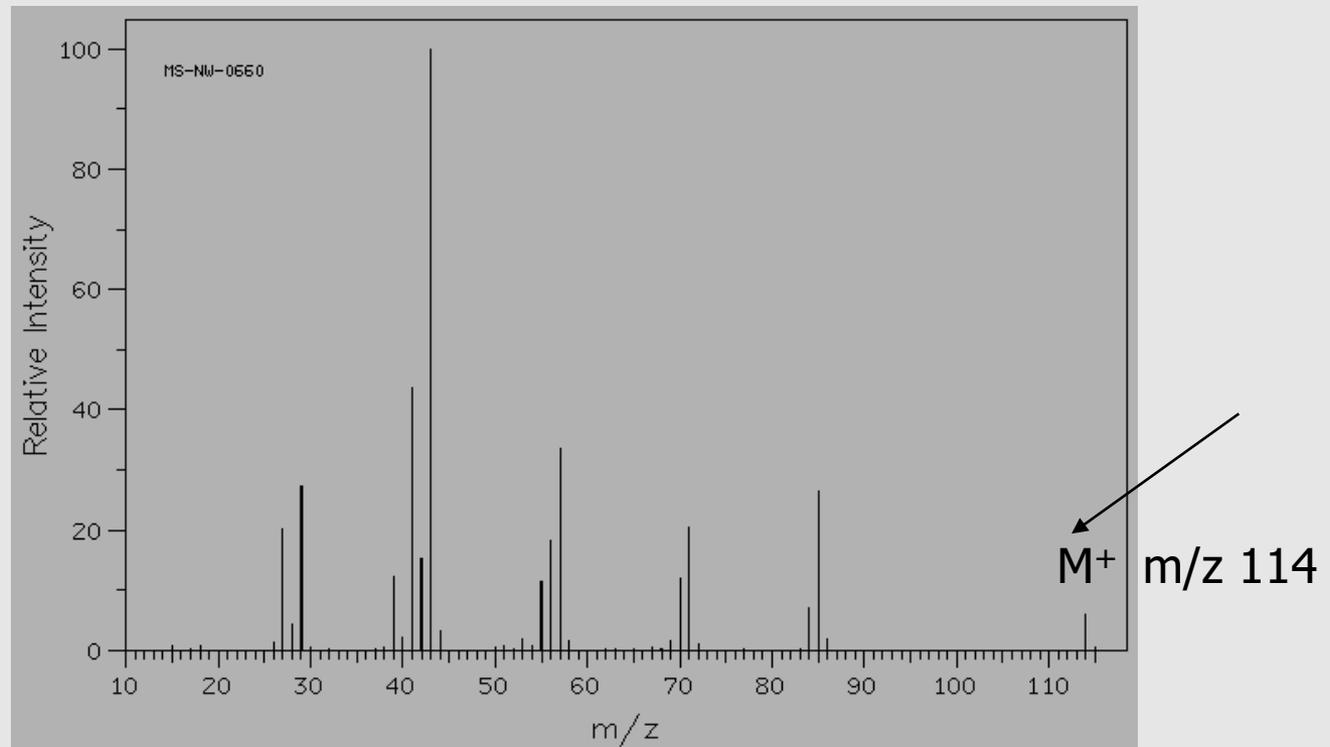
# Espectros de massa

1. O espectro de massas é apresentado na forma de um gráfico de linha que ilustra a abundância relativa de íons de massa  $m/z$ .
  - O íon mais abundante, formado durante o processo de ionização, dá origem ao pico mais intenso – **o pico base** do espectro.



