

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química

Manual Do Programa MS Analyzer

Laboratório de Síntese Orgânica

Ribeirão Preto, 2000

Índice

| | |
|--|----|
| 1.Introdução | 1 |
| 2. Instalação/Desinstalação | 3 |
| 3. “Para que serve?” ou Visão Geral das Várias Características do Programa | 4 |
| 4. Como Proceder Para... | 13 |
| 5. Como são realizados alguns dos cálculos | 17 |

1.Introdução

O programa MS Analyzer foi elaborado com a finalidade de equipar os químicos pesquisadores com uma ferramenta útil para análise de espectros de massa. Os computadores dos espectrômetros de massa em geral possuem uma biblioteca de espectros que permite a identificação de substâncias conhecidas por comparação. No caso, porém, do químico que investiga *novas* substâncias essas bibliotecas têm pouca utilidade, e não há muitos programas de computador apropriados para a finalidade de analisar esses espectros de amostras “desconhecidas”.

Essa análise envolve tediosas operações aritméticas – é preciso ficar subtraindo a massa de um pico da massa de outro pico, consultar tabelas (geralmente muito incompletas) para verificar quais as possíveis fórmulas dos fragmentos, calcular porcentagens de picos de isótopos, etc. Além disso é necessário fazer suposições sobre possíveis mecanismos de fragmentação e, com base nessas suposições, refazer várias vezes os cálculos aritméticos.

Todas as operações aritméticas são bem simples, mas extremamente aborrecidas. Tome-se como exemplo a massa molecular de possíveis fórmulas de fragmentos; é muito fácil calcular massas moleculares, mas após calcular para umas 10 ou 20 fórmulas, o químico em geral passa a achar a repetição dessas operações uma tarefa muito irritante e cansativa.

Lembrando que uma das maiores utilidades dos computadores vem exatamente de eles poderem repetir indefinidamente essas operações, nada mais natural do que procurarmos um meio de transferir essas tarefas repetitivas para a máquina, principalmente tendo em vista que todos os laboratórios hoje estão equipados com bons computadores.

Elaboramos, assim, o programa MS Analyzer com a finalidade de:

a) Executar no computador todos os cálculos aritméticos envolvidos na análise dos espectros de massa; isso vai muito além de meramente executar mecanicamente as mesmas operações que o químico faria, pois o computador tem uma potencialidade muito maior para efetuar cálculos longos e complexos; dificilmente um químico teria condições de efetuar manualmente, por exemplo, um cálculo de **todas** as fórmulas possíveis para uma massa molecular 200 (com os elementos C, H, O). Esse cálculo consumiria muito tempo (horas, para a maioria dos químicos), e não seria de forma nenhuma compensador. O computador, no entanto, pode efetuá-lo em uma fração de segundo, e ainda decide facilmente se o “íon” ou o fragmento neutro tem ou não um elétron desemparelhado, para cada fórmula calculada. Outro exemplo é o caso dos picos de isótopos: se o leitor nunca tentou, pode fazê-lo agora para ver como

é difícil calcular certos picos de isótopos – tente com o pico molecular de uma substância contendo selênio. Este cálculo o computador também faz com extrema facilidade, e sem usar fórmulas aproximadas.

b) Reduzir a necessidade de consultas a tabelas; foram incluídas várias tabelas no programa, tais como tabelas de massas e abundância de isótopos, tabelas de fórmulas de fragmentos iônicos e neutros, etc. Os dados correspondentes são mostrados automaticamente nos momentos apropriados, evitando que o químico tenha que abrir constantemente o livro para consultar a tabela.

c) Permitir ao químico um certo tratamento gráfico dos dados espectrais. Dados numéricos, introduzidos no computador por meio de um arquivo *.txt ou por simples digitação, são transformados em um gráfico (o “espectro”) que pode ser copiado e colado em um documento do Word, por exemplo; a fórmula estrutural e/ou molecular pode ser colada sobre o espectro, pode ser movida, ter seu tamanho modificado, fixada, e pode ser também copiada e colada junto com o espectro.

Acreditamos, assim, que este programa será uma ferramenta muito útil para o pesquisador químico, e também para professores e estudantes desejosos de relembrar ou aprofundar seus conhecimentos sobre certos aspectos da espectrometria de massa.

2. Instalação / Desinstalação

O dimensionamento dos quadros apresentados pelo programa foi otimizado para uma área da tela de 800×600 “pixels” (painel de controle → vídeo → configurações). Se você usar uma tela com menos “pixels” (e.g. 640×480) os quadros não cabem na tela, o que o obrigará a um constante acionamento de barras de rolagem, tornando o uso do programa muito incômodo. Usar uma tela com mais “pixels” (e.g. 1024×768) não tem maiores conseqüências que uma certa sensação de prejuízo por mau aproveitamento do espaço, pois os quadros estão parcialmente sobrepostos quando há espaço sobrando.

2.1. Instalação com disquetes

Dispondo do programa na forma de disquetes, basta inserir o disquete nº 1 no leitor do computador, abrir com o “Windows Explorer” e dar um clique duplo em “Setup.exe”. Depois é só seguir as instruções. Se tiver uma versão anterior deste programa instalada em seu computador, é necessário **desinstalar** a antiga **antes** de instalar a nova.

Após completar, copie a pasta “Examples” do terceiro disquete para dentro do diretório onde foi instalado o programa (se você não alterou, o diretório é “C:\Arquivos de Programas\MS Analyzer\”).

2.2. Instalação do programa copiado via Internet

Inicialmente é preciso descompactar o pacote. Crie um diretório provisório (por exemplo, “C:\Lixo\”), descompacte para dentro desse diretório e depois clique em “Setup.exe”. O restante do processo é similar ao caso dos disquetes.

2.3. Desinstalação

Proceda normalmente, abrindo “Meu Computador”, a seguir “Painel de Controle” e depois “Adicionar ou remover programas”. Durante a desinstalação o programa costuma perguntar se você quer remover este ou aquele “shared” (compartilhado) arquivo; é aconselhável mantê-los todos.

Se tudo correr normalmente, o programa deve avisar que não foi possível remover o diretório “C:\Arquivos de Programas\MS Analyzer\”, ou outro se você mudou o diretório original na hora de instalar.

Remova esse diretório com o “Windows Explorer”, assim eliminando a pasta “Examples” nele ainda contida e o arquivo MS Analyzer.ini que o programa criou ao rodar a primeira vez.

3. “Para que serve?” ou Visão Geral das Várias Características do Programa

A primeira pergunta que ocorre ao usuário ao considerar um novo programa é “para que serve este programa?” ou “o que este programa faz?”. Tentaremos responder a essas perguntas nesta seção, que nos esforçaremos ao máximo para manter bem resumida a fim de não cansar o leitor. Se tiver o programa já instalado, faça-o rodar enquanto lê.

Ao abrir, o programa mostrará 6 quadros com os títulos:

- **Data Input**- seguido de um sub-título
- **Formulas & Isotope Peaks**
- **Isotopes of Elements**
- **Graph of Isotope Peaks**
- **Mass Spectrum**
- **Periodic Table of Elements**

Tabela Periódica

Arrastando o mouse sobre a tabela periódica (sem apertar os botões) um quadro ampliado mostrará detalhes do elemento sobre o qual está o ponteiro do mouse, incluindo número atômico (acima e à esquerda), massa atômica média (embaixo à esquerda) e valências (acima à direita). Para cada elemento há uma valência com fundo mais escuro, que é a valência selecionada para o cálculo de remoção de fórmulas “impossíveis” (V. adiante). O leitor certamente pode deduzir o significado das cores usadas na tabela.

Clicando sobre um elemento qualquer o leitor poderá ver acima (no quadro “Isotopes of Elements”) uma tabela dos isótopos do elemento em questão. O gráfico à esquerda (Graph of Isotope Peaks) simula um espectro de massa correspondendo a esses isótopos. Aproveite para observar como são pequenos os picos de isótopos de elementos comumente encontrados em compostos orgânicos como C, H, N, O, S, Si, F, P, I e observe o forte contraste com elementos como Cl, Br, Se, Te (e vários outros).

Massas Moleculares

O programa pode ser usado para calcular massas moleculares: no quadro “Data Input - ...” escolha a guia “Formula”, e escreva a fórmula desejada no quadrinho apropriado (é preciso utilizar maiúsculas e minúsculas corretamente para o símbolo dos elementos). Escrevendo CH₄, por exemplo, acima poderão ser lidos os valores da massa molecular média (16,0426) e da massa correspondente aos isótopos mais abundantes (16,03130016). A massa média pode facilmente ser calculada com os valores retirados de uma tabela periódica comum, mas a massa correspondente aos principais isótopos (que é a massa fornecida por um espectrômetro de massa de alta resolução) exigiria uma consulta a uma tabela de massas de isótopos, nem sempre tão facilmente acessível aos químicos como uma tabela periódica.

