

**COMPARANDO O DESEMPENHO DE DOIS ANALISADORES DE MASSAS (FT-ICR MS & LTQ MS): UMA AULA EXPERIMENTAL SOBRE ANÁLISE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS**

Marcos V. V. Lyrio<sup>a</sup>, Amanda E. Feu<sup>a</sup>, Larissa C. Motta<sup>a</sup>, Laura P. R. Figueroa<sup>a</sup>, Leonardo Boasquevisque<sup>a</sup>, Roberta T. Pinto<sup>a</sup>, Ana Caroline L. Rosa<sup>a</sup>, Heryson T. L. de Arantes<sup>a</sup>, Ramon R. T. Bottocim<sup>a</sup>, Victor da R. Fonseca<sup>a</sup>, Nayara A. Santos<sup>a</sup>, Valdemar Lacerda Jr.<sup>a</sup>, Eustaquio V. R. Castro<sup>a</sup> e Wanderson Romão<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Química, Universidade Federal do Espírito Santo, 29075-910, Vitória – ES, Brasil

<sup>b</sup>Instituto Federal do Espírito Santo, 29106-010 Vila Velha, ES, Brasil

Recebido em 25/06/2021; aceito em 09/09/2021; publicado na web em 13/10/2021

COMPARING THE PERFORMANCE OF TWO MASS ANALYZERS (FT-ICR MS & LTQ MS): AN EXPERIMENTAL CLASS ON ANALYSIS OF ORGANIC COMPOUNDS. Mass spectrometry (MS) is a high-performance analytical technique that allows a measurement of the mass/charge ( $m/z$ ) ratio of compounds present in a sample. MS is able to separate two  $m/z$  ions with determined values (mass resolution), being an important characteristic, especially in the analysis of biochemical components and complex mixtures. Mass analyzers define the resolving power and accuracy of different types of mass spectrometers. Herein, the performance of two mass analyzers (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FT-ICR) and quadrupole ion trap (LTQ)) was tested on low ( $M_w = 165-679$  Da) and high ( $M_w = 783-8.58$  kDa) molecular weight molecules (Phenacetin, Procaine, Benzocaine, Caffeine anhydrous, Lidocaine, two metal porphyrin standards, the first cobalt and the second vanadium, and two protein standards, Ubiquitin and Beauvericin), and finally, for an oil sample. LTQ-MS and FT-ICR-MS had similar performance and high reproducibility. However, the mass accuracy and resolution power of the FT-ICR (error lower than 5 ppm and RP higher than 400,000) was higher, being therefore, it was more suitable for the analysis of proteins and oil, for instance. On the other hand, the CID analysis via LTQ demonstrated its applicability in fragmentation experiments, being able to determinate the chemical connectivity of organic compounds in non-complex mixtures.

Keywords: mass spectrometry; FT-ICR; quadrupole-linear ion trap; ultra-high resolution; electrospray.

## INTRODUÇÃO

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica que consiste na ionização de moléculas seguida pela separação dos íons com base em suas diferentes razões massa/carga ( $m/z$ ) para posterior detecção, resultando no espectro de massas.<sup>1</sup> Essa técnica combina a capacidade de detectar, contar e identificar compostos, além de permitir a elucidação estrutural (experimentos de *collision induced dissociation* (CID), por exemplo).<sup>1,2</sup> A MS é uma técnica de alta sensibilidade e seletividade, e por isso, muito utilizada em diversas áreas da ciência, como nas ciências ômicas,<sup>3-5</sup> química forense,<sup>6,7</sup> análise de bebidas e alimentos,<sup>8-11</sup> e em áreas médicas.<sup>12,13</sup>

A MS por infusão direta (isso é, sem hifenadas com técnicas de separação como a LC (cromatografia líquida, do inglês *liquid chromatography*) e GC (cromatografia gasosa, do inglês *gas chromatography*) é capaz de identificar um analito específico na presença de outros com base em sua medida da  $m/z$ , desde que os analitos não sejam isômeros.<sup>14</sup> Nesse sentido, a escolha do analisador interfere de forma significativa no poder de resolução (PR), limite de massas, erro de massas (erro) e preço do equipamento. A resolução ou poder de resolução consiste no valor da  $m/z$  observada dividida pela largura do sinal a 50% da altura e está relacionado com a capacidade do analisador de distinguir dois sinais com  $m/z$  muito próximos. Dessa forma, uma maior resolução corresponde a melhor distinção entre os sinais. O erro de massas está associado a diferença entre a massa experimental e a massa teórica da molécula.<sup>15</sup> Em função disso, a medida precisa da massa demanda de maior resolução para garantir que apenas um único componente contribua para o sinal no espectro. Assim, a confiabilidade de sua determinação pode estar relacionada

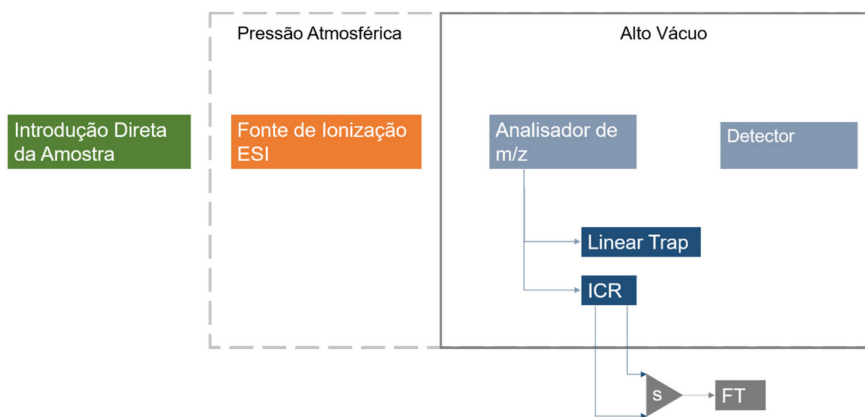
diretamente com a resolução do sinal.<sup>14</sup> Entretanto, a exatidão de massas pode ser melhorada com o auxílio de um calibrante externo (de massa exata conhecida), isso é, um dopante que é adicionado na solução, ou no processo de ionização.

A Figura 1 apresenta as cinco etapas básicas do funcionamento de um espectrômetro de massas<sup>15,16</sup> que são: (1) introdução da amostra; (2) ionização das moléculas/acúmulo dos íons; (3) passagem de um íon por um analisador de massas que separa os íons de acordo com a  $m/z$ ; (4) o detector: que faz a contagem dos íons e transforma o sinal em corrente elétrica ou um sensor que percebe a órbita dos íons; e (5) o processador: que converte o sinal elétrico em função da  $m/z$  ou a transformada de Fourier que desdobra frequências em dados gerando o espectro de massas.

Entre os componentes de um espectrômetro de massas, sem dúvida o analisador de massas é quem dita o preço do instrumento. Os analisadores de massas funcionam de diferentes formas, entretanto, um parâmetro em comum a eles é o poder de resolução e exatidão de massas. Os analisadores possuem resolução que vão de 1.000 (resolução unitária), 100.000 (alta resolução) até 1.000.000 (altíssima resolução), podendo chegar a 10.000.000. A exatidão de massas é normalmente citada em partes por milhão (ppm).<sup>17</sup>

Entre os analisadores de baixa resolução, isso é que vão até 1.000, destaca-se o analisadores do tipo *ion trap* (3D ou linear, LTQ). Eles operam de forma similar ao quadrupolo, entretanto, ao invés dos íons realizarem uma trajetória através do eletrodo quadrupolar, eles são aprisionados dentro dele. As primeiras patentes instrumentais que originaram estes analisadores surgiram na década de 1950, com o trabalho de Wolfgang Paul, vencedor do Prêmio Nobel de 1989. Sua patente em 1954 foi de um quadrupolo bidimensional - um arranjo com quadro eletrodos longos com seção transversal hiperbólica nos quais a tensão elétrica em radiofrequência é aplicada - e seu

\*e-mail: wandersonromao@gmail.com



**Figura 1.** Esquema ilustrativo dos componentes básicos de um espectrômetro de massas, destacando a fonte de ionização electrospray ionization (ESI) e os analisadores de massas (LTQ e ICR) utilizados nesse artigo

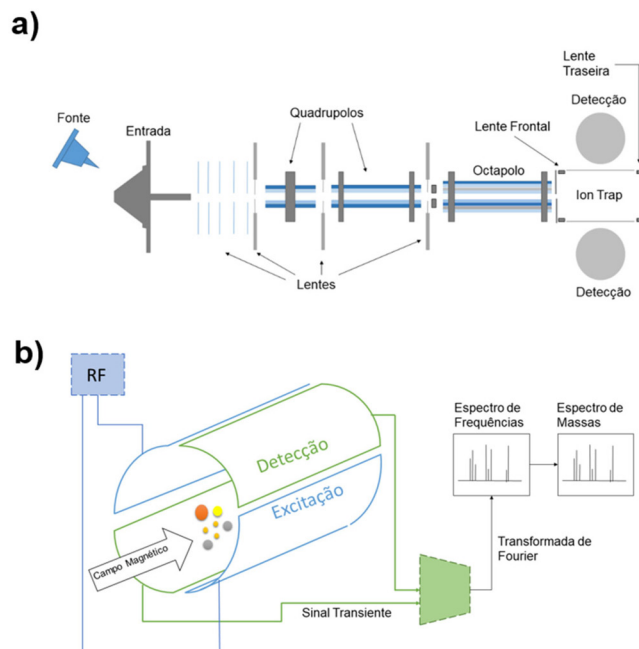
análogo 3D, em que o campo quadrupolo existe nas três dimensões.<sup>18</sup> O *Ion trap* (IT) é um dispositivo que usa um campo elétrico e radiofrequência oscilante para armazenar íons. Na configuração 2D os íons são aprisionados na direção radial pelo campo oscilante, e na direção longitudinal pelo campo DC. Na configuração 3D, o aprisionamento longitudinal também é feito pelo campo oscilante.<sup>18,19</sup> Em comparação com o *3D trap*, o *ion trap* linear possui maior eficiência de injeção de íons e maior capacidade de armazená-los.

