

## ACOPLAMENTO DAS ESPECTROMETRIAS DE MOBILIDADE IÔNICA E DE MASSA MALDI-TOF

F.A. Fernandez-Lima<sup>1</sup>; C.R. Ponciano<sup>2</sup>; E. Pedrero<sup>3</sup>; E.F. da Silveira<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto Superior de Tecnologias y Ciencias Aplicadas, Cuba.

<sup>2</sup> Pontifícia Universidade Católica, Brasil.

<sup>3</sup> Facultad de Física-IMRE, Universidad de la Habana, Cuba

Recebido: 29 de Setembro, 2004; Revisado: 24 de Junho, 2005

Palavras-chave: Espectrometria de Mobilidade Iônica, Espectrometria de Massa MALDI-TOF, Tempo de Vôo.

### RESUMO

Atualmente, a identificação de proteínas em materiais biológicos complexos é principalmente feita por espectrometria de massa MALDI (dessorção de íons induzida por laser), após a separação prévia por eletroforese 2D. Postula-se que este procedimento possa ser executado com vantagens se a eletroforese for substituída pela técnica de mobilidade iônica acoplada, em um só instrumento, ao espectrômetro de massa. No presente trabalho é feita uma revisão dos fundamentos da espectrometria de mobilidade iônica, da fonte de íons MALDI, da espectrometria de massa por tempo-de-vôo (TOFMS), com vistas a um melhor entendimento sobre como a realização instrumental para tal acoplamento pode ser feita na configuração dita extração ortogonal.

### ABSTRACT

Nowadays, the protein identification of complex biological materials is performed mainly by mass spectrometry MALDI (laser induced ion desorption), after a previous separation by 2D electrophoresis. It has been proposed that this procedure could be highly improved by the operation, instead of the electrophoresis, of the ion mobility technique coupled in a single instrument to the MALDI spectrometer. In this article, the basic concepts of the ion mobility spectrometry, the MALDI ion source and the time-of-flight (TOFMS) mass spectrometry are reviewed. The coupling of these techniques, in the so called orthogonal extraction, is discussed.

### 1. INTRODUÇÃO

Na última década observou-se um progresso fantástico da bioquímica que levou ao aparecimento de áreas como a Genômica e a Proteômica. No último caso, o processo foi catalisado pelo desenvolvimento, nos anos oitenta, de dois métodos de ionização de amostras para análise por **espectrometria de massa** (MS): a **ionização por electrospray** (*Electrospray ionization*, ESI) e a **dessorção a laser assistida por matriz** (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*, MALDI)[1-4].

A espectrometria de massa, devido a sua elevada sensibilidade, exatidão e resolução na identificação das massas das proteínas, pode ser considerada a principal ferramenta analítica no campo da Proteômica. Dado o grande número e a alta complexidade das amostras biológicas, diversas etapas de purificação são exigidas para sua análise e, em consequência, existe uma forte demanda para o desenvolvimento de métodos rápidos e eficientes de separação que possam ser acoplados à MS.

As metodologias atuais para a análise de misturas de proteínas são baseadas em protocolos introduzidos inicialmente por Henzel et al. [5] nos quais as proteínas constituintes da amostra são separadas por eletroforese 2D. Em seguida, as proteínas em cada ponto revelado no gel são digeridas e o produto final é analisado por MALDI-MS, gerando o mapa peptídico da proteína. Embora este método seja hoje o mais eficaz, o processo é demorado, trabalhoso e de difícil reprodutibilidade. As avaliações completas de um gel, incluindo a análise dos dados, levam aproximadamente um dia para serem feitas [6]. Para a segunda etapa, a análise dos pontos revelados no gel por MS, precisa-se de quase um mês. Embora este tempo possa ser reduzido para três a sete dias em um sistema parcialmente automatizado, ele ainda é uma limitação séria no estudo de amostras que evoluem continuamente [7]. Deve ser ressaltado que a eletroforese não é adequada para proteínas hidrofóbicas, básicas, muito grandes ou muito pequenas, o que limita a universalidade do protocolo.

A **espectrometria de mobilidade iônica** (*Ion Mobility Spectrometry*, IMS) já era considerada nos anos 70 uma importante ferramenta analítica [8]. Por esta razão e por ser uma técnica de separação rápida e limpa, foi proposto o seu emprego para substituir a eletroforese 2D. A IMS baseia-se na separação em fase gasosa dos íons de interesse em função da quantidade  $\Omega/Z$ , definida como a razão entre a seção eficaz de colisão  $\Omega$  entre os íons e as moléculas do gás no qual eles se difundem e o estado de carga  $Z$  desses íons. Denominada inicialmente como *Plasma Chromatography* ou *Ion Chromatography* [9], esta técnica é aplicada na análise de compostos orgânicos voláteis [8,10] e de fulerenos [11], sendo também usada como sonda dos estados eletrônicos de íons [12]. Na maioria dos trabalhos, a ESI é empregada como fonte de íons para a célula de mobilidade, entre-

\* enio@vdg.fis.puc-rio.br

tanto, outras fontes de íons também podem ser acopladas com sucesso à IMS: dessorção por laser, impacto de elétrons, fontes de agregados e descarga por arco [10].