Picos de
Isótopos

Apertando “Enter” ou clicando no botão “Go” o programa efetuará os cálculos dos picos de isótopos correspondentes ao *pico molecular* da fórmula introduzida (CH₄). O resultado é mostrado em um gráfico e numa tabela; o gráfico é visível à esquerda em baixo; para ver a tabela escolha a guia “Isotope Peaks” no quadro “Formulas & Isotope Peaks”. Tanto essa tabela como o gráfico podem ser copiados através do menu “Edit”, para transferência para outros programas como o Word, por exemplo.

Massa
Molecular e
Fórmulas

Escolhendo a guia “Mol. Weight” (no mesmo quadro “Data Input - ...”) é possível fornecer uma massa molecular qualquer ao computador (experimente o valor 200) e, ao apertar “Enter” (ou ao clicar o botão “Go”) o computador calculará todas as fórmulas possíveis que têm essa massa molecular (200), nas condições estabelecidas (V. adiante). Para ver as fórmulas, escolha a guia “Formulas” no quadro “Formulas & Isotope Peaks”; no caso do valor 200, com C, H, O e removendo as fórmulas “impossíveis”, o computador encontra 21 fórmulas. Clicar no quadrinho correspondente a cada fórmula provoca o cálculo dos picos de isótopos (do pico molecular) para aquela fórmula. Os resultados são mostrados como no caso anterior, no gráfico e na tabela.

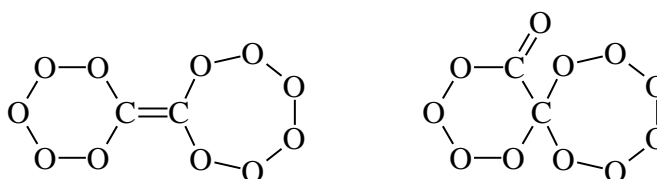
Como já mencionado de passagem, há três condições imperando nesses cálculos:

Condições para
Cálculo

- 1) Quais elementos devem ser considerados?
- 2) As fórmulas calculadas devem ser todas exibidas, ou devem ser removidas algumas que são obviamente “impossíveis”?
- 3) Precisão requerida.

Condição 2
(Remoção de
Fórmulas)

As duas primeiras condições são estabelecidas no quadro “Data Input - ...”; a segunda é mais evidente, pois há um quadrinho com o título “Formulas” e duas opções: clique na opção “Show All” e novamente no botão “Go”, verificando que o número de fórmulas encontradas sobe para 120 (com massa molecular 200). Dê uma olhada nessas fórmulas e você verá que há absurdos do tipo C₁₀H₆₄O, C₄H₁₅₁, H₁₉₈, etc. Isto porque o computador experimenta efetivamente **todas** as combinações dos elementos dados, encontrando **todas** as fórmulas que tenham a dada massa molecular. Ao escolher a opção “Remove formulas with excess monovalent elements”, a maior parte dos absurdos é eliminada. É bom lembrar aqui que, baseando-se apenas na valência, somente os elementos monovalentes podem ser limitados. Não há como dizer que a fórmula C₁₄O₂, por exemplo, não pode existir, com base apenas na valência dos elementos. Mesmo fórmulas menos prováveis, como C₂O₁₁, hipoteticamente seriam possíveis:



São fórmulas altamente improváveis, pois qualquer químico sabe como a ligação O-O é fraca, principalmente quando se tenta estender a cadeia. Transferir esse tipo de informação para o computador sem correr o risco de que ele comece a desprezar fórmulas razoáveis é muito difícil, pois há muitos elementos e muitas combinações a serem consideradas. É melhor e muito mais fácil e seguro deixar o computador calcular tudo e confiar no químico para eliminar o improvável.¹

Condição 1
Elementos
Selecionados

A primeira condição, “Quais elementos devem ser considerados?”, é muito importante porque o tempo necessário para calcular aumenta muito com o aumento do número de elementos. Este programa admite um máximo de sete elementos de cada vez.

Os elementos escolhidos são mostrados no quadrinho “Selected Elements”. Para modificar a lista escolhe-se a guia “Elements” (sempre no quadro “Data Input - ...”) e clica-se sobre o elemento desejado na tabela periódica, tanto para adicionar como para remover.

May / Must be
present

Para cada elemento são mostradas duas opções, sendo que a opção “May be present” vem automaticamente selecionada. Se for escolhida a opção “Must be present” para um certo elemento, apenas as fórmulas que contenham aquele elemento serão consideradas.

A opção “Must be present” não deve ser selecionada para a análise de um espectro de massa, pois a mesma opção vale para todos os cálculos; suponha o caso em que uma molécula contenha 1 átomo de cloro: se a opção “Must be present” for selecionada para o cloro, isto significará que tanto o pico molecular como o fragmento neutro como o fragmento positivo teriam que conter cloro, o que não é possível.

Condição 3
Precisão
Requerida

Finalmente a terceira condição, “Precisão Requerida”, é modificada à vontade no quadrinho que se encontra na barra de ferramentas. O valor $\pm 0,5$ amu é apropriado para espectros comuns de baixa resolução. No caso de espectros de resolução maior este valor pode (e deve) ser modificado correspondentemente.

Tente colocar no quadrinho da massa molecular o valor “200” e, com precisão $\pm 0,5$ amu, elementos C, H, O, removendo fórmulas com excesso de elementos monovalentes, o computador encontrará 21 fórmulas. Mudando a precisão para $\pm 0,05$ amu o número de fórmulas cai para 10 e, com $\pm 0,005$ amu, apenas uma fórmula é encontrada.

¹ Até mesmo a eliminação das fórmulas que têm excesso de elementos monovalentes, bastante segura nas circunstâncias ora em questão, pode induzir a alguns poucos erros quando se estuda um espectro de massa: suponha uma substância cujo íon molecular perca simultaneamente H(·) e H₂O, dando um pico em M-19; colocando “19” no quadrinho de massa molecular, o computador não encontrará a fórmula verdadeira (H₂O + H = “H₃O”), porque decidirá que essa fórmula (“H₃O”) tem excesso de elementos monovalentes. Escolhendo a opção “Show All”, três fórmulas são encontradas, entre elas H₃O (que aparece na tela do computador com o sinal positivo porque, quando o cálculo é feito desta maneira, o computador está presumindo que se trata de um pico no espectro de massa, e não de um fragmento neutro).

| | |
|-----------------------------|--|
| Analisar Espectros | <p>A principal utilidade do programa, porém, é para analisar espectros de massa. No quadro “Data Input - ...”, clique na guia “Spectrum” e um espectro de massa de óxido de isoforona, incluído no próprio arquivo do programa como exemplo, será mostrado. Acima e à esquerda é visível a tabela com os valores correspondentes ao espectro.</p> <p>Movendo-se o mouse sobre o espectro, a posição horizontal (“massa”) do cursor é apresentada logo acima do espectro. Observe que, ao colocar o mouse exatamente sobre um pico, o cursor muda de cor e de forma, permitindo a leitura do valor exato da massa de cada pico.</p> |
| Figura da Fórmula Molecular | <p>A figura da fórmula molecular pode atrapalhar um pouco essas e outras operações, de forma que é melhor descrever logo como manipular a figura.</p> |
| Mover | <p>Mova o mouse sobre a figura e aparecerá um quadro envolvendo-a; aperte o botão esquerdo e mova o mouse (mantendo o botão esquerdo apertado), transportando assim a figura para o local desejado (mas somente dentro do “espectro”). É melhor escolher uma região onde não haja picos. Basta largar o botão esquerdo do mouse para que a figura fique no local.</p> |
| Redimensionar | <p>Observe agora, ao mover o mouse sobre a figura, o pequeno quadrado preto que aparece em baixo e à direita do quadro da figura: colocando o mouse sobre esse quadradinho preto (o ícone do mouse muda de forma), apertando o botão esquerdo e movendo o mouse diagonalmente (mantendo o botão esquerdo apertado) a figura será redimensionada para o tamanho desejado. Basta largar o botão esquerdo para encerrar.</p> |
| Fixar/Liberar | <p>Finalmente, colocando o mouse sobre a figura e clicando o botão direito, a figura será fixada no local. Passar o mouse sobre ela agora não mais provocará o incômodo aparecimento do quadro. Se você se arrepender do local ou do tamanho escolhidos, coloque o mouse sobre a figura e clique o botão direito: ela será novamente liberada para reiniciar todas as operações anteriores.</p> |
| Apagar | <p>Se quiser apagar a figura, abra o menu “Edit” e escolha a opção “Delete Formula (on the Spectrum)”. Não se preocupe, a eliminação não é definitiva: ao apagar, o mesmo menu será transformado em “Undo Delete Formula”, permitindo a recuperação da figura.</p> |
| Nova Figura | <p>Para substituir, desenhe a fórmula desejada num programa como o ChemWindow, por exemplo, copie para o “clipboard” (área de transferência) e cole usando o mesmo menu “Edit”. Observe que a opção “Paste Formula Picture” só se apresentará ativa se o “clipboard” contiver uma figura no formato “metafile”. Esta exigência ocorre porque os “bitmaps” e outros formatos não são apropriados para o redimensionamento, resultando em fórmulas com linhas falhadas e letras muito deslocadas quando reduzidas ou aumentadas.</p> |