O *Ion trap* (IT) é um dispositivo que usa um campo elétrico e radiofrequência oscilante para armazenar íons. São comumente vistos como um quadrupolo “dobrado” onde um eletrodo hiperbólico circular é colocado entre dois eletrodos hiperbólicos. O analito é ionizado na fonte, passando pelas lentes *skimmer*, e pelos quadrupolos e um octapolo (que funcionam por RF), e chega no analisador, que é composto com duas lentes (frontal e traseira), que controla a quantidade de íons, e uma câmara de trapeamento linear. No analisador quadrupolar, potenciais elétricos são adaptados afim de selecionar os íons a partir da sua razão  $m/z$ , os íons que estão em movimentação são esfriados por gás inerte diminuindo sua energia cinética, e com isso os fazendo “viajar” no eixo axial (eixo  $z$ ) dentro do quadrupolo e indo para o sistema de detecção (Figura 2a).<sup>18,20</sup>

Diferentemente do analisador LTQ, os espectrômetros com analisadores que se baseiam no princípio de ressonância para a separação dos íons, como o de ressonância ciclônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR), possuem altíssima resolução e exatidão de massas (poder de resolução,  $m/\Delta m_{50\%} > 100\,000$  até  $10\,000\,000$  e erro de massas menor do que 1 ppm), porém, são mais difíceis de operar e apresentam alto custo, tanto na instalação quanto na manutenção.<sup>2,14</sup> Por outro lado, analisadores do tipo quadrupolo Ion Trap 3D ou linear são mais robustos, compactos, de fácil manuseio, muito sensíveis, permitem a realização de experimentos de multiestágio de fragmentação ( $MS^n$ ) e apresentam menor custo quando comparados ao FT-ICR. Porém, eles apresentam baixa resolução e baixo limite de massas.<sup>15</sup>

Os analisadores de massas baseados em FT (transformada de Fourier) usam principalmente a frequência de oscilação de um íon no campo magnético ou eletrostático, para a determinação da  $m/z$  de um determinado íon. Ao aplicar a transformada de Fourier os espectros são gerados em domínios de frequência que, através de equações matemáticas, são transformados em domínio de  $m/z$ . Além disso, eles fornecem a resolução e exatidão de massas necessárias para atribuir fórmulas moleculares aos íons detectados.<sup>17,21</sup>

O FT-ICR MS foi desenvolvido na década de 70 e emprega o movimento circular de íons sob campos magnéticos. Um magneto supercondutor cria um campo magnético uniforme de alta intensidade  $[B]$  fazendo com que os íons girem em uma órbita em torno do campo.



**Figura 2.** (a) Esquema geral do espectrômetro de massas Ion trap LTQ-XL, Thermo Scientific<sup>10</sup> e (b) representação esquemática de uma cela de FT-ICR MS e do movimento ciclônico do íon e da excitação dos íons através do campo elétrico

Esse campo magnético submete os íons em movimento a uma força dada pela Equação 1.<sup>22</sup>

$$F = qv \times B \quad (1)$$

em que  $q$  representa a carga do íon e  $v$  a velocidade do íon. O campo magnético atua sobre os íons, que se movimentam em uma trajetória circular  $r$ , denominado de movimento ciclônico. A equação ciclônica está descrita na Equação 2 como:<sup>22</sup>

$$\omega_c = qB/m \quad (2)$$

em que  $\omega_c$  é a frequência ciclônica, e  $m$  corresponde à massa do íon. Analisando essa equação, nota-se que os íons que apresentarem mesma relação  $m/z$  terão uma frequência ciclônica igual, independente de suas velocidades.

Em seguida, é feito um registro das correntes induzidas pelo movimento de íons perto das placas de detecção, em função do tempo (transiente). A alta resolução do instrumento está diretamente

relacionada ao tempo durante o qual o sinal transiente é gravado após a excitação dos íons e à intensidade do campo magnético, que aumenta a frequência ciclôtrônica.<sup>22</sup> O domínio de tempo do transiente é convertido em domínio de frequência com aplicação de equações da transformada de Fourier para gerar o espectro de massas conforme ilustra a Figura 2b.

Os analisadores de massas são incapazes de trabalhar com moléculas neutras, dessa forma torna-se necessário a ionização da molécula para que seja possível a interação dela com os seus respectivos campos magnéticos e elétricos.<sup>2,15</sup> Dentre as inúmeras formas disponíveis, a técnica de ionização por *electrospray* (ESI) pode fornecer três tipos de íons de acordo com os processos químicos que ocorrem no interior do capilar. São eles: os íons moleculares ( $M^{+}$ ) ou ( $M^{-}$ ) gerados através de reações redox, as moléculas protonadas ( $[M + H]^{+}$ ) em função da afinidade protônica ou desprotonadas ( $[M + H]^{-}$ ) por meio de reações ácido-base de Brønsted-Lowry, e moléculas cationizadas ( $[M + Na]^{+}$ ,  $[M + K]^{+}$ ) ou anionizadas ( $[M + Cl]^{-}$ ) decorrentes da coordenação com cátions ou ânions, respectivamente. O ajuste das condições e dos parâmetros experimentais, como a natureza do solvente empregado, pH e a voltagem do cone de amostragem, podem contribuir para um maior controle da extensão desses processos químicos.<sup>23</sup>

Sendo assim, o presente trabalho, que foi fruto de uma aula experimental, tem como objetivo avaliar, comparar e identificar as principais diferenças entre o equipamento *Ion Trap Linear* e o FT-ICR MS no que tange a resolução, erro de massas, e aspectos peculiares referentes às características de ionização e formação dos espectros obtidos para algumas amostras de baixa massa molar e complexidade (padrões de fármacos, peptídeo, e metalporfirinas) até amostras mais complexas como proteína e de petróleo.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Preparo das amostras

Analisaram-se cinco padrões de fármacos: Fenacetina (Sigma Aldrich®, EUA), Procaína (farmácia e manipulação Espírito Santo, Brasil), Benzocaína (farmácia e manipulação Espírito Santo, Brasil), Cafeína anidra (Vetec, Brasil), Lidocaína (Sigma Aldrich, EUA); dois padrões de porfirinas metálicas, o primeiro deles de cobalto e o segundo de vanádio (Sigma Aldrich, EUA); um padrão de proteína, Ubiquitina (Sigma Aldrich, EUA); um padrão de peptídeo, Beauvericina (Sigma Aldrich, EUA) e uma amostra de petróleo. Tolueno (grau HPLC – Applichem), da marca ATQ Lichen®, acetonitrila (ACN grau HPLC) da marca Neon® foram os solventes utilizados no preparo da amostra.

Para a preparação de cada uma das amostras padrões de fármacos, porfirinas e proteínas analisadas, utilizou-se 1 mg de analito, por meio da ponta de um capilar de ponto de fusão, para dissolução em 1 mL de acetonitrila e água 50:50 v/v%.

Para a amostra de petróleo, pesaram-se 8 mg, utilizando capilar de ponto de fusão e um *vial* de volume de 4 mL. Após a pesagem, a amostra foi dissolvida em 4 mL de Tolueno (grau HPLC), na concentração de 2 mg/mL, e posteriormente, uma alíquota de 1 mL foi diluída com 1 mL de metanol (grau HPLC) dopado com 10 µL de ácido fórmico para auxiliar na protonação dos compostos. A calibração externa foi realizada com padrão de Arginina ( $m/z$  200-1200).

### Equipamentos

#### ESI(+)FT-ICR MS

A análise de espectrometria de massas foi realizada no FT-ICR MS modelo 9,4T Solarix (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) acoplado a uma fonte de *electrospray* (ESI) configurada para operar no modo positivo de ionização, ESI(+), sob faixa de massas entre

de  $m/z$  154-1500 para a benzocaína, fenacetina, cafeína, lidocaína e procaína;  $m/z$  154-2500 para ubiquitina; e  $m/z$  202-1500 para beauvericina, petróleo e porfirinas de vanádio e de cobalto. As condições de operação da fonte ESI foram: pressão do gás nebulizador de 2,0 bar temperatura do gás de secagem de 200 °C, voltagem do capilar de 4,2 kV para a ubiquitina e petróleo; 4,1 kV para lidocaína, beauvericina e porfirina vanádio; e 3,9 kV para as demais, e tempo de acumulação de íons de 0,005 s para fenacetina, lidocaína; 0,010 s para benzocaína, cafeína, procaína, ubiquitina beauvericina, e porfirinas, e 0,040 s para o petróleo. Os espectros de ESI(+)FT-ICR MS foram adquiridos acumulando 8 varreduras de sinais transitórios no domínio do tempo em conjuntos de dados de 4 mega pontos. Os espectros foram calibrados externamente com uma solução padrão de arginina sob uma faixa de massas de  $m/z$  154-2000, tempo de acumulação de íons de 0,005 s e voltagem do capilar de 3,0 kV.

Os espectros FT-ICR MS foram adquiridos e processados usando o programa *Compass Data Analysis*® (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), onde determinaram-se o erro de massas, a resolução e a composição elementar a partir dos valores de  $m/z$ , fixando um erro máximo de 2 ppm. O espectro de massas do petróleo foi processado usando o programa *Composer*, versão 1.0.6 (Sierra Analytics, Modesto, CA, EUA) para a identificação dos constituintes, número de sinais atribuídos, classe de compostos e DBE (distribuição equivalente de dupla ligação) versus CN (número de carbonos).