Nos últimos anos, visando a análise de biomoléculas, diversos sistemas foram desenvolvidos para acoplar IMS a fontes de íons ESI [13-16] ou MALDI [17-19]. Os resultados preliminares indicam que a combinação IMS-MS é uma ferramenta potencialmente poderosa para a análise de proteínas e peptídeos, justificando seu aperfeiçoamento. Em particular, o acoplamento de extração ortogonal IMS-o-TOFMS, em um único instrumento, permite aumentar o grau de confiança na identificação de proteínas pela análise de duas de suas características básicas: a conformação (dada por sua mobilidade no gás) e a massa (determinada com acurácia nos analisadores TOF). Em outras palavras: como a forma geométrica (tridimensional) de uma proteína é determinante para a sua função biológica, informações sobre essa forma são extremamente úteis na caracterização dela.

Na análise de biomoléculas, o acoplamento MALDI-IMS tem várias vantagens sobre ESI-IMS. Por exemplo: i) a ionização por ESI de peptídeos, proteínas e DNA gera diversos estados de carga (valores de  $m/z$ ) e pode causar ambigüidades na análise, enquanto que, na ionização MALDI o estado de carga simples das moléculas protonadas,  $(M+H)^+$ , é o dominante; ii) na ESI, por funcionar em regime contínuo, só parte dos íons pode ser introduzida na célula de IM (desperdiçando assim boa parte do material) ou acumulada numa armadilha de íons e depois injetada na célula de IM, enquanto MALDI opera em regime pulsado, adequado para a análise por tempo-de-vôo (TOF).

Assim, na fase atual do conhecimento, o acoplamento MALDI-IMS-o-TOFMS apresenta-se como o melhor candidato para a análise de biomoléculas. Com o objetivo de discutir as características do acoplamento MALDI-IMS-o-TOFMS, os fundamentos das técnicas envolvidas são revisitos teoricamente e um projeto experimental é descrito.

## 2. PARTE TEÓRICA

### 2.1. ESPECTROMETRIA DE MOBILIDADE IÔNICA

A espectrometria de mobilidade iônica baseia-se na separação dos íons por suas diferentes velocidades de difusão (*drift velocity*)  $v_d$  em um gás inerte (*buffer*) sob a ação de um campo elétrico externo ( $E$ ). Para campos não muito intensos, a velocidades de difusão aumenta proporcionalmente com o campo local  $E$ :

$$v_d = K E \quad (1)$$

O coeficiente  $K$  é denominado **mobilidade**, sendo característico da difusão de cada espécie iônica.

A grandeza a ser medida na Espectrometria de Mobilidade Iônica é o **tempo de trânsito**  $t_D$  dos íons na célula gasosa de comprimento  $L_D$ :

$$t_D = \int_0^{L_D} \frac{dx}{v_d} = \frac{1}{K} \int \frac{dx}{E} \quad (2)$$

Por esta expressão vê-se que o tempo de difusão é inversamente proporcional a  $K$ , mesmo quando a componente axial do campo  $\vec{E}$  não for uniforme ao longo da célula de difusão. Ainda na condição de campos não muito intensos, a velocidade de difusão decresce linearmente a medida que o número de colisões entre o íon e as moléculas do gás aumenta, o que significa que  $K$  é inversamente proporcional a pressão do gás,  $p$ , ou a densidade dele,  $N$ .

Uma expressão geral para a mobilidade  $K$ , válida para campos de intensidade altas ou baixas, pode ser obtida a partir de primeiros princípios e sua dedução é apresentada no Apêndice. Para o caso de campos de intensidades baixas, a mobilidade  $K$  não depende da intensidade do campo  $E$  e, em primeira aproximação, pode ser escrita como [20]:

$$K = \frac{3}{16} \frac{q}{N} \sqrt{\frac{1}{\mu} \frac{2\pi}{k_B T} \frac{1}{\Omega_D}} \quad (3)$$

onde  $q$  é a carga do íon,  $\mu$  a massa reduzida íon-molécula,  $k_B$  a constante de Boltzmann,  $T$  a temperatura do gás e  $\Omega$  a **seção de choque de colisão** entre o íon e a molécula do gás. A determinação de  $\Omega$  permite determinar a área aparente da espécie iônica, fornecendo informação crucial sobre sua forma. A substituição da eq. (3) em (2) mostra que  $t_d$  é diretamente proporcional à área aparente do íon, que depende por sua vez tanto da massa do íon quanto de sua estrutura geométrica; entretanto esta ambigüidade pode ser eliminada com o uso concomitante da espectrometria de massa.

Cabe destacar que, na análise de macro-moléculas, o valor da massa reduzida  $\mu$  é muito próximo ao valor da massa do gás, o que faz com que sua contribuição na eq. (3) seja quase constante para massas maiores que 0.5 kDa. Desta forma, a mobilidade  $K$  no caso de macromoléculas depende fundamentalmente do valor inverso de  $\Omega_D$ .