| | |
|---------------------------|---|
| Parent Peak | <p>Iniciando a análise do espectro, clique na figura da mão que aponta para baixo, na barra de ferramentas, e mova o mouse sobre o espectro: a figura da mão se deslocará junto com o cursor. Posicione o cursor exatamente sobre o pico em “154” (a linha deve estar amarela e o ícone do mouse deve ser uma cruz), clicando então o botão esquerdo (o botão direito cancelará toda a operação!).</p> <p>Um novo quadro aparecerá, contendo uma lista das 12 fórmulas possíveis para essa massa molecular (154).</p> |
| Selected Peak | <p>Volte à barra de ferramentas e clique na seta vertical, movendo em seguida o mouse sobre o espectro (mas somente à esquerda da mão que indica o pico “mãe”, ou “Parent Peak”; à direita deste [experimente!] a coisa não funciona, porque o fragmento não pode ter massa maior do que a molécula que lhe deu origem). Coloque o cursor com a seta exatamente sobre o pico em 139 e clique no botão esquerdo.</p> |
| Fórmulas Calculadas | <p>Várias listas se tornarão visíveis agora. A parte de cima é das listas de fórmulas <i>calculadas</i> pelo computador; à esquerda, as 12 fórmulas do pico “mãe” (que já estavam antes); no centro, as 9 fórmulas do pico selecionado (139); à direita, a única fórmula possível para o fragmento neutro (15), que só pode ser $[\cdot]\text{CH}_3$.</p> |
| Tabelas da Literatura | <p>A parte inferior é de listas contendo dados de tabelas da literatura para as massas correspondentes ao pico selecionado (“Selected Peak”, aquele da seta) e ao fragmento neutro (diferença entre a massa do pico “mãe” e a massa do pico selecionado). Essas tabelas são simples e o leitor pode facilmente descobrir como utilizá-las. Observe apenas que a tabela da esquerda (Gottlieb) é separada em compostos alifáticos e aromáticos, e a opção correspondente deve ser escolhida.</p> <p>Deve-se lembrar que os próprios autores destacam claramente que essas tabelas não são completas, mas apresentam apenas alguns exemplos mais comuns de fórmulas para cada massa. Na verdade, para massas mais elevadas (como é o caso aqui para o pico selecionado – 139) as tabelas da literatura são muito incompletas.</p> |
| Eliminando Possibilidades | <p>A essa altura o leitor pode já estar um pouco desanimado, imaginando que sua análise teria que envolver considerações para escolher entre 12 fórmulas para o pico “mãe” e entre 9 fórmulas para o pico selecionado. De fato, se a amostra fosse mesmo totalmente desconhecida, alguma coisa no gênero teria que ser feita, mas o programa ajuda a simplificar um pouco a tarefa: clique no quadrinho do $[\cdot]\text{CH}_3$ (na lista dos fragmentos neutros, em cima e à direita) e as 12 fórmulas do pico “mãe” serão reduzidas a 9 (as nove fórmulas que, perdendo CH_3, dariam origem às 9 diferentes fórmulas do pico selecionado).</p> <p>Na prática, porém, mesmo com amostras desconhecidas, é comum que haja razões para acreditar que a amostra pode ou deve corresponder a uma certa fórmula molecular.</p> |

Se este for o caso (como aqui, que “sabemos” que a amostra deve ter a fórmula $C_9H_{14}O_2$), a situação pode ser bem simplificada clicando (na lista à esquerda, acima) no quadrinho da suposta fórmula molecular: imediatamente são eliminadas várias possibilidades (na verdade, neste caso particular, fica apenas uma possibilidade para o pico selecionado: $C_8H_{11}O_2$, que é o resultado da subtração de CH_3 da fórmula $C_9H_{14}O_2$). *Anote essas fórmulas, pois elas serão úteis mais tarde.*

Isto significa que, se tivermos razão para acreditar que a fórmula correspondente ao pico molecular é $C_9H_{14}O_2$, podemos dizer quase com certeza que a fórmula correspondente ao pico 139 é $C_8H_{11}O_2$. Neste caso há apenas uma possibilidade porque há apenas uma fórmula possível para o fragmento neutro.

Mover a Seta

Prosseguindo com a análise, mova a seta para o próximo pico (126). Isto se consegue de duas maneiras diferentes: 1) clique outra vez na seta na *barra de ferramentas* e mova o mouse sobre o espectro, ou 2) mova o mouse lentamente pela parte superior da figura da seta no espectro, até que o ícone se transforme em anzol; clique então com o botão esquerdo do mouse, que assim capturará a seta.

Agora há duas fórmulas possíveis para o fragmento neutro (C_2H_4 e CO) e, se você deixou a fórmula do pico “mãe” $C_9H_{14}O_2$ marcada, há correspondentemente duas fórmulas para o pico selecionado: $C_7H_{10}O_2$ e $C_8H_{14}O$, cada uma correspondendo à perda do fragmento neutro que está na mesma linha.

Pode-se prosseguir a análise movendo agora a seta para cada um dos picos que o leitor quiser considerar, anotando as fórmulas para os picos e para os fragmentos, sem esquecer que cada um desses fragmentos positivos (os picos) pode ser proveniente de algum outro fragmento positivo, e não do pico “mãe” diretamente. Se for deixada assinalada a suposta fórmula do pico molecular, cada caso apresentará apenas duas ou três possibilidades.

Por outro lado, pode-se deixar a seta (pico selecionado) em 126 e mover a mão (pico “mãe”) para 139: isto dá uma única fórmula para o fragmento neutro, $[\cdot]CH$, que a literatura classifica como “impossível”; tem-se aí uma forte indicação de que o fragmento positivo de massa 126 origina-se do pico molecular (154) (por perda de CO ou C_2H_4), e não do fragmento positivo de massa 139.

Prosseguindo de forma semelhante, conclui-se que o fragmento positivo de massa 111 pode originar-se do pico molecular (perdendo $[\cdot]C_3H_7$ ou $[\cdot]C_2H_3O$), do fragmento de massa 139 (perdendo C_2H_4 ou CO), ou do fragmento 126 (perdendo $[\cdot]CH_3$). Já o fragmento positivo de massa 97 não deve ser proveniente do fragmento positivo de massa 111, pois a perda de CH_2 (a única possibilidade que aparece) é considerada “muito rara” pela literatura; os fragmentos de massa 126 e 129, bem como o “pico molecular”, podem ser a origem de “97”.

Opções

Isto já deve ter dado ao leitor uma boa idéia da versatilidade do programa para essa análise aritmética. Deve-se destacar, porém, que o programa funcionará de maneira um pouco diferente conforme as opções selecionadas. Clique no menu “Options” e veja que há três opções a serem feitas: a opção da guia “Formulas” é a mesma já anteriormente discutida; a da guia “Peak Markers” diz respeito apenas à cópia do espectro (como figura a ser transferida para outros programas); a opção da guia “PP Choose” determina como o programa vai funcionar quando o usuário clica no quadrinho de uma das fórmulas do pico “mãe”. O que estivemos expondo até agora presume que a segunda opção estava selecionada (*Delete all other formulas and use the chosen one to find the “Selected Peak” formulas*). Se quiser experimentar, clique na outra opção e verifique que, ao escolher uma das fórmulas do pico “mãe”, as outras não serão mais eliminadas.

Observe também que, ao ser desligado, o programa gravará as opções selecionadas, recomeçando depois com o mesmo conjunto de opções que tinha ao ser desligado.

Um outro aspecto da análise do espectro, os picos de isótopos, não pode ser bem ilustrado com este exemplo porque este espectro não está bem traçado e não contém importantes picos de isótopos. Na pasta “Examples” há um outro espectro de óxido de isoforona, com o nome “Isophorone Oxide”, que está bem melhor para essa finalidade.