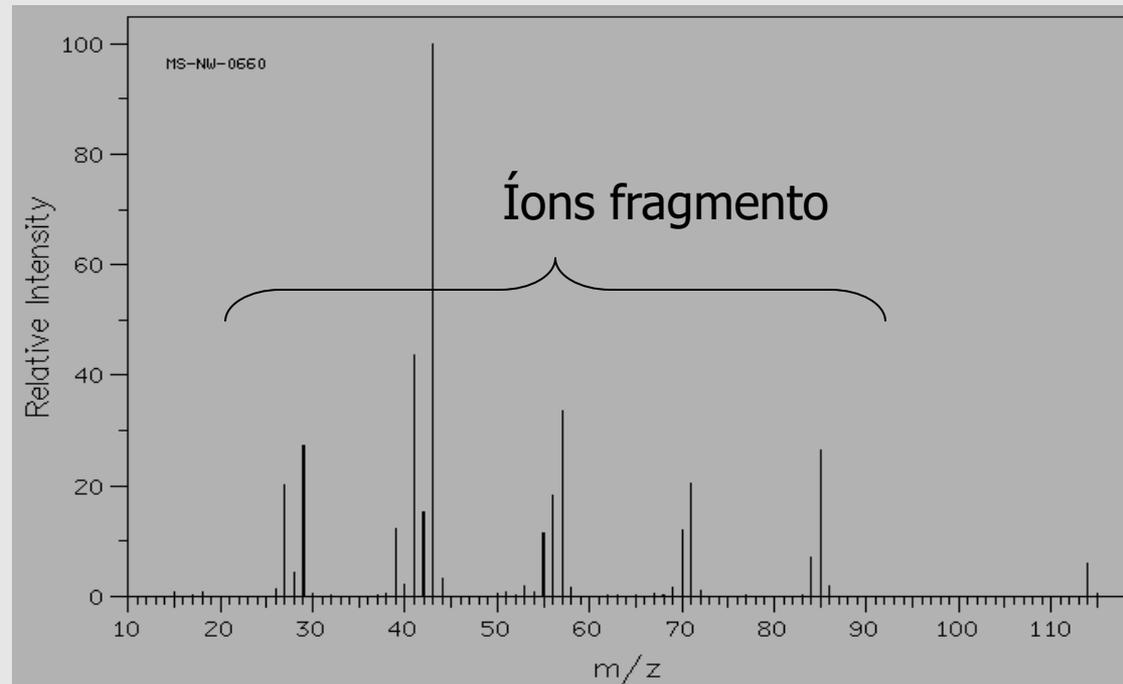
As intensidades de todos os outros picos do espectro são indicadas em relação (porcentagem) ao pico base.

2. Se a molécula da amostra perde somente um elétron durante o processo de ionização, observa-se o **pico do íon molecular** no espectro -  $M^+$



3. Quando a molécula da amostra perde um elétron de valência adquire uma energia suficiente alta, para que ocorram quebras de ligações covalentes, dando origem a fragmentos (íons) e moléculas menores .

  - O espectro de massas mostra além da presença do pico do íon molecular (quando este aparece) os picos dos íons fragmentos.



# Massa molar

1. Quando o pico do **íon molecular**  $M^+$  é observado, este indica a massa molar.
2. Como o átomo de carbono (C) é uma mistura de isótopos  $\rightarrow$  98.9%  $^{12}\text{C}$  (massa 12), 1.1%  $^{13}\text{C}$  (massa 13) e  $<0.1\%$   $^{14}\text{C}$  (massa 14);  
O espectrometro de massas irá indicar alem do pico  $M^+$  (constituído somente por átomos de  $^{12}\text{C}$ ) um pico de massa  $M + 1$

Algumas moléculas são muito “frágeis”, e seus picos de íon molecular  $M^+$  não são observados, pois se fragmentam rapidamente.

Para confirmar si o íon observado é o íon molecular pode-se diminuir a voltagem do feixe de elétrons (se a ionização é feita por impacto de elétrons)

O íon molecular devera:

- Apresentar um número ímpar de elétrons – cátion radical ( $M^{+\bullet}$ ).
- Estar ligado a outros íons-fragmento observando as regras básicas de fragmentação.

A **Regra do Nitrogênio** é outra maneira de se confirmar a presença do íon molecular.