#### Poder de resolução teórico da mobilidade iônica:

A possibilidade de resolver duas conformações com seções eficazes de colisão diferentes  $\Omega_D$  pode ser avaliada a partir da expressão do poder de resolução temporal [25]:

$$\frac{t_D}{\Delta t_D} = \sqrt{\frac{L_D q E}{16 k_B T \ln 2}} \quad (4)$$

onde  $\Delta t_D$  representa a largura do pico de mobilidade iônica na metade de sua altura (FWHM).

Para aumentar o poder de resolução instrumentalmente tem-se três opções:

- 1) Aumento de  $E$ . Para isso é necessário também aumentar a pressão  $P$ , de modo que a mobilidade continue independente do valor do campo. Esta melhoria é limitada, já que com pressões de trabalho acima de 10 torr a alta

probabilidade de fragmentação da molécula de interesse reduz significativamente seu sinal no detector.

- 2) Aumento de  $L_D$ . Comprimentos longos da célula também aumentam a difusão dos íons perpendicularmente à direção do campo.
- 3) Esfriamento do gás de difusão. Note-se que, com a diminuição da temperatura de trabalho  $T$  de 298 K para 77 K, o poder de resolução dobra.

## 2.2. FONTE DE ÍONS MALDI

A fonte de íons MALDI baseia-se na absorção intensa da radiação laser por uma matriz, que é misturada em solução com quantidades muito pequenas da biomolécula de interesse (o analito). A mistura matriz-analito é depositada sobre o porta amostra e secada, produzindo uma amostra sólida.

Supõe-se que as funções da matriz sejam: i) absorver fortemente a radiação laser para possibilitar uma transferência eficiente da energia do pulso de radiação para o analito e ii) isolar as moléculas de analito umas das outras, para diminuir as ligações intermoleculares e permitir a desorção intacta das moléculas. A rápida elevação da temperatura devido a interação da radiação laser com a amostra, tanto na fase sólida quanto gasosa, gera uma pressão extremamente alta na mistura matriz-analito em sublimação.

Dois mecanismos são possíveis para a criação de íons no sistema matriz-analito [4]: i) ablação explosiva em clusters a partir de uma energia limiar [21,22] e ii) expansão gasosa em jato, no qual as moléculas do analito estão dispersas dentro da matriz [23-25].

## 2.3. ESPECTROMETRIA DE MASSA POR TOF

O tempo de voo é o tempo que os íons levam para percorrer, em vácuo, uma determinada distância dentro do espectrômetro de massa. Em geral, esse percurso é constituído por uma ou duas regiões de aceleração curtas e outra região, longa, livre de campo elétrico. Sendo  $U$  o potencial acelerador, a energia cinética que os íons de massa  $m$  e carga  $q$  possuem ao entrarem na região livre de campo é igual a  $qU$ . O tempo necessário para que atravessem esta região, de comprimento  $L$ , é:

$$t_v = L \sqrt{\frac{m}{2qU}} \quad (5)$$

mostrando que os íons podem ser discriminados de acordo com as suas razões massa/carga ao serem detectados no fim do trajeto.

No caso de um espectrômetro de massa de dois estágios de aceleração, como o mostrado na Fig. 1, o tempo-de-voo (TOF) pode ser escrito em função das distâncias dos dois estágios de aceleração ( $d_1$  e  $d_2$ ), dos potenciais das grades do primeiro e do segundo estágio ( $U_0$  e  $U_1$ ), da massa ( $m$ ) e da carga ( $q$ ) do íon:

$$\text{TOF} = \frac{d_1}{v_R} + \frac{d_2}{v_R/2} \left( \frac{\sqrt{R}}{1 + \sqrt{R}} \right) + \frac{L}{v_R} \sqrt{R} \quad (6)$$

onde

$$v_R = \sqrt{\frac{2q}{m}(U_1 - U_0)} \quad \text{e} \quad R = \frac{U_1 - U_0}{U_1}$$

Os campos aceleradores do primeiro e do segundo estágio são respectivamente:

$$\bar{\varepsilon}_1 = (U_0 - U_1)/2d_1 \quad \text{e} \quad \bar{\varepsilon}_2 = U_1/d_2 \quad (7)$$

Uma descrição detalhada da dinâmica dos íons e dos efeitos de penetração de campo em sistemas com campo pulsado e dois estágios de aceleração pode ser encontrada na referência [26].

É bem conhecido na técnica TOF que a distribuição inicial de velocidades dos íons tem grande efeito na resolução em massa obtida. A extração no modo ortogonal resolve parcialmente este problema uma vez que a fenda imediatamente antes da região de extração elimina os íons com velocidade radial relativamente elevada.

## 3. PARTE EXPERIMENTAL

Na Fig. 1 é ilustrado esquematicamente como uma célula de mobilidade iônica IMS pode ser inserida entre uma fonte de íons MALDI e um espectrômetro de massa com extração ortogonal: é o acoplamento MALDI-IMS-o-TOFMS.