Os graus de insaturação para cada molécula foram deduzidos diretamente de seus valores de DBE de acordo com a equação 3.

$$DBE = [IV] - [I]/2 + [III]/2 + 1 \quad (3)$$

Em que I representa átomos monovalentes (como hidrogênio, cloro, bromo e iodo), III representa átomos trivalentes (como nitrogênio e fósforo) e IV representa átomos tetravalentes, como o carbono.

A acurácia de massas foi definida com base no erro de massas, calculado via *software*, a partir da equação 4.

$$\text{Erro} = [(M_{\text{medido}} - M_{\text{teórico}})/M_{\text{teórico}}] \times 10^6 \quad (4)$$

#### ESI(+)LTQ MS

Usou-se um espectrômetro de massa LTQ XL™ *Linear Ion Trap Mass Spectrometer* (Thermo Fisher Scientific, EUA). A solução foi injetada diretamente na fonte de ESI configurada para operar no modo positivo de ionização, ESI(+). A faixa dinâmica de aquisição de íons no analisador foi  $m/z$  55-1000 para a benzocaína, fenacetina, cafeína, procaína; lidocaína e petróleo;  $m/z$  100-1500 para a beauvericina e as porfirinas; e  $m/z$  200-2000 para a ubiquitina. Outros parâmetros da fonte ESI foram: i) voltagem da fonte = 4kV, ii) temperatura do *probe* de 100 °C; iii) taxa de fluxo do gás = 10; iv) fluxo de gás auxiliar = 2; v) taxa de fluxo de gás de varredura = 0,01; vi) voltagem do capilar = 32,96 V; vii) temperatura capilar de entrada = 275 °C e viii) voltagem de *tube lens* = 109 V.

A calibração do equipamento foi realizada usando uma solução de CalMix LTQ Positivo sob uma faixa de massas de  $m/z$  154-200, tempo de acumulação de íons de 0,005 s e voltagem do capilar de 4,0 kV. Os espectros de massa obtidos foram adquiridos e processados usando o programa *Xcalibur*, versão 2.2 (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Análise dos padrões de fármacos

Os espectros de ESI(+)FT-ICR MS e ESI(+) LTQ MS possibilitaram a avaliação da exatidão de massas para o dois

equipamentos. Observam-se na Figura 3a-e os espectros gerados no LTQ-MS, para os compostos benzocaina, fenacetina, cafeína, lidocaína e procaina que foram detectados como moléculas protonadas,  $[M+H]^+$ , de  $m/z$  166, 180, 195, 235 e 237 respectivamente. Já para o FT-ICR MS, a maior parte dos compostos (benzocaina, fenacetina, cafeína, lidocaína, Figura 3f-i, respectivamente) foi detectada na formas sodiada,  $[M+Na]^+$  ( $m/z$  188,06817, 202,08382, 217,06957, e 257,16241) e  $[2M+Na]^+$  ( $m/z$  353,14713, 381,17841, 411,14997 e 491,33568). Apenas as espécies lidocaína e procaina (Figura 3i-j) foram detectadas na forma protonada,  $[M+H]^+$ , enquanto que a procaina foi a única espécie detectada na forma  $[2M+2H+Cl]^+$ , produzindo o íon de  $m/z$  509,2892. Ressalta-se no entanto que a formação das moléculas protonadas, adutos sodiados e dímeros sodiados são formados durante o processo de ionização por electrospray (ESI),<sup>23,24</sup> que diferenciou-se para cada equipamento devido a variações em suas formas de funcionamento.

Como o FT-ICR MS é um equipamento fabricado para investigação de problemas na área das ciências ômicas (Metabolômica, Proteômica, Petrolômica, etc.), moléculas de massa molar ( $M_w$ ) menor do que 200 Da não são tipicamente detectadas, sugerindo que esse equipamento não seja o mais indicado para a realização de experimentos de caracterização e de fragmentação (CID ou multistágios de fragmentação, MS<sup>n</sup>) com padrões de fármacos com essa característica. Por outro lado, os espectros gerados no LTQ foram os únicos capazes de descrever a forma protonada para todas as espécies, não apresentando sinais das moléculas sodiadas ou dímeros. Observa-se também que o LTQ apresentou maior intensidade para os sinais de menor  $m/z$  quando comparado com o FT-ICR MS. Além disso, com base nas Figuras 3a-e, apenas os espectros de ESI(+)-LTQ apresentaram indícios de fragmentação (sinais na faixa de  $m/z$  100-200) bem como incerteza de massas na 1ª casa decimal. Por outro lado, FT-ICR apresentou incerteza de massas, na maior parte dos casos, na 5ª casa decimal, ou seja, permitindo com maior facilidade a obtenção de suas respectivas fórmulas moleculares, DBEs, e erros de massas, de forma exata, como descrito na Tabela 1.

Ambos os *softwares* dos equipamentos permitem a obtenção da composição elemental ( $C_xH_yN_nO_oS_s$ ) a partir da massa dos sinais

detectados, bem como, calcular o erro de massas em partes por milhão ( $[(m/z_{\text{medido}} - m/z_{\text{teórico}}) / m/z_{\text{teórico}}] \times 10^6$  ppm), que pode variar conforme cada analisador de massas. As Tabelas 1 e 2 sumarizam o erro de massas para cada sinal identificado, bem como o valor de DBE e a resolução.

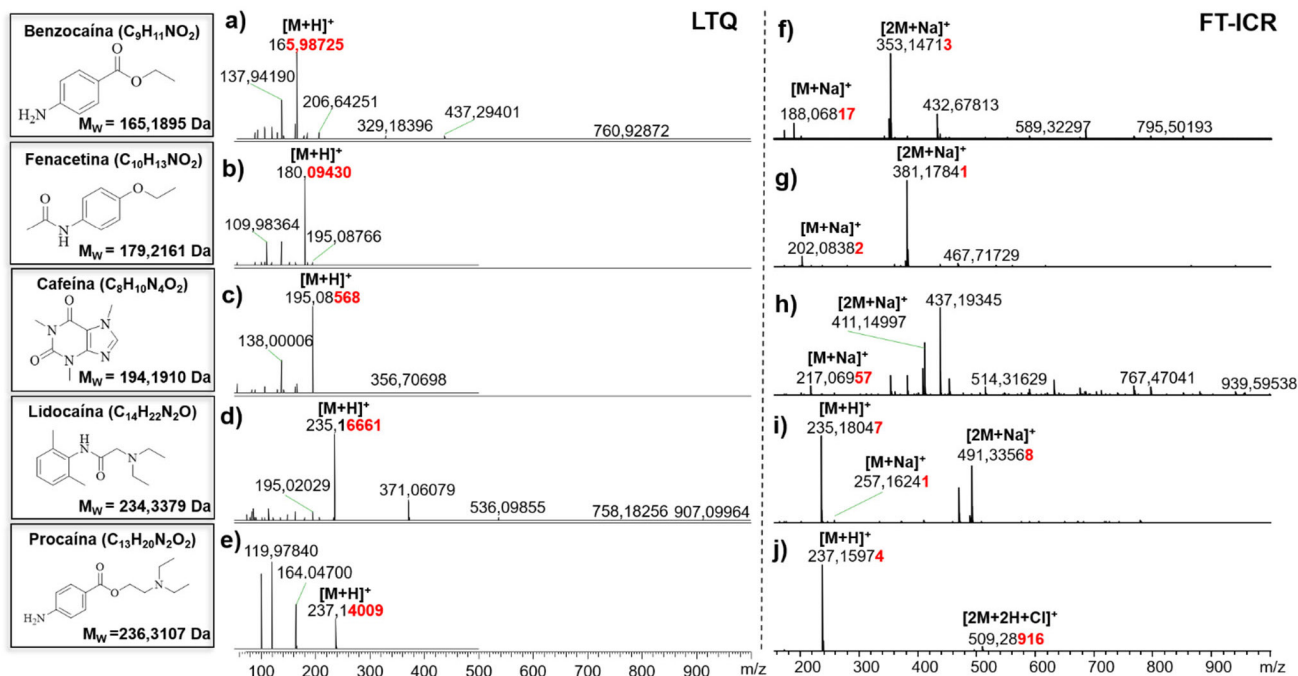
Os sinais identificados no ESI(+)-FT-ICR MS, expressos na Tabela 1, apresentaram erros absolutos inferiores a 0,50 ppm e permitiram que o *software* Data Analysis propusesse com maior exatidão a composição elemental, o erro de massas, e o DBE para a espécie analisada. É possível ainda observar nas Tabelas 1 e 2 que o valor do DBE experimental ( $DBE_{\text{exp}}$ ) está fracionado e menor que o DBE teórico ( $DBE_{\text{teo}}$ ). Isso se deve ao modo positivo de ionização em sistemas monocarregados, o qual promove o acréscimo de um átomo monovalente (hidrogênio, sódio ou potássio). Para expressar o DBE teórico, faz-se necessário que se subtraia o átomo acrescido. Como o sinal do número de átomos monovalentes é negativo e se divide por dois na equação 3, nesse caso, a soma de 0,5 ao valor do DBE experimental é análoga à subtração de um átomo monovalente.

Por outro lado, com base nos erros apresentados na Tabela 2, o ESI(+)-LTQ MS não foi capaz de apontar corretamente a estrutura elemental dos padrões como primeira opção, propondo outras fórmulas moleculares em desacordo com a composição elemental e com a estrutura das moléculas investigadas. Os erros obtidos no LTQ oscilaram entre -10,11 ppm e -596,46 ppm, por conta disso, o *software* Xcalibur<sup>®</sup> não foi capaz de definir a molécula corretamente.