1. Se a molécula da amostra apresenta um número ímpar de átomos de nitrogênio, deve necessariamente apresentar massa ímpar (pois o número de valência do N é ímpar)
2. Se a molécula da amostra apresenta um número par de átomos de nitrogênio, ou não tem átomos de nitrogênio em sua estrutura, sua massa deve necessariamente ser par.

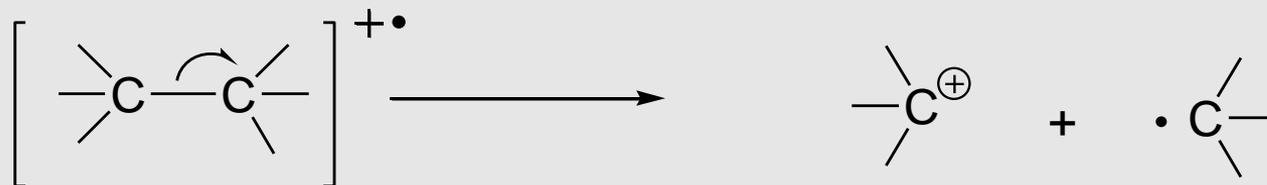
## Fragmentações.

- Se uma molécula permanece intacta entre a ionização e a sua detecção, período aproximadamente de  $10^{-5}$  segundos, será observado o seu pico  $M^+$ .
- Se uma molécula sofre quebra de ligações muito mais rápido, o íon molecular será muito menos intenso (podendo não surgir), levando apenas à formação de fragmentos.
- A fragmentação de moléculas que tem deficiência de 1 elétron ( $M^{\cdot+}$ ) resulta na quebra homolítica de ligações → um fragmento será um cátion e o outro será um radical.
- Somente íons carregados positivamente são observados; a perda de fragmentos neutros é inferida pela massa dos íons fragmento formados.
- Os processos de fragmentação podem estar acompanhados de reações que formam espécies mais estáveis do ponto de vista termodinâmico.

# Alguns exemplos de fragmentações...

## 1. Clivagem de ligações $\sigma$ :

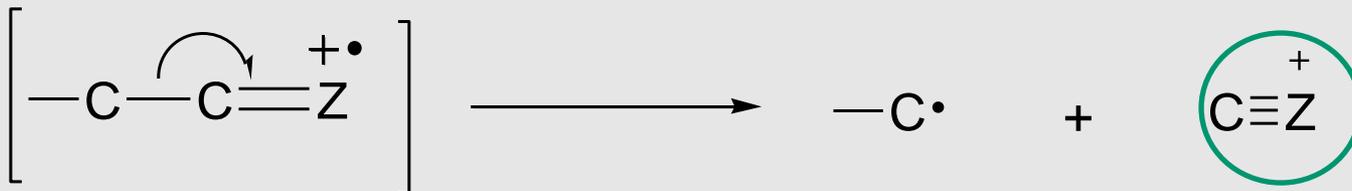
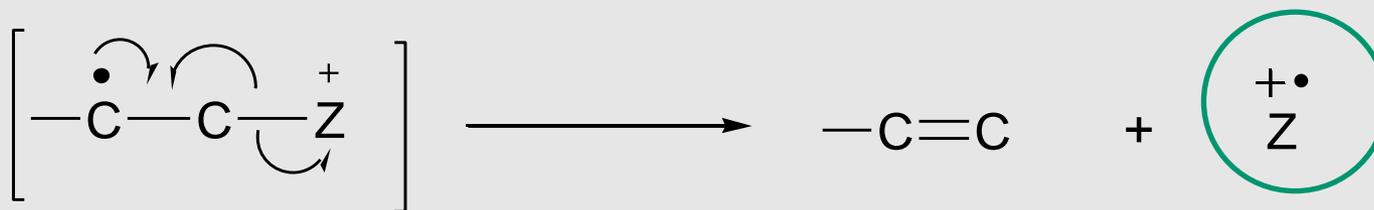
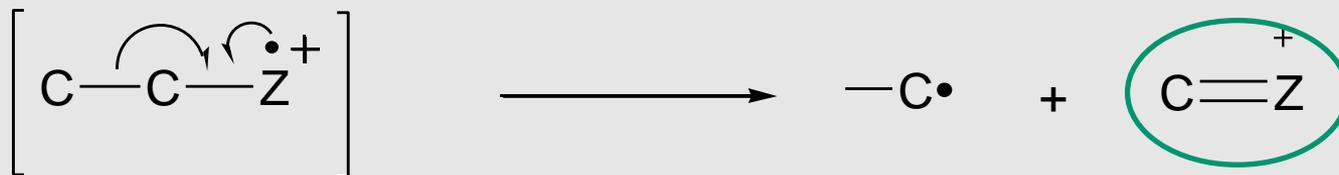
### a) Clivagem C-C