Em linhas gerais, os íons produzidos na amostra são forçados, via campo elétrico ( $<20$  V/mm) criado pelos eletrodos anulares, a colidir com o gás inerte (geralmente He ou  $N_2$ ). Os íons de menor área aparente são mais rápidos e saem primeiro da célula gasosa. Um campo elétrico pulsado, ortogonal ao eixo da célula, dá início à etapa da determinação da massa por TOF. O detector situado após a região de extração ortogonal é útil para monitorar a etapa de IM.

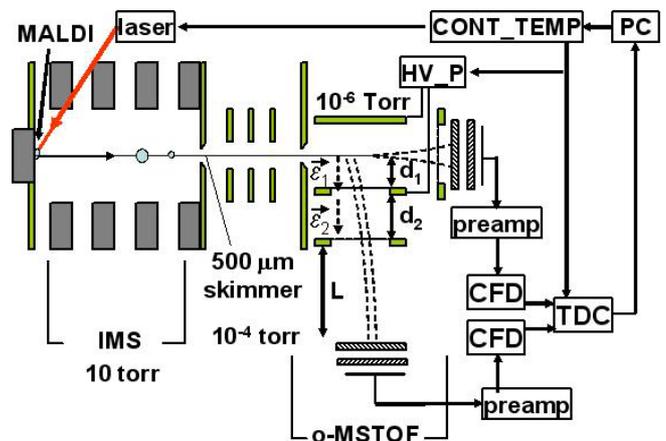


Figura 1 - O acoplamento MALDI-IMS-o-TOFMS. . . Os componentes são: laser, pulsador de alta tensão (HV\_P), controlador de tempo (CONT\_TEMP), pré-amplificador (pre-amp), constant fraction discriminator (CFD), conversor tempo-digital tipo multi-stop (TDC) e computador (PC).

### 3.1. ESQUEMA DE AQUISIÇÃO NO MALDI-IMS-O-MSTOF:

A construção do espectro bidimensional IMS-TOF completo é feita com N disparos de laser sobre a amostra. A cada disparo, os íons são separados na célula de difusão e passam pelo *skimmer* na forma de uma fila de íons (ordenados por sua área aparente e massa), a qual será subdividida em N<sup>2</sup> segmentos. Por disparo, N destes segmentos são analisados pelo espectrômetro TOF, sendo os demais segmentos perdidos. No disparo seguinte, outros N segmentos são analisados e, após N disparos, todo o espectro terá sido analisado. Uma observação importante é que os N segmentos analisados em cada disparo não são consecutivos, mas se distribuem uniformemente pelo espectro IMS, de forma a impedir que haja superposição no detector de um íon lento de um segmento com um íon rápido de segmento que o sucede. Para maior clareza, um exemplo numérico será apresentado a seguir.

A estrutura de montagem de um espectro MALDI-IMS-o-TOFMS, com N = 10 e para espectros TOF de 26 μs de duração, é ilustrada na Fig 2. O disparo do laser cria íons por MALDI e dá início ao processo IMS. As extrações ortogonais o-TOFMS são feitas a cada disparo do laser, pulsando o campo extrator 10 vezes (frequência de 1/(26 μs) = 38 kHz).

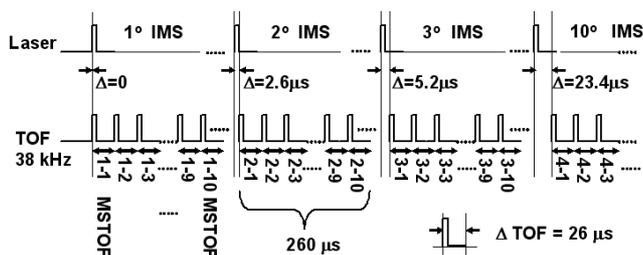


Figura 2 - Seqüência dos disparos laser e as pulsações do campo extrator. Para cada disparo laser, existem 10 pulsações do campo, cada uma destas gerando 1 espectro TOF de 26 μs (baseado na ref.[27]).

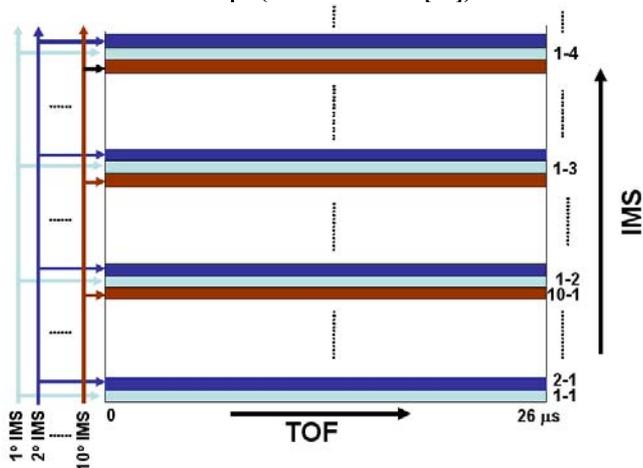


Figura 3 - Estrutura da montagem de um espectro bidimensional IMS x TOF. No 1º disparo laser (1º IMS) são obtidos os 10 espectros TOF: 1-1, 1-2, ..., 1-10.