Assim sendo, o equipamento com analisador FT-ICR MS é o mais indicado quando pretende-se encontrar ou identificar a massa exata, isso é,  $m/z$  exato, o grau de insaturação, isso é, DBE e a respectiva composição elemental do analito ( $C_xH_yN_nO_oS_s$ ).

### Experimentos de multistágio de fragmentação

Conforme discutido anteriormente, o FT-ICR não é capaz de realizar experimentos de MS/MS, ou MS<sup>2</sup> de moléculas com valores de  $m/z < 200$ , e não se observam indícios de fragmentação na fonte durante uma aquisição por *fullscan*, como visto no LTQ. Sendo assim, buscou-se explorar o desempenho do ESI(+)-LTQ MS na realização



**Figura 3.** Espectros dos padrões de fármacos para o LTQ em (a), (b), (c), (d) e (e), e para o FT-ICR em (f), (g), (h), (i) e (j). As casas decimais marcadas em vermelho indicam a incerteza da leitura

**Tabela 1.** Resultados das análises dos padrões de benzocaína, fenacetina, cafeína, lidocaína e procaína contendo os seus valores de  $m/z_{exp}$ ,  $m/z_{teo}$ , erro de massas, DBEs e resolução para os dados obtidos pela técnica de ESI (+) FT-ICR MS

FT-ICR MS							
Composto & fórmula molecular (M)	$m/z_{exp}$	Íon	$m/z_{teo}$	Erro ppm	DBE <sub>Teo</sub>	DBE <sub>Exp</sub>	Resolução
Benzocaína	188,06817	[M + Na] <sup>+</sup>	188,06820	0,15	5	4,5	675174
C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	353,14713	[2M + Na] <sup>+</sup>	353,14718	0,13	9	8,5	425730
Fenacetina	202,08382	[M + Na] <sup>+</sup>	202,08385	0,16	5	4,5	658188
C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	381,17841	[2M + Na] <sup>+</sup>	381,17848	0,18	9	8,5	417064
Cafeína	217,06957	[M + Na] <sup>+</sup>	217,06960	0,13	6	5,5	621407
C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	411,14997	[2M + Na] <sup>+</sup>	411,14997	0,01	11	10,5	378757
	235,18047	[M + H] <sup>+</sup>	235,18049	0,10	5	4,5	650217
Lidocaína	257,16241	[M + Na] <sup>+</sup>	257,16243	0,10	5	4,5	518561
C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O	491,33568	[2M + Na] <sup>+</sup>	491,33565	-0,07	9	8,5	321777
Procaína	237,15974	[M + H] <sup>+</sup>	237,15975	0,04	5	4,5	684311
C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	509,28916	[2M + 2H + Cl] <sup>+</sup>	509,28891	-0,49	8	7,5	299789

**Tabela 2.** Resultados das análises dos padrões de benzocaína, fenacetina, cafeína, lidocaína e procaína contendo os seus valores de  $m/z_{exp}$ ,  $m/z_{teo}$ , erro de massas, DBEs e resolução para os dados obtidos pela técnica de ESI (+) FT-ICR MS

LTQ MS						
Composto & fórmula molecular (M)	$m/z_{exp}$	Formula molecular	$m/z_{teo}$	Erro ppm	DBE	Resolução
Benzocaína	165,98725	[M + H] <sup>+</sup>	166,08626	-596,46	5	456
C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>						
Fenacetina	180,09430	[M + H] <sup>+</sup>	180,10191	-53,17	5	743
C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>						
Cafeína	195,08568	[M + H] <sup>+</sup>	195,08765	-10,11	6	827
C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>						
Lidocaína	235,16601	[M + H] <sup>+</sup>	235,18049	-61,57	5	602
C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O						
Procaína	237,14009	[M + H] <sup>+</sup>	237,15975	-82,92	5	919
C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>						

de experimentos de MS/MS dos padrões benzocaína, fenacetina, cafeína, lidocaína e procaína, Figura 4a-e.

A benzocaína ( $m/z$  166), Figura 4a, apresenta duas perdas neutras, a primeira de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> levando a formação de  $m/z$  138, e a segunda de H<sub>2</sub>O levando a formação do sinal em  $m/z$  120. O espectro da fenacetina ( $m/z$  180), Figura 4b, caracteriza-se pela perda de H<sub>2</sub>O levando a formação do fragmento  $m/z$  162, e pela perda de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> levando a formação do  $m/z$  152. A perda de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O foi a que levou a formação do sinal mais intenso ( $m/z$  138) que por conseguinte, fragmentou-se perdendo C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> levando ao fragmento correspondente ao sinal  $m/z$  110. O espectro da cafeína ( $m/z$  195), Figura 4c, caracteriza-se pela perda de CH<sub>3</sub>OH levando a formação de  $m/z$  163, e perda de CH<sub>3</sub>COH levando a formação de  $m/z$  151. A perda de OCNCH<sub>3</sub> foi a que levou a formação do sinal mais intenso ( $m/z$  138) que fragmentou-se perdendo CO levando ao fragmento correspondente ao sinal  $m/z$  110. O espectro da lidocaína ( $m/z$  235), Figura 4d, caracteriza-se pela perda de H<sub>2</sub>O levando à formação do fragmento  $m/z$  217; perda de CO levando à formação do  $m/z$  207; perda de C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>N, formando  $m/z$  205; perda de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>, levando à formação do fragmento  $m/z$  162. Por último, o espectro da procaína ( $m/z$  237), Figura 4e, resultou na em três perdas, a de C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>N, C<sub>6</sub>H<sub>15</sub>NO e C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>, formando os fragmentos  $m/z$  167, 119 e 100, respectivamente. Pode-se observar que esse experimento comprova os resultados obtidos na Figura 3a-e, em que essas estruturas são lábeis para se fragmentarem em um típico experimento de *fullscan* ou ESI(+)*MS*.

## Análise de porfirinas

Na análise por ESI(+)*MS* dos dois padrões de porfirinas em ambos os equipamentos, é observado, nos espectros gerados no LTQ e no FT-ICR MS, a formação do sinal M<sup>+</sup>. Isso já foi observado em outros estudos,<sup>25</sup> em que porfirinas metálicas divalentes são detectadas como M<sup>+</sup>. Isso é decorrente do fato da ionização das metaloporfirinas no modo positivo de ionização ser uma função direta de seus potenciais de oxidação.<sup>26</sup>

Na porfirina de cobalto, de M = C<sub>44</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>Co e M<sub>w</sub> = 671,164597 Da, foi possível identificar por meio da análise por ESI(+)*LTQ* a molécula como cátion M<sup>+</sup> de  $m/z$  671. Já por ESI(+)*FT-ICR MS* observa-se o íon M<sup>+</sup> de  $m/z$  671,16424, fornecendo um erro de massas de 0,28 ppm. Também quando comparamos a resolução do sinal entre os equipamentos (FT-ICR MS e LTQ), os valores obtidos são de 313953 e 1420, respectivamente, para o íon de  $m/z$  671.

Para a porfirina de vanádio, M = C<sub>44</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>OV e M<sub>w</sub> = 679,170283 Da, os resultados de ESI(+)*LTQ MS* identificaram o complexo principalmente nas formas M<sup>+</sup> (espécie mais abundante) e [M + Na]<sup>+</sup> de  $m/z$  679 e 702, respectivamente, enquanto o ESI(+)*FT-ICR MS* detecta com alta resolução e exatidão de massas, o complexo, principalmente na forma [M + Na]<sup>+</sup> de  $m/z$  702,15976. Por FT-ICR MS foi possível identificar a molécula protonada [M + H]<sup>+</sup> de  $m/z$  680 com baixa intensidade e também a molécula sodiada [M + Na]<sup>+</sup> de  $m/z$  702 (Figura 5).



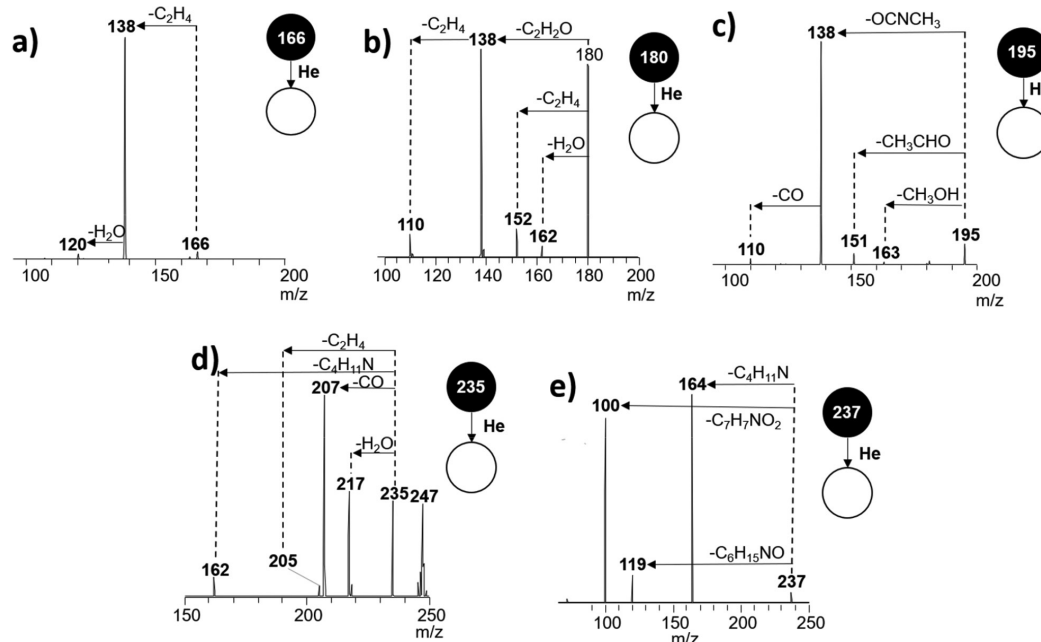


Figura 4. Espectros de ESI(+)-MS/MS no LTQ MS para os padrões de (a) benzocaína, (b) fenacetina, (c) cafeína, (d) lidocaína e (e) procaína

Ambos os complexos  $C_{44}H_{28}N_4OV$  e  $C_{44}H_{28}N_4Co$  foram detectados com uma resolução de massas na ordem de  $10^3$  e  $10^6$  para os analisadores LTQ e FT-ICR MS, respectivamente. Isso significa que apenas o FT-ICR MS é capaz de obter o seu perfil isotópico com alta resolução e exatidão de massas, distinguindo e fornecendo as fórmulas moleculares para as espécies, M, M+1 e M+2, e M+3, por exemplo. Isso é bem evidenciado ao analisar a expansão do sinal, magnificado na Figura 5 para o complexo  $C_{44}H_{28}N_4Co$ .

