

Espectrometria de Massa de Electrospray – Técnica do Presente e do Futuro

M. F. DUARTE*

1. INTRODUÇÃO

A espectrometria de massa é uma técnica analítica poderosa que é usada para identificar compostos desconhecidos, quantificar materiais conhecidos e elucidar as propriedades químicas e estruturais das moléculas. A detecção de compostos pode ser conseguida para quantidades tão pequenas como 10^{-15} g para um composto de massa de 1000 Dalton. Isto significa que os compostos podem ser identificados em concentrações muito baixas (uma parte em 10^{12}) em misturas quimicamente complexas. A espectrometria de massa fornece informação tanto para químicos, como para físicos, engenheiros de controlo de processos, bioquímicos e ainda biólogos, para só citar alguns.

Os princípios científicos em que a técnica se baseia são simples. A essência da técnica envolve a geração de iões que são depois detectados. A sofisticação surge nos métodos que são usados para a geração desses mesmos iões e no modo de os analisar.

Uma das técnicas de ionização, em maior expansão, é por electrospray que passou por duas fases distintas de investigação e desenvolvimento. A primeira decorreu antes de 1970 e centrou-se mais nos aspectos fundamentais do processo de produção de carga assim como no modo experimental de o concretizar, sendo de salientar o trabalho realizado por Dole et al. [1]. A segunda fase deu-se a partir de 1970 com destaque para o trabalho desenvolvido em 1984 por Yamashita e Fenn [2], considerado pioneiro da espectrometria de massa de ionização por electrospray. A partir deste trabalho a técnica sofreu um incremento notório com o desenvolvimento e construção de fontes iónicas comercializáveis baseadas no princípio de carregar gotas electricamente.

Há essencialmente três características que fazem com que seja considerada uma técnica distinta das outras técnicas de ionização. A primeira destas características é a capacidade

para produzir iões multiplamente carregados, com número de cargas elevado, reduzindo, assim a razão m/z , de tal modo que seja possível analisar compostos de elevada massa molecular até centenas de kDa, em praticamente todo o tipo de analisadores. Uma segunda característica é que as amostras a analisar devem ser introduzidas em solução, o que faz com que seja possível o acoplamento com muitas técnicas de separação. Por último e não menos importante o facto de ser o electrospray uma técnica de ionização suave permitindo que as interações não covalentes entre moléculas que existem em solução sejam preservadas na fase gasosa.

O desenvolvimento da espectrometria de massa de ionização por electrospray permitiu assim novas possibilidades para análise de compostos de elevada massa molecular de todos os tipos, incluindo proteínas, nucleotídeos e polímeros sintéticos, sendo por isso uma técnica muito usada em investigação biológica, bioquímica, farmacêutica e médica.

2. MECANISMO

A produção de iões em electrospray requer essencialmente dois passos: dispersão de gotas altamente carregadas quase à pressão atmosférica seguida de condições que permitam a evaporação da gota.

As soluções são primeiramente pulverizadas electrostaticamente com formação de gotas pequenas e altamente carregadas. A nebulização da solução é nalguns casos facilitada pela ajuda de um gás nebulizador. Posteriormente as moléculas de analito devem de alguma forma ser separadas do solvente na forma de iões. Este passo de formação de iões como em muitas das técnicas de ionização consideradas suaves é provavelmente o menos compreendido no processo global do electrospray. Alguns mecanismos têm sido propostos para a desadsorção de iões a partir de gotas carregadas sendo que o modelo de *resíduo de carga* de Dole [1], aplica-

do a macromoléculas, foi talvez o primeiro a servir de base para a actual técnica de electrospray. Neste modelo é considerado que à medida que o solvente se evapora a densidade de carga à superfície aumentará até que as forças repulsivas de Coulomb entre as cargas superficiais excederão a tensão superficial levando à divisão da gota inicial. Se este processo de divisão continuar e se a solução original for suficientemente diluída será alcançado um estado no qual cada gota conterá uma única molécula que reterá parte da carga inicial, ou seja formar-se-ão macro iões.