Após cada disparo do laser, a extração ortogonal (o-TOFMS) é atrasada em 2.6 μs com relação ao disparo ante-

rior. Decorridos 10 disparos do laser, as frações do espectro IMS são agrupadas, completando-o. Na Fig 3 é ilustrada a construção do espectro bidimensional correspondente a este esquema de aquisição. Como resultado, obtém-se uma matriz IMS x TOF onde as moléculas estão separadas por massa e por mobilidade.

### 3.2. CONFIGURAÇÃO DO MALDI-IMS-O-TOFMS

O início do ciclo de aquisição é dado pelo controlador de tempo CONT\_TEMP, que dispara sucessivamente N vezes o laser. Para cada um destes disparos, o pulsador de alta tensão HV\_P também é disparado N = 10 vezes. Segmentos de espectros de IMS e de MSTOF são adquiridos sincronizadamente (ver Fig. 2) para serem reunidos posteriormente no computador. Os íons são produzidos na amostra pela absorção de um pulso de radiação laser ultravioleta e lançados dentro da célula de mobilidade iônica, passando a colidir com o gás inerte mantido à pressão de alguns torr. Uma dezena de eletrodos anulares co-axiais no interior da célula de mobilidade iônica garante um campo elétrico E, aproximadamente uniforme e da ordem de 20 V/mm, ao longo do eixo da célula. A configuração dos anéis é projetada de forma a causar uma focalização centrípeta ao longo do eixo da célula, evitando a dispersão dos íons para longe de sua região central.

A célula de mobilidade iônica comunica-se com um espectrômetro de massa por tempo de voo através de um *skimmer* de 300-500 μm de diâmetro, necessário para manter a diferença de pressão entre as duas regiões do instrumento (ver Fig 1). Após passarem pelo *skimmer*, os íons são focalizados e extraídos ortogonalmente para serem separados por massa no analisador TOF. Na extração ortogonal, o poder de resolução temporal é aumentado, dado que a velocidade inicial radial é desprezível em relação à axial (na direção do eixo da célula de difusão).

A extração ortogonal ocorre quando, em um determinado instante após o disparo do laser, o pulsador de alta tensão HV\_P aciona o campo  $\epsilon_1$  perpendicular ao movimento dos íons. Este pulsador é regido pelo controlador CONT\_TEMP que também gera o trem de pulsos (o-TOF) mostrado na Fig. 2. No analisador TOF, os íons atravessam o primeiro estágio de aceleração (de comprimento  $d_1$ ), são novamente acelerados no segundo estágio (comprimento  $d_2$ ) pelo campo  $\epsilon_2$  (onde  $\epsilon_2 \gg \epsilon_1$ ) e finalmente entram na região livre de campo (comprimento L). O sinal gerado pelo íon ao chegar no detector é amplificado (preamp), conformado por um CFD e analisado por um conversor tempo-digital (TDC). Este último módulo é um relógio que determina os intervalos de tempo decorridos entre cada um dos sinais gerados pelo detector e o sinal *start* dado pelo contador temporal, registrando-os digitalmente. O sinal *start* é produzido a cada pulso gerado pelo pulsador de alta tensão. Um espectro TOF é adquirido para cada pulso do trem de pulsos e a duração do TOF é fixada pelo espaçamento entre os pulsos do trem de pulsos.

Os sinais tratados pelo TDC são transferidos para o computador com uma taxa de 33 MB/s onde é construído o espectro bidimensional de mobilidade vs massa/carga.

#### 4. COMENTÁRIOS FINAIS

O acoplamento MALDI-IMS-o-TOFMS é descrito teórica e instrumentalmente. As equações que descrevem o processo de IMS e a extração ortogonal MSTOF são mostradas. Os diferentes componentes do acoplamento e o esquema de funcionamento são descritos.

Pelas possibilidades que oferece, o acoplamento MALDI-IMS-o-TOFMS apresenta-se como o melhor candidato para a separação e identificação em serie de biomoléculas. No presente momento, vários protótipos do instrumento descrito estão em operação no exterior; os autores estão desenvolvendo um novo protótipo no país.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CLAF, à Rede de Proteoma- RJ e às Agências CNPq e Faperj.

#### 6. APÊNDICE

##### O cálculo da mobilidade K

A demonstração abaixo segue a feita por H.E. Revercomb e E.A. Mason [20].