### Beauvericina

A beauvericina (BEA) é um hexa-depsipeptídeo cíclico que contém três resíduos em sequência alternada de D-hidroxi-isovaleril

e N-metil-fenilalanil, com DBE igual a 19, descoberta pela primeira vez no fungo *Beauveria bassiana* e posteriormente encontrada em diversas outras espécies do fungo *Fusarium* spp.<sup>27,28</sup>

Moléculas de baixa massa molecular (considerando-se uma faixa de 200 a 1000 Da) e não voláteis, como BEA (783 Da), não desenvolvem múltiplas cargas durante sua ionização.<sup>27</sup> Portanto, verifica-se na Figura 6 um comportamento monocarregado com formação de adutos em ambos instrumentos (típica distribuição isotópica do tipo M; M+1; M+2: e M+3). De acordo com Pócsfalvi e colaboradores,<sup>29</sup> em análises por ESI(+) no modo positivo, a beauvericina pode facilmente formar adutos com moléculas e íons presentes na solução em que foi preparada e no tampão utilizado, principalmente potássio e sódio, devido à alta afinidade destes

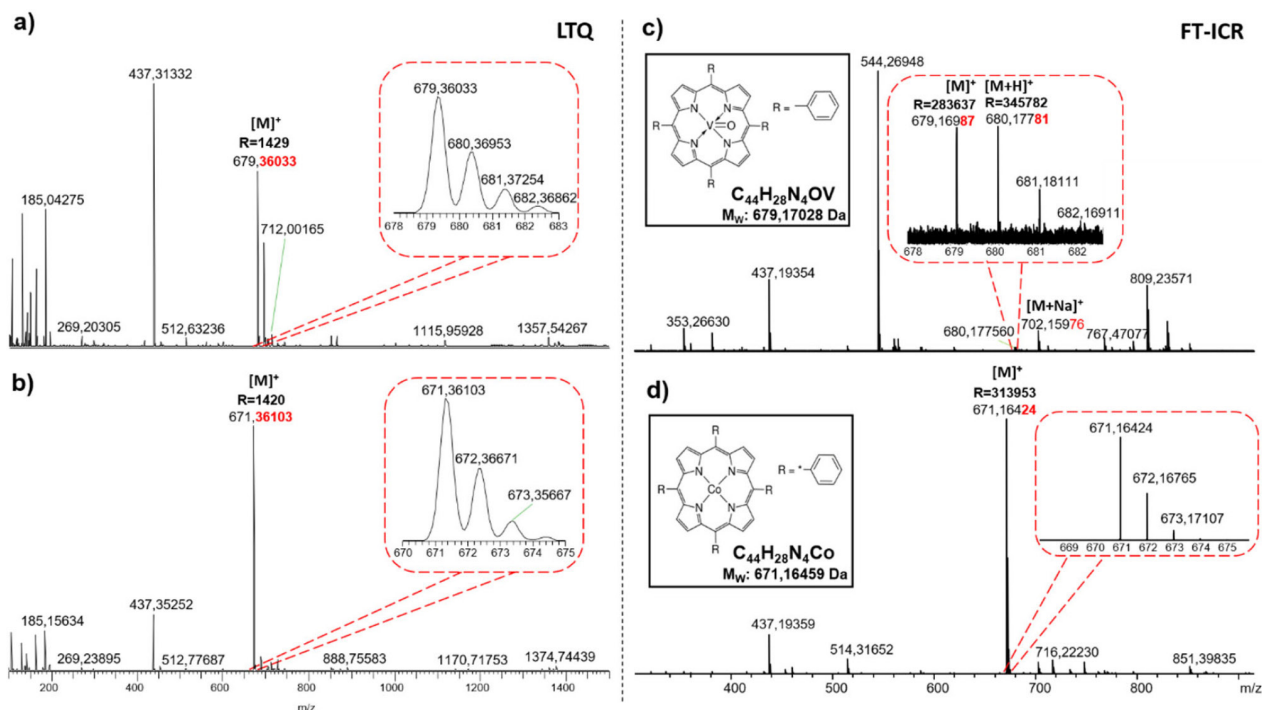


Figura 5. Espectros de ESI(+)-LTO-MS ((a) e (b)) e ESI(+)-FT-ICR MS ((c) e (d)) para padrões de porfirinas de cobalto e vanádio

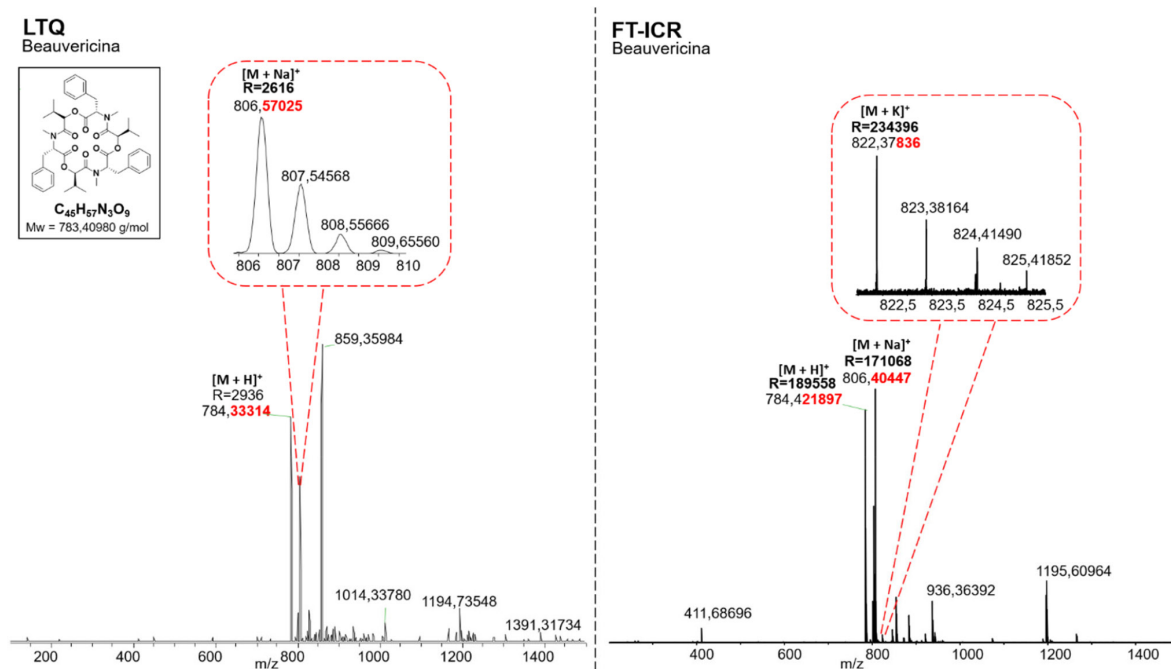


Figura 6. Espectros de massas adquirido para BEA através de ESI(+)-LTQ-MS à esquerda e ESI(+)-FT-ICR MS à direita

com a beauvericina. Foi possível identificar através da análise por FT-ICR MS a formação dos adutos  $[M + H]^+$ ,  $m/z$  784,42189,  $[M + Na]^+$ ,  $m/z$  806,40447 e  $[M + K]^+$ ,  $m/z$  822,37839 (com R 230 000,00 e erro < 7 ppm), o último sinal em menor intensidade. Um resultado similar é observado pela técnica de LTQ-MS, em que, apesar da baixa resolução ( $R = 2616$  para  $m/z$  806), é possível ainda fazer a distinção monoisotópica do seu sinal, como demonstrado na ampliação na região de  $m/z$  806 a 810. Os dados obtidos nos experimentos anteriores estão sumarizados na Tabela 3.