Introduzir
Novo
Espectro

Por isso vamos ver agora como se introduzem dados de um novo espectro no programa. Há duas maneiras: 1) abrir um arquivo *.txt (uma tabela de dados que pode ser gravada pela maioria dos espectrômetros de massa) ou 2) digitar diretamente os dados na tabela.

Na barra de ferramentas, clique na figura do espectro de massa, para trazer o quadro “Data Input – Spectrum Analyzer” (com a guia “Spectrum” já selecionada) para o primeiro plano e observe os botões: para abrir um novo espectro clique em “Open”, abra a pasta “Examples” e escolha “Isophorone Oxide.txt” (apenas arquivos *.txt podem ser abertos aqui). Clique em “Abrir” e observe que o espectro aparece já traçado, com a nova fórmula, em poucos instantes. Coloque a fórmula em lugar apropriado, reduza e fixe.

Comparar
Picos de
Isótopos

Clique na seta da barra de ferramentas e selecione o pico em 154. Na lista de fórmulas marque o quadrinho da fórmula $C_9H_{14}O_2$. Em seguida clique (novamente na barra de ferramentas) na figura da página amarela não rasgada (a da esquerda): isso mostrará a tabela dos picos de isótopos calculados (à direita) e a tabela dos dados do espectro (à esquerda) simultaneamente. Use a barra de rolagem para deixar os valores 154,1 e 155,15 visíveis e compare as intensidades (10,74 e 1,06) com os valores calculados (10,74 e 1,106). O valor 10,74 foi, evidentemente, tomado como base para o cálculo; a comparação é entre 1,06 e 1,106, levando à conclusão de que está razoavelmente dentro do esperado (os picos de isótopos desse tipo de fórmula são muito pequenos e sujeitos a grandes erros

de medida – lembre-se que no espectro anterior o pico em 155 nem sequer aparecia).

Repita o procedimento para o pico em 139.

Lembrando que, como anteriormente determinado, sua fórmula deve ser $C_8H_{11}O_2$, marque essa fórmula na lista e compare os picos 139 e 140. Novamente os valores em comparação (2,82 experimental e 2,975 calculado) são bem próximos.

Com o pico em 126 ocorre um fato curioso. Há duas fórmulas possíveis para esse “pico” (como anteriormente determinado): $C_8H_{14}O$ e $C_7H_{10}O_2$. A primeira dá origem a um pico de isótopos em 127 (calculado) de 1,743% enquanto a segunda dá um valor de 1,527%; como o valor experimental é 1,53%, o leitor sentirá possivelmente a tentação de concluir que a fórmula mais provável é $C_7H_{10}O_2$. Pelas razões já expostas acima, porém, não é aconselhável precipitar-se em conclusões com bases em picos de isótopos: é bem mais seguro basear-se em uma análise mecanística. A maior utilidade dos picos de isótopos é para detectar, no pico molecular e nos fragmentos, a presença de elementos que possuem isótopos em alta porcentagem, como Cl, Br, Se, Te, etc.

Digitar Dados
Novo Espectro

Para introduzir os dados de um novo espectro digitando diretamente, clique no botão “Type in Data”, responda “Não” quando o programa perguntar se você quer manter os dados antigos, e vá digitando os valores de massa, apertando “Enter” ao fim de cada valor, depois fazendo o mesmo com os valores de intensidade. O quadrinho amarelo para digitação pode ser movido com as teclas de setas. Quando tiver digitado todos os dados, clique no botão “End Data” (o mesmo botão “Type in Data”, que mudou de nome ao ser clicado).

Adicionar M+

No caso (bastante comum, a propósito) de um espectro que não apresente o pico molecular, você pode adicionar um pico molecular fantasma, com intensidade zero, para facilitar suas operações de análise. Naturalmente isso presume que você saiba a fórmula da substância, ou tenha algumas boas razões para achar que sabe. No quadro “Data Input - ...” escolha a guia “Formula”. Digite a suposta fórmula molecular da substância e copie a massa molecular correspondente aos isótopos principais (se for um espectro de baixa resolução, copie apenas até 1 a 3 casas depois da vírgula). Escolha a guia “Spectrum” e clique no botão “Add M+”; digite o valor encontrado e aperte “Enter”. Passe o cursor pelo espectro na região de M+ e você verá que o pico está lá, apesar de não aparecer (porque tem intensidade “0”). Este pico pode agora ser marcado como “Parent Peak” (ou como “Selected Peak”) para o cálculo dos fragmentos.

Alguns exemplos (aqueles cujos nomes terminam com “M+”) contêm esses picos fantasmas, que foram acrescentados da forma descrita acima.

- Copiar Espectro** O espectro pode ser copiado, através do menu “Edit”, para ser colado em outros programas. Pode-se copiar tal como se apresenta na tela (com fundo azul) ou com fundo branco. Se a fórmula estiver fixada no espectro, será copiada também; caso contrário, o programa perguntará se você quer copiar a fórmula ou não. Os indicadores de seleção (a mão e a seta) serão copiados ou não junto com o espectro, de acordo com a opção feita (menu “Options”, guia “Peak Markers”).
- Salvar Espectro** Pode-se também salvar os dados do espectro, uma operação especialmente útil quando os dados foram digitados, ou quando for acrescentado um pico M+ fantasma. Clique no botão “Save As...” (que é visível junto à tabela de dados do espectro), digite um nome apropriado e salve.
- Salvar Figura da Fórmula** Se você salvar a figura da fórmula (menu “File”, sub-menu “Save Formula Picture As...”) com o mesmo nome* usado para os dados do espectro (obviamente a *extensão* é diferente, pois é “txt” para os dados e “wmf” para a figura) e no mesmo diretório, quando você abrir os dados a figura virá junto. Caso você grave com nome diferente, será necessário abrir a figura separadamente com o menu “File”, sub-menu “Open Formula Picture”.
- Abrir Figura da Fórmula** Examinando o interior da pasta “Examples” com o “Windows Explorer”, você poderá ter uma idéia de como organizar seus arquivos de maneira prática.

* Se você tiver acrescentado um pico molecular fantasma ao seu arquivo e quiser escrever “M+” no final de seu nome para destacar essa situação (por exemplo, “MentonaM+”), o nome da figura não deverá conter “M+” (no exemplo dado, deve chamar-se simplesmente “Mentona”); assim, a mesma figura abre junto com os dados *com* e *sem* pico molecular fantasma. Dê uma olhada na pasta “Examples” para ver como isso é feito.

Como Proceder Para...

a) Selecionar os elementos a serem usados nos cálculos

Clique no primeiro botão à esquerda da barra de ferramentas. Isto mostrará a tabela periódica com os elementos atualmente selecionados em fundo cinza. Clique em qualquer outro elemento para acrescentá-lo à lista, ou clique num dos selecionados para retirá-lo da lista. Não é possível selecionar mais do que 7 elementos de cada vez.

Alguns elementos têm suas tabelas incompletas neste programa (não há informação sobre isótopos) e por isso não podem ser selecionados para esse propósito. O programa se encarregará de avisá-lo, não se preocupe em memorizar. Se quiser saber, esses elementos são Tc, Po, At, Ru, Fr, Ra, Ac, Pm, Pa, Np, Pu, Am, Cm, Bk, Cf, Es, Fm, Md, No, Lr.

b) Alterar a valência de um elemento

Clique no segundo (o da balança) ou no terceiro (o da fórmula CO_2) botão da barra de ferramentas. Se a tabela periódica estiver sob o espectro, passe o mouse sobre a parte visível da tabela ou clique no botão "Activate" para trazer a tabela para o primeiro plano. Coloque o ponteiro do mouse sobre o elemento desejado e clique com o botão **direito**. Isto paralisa a ação do mouse sobre os outros elementos.

No quadro ampliado clique (normalmente, com o botão esquerdo) sobre a nova valência desejada, leia cuidadosamente o aviso que aparece e decida se quer ou não mudar a valência. Em seguida, volte com o mouse sobre a tabela periódica e clique novamente o botão direito para retornar ao modo de operação normal.

Observe que a mudança feita não é definitiva, mas será válida apenas enquanto o programa estiver funcionando. Ao desligar, passarão a valer as mesmas valências de antes das modificações.

c) Calcular as fórmulas possíveis para uma dada massa molecular

Clique no segundo botão da barra de ferramentas (o da balança), digite a massa molecular no quadrinho apropriado e tecele "Enter" (ou clique no botão "Go"). As fórmulas possíveis são mostradas à direita. Observe as opções de elementos selecionados e remoção ou não de fórmulas com excesso de elementos monovalentes, mudando de acordo com o desejado.