Supondo que os íons sejam imobilizados após cada colisão com as moléculas do gás na célula de mobilidade iônica, a velocidade de difusão ( $v_d$ ) será dada pela velocidade média entre duas colisões sucessivas. Como a força externa sobre cada íon é  $qE$ , sua aceleração é  $qE/m$  e a velocidade média entre duas colisões será  $(qE/2m)\tau$ , onde  $\tau$  é o tempo médio entre duas colisões. Entretanto, os íons não param completamente após cada colisão, o que eleva o valor de  $v_d$ . Em um regime estacionário, o momento médio transferido pelos íons às moléculas neutras do gás por colisão é igual ao momento médio ganho pelos íons entre colisões:

$$M \langle \vec{V}' - \vec{V} \rangle = qE\tau \quad (A1)$$

onde  $\vec{V}$  e  $\vec{V}'$  são respectivamente as velocidades das moléculas neutras antes e depois da colisão e  $M$  a massa destas. Esta expressão pode ser aplicada a gases com densidades suficientemente baixas, bem abaixo da pressão atmosférica, onde as colisões binárias íon-molécula predominam. Supõe-se também que o número de íons seja muito menor do que o número de moléculas neutras, de modo que as colisões íon-íon possam ser desprezadas, assim como as colisões consecutivas entre a molécula neutra e dois íons. Como a velocidade média do gás é relativamente pequena, a velocidade média das moléculas neutras pode ser considerada nula,  $\langle V \rangle = 0$ . Desta forma, a equação (A1) pode ser reescrita como:

$$M \langle \vec{V}' \rangle = qE\tau \quad (A2).$$

Para calcular o valor de  $\langle \vec{V}' \rangle$ , será considerado que as colisões ocorram ao acaso em relação à direção de movimento dos íons, fazendo com que estes sejam espalhados aleatoriamente em qualquer direção após cada colisão. Utilizando-se um sistema de referência que se move com o centro de massa do par íon-molécula em colisão, a velocidade relativa após a colisão é zero:

$$\langle \vec{v}_r' \rangle \equiv \langle \vec{v} - \vec{V}' \rangle = 0, \text{ ou } \langle \vec{v}' \rangle = \langle \vec{V}' \rangle \quad (A3)$$

onde  $\vec{v}$  é a velocidade do íon após a colisão.

O valor de  $\langle \vec{v}' \rangle$  é determinado pela equação de conservação do momento linear durante uma colisão:

$$m \langle \vec{v} \rangle + M \langle \vec{V} \rangle = m \langle \vec{v}' \rangle + M \langle \vec{V}' \rangle \quad (A4)$$

Substituindo  $\langle \vec{v} \rangle = v_d$ ,  $\langle \vec{V} \rangle = 0$  e  $\langle \vec{v}' \rangle = \langle \vec{V}' \rangle$  na equação (A4) obtém-se:

$$\langle \vec{v} \rangle \equiv v_d = \left(1 + \frac{M}{m}\right) \langle \vec{V}' \rangle \quad (A5)$$

Tomando o valor de  $\langle \vec{V}' \rangle$  da eq. (A2) tem-se que:

$$v_d = \frac{qE\tau}{M} + \frac{qE\tau}{m} \quad (A6)$$

O primeiro termo da eq. (A6) representa a velocidade média dos íons após uma colisão e o segundo termo representa a velocidade média ganha por eles em decorrência da ação do campo entre as colisões.

Para completar o cálculo de  $K$ , necessita-se de uma expressão para  $\tau$ . Supõe-se que as moléculas do gás estejam paradas, de forma que os íons movimentam-se entre elas com uma velocidade média relativa,  $\langle v_r \rangle$ . Então, no tempo  $\tau$ , um íon percorre a distância  $\langle v_r \rangle \tau$ . Se  $\Omega_D$  for a área efetiva para a colisão íon-molécula neutra (no caso de esferas rígidas  $\Omega_D = \pi d^2$ , onde  $d$  é a soma dos raios do íon e da molécula neutra), então a densidade de moléculas do gás  $N$  pode ser escrita como:

$$N = \frac{1}{\langle v_r \rangle \tau \Omega_D} \quad (A7)$$

pois só haverá uma molécula no volume  $\langle v_r \rangle \tau \Omega_D$ .

Substituindo este resultado na equação (A6) tem-se que:

$$v_d = \frac{qE}{N} \left(\frac{1}{m} + \frac{1}{M}\right) \frac{1}{\langle v_r \rangle \Omega_D} \quad (A8)$$

A velocidade média relativa  $\langle v_r \rangle$  pode ser aproximada através de sua raiz quadrática média:

$$\langle v_r \rangle^2 \approx \langle v_r^2 \rangle = \langle |\vec{v} - \vec{V}'|^2 \rangle = \quad (A9)$$

$$= \langle v^2 \rangle + \langle V'^2 \rangle - 2 \langle \vec{v} \cdot \vec{V}' \rangle = \langle v^2 \rangle + \langle V'^2 \rangle$$

onde  $\langle \vec{v} \cdot \vec{V}' \rangle = 0$  por ter a velocidade  $\vec{V}'$  uma distribuição isotrópica.

O valor de  $\langle \vec{V}'^2 \rangle$  pode ser calculado a partir da energia térmica das moléculas:

$$\frac{1}{2} M \langle \vec{V}^2 \rangle = \frac{3}{2} kT \quad (\text{A10})$$

No caso dos íons, as colisões não apenas absorvem energia, como também a redistribuem aleatoriamente. Para calcular a energia total dos íons considera-se as equações de conservação da energia. A energia média transferida por colisão tem que ser igual a energia média adquirida entre colisões,  $qE\langle x \rangle$ , onde  $\langle x \rangle = v_d \tau$  é a distância média percorrida na direção do campo. Então, tem-se que:

$$\frac{1}{2} m \langle v^2 - v'^2 \rangle = \frac{1}{2} M \langle \vec{V}'^2 - \vec{V}^2 \rangle = qE(v_d \tau) \quad (\text{A11})$$

onde a primeira igualdade refere-se à conservação da energia e a segunda à transferência de energia.