### b) Clivagem C-heteroátomo

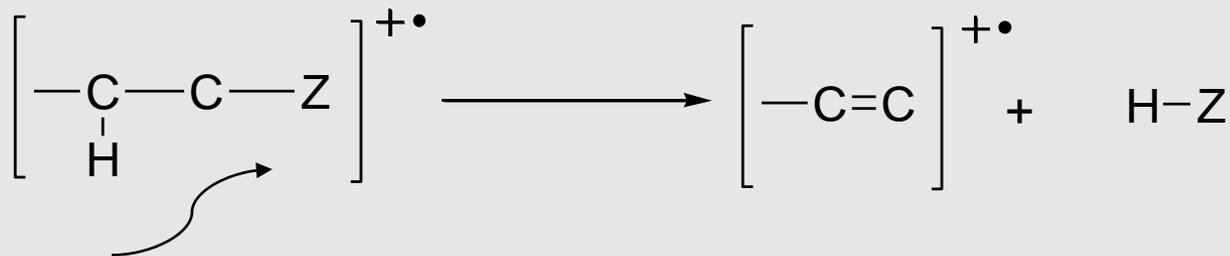


c) clivagem- $\alpha$  de C-heteroátomo

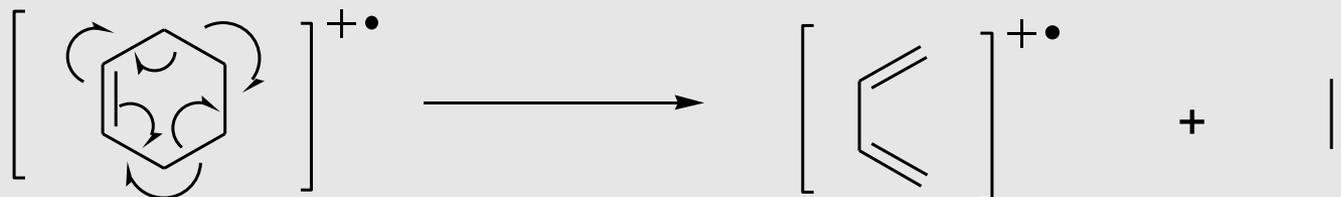


## 2. Rearranjos e clivagens- $\sigma$ de duas ligações:

- **Eliminação de H vicinal e de heteroátomo:**

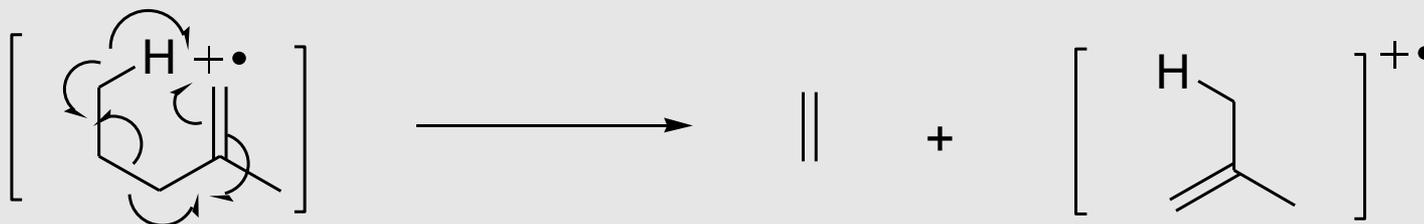


- **Retro-Diels-Alder**



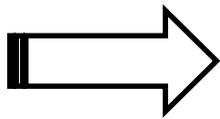
## 3. Rearranjos e clivagens-s de duas ligações :