Os picos de isótopos para cada fórmula serão calculados no momento em que for clicado o quadrinho à esquerda da fórmula. Para ver a tabela dos picos de isótopos, clique na guia “Isotope Peaks”, ou no botão da barra de ferramentas que mostra uma página amarela não rasgada.

d) Calcular a massa molecular de uma dada fórmula

Na barra de ferramentas, clique no terceiro botão (o que tem a fórmula CO_2 escrita) e digite a fórmula no quadrinho apropriado. É necessário usar corretamente as letras maiúsculas e minúsculas para os símbolos dos elementos. Quando terminar de digitar a fórmula, as massas moleculares (média e correspondente aos isótopos mais abundantes) já estarão visíveis logo acima.

e) Calcular os picos de isótopos de uma dada fórmula

Digite a fórmula como descrito em (d), e aperte “Enter” (ou clique no botão “Go”). Os picos de isótopos, em forma de gráfico, são visíveis à esquerda, em baixo. Se quiser ver a tabela, clique no botão da barra de ferramentas que mostra uma página amarela não rasgada.

f) Introduzir dados de um novo espectro

Clique no 4º botão da barra de ferramentas (que mostra um espectro de massa). Se os dados de seu novo espectro estiverem em um arquivo apropriado (*.txt) basta abrir o arquivo, começando por clicar no botão “Open” (ou, no menu “File”, escolher “Open Spectrum File”). Se a tabela do arquivo estiver em um dos formatos suportados pelo programa, os dados serão copiados e o espectro será automaticamente traçado.

Se seus dados não estiverem em forma legível pelo programa, você pode digitá-los diretamente na tabela: clique no botão “Type in Data”, responda “Não” à pergunta sobre conservar os dados antigos e comece a digitar os valores de massa, sem esquecer de apertar “Enter” ao final de cada valor (o valor digitado só é transferido efetivamente para a tabela quando você apertar “Enter”). Em seguida, posicione o quadrinho amarelo no topo da coluna de intensidades (mova o quadrinho com as teclas de setas) e vá digitando as intensidades, sempre apertando “Enter” ao final de cada valor.

Quando terminar, clique no botão “End Data”.

g) Acrescentar pico M^+ fantasma

Proceda como em (f) até ver a tabela de dados. Clique no botão “Add M^+ ”, digite o valor da massa molecular do pico M^+ e aperte “Enter”.

Se tiver que calcular antes a massa molecular, proceda inicialmente como em (d), utilizando o valor da massa correspondente aos isótopos mais abundantes (e não a média). Para espectros de baixa resolução basta copiar 1-3 algarismos depois da vírgula.

h) Salvar dados de um espectro

Proceda como em (f) até ver a tabela de dados. Clique no botão “Save As...”, digite um nome para seu arquivo (não é necessário acrescentar a extensão .txt, ela será adicionada automaticamente) e clique em “Salvar”.

i) Introduzir uma fórmula estrutural e/ou molecular no espectro

Desenhe ou escreva a fórmula em um programa como o ChemWindow (vários outros programas podem ser usados, mas é importante que o programa forneça a figura no formato “metafile”, que é o único aceito pelo MS Analyzer). Copie a figura (para o “clipboard”, ou área de transferência) e cole no espectro abrindo o menu “Edit” e escolhendo “Paste Formula Picture”. Se a fórmula copiada não estiver no formato “metafile”, este sub-menu não estará ativo.

j) Ajustar tamanho e posição da fórmula

Passando o mouse sobre a fórmula, aparece um quadro envolvendo-a; aperte o botão esquerdo do mouse (dentro do quadro) e arraste para posicionar a figura onde desejar. Largue o botão esquerdo para encerrar.

O redimensionamento é feito posicionando o ponteiro do mouse sobre o quadradinho preto (que aparece quando se passa o mouse sobre a figura da fórmula), apertando o botão esquerdo e arrastando diagonalmente. Novamente basta largar o botão para encerrar.

A figura pode ser fixada clicando o botão direito, com o mouse sobre a figura. Para liberar, basta clicar novamente com o botão direito.

k) Salvar a figura da fórmula

No menu “File”, escolha “Save Formula Picture As...”, digite o nome desejado e clique em “Salvar”.

É **importante** salvar a figura com o mesmo nome do arquivo usado para salvar os dados do espectro. Só assim a figura será carregada juntamente com os dados. *Veja observação em (l).*

Não é necessário escrever as extensões “.wmf” para a figura e “.txt” para os dados.

l) Abrir figura da fórmula

No menu “File”, escolha “Open Formula Picture”, escolha o arquivo desejado (apenas arquivos *.wmf podem ser abertos) e clique em “Abrir”.

Se você tiver salvado a figura com o mesmo nome do arquivo de dados, ela abrirá automaticamente junto com os dados.

Obs.: caso você grave um arquivo de dados contendo um pico $M+$ fantasma e queira indicar esse fato acrescentando $M+$ ao nome do arquivo (por exemplo, “Terpineol $M+$ ”), não acrescente $M+$ ao nome da figura, chamando-a simplesmente “Terpineol”. Essa mesma figura será aberta automaticamente tanto com o arquivo Terpineol.txt como com o arquivo Terpineol $M+$.txt. Se, por outro lado, você nomear a figura “Terpineol $M+$ ” ela não será aberta automaticamente em nenhum caso, tendo que ser aberta separadamente como descrito acima.

m) Analisar um espectro

A análise de um espectro envolve muitas operações diferentes e não se presta a descrições resumidas. Leia a seção 3 para aprender as operações básicas de análise de espectros.

5. Como são realizados alguns dos cálculos

Certos cálculos realizados por este programa são muito simples e evidentes. Outros, porém, têm certas características que são, a nosso ver, merecedoras de uma exposição mais detalhada, no mínimo para deixar o leitor mais seguro quanto à confiabilidade dos resultados.

5.1. Cálculo das fórmulas

Quando é dada uma certa massa molecular, para calcular as fórmulas que possam ter aquela massa o programa experimenta todas as combinações possíveis dentro dos parâmetros estabelecidos. Entre esses parâmetros contam-se: quais os elementos que devem ser considerados e qual a precisão requerida para o cálculo. A rotina principal que realiza essas operações está reproduzida a seguir:

```
Sub FNLoop(El)
  Dim g As Integer, Beg As Integer
  Dim N As Integer, PAnt As Double
  NLoop = NLoop + 1
  For g = 1 To El - 1
    PAnt = PAnt + PP(g)
  Next g
  Beg = Int((PMol - PAnt) / PA(El))
  For N = Beg + 1 To MayMust(El) Step -1
    NEl(El) = N
    PP(El) = NEl(El) * PA(El)
    Pfrag = PAnt + PP(El)
    If Abs(Pfrag - PMol) < PcReq Then
      Call ImpFormula
      GoTo Fim
    End If
    If NLoop < NElSel Then
      Call FNLoop(El + 1)
    End If
  Next N
  Fim:
  Next N
  If El > 1 Then
    NEl(El) = 0
    NLoop = NLoop - 1
  End If
End Sub
```

Naturalmente, antes de entrar nessa rotina é necessário efetuar uma série de preparações, que não vamos discutir. A parte principal da rotina é constituída por um loop For...Next, com a característica de ser a rotina novamente chamada de dentro dela mesma (“recorrente” é o termo empregado por alguns, “recursivo” por outros). Dessa forma o resultado é equivalente a vários loops For...Next aninhados: como é necessário

um loop para cada elemento, a escrita de sete loops aninhados se tornaria muito complicada e, como se vê, é desnecessária. A limitação em sete elementos é apenas de ordem prática, pois com muitos elementos haveria grande consumo de tempo, memória, etc., podendo exceder o limite das “Lists” que armazenam as fórmulas, etc. A rotina em si pode ser usada para quantos elementos se quiser.

A contagem do loop é regressiva, começando no maior valor possível ($Beg + 1$) e reduzindo-se até 1 (se o usuário tiver selecionado a opção de que aquele elemento **deve** estar presente) ou zero, que são os dois valores possíveis da variável `MayMust(EI)`. O valor de “N” representa o número de átomos do elemento em questão que está presente na fórmula; como se vê, para cada valor de N é calculada a massa molecular resultante (`Pfrag`) e, se a diferença (em valor absoluto) entre esse valor e a massa dada (`Pmol`) for inferior à precisão requerida (`Pcreq`), então a fórmula será considerada, por enquanto, como uma solução (`Call ImpFormula`).