Substituindo o valor de  $\tau$  da equação (A6) obtém-se:

$$\frac{1}{2} m \langle v^2 \rangle - \frac{1}{2} m \langle v'^2 \rangle = \left( \frac{1}{m} + \frac{1}{M} \right)^{-1} v_d^2 \quad (\text{A12})$$

Aplicam-se agora as considerações anteriores do efeito aleatório das colisões no sistema de referência do centro de massa. A velocidade do centro de massa pode ser escrita como:

$$\vec{v}_{cm} = \frac{m\vec{v} + M\vec{V}}{m + M} \quad (\text{A13})$$

e a velocidade relativa por:

$$\vec{v}_r \equiv \vec{v} - \vec{V} \quad (\text{A14})$$

Em função destas quantidades, as velocidades do íon antes e depois da colisão podem ser reescritas como:

$$\vec{v} = \vec{v}_{cm} + \frac{M}{m + M} \vec{v}_r, \quad \vec{v}' = \vec{v}'_{cm} + \frac{M}{m + M} \vec{v}'_r \quad (\text{A15})$$

Aplicando a conservação do momento linear ( $\vec{v}_{cm} = \vec{v}'_{cm}$ ), a conservação da energia em colisões elásticas ( $v_r^2 = v'^2_r$ ), elevando ao quadrado e subtraindo as equações (A15) tem-se que:

$$\begin{aligned} \langle v^2 \rangle - \langle v'^2 \rangle &= \\ &= \frac{2M}{m + M} \langle \vec{v}_{cm} \cdot \vec{v}_r \rangle - \frac{2M}{m + M} \langle \vec{v}_{cm} \cdot \vec{v}'_r \rangle \end{aligned} \quad (\text{A16})$$

O último termo em (A16) pode ser desprezado, uma vez que  $\vec{v}'_{cm}$  e  $\vec{v}'_r$  podem ser consideradas grandezas independentes. Substituindo os valores de  $\vec{v}_{cm}$  e  $\vec{v}_r$  das equações (A13) e (A14) na equação (A16) tem-se que:

$$\begin{aligned} \langle v^2 \rangle - \langle v'^2 \rangle &= \\ &= \frac{2M}{m + M} \langle mv^2 + MV^2 + (M - m)\vec{v} \cdot \vec{V} \rangle \end{aligned} \quad (\text{A17})$$

O último termo da eq. (A17) é igual a zero uma vez que  $\langle \vec{V} \rangle = 0$ . Finalmente, combinando as eqs. (A17), (A12) e (A10) obtém-se:

$$\frac{1}{2} m \langle v^2 \rangle = \frac{3}{2} kT + \frac{1}{2} m v_d^2 + \frac{1}{2} M v_d^2 \quad (\text{A18})$$

e a equação para a velocidade de difusão  $v_d$  pode ser reescrita como:

$$v_d = \frac{qE}{N} \left( \frac{1}{m} + \frac{1}{M} \right)^{1/2} \frac{1}{(3kT + Mv_d^2)^{1/2}} \frac{1}{\Omega_D} \quad (\text{A19})$$

ou ainda:

$$(v_d^2)^2 + \frac{3kT}{M} (v_d^2) - \frac{1}{M} \left( \frac{1}{m} + \frac{1}{M} \right) \left( \frac{qE}{N\Omega_D} \right)^2 = 0 \quad (\text{A20})$$

As equações (A19) e (A20) são válidas para qualquer intensidade do campo E. A determinação do valor de  $v_d$  é possível se a dependência de  $\Omega_D$  com  $v_d$  for conhecida. De uma forma geral, a velocidade de difusão  $v_d$  só depende de  $qE/N\Omega_D$ , válido para qualquer intensidade do campo E. Para intensidades de campo baixas (baixo E/N), a velocidade de difusão é muito menor do que a velocidade térmica das partículas, o que faz com que a mobilidade K seja independente da intensidade do campo aplicado. Porém, para intensidades de campo elevadas, a velocidade de difusão é muito maior do que a velocidade térmica das partículas, a mobilidade  $K = K(E/N)$ , o que faz com que os íons possam se alinhar de alguma forma dentro da célula de mobilidade.

### Relação entre a mobilidade e a constante de difusão. Equação de Einstein

A mobilidade, K, para intensidades de campo baixas está relacionada com o coeficiente de difusão, D. Este coeficiente descreve o movimento dos íons através do gás inerte, que é regido pela ação de pequenos gradientes de concentração ou pelo movimento Browniano. A relação entre a mobilidade e a constante de difusão é dada pela relação de Einstein, também conhecida como a relação de Nerst-Einstein ou, ainda, relação de Nerst-Townsend-Einstein.