- **Rearranjo de McLafferty**



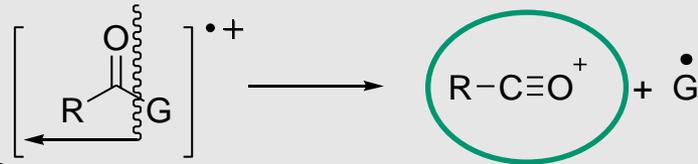
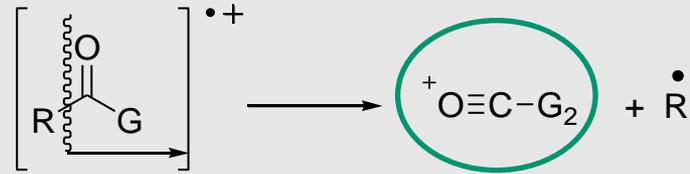
# Metodologia básica de análise

1. Identificação do íon  $M^+$  (caso seja detectado)
  - Intenso ou não?
  - Presença de isótopos?  $M+1$ ?  $M+2$ , 4, ...
  - Regra do nitrogênio: massa ímpar?
  - Presença de fragmento (pico)  $M-1$ ?
  - Presença de pico  $M-18$  ( $M-H_2O$ )?
3. Identificar fragmentos neutros a partir de  $M^+$   
( $H_2C=CH_2$ ,  $HC\equiv CH$ ,  $H_2O$ ,  $HOR$ ,  $HCN$ ,  $HX$ )
4. Presença de picos típicos no espectro (29, 30, 31, 45, 59, 77, 91, etc.)
3. Tendo uma **hipótese estrutural**, atribuir a estrutura os fragmentos observados no espectro de massas.

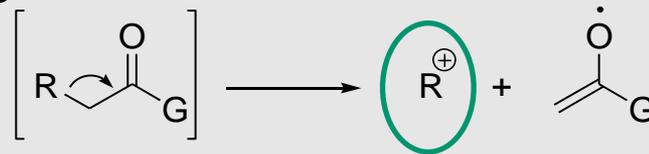


# Compostos carbonílicos (ex. PHAs) apresentam 4 modos principais de fragmentação:

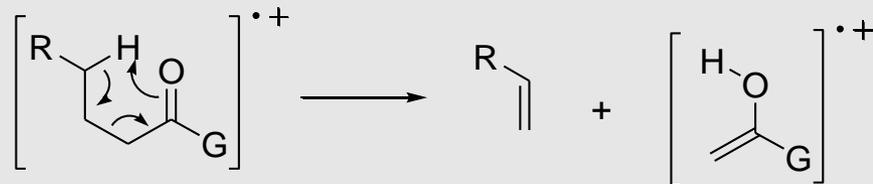
## ➤ Clivagens- $\alpha$ de ambos substituintes de carbonila