A rotina `ImpFormula` (muito longa para ser reproduzida aqui) realiza então as seguintes operações com a fórmula recebida: calcula o número total de elétrons da fórmula ($\sum_i (n^\circ \text{ atômico do elemento } i) \times (n^\circ \text{ de átomos do elemento } i \text{ na fórmula})$) e verifica se é par ou ímpar. No caso de um fragmento neutro, se for par não há elétron desemparelhado, e se for ímpar, há. Já se o fragmento é positivo, é porque perdeu um elétron (apenas íons com uma única carga são considerados neste programa), e a situação acima se inverte. Assim o programa decide os sinais `[·]`, `[+·]` e `[+]` que coloca na frente das fórmulas.

Em seguida é feita a operação, um pouco mais complicada, de decidir se a fórmula contém ou não excesso de elementos monovalentes. Essa operação baseia-se nas considerações a seguir.

Elementos com valência acima de 1 podem, em princípio, fazer cadeias unindo-se a eles mesmos ou a outros elementos polivalentes. Por essa razão não é possível estabelecer limites para o número de cada um desses elementos que pode estar presente em uma fórmula.

Tais cadeias, porém, se forem lineares, deixam sobrando $V-2$ valências para cada um dos elementos intermediários (pois o elemento intermediário precisa “gastar” duas valências para unir-se a seus dois vizinhos), e $V-1$ para cada um dos elementos dos extremos da cadeia (V é o número total de valências do elemento em questão). Assim uma molécula que contenha n_1 átomos do elemento 1, com valência V_1 , n_2 átomos do elemento 2, com valência V_2 , etc., terá um total máximo de “valências livres” (aquelas às quais se podem ligar os elementos monovalentes) de

$$\text{ValênciasLivres}_{\max} = 2 + \sum_i n_i (V_i - 2)$$

Este é, também, o número máximo de elementos monovalentes que essa fórmula pode conter.

Em linguagem de programação Basic isso adquire o seguinte aspecto:

```
For N = 1 To NElSel
  NFELV(V1(N)) = NFELV(V1(N)) + NEl(N)
Next N
For N = 2 To 10
  MonoMax = MonoMax + (N - 2) * NFELV(N)
Next N
MonoMax = MonoMax + 2
```

O primeiro loop simplesmente conta o total de elementos de cada valência que está presente na molécula; o segundo loop faz a somatória da fórmula matemática acima e a última linha soma 2 ao resultado.

Apesar de ter sido calculado para cadeias lineares, o resultado é válido também para cadeias ramificadas, pois uma cadeia ramificada qualquer pode sempre ser obtida a partir de uma cadeia linear: “quebrando um pedaço” da ponta (e assim liberando duas valências) e ligando esse “pedaço” em outro ponto da cadeia (e assim consumindo novamente as duas valências recém-liberadas, resultando no mesmo número de valências livres).

5.2. Cálculo dos picos de isótopos

Apesar de ser o cálculo dos picos de isótopos, em princípio, uma operação simples, a sua aplicação na prática envolve muitas etapas, que acaba conferindo considerável complexidade às rotinas. Há um grande número de variáveis envolvidas, dificultando a memorização e, conseqüentemente, a compreensão.

A maneira de abordar o problema que nos pareceu mais simples é a seguinte:

- 1) Fazer todas as combinações* possíveis dos isótopos de um elemento de cada vez, e calcular a probabilidade[§] de cada combinação;
- 2) Fazer as combinações entre os grupos encontrados de um elemento com os grupos dos outros elementos.

* Neste texto, a palavra “combinação” escrita normalmente está sendo usada no sentido vulgar do termo; quando usada no sentido “matemático” (“técnico”), aparecerá em itálico: *combinação, arranjo, permutação*.

§ O termo “probabilidade” estará sendo usado aqui com um sentido especial, que poderia talvez ser expresso como “probabilidade relativa”. O leitor deve estar familiarizado com o fato de que, em espectrometria de massa, é costume atribuir ao pico principal o valor 100% (ou 1,00). No caso, por exemplo, dos isótopos de um elemento, o principal terá 100% (1,00) e outro isótopo pode ter uma intensidade de 40% (0,40), fazendo com que a soma dos dois seja 140% (1,40). Quando se fala de probabilidade, a soma das probabilidades teria que ser 100% (1,00), e esse termo não poderia ser usado para aquelas intensidades (100% e 40%). **No entanto**, esses números são **proporcionais** às probabilidades, e como o que queremos no final é comparar as intensidades **relativas** dos vários picos, tanto faz usar um como outro valor, pois a relação final será a mesma.

Como exemplo, examinemos a molécula de água (H₂O):

Fase 1:

| a) Para o hidrogênio | | b) Para o oxigênio | |
|--|---|----------------------------------|---------------|
| combinação | probabilidade | combinação | probabilidade |
| A ₁ : ¹ H ¹ H | 1,00×1,00 =1,00 | B ₁ : ¹⁶ O | 1,00 |
| A ₂ : ¹ H ² H | 1,00×0,00016 =0,00016 | B ₂ : ¹⁷ O | 0,0004 |
| A ₃ : ² H ¹ H | 0,00016×1,00 =0,00016 | B ₃ : ¹⁸ O | 0,002 |
| A ₄ : ² H ² H | 0,00016×0,00016 =2,56×10 ⁻⁸ | | |

Fase 2:

Agora teríamos que combinar todos os “A’s” com todos os “B’s”, calculando a correspondente probabilidade (produto das probabilidades de cada um). Os grupos resultantes são:

| | | | |
|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| A ₁ B ₁ | A ₂ B ₁ | A ₃ B ₁ | A ₄ B ₁ |
| A ₁ B ₂ | A ₂ B ₂ | A ₃ B ₂ | A ₄ B ₂ |
| A ₁ B ₃ | A ₂ B ₃ | A ₃ B ₃ | A ₄ B ₃ |

(Consideramos desnecessário mostrar as probabilidades aqui)

Para o caso do hidrogênio apresentado acima, o que está sendo chamado de “combinação” é, na verdade, *arranjo*, pois A₂ e A₃ diferem apenas pela ordem. Percebe-se aqui um certo desperdício de esforço neste cálculo, pois A₂ e A₃ têm a mesma massa e a mesma probabilidade, não tendo portanto sentido fazer o cálculo duas vezes. Seria mais lógico fazer as *combinações* (verdadeiramente *combinações*, diferindo apenas pela natureza) para os isótopos do hidrogênio e depois multiplicar a probabilidade de cada *combinação* pelo número de *permutações* possíveis para cada uma.

| <i>combinações</i> | <i>permutações</i> | | Probabilidade |
|--|-------------------------------|---|-------------------------|
| A ₁ : ¹ H ¹ H | -- | 1 | 1,00×1 |
| A ₂ : ¹ H ² H | ² H ¹ H | 2 | 0,00016×2 |
| A ₃ : ² H ² H | -- | 1 | 2,56×10 ⁸ ×1 |

As *combinações* e *permutações* referidas devem ser **com repetições**, pois o mesmo isótopo pode aparecer várias vezes em cada *combinação* (ou *permutação*). Um exemplo que pode deixar vários desses aspectos mais claros é o cálculo dos isótopos de hidrogênio para o CH₄:

| <i>combinações</i> | <i>permutações</i> | | Probabilidade |
|--|---|---|--------------------|
| A ₁ : ¹ H ¹ H ¹ H ¹ H | -- | 1 | P _{A1} ×1 |
| A ₂ : ¹ H ¹ H ¹ H ² H | ¹ H ¹ H ² H ¹ H ¹ H ² H ¹ H ¹ H ² H ¹ H ¹ H ¹ H | 4 | P _{A2} ×4 |
| A ₃ : ¹ H ¹ H ² H ² H | ¹ H ² H ¹ H ² H ² H ¹ H ¹ H ² H ¹ H ² H ² H ¹ H ² H ¹ H ² H ¹ H ² H ² H ¹ H ¹ H | 6 | P _{A3} ×6 |
| A ₄ : ¹ H ² H ² H ² H | ² H ¹ H ² H ² H ² H ² H ¹ H ² H ² H ² H ² H ¹ H | 4 | P _{A4} ×4 |
| A ₅ : ² H ² H ² H ² H | -- | 1 | P _{A5} ×1 |

Um ponto muito importante para a compreensão é que, no caso das *combinações*, é preciso determinar cada uma das *combinações mesmo*, para poder calcular sua massa “molecular” e sua probabilidade. Já no caso das *permutações* não precisamos conhecer cada uma, mas apenas o **número** de *permutações* para cada caso (a massa e a probabilidade já são conhecidas, e são as mesmas para cada caso de um conjunto de *permutações*).