### Ubiquitina

Uma característica intrínseca da fonte de ESI para macromoléculas (acima 1000 Da) é a produção de íons multicarregados, principalmente em peptídeos e proteínas. Devido à elevada quantidade de sítios de protonação, a análise no modo positivo de ionização normalmente exibe uma sequência de picos que correspondem a íons de proteína em diferentes estados de carga, também conhecida como “envelope isotópico”.<sup>30</sup> O estado de carga de um íon ( $z_i$ ) para um espectro de

ESI(+)-MS de uma proteína pode ser calculado através da equação 5, em que  $m_i$  corresponde à massa medida do íon,  $m_p$  a massa de um próton (1,0073 Da) e  $M_w$  a massa molecular da proteína.<sup>2</sup>

$$z_i = M_w / (m_i - m_p) \quad (5)$$

A determinação da carga do íon também é possível por intermédio da operação inversa do módulo da subtração de dois sinais consecutivos. A alta resolução de massa do FT-ICR permite a separação do envelope isotópico de proteínas com diversos estados de carga, em que os isótopos são separados por  $(1/z_i)$  Da. Essa forma mais simplificada de averiguar as cargas em um espectro de ESI(+)-FT-ICR-EM é encontrada na Figura 7, ao qual ilustra o espectro obtido da análise do polipeptídeo Ubiquitina (8565 Da).<sup>31</sup>

Tomando-se como exemplo a ampliação realizada na região de  $m/z$  1735,52174 – 1736,31553, ao subtrair os valores de dois picos vizinhos é possível verificar um resultado próximo à 0,20. O inverso desse valor, por sua vez, é igual a 5, referindo-se então a um íon com

Tabela 3. Dados de ESI(+)-FT-ICR-MS obtidos para as moléculas beauvericina, porfirina cobalto e porfirina vanádio

Nome	Fórmulas Moleculares [M], Mw	Instrumentação	Fórmulas Moleculares [M + Na] <sup>+</sup> , [2M + Na] <sup>+</sup> , [M + H] <sup>+</sup> , [2M + H] <sup>+</sup>	$m/z$ teórico	DBE	$m/z$ medido	Erro (ppm)	Resolução
Beauvericina	$C_{45}H_{57}N_3O_9$ , 783,41676	FT-ICR MS		784,41676		784,42189	6,55	189558
		LTQ MS	$[C_{45}H_{57}N_3O_9 + H]^+$	784,41676	19	784,33314	-106,61	2936
		FT-ICR MS	$[C_{45}H_{57}N_3O_9 + Na]^+$	806,39870	19	806,40447	7,15	171068
		LTQ MS		806,39870		806,57025	212,73	2616
Porfirina Cobalto	$C_{44}H_{28}N_4Co$ , 671,16405	FT-ICR MS	$[C_{45}H_{57}N_3O_9 + K]^+$	822,37264	19	822,37836	6,96	234396
		LTQ MS	$[C_{44}H_{28}N_4Co]^+$	671,16405	33	671,36103	293,41	1420
Porfirina Vanádio	$C_{44}H_{28}N_4OV$ , 679,16973		$[C_{44}H_{28}N_4OV]^+$	679,16973		679,16987	0,21	283637
		FT-ICR MS	$[C_{44}H_{28}N_4OV + H]^+$	680,17756	33	680,17781	0,36	345782
			$[C_{44}H_{28}N_4OV + Na]^+$	702,15950		702,15976	0,38	294412
		LTQ	$[C_{44}H_{28}N_4OV]^+$	679,17028	33	679,36033	279,76	1429

carga igual a cinco ( $[M + 5H]^{5+}$ ), a qual confere com a aplicação dos mesmos dados na Equação 5:

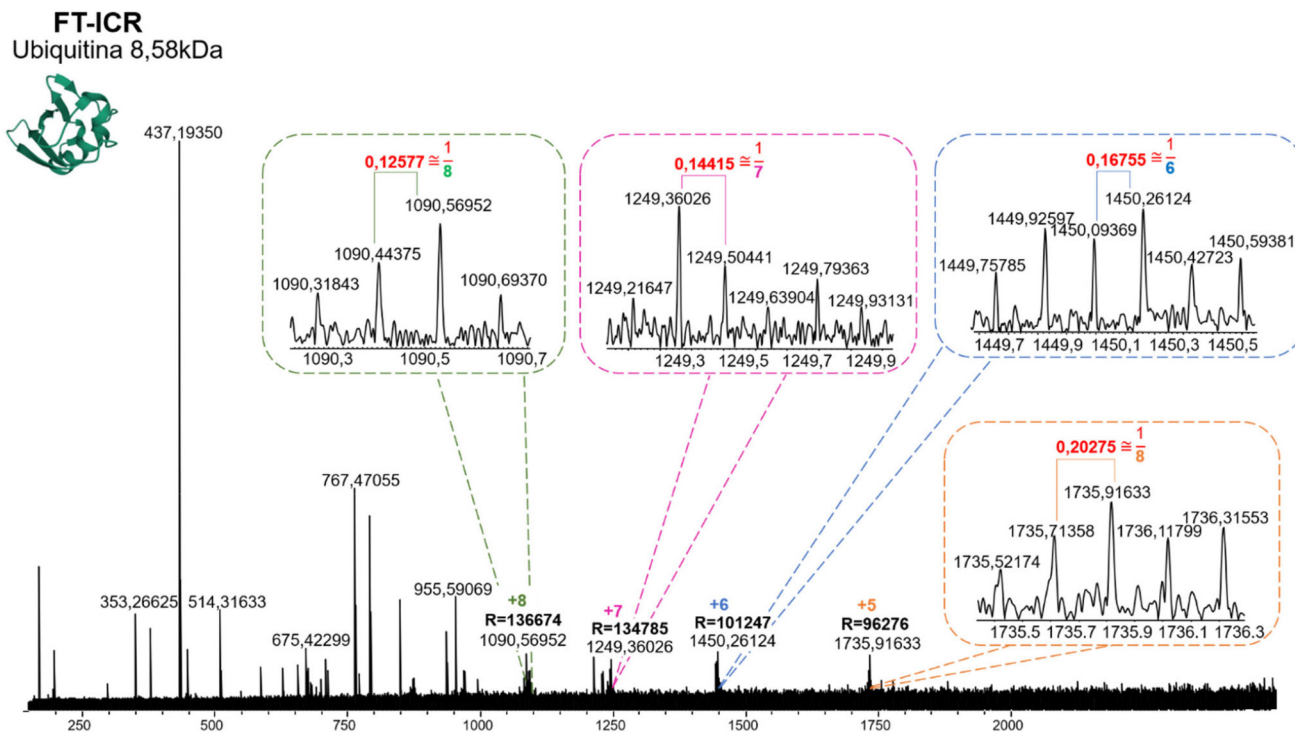
$$z_i = 8565 / (1735,71358 - 1,0073) = 4,9 \ 5$$

$$z_i = 8565 / (1735,91633 - 1,0073) = 4,9 \ 5$$

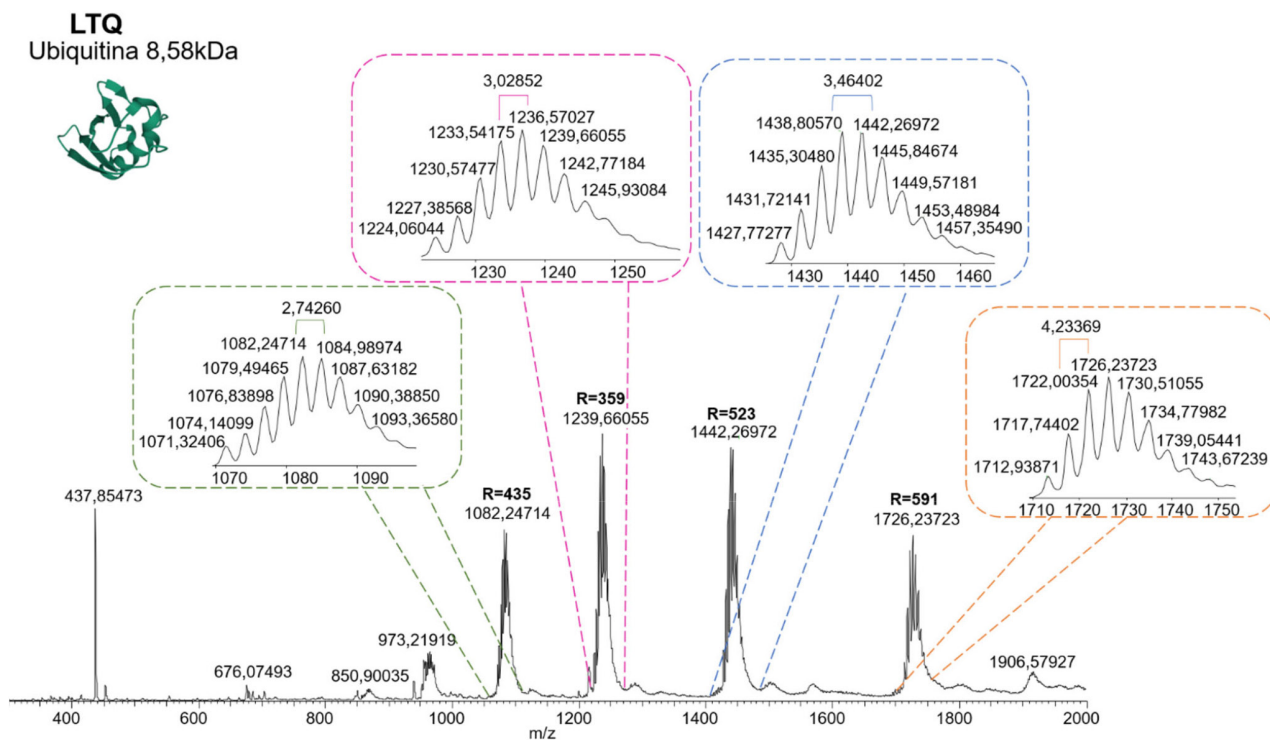
Para o caso da Ubiquitina, esse raciocínio pode ser empregado para uma série de picos (regiões de  $m/z$  1449,75 a 1450,59 (+6);  $m/z$

1249,21 a 1249,93 (+7);  $m/z$  1090,31 a 1090,69 (+8)); até a carga igual a nove ( $m/z$  972,28275). Para a determinação de cargas superiores, é necessário a utilização de um *software*.