## ➤ Clivagem- $\beta$

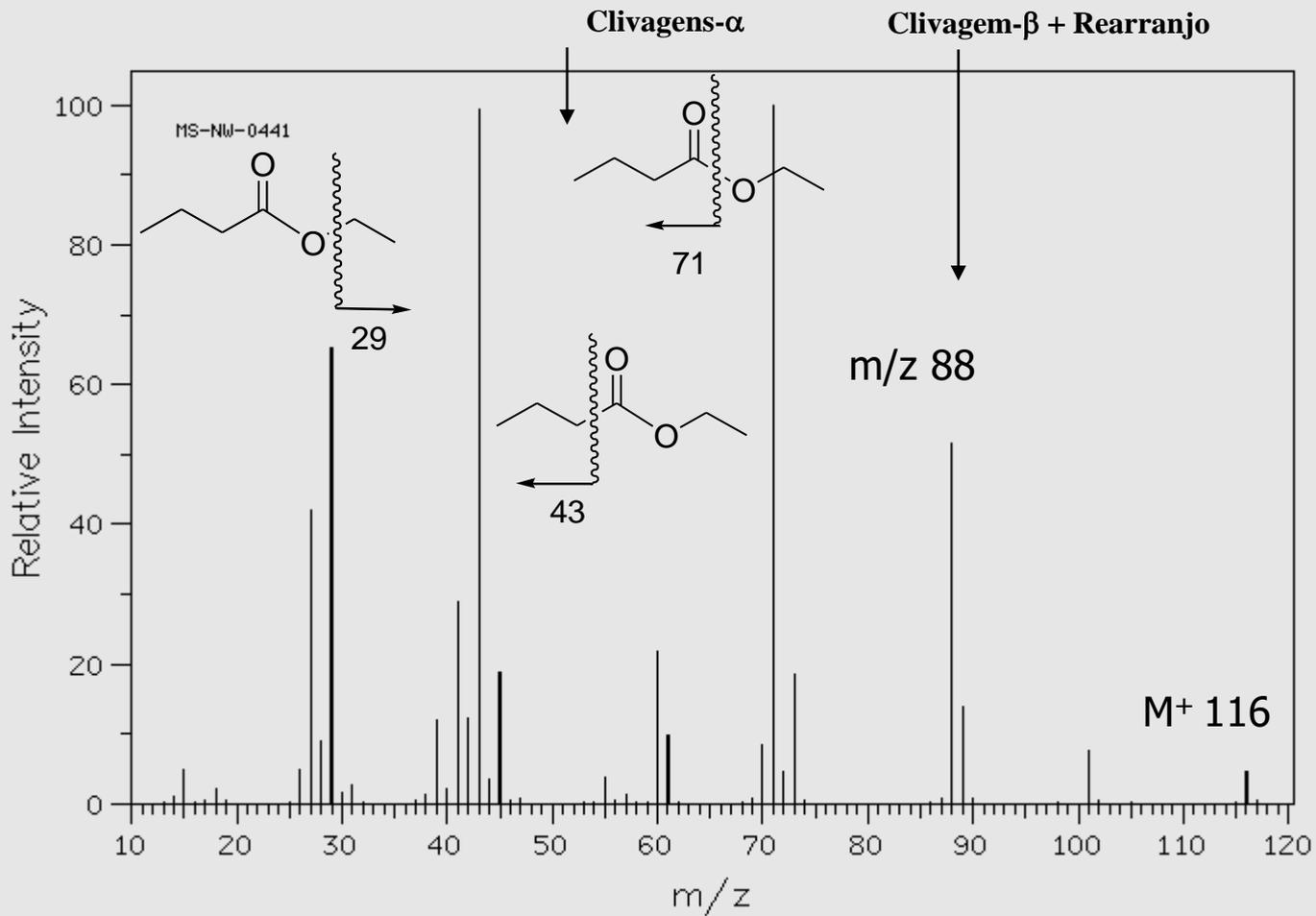
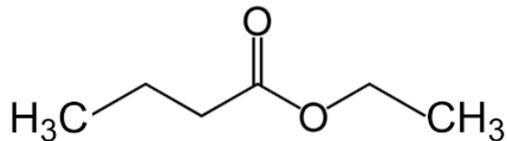