A obtenção da relação entre K e D é descrita a seguir. O número de íons por unidade de área e tempo, J, é proporcional ao campo elétrico e ao gradiente da concentração de íons na direção do campo E através da relação:

$$J = nKE - D \frac{\partial n}{\partial x} \quad (\text{B1})$$

onde n é o número de íons por unidade de volume.

No equilíbrio, a distribuição de íons pode ser descrita pela distribuição de Boltzman:

$$n = n_0 e^{+qEx / K_B T} \quad (\text{B2})$$

onde  $K_B$  é a constante de Boltzman, e o sinal positivo da exponencial é dado pela convenção de sinais entre a carga iônica q ( $q=eZ$ ), E e x. Diferenciando (B2) em relação a x tem-se que:

$$\frac{\partial n}{\partial x} = n \frac{qE}{kT} \quad (\text{B3})$$

Substituindo a equação (B3) na equação (B1), e lembrando que no equilíbrio  $J = 0$ , obtém-se a relação de Einstein:

$$K = qD / kT \quad (\text{B4})$$

As únicas condições necessárias para a obtenção desta equação são: que o campo elétrico E seja linear em função de J e de  $\partial n / \partial x$  e que o sistema esteja perto do equilíbrio para que possa utilizar a equação (B2).

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. KARAS, M.; HILLENKAMP, F., *Anal Chem.* 60 (1988) 2229.
2. YAMASHITA, M.; FENN, J.B., *Phys. Chem.* 88 (1988) 4451.
3. AEBERSOLD, R.; GOODLET, D.R., *Chem. Rev.* 101 (2001) 269.
4. KARAS, M.; BAHR, U., *Large Ions: Their vaporization, Detection and Structural Analysis*, Wiley, 1996.
5. HENZEL, W.J.; BILLECI, T.M.; STULTS, J.T.; WONG, S.C.; GRIMLEY, C.; WATANABE, C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 5011.
6. LOPEZ, M.F., *Electrophoresis* 21(2000) 1082.
7. HILLE, J. M. et al., *Electrophoresis* 22 (2001) 4035.
8. KARASEK, F.W., *Anal Chem.* 46 (1974) 710.
9. CARR, T.W., *Plasma Chromatography*. New York: Plenum Press, 1984.
10. EICEMAN, G.A.; KARAPAS, Z., *Ion Mobility Spectrometry*. Boca Raton: CRC Press, 1994.
11. FYE, J.L.; JARROLD, M.F., *Int. J. Mass Spectrom.* 185-187 (1999) 507.
12. KEMPER, P.R.; BOWERS, M.T., *J. Phys. Chem.* 95 (1991) 5134.
13. CLEMMER, D.E.; JARROLD, M.F., *J. Mass Spectrosc.* 32 (1997) 577.
14. COUTERMAN, A.E.; CLEMMER, D.E., *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 1490.
15. WU, C.; SIEMS, W.F.; KLASMEIER, J.; HILL, H.H., *Anal Chem.* 72 (2000) 391.
16. WYTENBACH, T.; KEMPER, P.R.; BOWERS, M.T., *Int. J. Mass Spect.* 212 (2001) 13.
17. KOOMEN, J.M.; RUOTOLO, B.T.; GILLIG, K.J.; MCLEAN, J.A.; KANG, M.; FUHRER, K.; GONIN, M.; SCHULTZ, J.A.; DUNBAR, K.R.; RUSSELL, D.H., *J. Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 612.
18. RUOTOLO, B.T.; VERBECK, G.F.; THOMSON, L.M.; WOODS, A.S.; GILLIG, K.J.; RUSSELL, D.H., *J. Proteome Res.* 1 (2002) 303.
19. STONE, E.G.; GILLIG, K.J.; RUOTOLO, B.T.; RUSSELL, D.H. *Int. J. Mass Spect.* 212 (2001) 519.
20. REVERCOMB, H.E.; MASON, E.A., *Anal. Chem.* 47 (1975) 970.
21. BEAVIS, R.C.; CHAIT, B.T., *Chem. Phys. Lett.* 181 (1991) 479.
22. BÖKELMANN, V.; SPENGLER, B.; KAUFMANN, R., *Eur. Mass Spectrom.* 1 (1995) 81.
23. ZHIGUILEI, L.V.; KODALI, P.B.S.; GARRISON, B.J., *Chem. Phys. Lett.* 276 (1997) 269.
24. ZHIGUILEI, L.V.; GARRISON, B.J., *Mass Spectrom.* 12 (1998) 1273.
25. KARAS, M.; GLÜCKMANN, M.; SCHÄFER, J., *J. Mass Spectrom.* 35 (2000) 1.
26. COLLADO, V.M.; PONCIANO, C.R.; FERNANDEZ-LIMA F.A.; DA SILVEIRA, E.F., *Rev. Sci. Instrum.* 75 (2004) 2163.
27. FUHER, K.; GONIN, M.; MCCULLY, M.I.; EGAN, T.; UL-RICH, S.R.; VAUGHN, V.W.; BURTON JR., W.D.; SCHULTZ, J. A., *ASMS Conference*, Chicago, 2001.