Observando o espectro de ESI(+) da solução de Ubiquitina pelo analisador LTQ-MS, Figura 8, não foi possível calcular as cargas da mesma forma como discutida anteriormente. Isso se deve ao menor poder de resolução deste instrumento comparado ao FT-ICR-MS, fazendo com que ocorra uma sobreposição dos peptídeos coeluentes,



**Figura 7.** Espectro de massa adquirido para Ubiquitina através de ESI (+) FT-ICR-MS com ampliações para a determinação das cargas +5, +6, +7 e +8. Destaca-se em vermelho o resultado da separação isotópica equivalente a  $(1/z_i)$  Da



**Figura 8.** Espectro de massa adquirido para Ubiquitina através de ESI (+) LTQ MS



os quais apresentam razões de  $m/z$  muito próximas. Assim, a determinação tanto da massa exata quanto do estado de carga é prejudicada e esse último torna-se incoerente nesse instrumento.<sup>32</sup>

Por consequência, para a análise de analitos grandes e estáveis como proteínas é preferível o uso de espectrômetros de massa de alta resolução para a distinção adequada dos padrões isotópicos.<sup>33</sup>

### Amostra de petróleo

Foram realizadas análises de uma amostra de petróleo em ambos os espectrômetros de massas, FT-ICR MS (Figura 9a) e LTQ MS (Figura 9b-c), utilizando a técnica de ionização ESI(+). Os espectros de massas no analisador LTQ foram adquiridos de modo normal (Figura 9b) e turbo de aquisição de íons (Figura 9c).

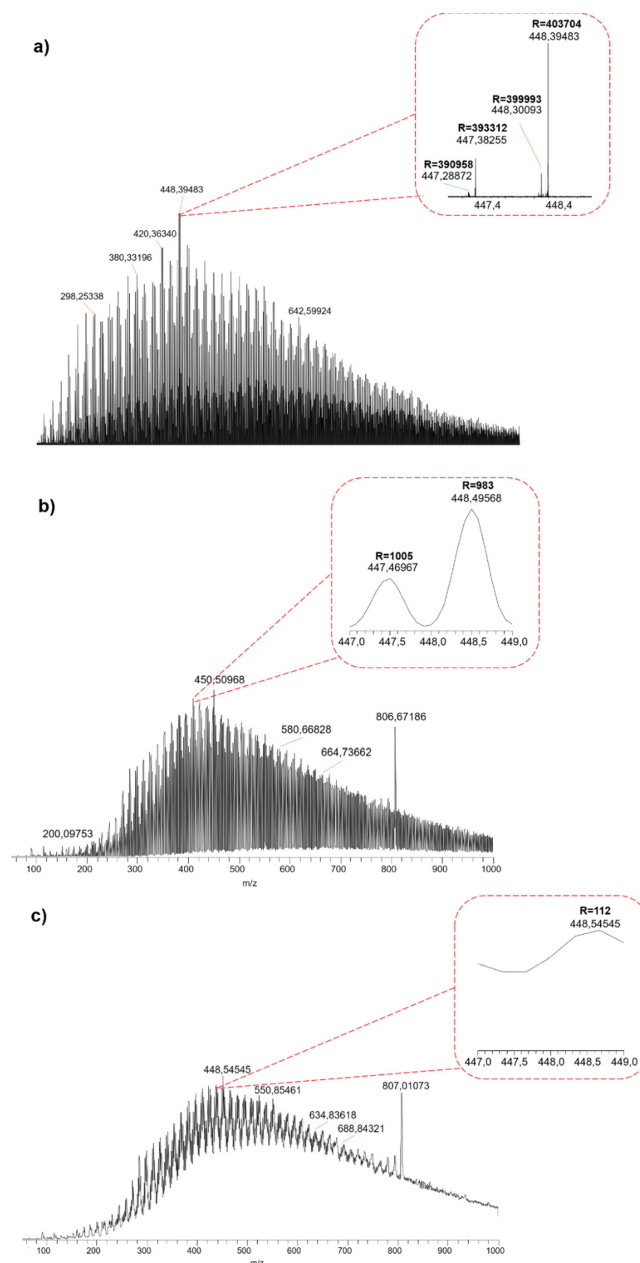
De uma maneira geral, ambos os equipamentos forneceram um perfil de distribuição dos sinais similares (perfil gaussiano de  $m/z$  200-1000). Esse perfil é tipicamente observado em amostras de petróleo, devido a presença de séries homólogas que se repetem com unidades de massa de 12 Da ( $\text{CH}_2$ ) que estão presentes neste caso em compostos nitrogenados de diferentes graus de insaturação, isso é, DBE. Isso produz uma mistura extremamente complexa que, neste caso, dos 25105 sinais detectados no FT-ICR MS, o *software* Composer® foi capaz de processar 1067 formulas moleculares.

Para comparar os espectros obtidos em ambos os equipamentos, foi realizada uma expansão de 2 Da, entre os  $m/z$  447 e 449, com intuito de verificar a capacidade do analisador de massas na resolução dos sinais, Figura 9a-c.

A Figura 9a representa o espectro ESI (+) FT-ICR MS para a amostra de petróleo obtida por infusão direta, contendo a expansão do sinal na faixa de  $m/z$  447-449. Nela podemos observar a presença de 4 sinais de maior intensidade e outros 53 de menores intensidades. Por outro lado, analisando os dados do ESI(+)/LTQ MS adquiridos no modo de aquisição de íons definido pelo equipamento como “normal”, este produz um resultado que consegue resolver apenas dois sinais ( $m/z$  447 e 448), não sendo possível identificar os demais. Adicionalmente, o modo Turbo de aquisição de sinal do instrumento (LTQ), Figura 9c, possui uma péssima resolução, 112 (na região ampliada), onde eles se sobrepõem, gerando uma espécie de espectro contínuo. Logo, ele não é capaz de identificar o perfil monoisotópico de uma molécula, mas acaba sendo importante para facilitar a distribuição gaussiana dos resultados e compará-los com outros analisadores de alta resolução.

Para as análises em Petroléomica, a interpretação dos dados se faz necessário a utilização de *softwares* computacionais especializados para o processamento dos espectros de MS, como o Composer®.<sup>34-37</sup> A partir dos dados obtidos pelo FT-ICR MS, Figura 9a, foi possível obter a distribuição das classes de petróleo, expressa como histograma de classes heteroatómicas, permitindo observar as classes de compostos em função da sua abundância, assim como também descrever a distribuição das intensidades de DBE para cada classe. O DBE corresponde ao grau de insaturação ou aos ciclos da molécula, é definido pela Equação 3.<sup>38,39</sup>

A partir dos espectros de FT-ICR MS é possível gerar outros gráficos, com auxílio do Composer®, as Figuras 10a-d representam esses dados. Na Figura 10a observa-se um gráfico que relaciona as classes de compostos identificados e a intensidade (%), nota-se que a classe N[H] foi majoritária compreendendo ~96% dos compostos identificados, seguida da classe  $\text{N}_2$  com ~4%. Nesse caso, temos um petróleo com compostos nitrogenados e podem ser classificados como básicos e não-básicos, e em geral apresentam anel aromático. Os básicos podem ser piridinas, aminas primárias, entre outros. Já os não-básicos podem ser indóis, carbazóis, pirróis, entre outros.<sup>38,40,41</sup>

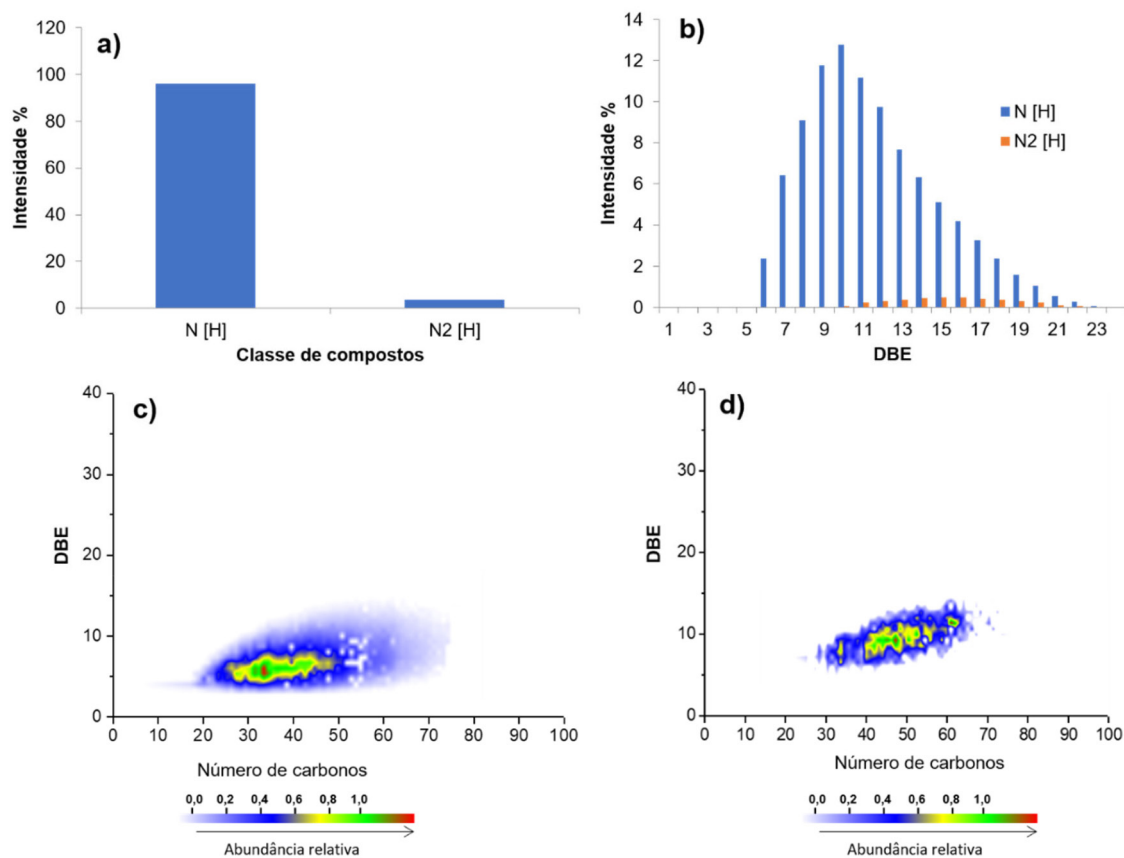


**Figura 9.** Espectros de (a) ESI(+)/FT-ICR MS; e ESI (+) LTQ MS para o modo (b) normal e (c) turbo de aquisição de íons. A expansão na região  $m/z$  447-449 enfatiza o número de sinais entre os analisadores de massas em uma faixa de 2 Da

Para ESI (+) FT-ICR MS, conforme apresentado pela Figura 10c-d, foi evidenciado a classe N[H], com diversas substâncias contendo número de carbono (CN) variando de  $\text{C}_{20}$  a  $\text{C}_{75}$ , com DBE entre 5 e 15, e grande abundância de compostos com DBE = 5. Na Figura 10d para a classe  $\text{N}_2$ [H], encontram-se compostos contendo CN variando de  $\text{C}_{30}$  a  $\text{C}_{80}$  com DBE entre 5 e 15 e uma maior quantidade de compostos com DBE = 10.

### CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos e análises correspondentes, observou-se que o ESI (+) FT-ICR MS apresentou maior poder de resolução e exatidão de massa, assim, foi mais adequado para determinação correta da composição elementar dos padrões de fármacos, na identificação dos sinais multicarregados da ubiquitina, na análise da



**Figura 10.** Distribuição de classe dos compostos (a)  $N[H]$  (b)  $N_2[H]$ ; e os gráficos de DBE versus número de carbonos para (c) classe  $N[H]$  (d) e  $N_2[H]$ , a partir dos dados de ESI (+) FT-ICR MS

beauverecina e na identificação dos compostos presentes no petróleo. Além disso, a fonte ESI permitiu a identificação de sinais de íons protonados, adutos de sódio e dímeros sodiados. Contudo, na análise dos padrões de fármacos, o ESI (+) FT-ICR MS teve dificuldades na identificação de sinais de baixa massa molecular.

Em comparação, o ESI (+) LTQ MS não foi capaz de identificar corretamente a composição elementar, apresentando erros de massa superiores ao outro analisador, mas foi útil na realização de experimentos de MS/MS, pois, diferentemente do FT-ICR, conseguiu detectar sinais de baixa massa molecular correspondente aos fragmentos.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES (Código Financeiro 1), à FAPES (EDITAL CNPq/FAPES N° 23/2018 – PRONEM (596/ 2018)) e ao CNPq (310057/2020-5, and 422555/2018-5) pelo suporte financeiro. Os autores também gostariam de agradecer ao Núcleo de Competências em Química do Petróleo e ao Laboratório Multiusuário de Petroleômica e Forense/LabPetro pelo uso de suas instalações.

## REFERÊNCIAS

- Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; Vyvyan, J. R.; *Introdução à espectroscopia*; Cengage Learning, 2010.
- Vaz, B. G.; de Moraes, L. A. B.; Romão, W.; In *Fundamentos da espectrometria e aplicações*; Beatriz, A., Lacerda, V., eds.; Editora Atheneu: São Paulo, 2017.
- Wang, X.; Wang, S.; Cai, Z.; *Trends Anal. Chem.* **2013**, *52*, 170.
- Carrera, M.; Cañas, B.; Gallardo, J. M.; *Curr. Opin. Food Sci.* **2018**, *22*, 9.
- Colati, K. A. P.; Dalmascio, G. P.; De Castro, E. V. R.; Gomes, A. O.; Vaz, B. G.; Romão, W.; *Fuel* **2013**, *108*, 647.
- Romão, W.; Schwab, N. V.; Bueno, M. I. M. S.; Sparrapan, R.; Eberlin, M. N.; Martiny, A.; Sabino, B. D.; Maldaner, A. O.; *Quim. Nova* **2011**, *34*, 1717.
- Wang, W.; Xu, F.; Jin, L.; Ding, C.-F.; *Int. J. Mass Spectrom.* **2021**, *467*, 116625.
- Oliveira, B. G.; Tosato, F.; Folli, G. S.; de Leite, J. A.; Ventura, J. A.; Endringer, D. C.; Filgueiras, P. R.; Romão, W.; *Microchem. J.* **2019**, *149*, 104033.
- Costa, H. B.; Souza, L. M.; Soprani, L. C.; Oliveira, B. G.; Ogawa, E. M.; Korres, A. M. N.; Ventura, J. A.; Romão, W.; *Food Chem.* **2015**, *174*, 139.
- Ellis, D. I.; Brewster, V. L.; Dunn, W. B.; Allwood, J. W.; Golovanov, A. P.; Goodacre, R.; *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 5706.
- Tosato, F.; Correia, R. M.; Oliveira, B. G.; Fontes, A. M.; França, H. S.; Coltro, W. K. T.; Filgueiras, P. R.; Romão, W.; *Anal. Methods* **2018**, *10*, 1952.
- Griffin, J. H.; Downard, K. M.; *Trends Anal. Chem.* **2021**, *142*, 116328.
- Rocca, M. F.; Zintgraff, J. C.; Dattero, M. E.; Santos, L. S.; Ledesma, M.; Vay, C.; Prieto, M.; Benedetti, E.; Avaro, M.; Russo, M.; Nachtigall, F. M.; Baumeister, E.; *J. Virol. Methods* **2020**, *286*.
- G. Marshall, A.; T. Blakney, G.; Chen, T.; K. Kaiser, N.; M. McKenna, A.; P. Rodgers, R.; M. Ruddy, B.; Xian, F.; *Mass Spectrom.* **2013**, *2*, S0009.
- Hoffmann, E.; Stroobant, V.; *Mass spectrometry*, Wiley: London, 2007.
- Sim, A.; Cho, Y.; Kim, D.; Witt, M.; Birdwell, J. E.; Kim B. J.; Kim, S.; *Fuel* **2015**, *140*, 717.
- Schmidt, E. M.; Pudenzi, M. A.; Santos, J. M.; Damoc, E.; Denisov, E.; Makarov, A.; Eberlin, M. N.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2014**, *25*.

18. Snyder, D. T., Szalwinski, L. J., Cooks, R. G.; In *Encyclopedia of Analytical Science*; Worsfold, P., Townshend, A., Poole, C., Miró, M., eds.; Elsevier; Amsterdam, 2019; pp. 385.
19. Douglas, D. J., Frank, A. J., Mao, D.; *Mass Spectrom. Rev.* **2005**, *24*, 1.
20. Cha, B.; Blades, M.; Douglas, D. J.; *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5647.
21. Denisov, E.; Damoc, E.; Lange, O.; Makarov, A.; *Int. J. Mass Spectrom.* **2012**, *325–327*, 80.
22. Robinson, E. W.; In *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*; Lindon, J. C., Tranter, G. E., Koppenaal, D. W., ed.; Elsevier: Amsterdam, 2017; pp. 725.
23. Crotti, A. E. M.; Vessecchi, R.; Lopes, J. L. C.; Lopes, N. P.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 287.
24. Schug, K.; McNair, H. M.; *J. Sep. Sci.* **2002**, *25*, 759.
25. Witowska-Jarosz, J.; Górski, L.; Malinowska, E.; Jarosz, M.; *J. Mass Spectrom.* **2002**, *37*, 1236.
26. Vandell, V. E.; Limbach, P. A.; *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **1998**, *33*, 212.
27. Thakur, R. A.; Smith, J. S.; *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1234.
28. Song, H. H.; Lee, H. S.; Lee, G. P.; Ha, S. D.; Lee, C.; *Food Addit. Contam., Part A* **2008**, *26*, 518.
29. Pócsfalvi, G.; Di Landa, G.; Ferranti, P.; Ritieni, A.; Randazzo, G.; Malorni, A.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 265.
30. Banerjee, S.; Mazumdar, S.; *Int. J. Anal. Chem.* **2012**, *2012*, 1.
31. Russell, D. H.; Edmondson, R. D.; *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32*, 263.
32. Mann, M.; Kelleher, N. L.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 18132.
33. Arnquist, I. J.; Beussman, D. J.; *J. Chem. Educ.* **2007**, *84*, 1971.
34. Souza, L. M.; Silva, S. R. C.; Filgueiras, P. R.; dos Santos, F. D.; Vasconcelos, G. A.; Lacerda, V.; Vaz, B. G.; Romão, W.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2020**, *31*, 627.
35. Tose, L. V.; Silva, S. R. C.; Barros, E. V.; Souza, L. M.; Pinto, F. E.; Palomino, D. K.; Freitas, J. C. C.; Thompson, C. J.; Vaz, B. G.; Lacerda, V.; Romão, W.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2019**, *30*, 997.
36. Vanini, G.; Pereira, V. B.; Romão, W.; Gomes, A. O.; Oliveira, L. M. S. L.; Dias, J. C. M.; Azevedo, D. A.; *Microchem. J.* **2018**, *137*, 111.
37. Santos, J. M.; Vetere, A.; Wisniewski, A.; Eberlin, M. N.; Schrader, W.; *Energies* **2018**, *11*.
38. Folli, G. S.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Espírito Santo, Brasil, 2020.
39. Terra, L.; Filgueiras, P.; Pereira, R.; Gomes, A.; Vasconcelos, G.; Tose, L.; Castro, E.; Vaz, B.; Romão, W.; Poppi, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2017**, *9*, 1822.
40. de Barros, E. V.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Espírito Santo, Brasil, 2016.
41. Teräväinen, M. J.; Pakarinen, J. M. H.; Wickström, K.; Vainiotalo, P.; *Energy Fuels* **2007**, *21*, 266.