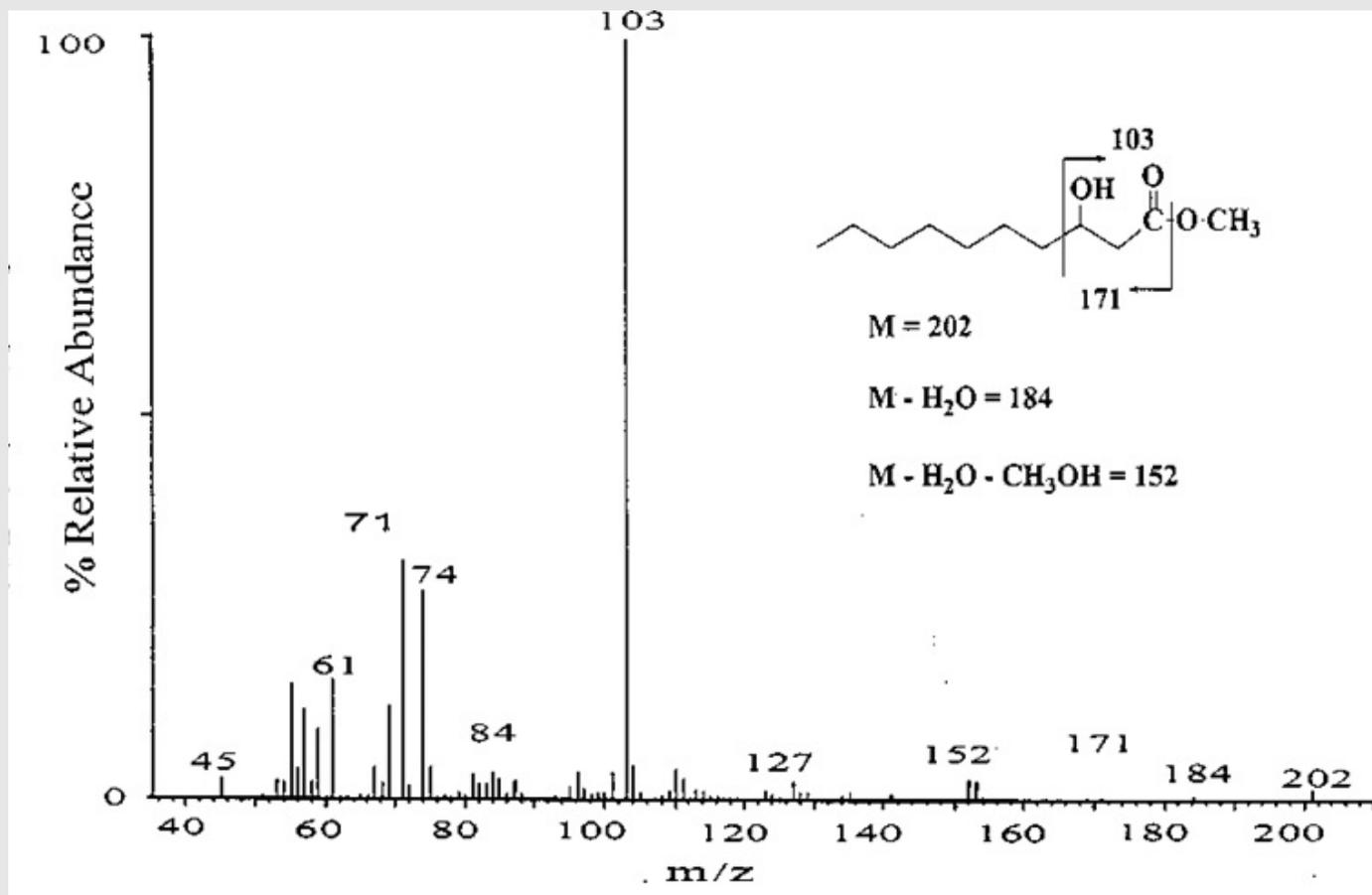
## ➤ Rearranjo de McLafferty



# Butirato de etila

Um dos ésteres responsáveis pelo aroma do suco do maracujá





Electron-impact mass spectrum of P3HB-methyl ester. The presence of an ion fragment with m/z 103 is indicative of a P3HB-methyl ester