No momento de combinar um elemento com outro, A₂ aparecerá só uma vez (ao invés de 4 vezes, como seria se tivéssemos feito da mesma forma que antes), mas sua probabilidade já estará multiplicada por 4, levando ao mesmo resultado final. Similarmente, A₃ aparecerá só uma vez (e não 6), com a probabilidade multiplicada por 6.

Para fazer o computador executar essas operações foi elaborada uma rotina principal, chamada “IsotPeaks”, que faz uma parte das operações e chama várias outras rotinas para a realização de tarefas especializadas. Não vamos reproduzir a rotina IsotPeaks inteira aqui, pois ela é muito longa e parte considerável dela é destinada à leitura de fórmula, impressão de resultados, etc. Reproduziremos apenas alguns trechos mais importantes e as outras rotinas também aparecerão “limpadas” de trechos menos relevantes.

Rotina IsotPeaks, trecho 1

```

ReDim Cr(Cnt)
MainPkMass = 0
Dim Zmin As Integer, Zmax As Integer
For N = 1 To Cnt
  For g = 1 To 103
    If AtSymb(N) = Symb(g) Then
      Exit For
    End If
  Next g
  AtNum(N) = g
  For j = 1 To NIsot(AtNum(N))
    If AbundIsot(AtNum(N), j) = 100 Then
      AtW(N, 0) = AtomW(AtNum(N), j)
      AbIs(N, 0) = 100
    Exit For
  End If
  Next j
  For j = 1 To NIsot(AtNum(N))
    Z = Abs(AtomW(AtNum(N), j) - AtW(N, 0))
    ZInt = Int(Z)
    If Z - ZInt >= 0.5 Then ZInt = ZInt + 1
    If AtomW(AtNum(N), j) - AtW(N, 0) < 0 Then
ZInt = -ZInt
      AtW(N, ZInt) = AtomW(AtNum(N), j)
      AbIs(N, ZInt) = AbundIsot(AtNum(N), j)
      If ZInt < Zmin Then Zmin = ZInt
      If ZInt > Zmax Then Zmax = ZInt
    Next j
    MainPkMass = MainPkMass + AtW(N, 0) * NFEL(N)
Call PrepComb(N, NFEL(N), AtNum(N))
  Next N

```

Este trecho é a parte final da leitura de fórmula. O computador já sabe quantos elementos diferentes há na fórmula (Cnt), quantos átomos de cada elemento há na fórmula [NFEL(x)], e vai agora achar, para cada elemento, o número atômico [AtNum(x)] e a massa atômica [AtW(x,y)] e abundância [AbIs(x,y)] para cada isótopo. Aproveita também para calcular a massa do pico “principal” (aquele constituído pelos isótopos mais abundantes) (MainPkMass), e chama a rotina PrepComb para cada elemento.

```

Sub PrepComb(NOrd, NElF, Atn)
  Dim Conj As Integer, So As Integer, P As Double
  Dim N As Integer, F As Double
  Conj = NIsot(Atn)
  So = 0
  P = 1
  For N = 0 To NElF - 1
    So = Conj + N
    P = P * So
  Next N
  F = 1
  For N = 1 To NElF
    F = F * N
  Next N
  Cr(NOrd) = P / F
End Sub

```


Esta rotina é simples, e tem a função de calcular o **número** de *combinações* com repetições [Cr(x)] para cada elemento da fórmula.

A fórmula matemática correspondente aos cálculos feitos por essa rotina é:

$$(CR)_m^p = \frac{m(m+1)(m+2)\dots(m+p-1)}{p!}$$

m: n° de isótopos do elemento em questão.

p: n° de vezes que o elemento aparece na fórmula molecular em questão.

Sabendo o **número** de combinações é possível dimensionar apropriadamente diversas variáveis, e é possível também calcular o número total de picos de isótopos (Npk), o que é feito no pequeno trecho da rotina IsotPeaks reproduzido a seguir:

Rotina IsotPeaks – trecho2

```
CRmax = 0
Npk = 1
For N = 1 To Cnt
  If Cr(N) > CRmax Then CRmax = Cr(N)
  Npk = Npk * Cr(N)
Next N
```

Como se vê, o número total de picos é o produto de todos os números de *combinações* de cada elemento. Isto fica claro quando se considera que cada *combinação* de um elemento pode ser “combinada” (“agrupada”) com todas as *combinações* de outro elemento (V. novamente o exemplo da água dado anteriormente).

Logo adiante a rotina IstotPeaks faz um dimensionamento de diversas variáveis e chama, para cada elemento da fórmula, a rotina CombLoop.

Rotina IsotPeaks – trecho 3

```
ReDim MolWE(50, CRmax): ReDim ProbWE(50, CRmax):
ReDim Pmut(50, CRmax)
ReDim MolW(Npk): ReDim ProbW(Npk)
For N = 1 To Cnt
  ReDim ZMolW(NFEL(N))
  ReDim ZProbW(NFEL(N))
  ReDim ZZ$(NFEL(N))
  ReDim Rep(NFEL(N))
  'Cont = 0
  Call CombLoop(1, NIsot(AtNum(N)), 0, N,
NFEL(N), AtNum(N), 0)
Next N
```

A rotina CombLoop (reproduzida abaixo) é, de certa forma, a mais importante, pois é ela que monta as combinações possíveis de isótopos para cada elemento e calcula a correspondente probabilidade.

```

Sub CombLoop(Inic, NIs, NLoop, NOrd, NEIF, AtoNu, Cont)
  Dim N As Integer, PrZ$, g As Integer, PrZ2$
  NLoop = NLoop + 1
  For N = Inic To NIs
    ZMolW(NLoop) = AtomW(AtoNu, N)
    ZProbW(NLoop) = AbundIsot(AtoNu, N) / 100
    ZZ$(NLoop) = N & Symb(AtoNu)
    If NLoop = NEIF Then
      Cont = Cont + 1
      MolWE(NOrd, Cont) = 0
      ProbWE(NOrd, Cont) = 1
      PrZ$ = ""
      For g = 1 To NEIF
        MolWE(NOrd, Cont) = MolWE(NOrd, Cont) + ZMolW(g)
        ProbWE(NOrd, Cont) = ProbWE(NOrd, Cont) * ZProbW(g)
        PrZ$ = PrZ$ & "[" & ZZ$(g) & "]"
        Rep(g) = 1
      Next g
      Call FindRep(1, 0, NEIF)
      PrZ2$ = ""
      For g = 1 To NEIF
        PrZ2$ = PrZ2$ & Rep(g) & ","
      Next g
      Call NPermutRep(NEIF, NOrd, Cont)
      ProbWE(NOrd, Cont) = ProbWE(NOrd, Cont) * Pmut(NOrd, Cont)
    End If
    If NLoop < NEIF Then
      Call CombLoop(N, NIs, NLoop, NOrd, NEIF, AtoNu, Cont)
    End If
  Next N
  NLoop = NLoop - 1
End Sub

```

Como o leitor pode facilmente observar, trata-se novamente de uma rotina recorrente (ou recursiva?), significando que a rotina é chamada novamente por ela mesma, o que resulta em vários loops For-Next aninhados. A parte central das operações é realizada apenas quando $NLoop = NEIF$, isto é, quando o número de loops executados for igual ao número de vezes que o elemento em questão aparece na fórmula. Em outras palavras, este é o momento em que a rotina terminou de fazer uma das *combinações* possíveis, e está pronta para calcular sua massa “molecular” e sua probabilidade.

Como exemplo, imaginemos que estão sendo calculadas as combinações de hidrogênio em CH_4 : na primeira entrada na rotina ($Nloop = 1$) as variáveis $ZmolW(x)$ e $ZprobW(x)$ são carregadas com os dados (massa atômica e abundância/100) do isótopo mais leve (1H), o mesmo ocorrendo nas três seguintes entradas; aí $Nloop$ torna-se igual a $NEIF$, e as variáveis $MolWE(x,y)$ e $ProbWE(x,y)$ são carregadas respectivamente com a massa

“molecular” e com a probabilidade da correspondente *combinação* (${}^1\text{H}^1\text{H}^1\text{H}^1\text{H}$). Em seguida são chamadas mais duas rotinas, FindRep e NPermutRep, que têm a finalidade de contar as repetições e calcular o número de *permutações* com repetições da combinação recentemente encontrada (essas rotinas são examinadas logo adiante). Uma vez conhecido o número de *permutações*, Pmut(x,y), a probabilidade da *combinação* ProbWE(x,y) é multiplicada por esse valor. O loop For-Next passa agora para o segundo isótopo (${}^2\text{H}$), achando a *combinação* (${}^1\text{H}^1\text{H}^1\text{H}^2\text{H}$) e novamente calculando massa e probabilidade. Depois retorna para o loop anterior, colocando um deutério na terceira posição (${}^1\text{H}^1\text{H}^2\text{H}$) e volta para o quarto loop **com N = 2**: observe a chamada

Call CombLoop (N,....)

Que faz com que em loops posteriores não sejam mais acrescentados os primeiros isótopos. Assim a rotina não encontra a “combinação” falsa ${}^1\text{H}^1\text{H}^2\text{H}^1\text{H}$ (que seria uma *permutação* da anterior), mas apenas a *combinação* verdadeira ${}^1\text{H}^1\text{H}^2\text{H}^2\text{H}$.

A rotina FindRep é destinada a encontrar o número de repetições em cada *combinação*, para cálculo do número de *permutações*.

```

Sub FindRep(Inic2, NLoop2, NEIF2)
  Dim N As Integer
  NLoop2 = NLoop2 + 1
  For N = Inic2 + 1 To NEIF2
    If ZZ$(N) = ZZ$(Inic2) Then
      Rep(Inic2) = Rep(Inic2) + 1
    End If
  Next N
  If Inic2 + Rep(Inic2) < NEIF2 Then
    Call FindRep(Inic2 + Rep(Inic2), NLoop2, NEIF2)
  End If
End Sub

```

Cada um dos valores Rep(x) encontrados por essa rotina é, na verdade, o número de vezes que o isótopo correspondente figura na *combinação*. Ao entrar na rotina, Rep(x)=1 para todos os *elementos** da *combinação* (observe o loop For g = 1 to NEIF ----Next g que antecede a chamada de FindRep na rotina CombLoop).

Em FindRep um dos valores de Rep(x) vai sendo aumentado de 1 cada vez que é encontrado um isótopo idêntico ao considerado.

A rotina fica muito simplificada pelo fato de que as *combinações* são formadas de maneira ordenada; assim, não é preciso verificar os *elementos* anteriores, pois os iguais ao considerado estarão sempre à sua frente.

Como exemplo, considere-se o caso da seguinte *combinação* de isótopos: ${}^1\text{X}^1\text{X}^2\text{X}^2\text{X}^2\text{X}^3\text{X}^4\text{X}^4\text{X}$. O loop recorrente rodará quatro vezes, efetuando as seguintes transformações:

* *Elementos* em itálico, neste texto, são elementos no sentido matemático, elementos de um conjunto, e não elementos químicos.

| Início | 1ª passada | 2ª passada | 3ª passada | 4ª passada |
|------------|------------|------------|------------|------------|
| Rep(1) = 1 | → 2 | | | |
| Rep(2) = 1 | | | | |
| Rep(3) = 1 | | → 3 | | |
| Rep(4) = 1 | | | | |
| Rep(5) = 1 | | | | |
| Rep(6) = 1 | | | → 1 | |
| Rep(7) = 1 | | | | → 2 |
| Rep(8) = 1 | | | | |

Em seguida à FindRep, a rotina CombLoop chama NPermut Rep, que calcula o número de *permutações* com repetições Pmut(x,y) que é possível fazer com uma dada *combinação*.

```

Sub NPermutRep(NELF3, NOrd3, Cont3)
  Dim Div As Double, NumFac As Double, N As Integer
  Dim Fac As Double, g As Integer
  Div = 1
  NumFac = 1
  For N = 1 To NELF3
    NumFac = NumFac * N
    If Rep(N) <> 1 Then
      Fac = 1
      For g = 1 To Rep(N)
        Fac = Fac * g
      Next g
      Div = Div * Fac
    End If
  Next N
  Pmut(NOrd3, Cont3) = NumFac / Div
End Sub

```

A fórmula matemática correspondente ao cálculo efetuado por essa rotina é

$$(PR) = \frac{m!}{\alpha! \beta! \gamma! \dots \lambda!}$$

sendo: \underline{m} o número de *elementos* da *combinação*

$\underline{\alpha}$ o número de *elementos* iguais a \underline{a}

$\underline{\beta}$ o número de *elementos* iguais a \underline{b}

.

.

etc.

Da maneira como é constituída a rotina, os valores Rep(x) = 1 são ignorados.

Após todas essas operações, o processamento retorna à rotina IsotPeaks no trecho representado a seguir:

Rotina IsotPeaks – trecho 4

```

For N = 1 To Npk
  ProbW(N) = 1
Next N
ReDim XM(Cnt): ReDim XP(Cnt)

Call FinCombLoop(0, Cnt, 0)
Call SelPeak

```

Aqui são chamadas ainda mais duas rotinas: FinCombLoop e SelPeak.

```

Sub FinCombLoop(NLoop, FimLoop, Contr)
  Dim N As Integer, g As Integer
  NLoop = NLoop + 1
  For N = 1 To Cr(NLoop)
    XM(NLoop) = MolWE(NLoop, N)
    XP(NLoop) = ProbWE(NLoop, N)
    If NLoop = FimLoop Then
      Contr = Contr + 1
      For g = 1 To NLoop
        MolW(Contr) = MolW(Contr) + XM(g)
        ProbW(Contr) = ProbW(Contr) * XP(g)
      Next g
    End If
    If NLoop < FimLoop Then
      Call FinCombLoop(NLoop, FimLoop, Contr)
    End If
  Next N
  NLoop = NLoop - 1
End Sub

```

Esta rotina faz as *combinações* associando cada *combinação* de isótopos de um certo elemento químico com cada *combinação* de isótopos de outro elemento químico, até montar a molécula inteira, calculando a correspondente probabilidade (que é o produto das probabilidades de cada *combinação* que entra na *combinação* final). Lembrar que a probabilidade de uma certa *combinação* já está multiplicada pelo número de *permutações* possíveis.

Exemplo:

Combinações de isótopos do elemento A: A₁, A₂, A₃

Combinações de isótopos do elemento B: B₁, B₂, B₃, B₄

Combinações feitas pela rotina FinCombLoop:

```

A1B1  A1B2  A1B3  A1B4
A2B1  A2B2  A2B3  A2B4
A3B1  A3B2  A3B3  A3B4

```

Cada um desses conjuntos pode agora passar a ser considerado como um “pico” no espectro.

```

Sub SelPeak()
  Dim N As Integer, g As Integer, H As Integer
  Dim MPP As Double, MPN As Integer, tempM As Double
  Dim tempP As Double
  PcReq = CDbl(Form1.Text2.Text)
  'Put together peaks of same mass
  N = 1
  Do While N < Npk
    g = N + 1
    Do While g < Npk
      If Abs(MolW(N) - MolW(g)) < PcReq Then
        ProbW(N) = ProbW(N) + ProbW(g)
        For H = (g + 1) To Npk
          MolW(H - 1) = MolW(H)
          ProbW(H - 1) = ProbW(H)
        Next H
        Npk = Npk - 1
        g = g - 1
      End If
      g = g + 1
    Loop
    N = N + 1
  Loop
  'find main peak
  MPP = 0
  For N = 1 To Npk
    If ProbW(N) > MPP Then
      MPP = ProbW(N)
      MPN = N
    End If
  Next N
  'adjust intensities (main peak is 1, or 100%)
  For N = 1 To Npk
    ProbW(N) = ProbW(N) / MPP
  Next N
  'remove peaks of too small intensity
  N = 1
  Do While N <= Npk
    If ProbW(N) < 0.000005 Then
      For g = N + 1 To Npk
        MolW(g - 1) = MolW(g)
        ProbW(g - 1) = ProbW(g)
      Next g
      Npk = Npk - 1
      N = N - 1
    End If
    N = N + 1
  Loop
  'Sort peaks by Molecular Weight
  For N = 1 To Npk
    For g = N + 1 To Npk
      If MolW(g) < MolW(N) Then
        tempM = MolW(N): tempP = ProbW(N)
        MolW(N) = MolW(g): ProbW(N) = ProbW(g)
        MolW(g) = tempM: ProbW(g) = tempP
      End If
    Next g
  Next N
End Sub

```

Finalmente, a rotina SelPeak faz os ajustes finais realizando as seguintes operações:

- 1) Junta os picos que têm a mesma massa (de acordo com a precisão requerida).
- 2) Encontra o pico maior e ajusta as “probabilidades” (ou “intensidades”) para que a intensidade do pico principal seja 1 (ou 100%).
- 3) Remove os picos de intensidade muito pequena ($<0,000005$).
- 4) Ordena os picos de acordo com a massa molecular.

Evidentemente, muitas outras operações são necessárias para que o programa desempenhe adequadamente suas funções. O conjunto de rotinas tem, no total, um número de centenas de páginas.

A parte aqui exposta, porém, esclarece os pontos principais dos cálculos, e o leitor provavelmente não sentirá falta do que não foi discutido.