Um outro mecanismo, para a geração de iões pequenos, o da *evaporação iónica* foi proposto, por Iribarne e Thomson [3], que sugerem que a evaporação do solvente conduz a uma instabilidade das gotas com razões elevadas de densidade de carga superficial/ raio da gota. A energia electrostática associada com a gota carregada torna-se então suficientemente grande para desadsorver iões do analito para a fase gasosa. Um esquema da sequência dos acontecimentos que conduzem à formação de iões pode ser visto na Fig. 1

Este mecanismo foi aplicado a macromoléculas por Fenn [5] o qual propôs que uma parte da molécula carregada, podia penetrar a superfície da gota devido a movimento Browniano. A existência de repulsão coulombiana entre esta parte da molécula e a superfície da gota puxará a molécula para fora da gota.

3. INSTRUMENTAÇÃO

3.1. Fonte

As fontes iónicas dos espectrómetros de massa estão em geral situadas numa região de alto vácuo. No caso da fonte de ionização por electrospray ela encontra-se à pressão atmosférica e a evaporação do solvente é muitas vezes completada por intermédio de um fluxo contra corrente de um gás, em geral, azoto. Os iões gerados são depois transferidos desta zona de alta pressão para a zona de alto vácuo do analisador de massa.

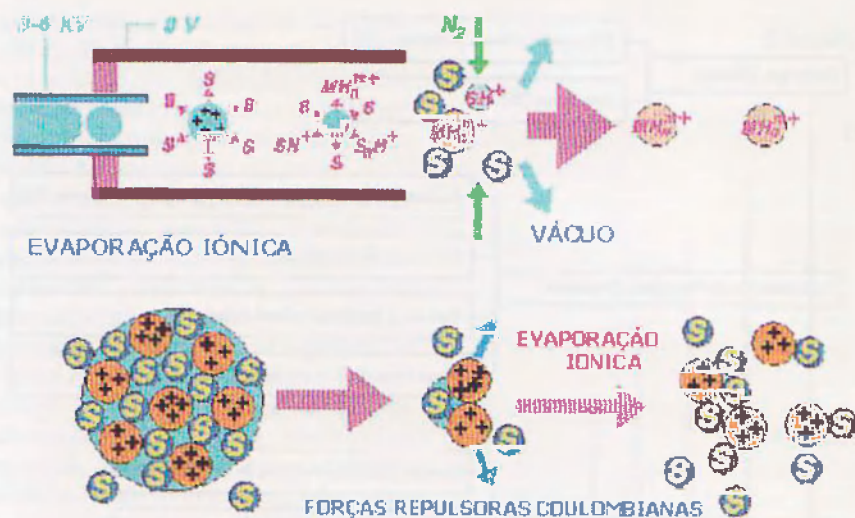


Fig. 1 - Mecanismo de evaporação iônica adaptado da Ref. 4 com permissão.

seguida os íons amostrados através de um cone ou orifício passando os íons a uma zona intermédia mantida a uma pressão mais baixa por meio de uma bomba rotatória. Os íons atravessam em seguida um *skimmer* em direcção ao analisador que se encontra a alto vácuo. O *skimmer* funciona como um separador de momento sendo que os íons amostra mais pesados passam através dele enquanto que as moléculas mais leves de gás e solvente são bombeadas.

3.2. Analisador

O analisador mais utilizado e mesmo o primeiro a ser comercializado em ESMS é o quadrupolo. Isto deve-se em princípio ao facto de os quadrupolos serem relativamente baratos, fáceis de usar e capazes de fornecer bom rigor nos valores de massa medidos. No entanto a resolução é limitada e a transmissão diminui linearmente com m/z sendo o limite superior de m/z cerca de 3000. Analisadores de sector podem fornecer melhor rigor, maior resolução e mesmo maior sensibilidade que os quadrupolos, em instrumentos que dispõem de um detector de array [8]. A combinação de ES a instrumentos de sector de dupla focagem foi concretizada [9,10] apesar desta combinação ser problemática devido à necessidade de utilização de potenciais eléctricos da ordem dos kV para aceleração dos íons, a existência dos quais pode provocar descargas eléctricas na zona de pressão intermédia. Em consequência, neste tipo de associação de analisador de sector a fontes funcionando à pressão atmosférica, há necessidade de sistemas de bombeamento adicionais para que haja um decréscimo de pressão mais gradual.

Outro tipo de analisadores têm sido usados em combinação com electrospray sempre com o intuito de melhorar quer a resolução, quer o rigor na medida quer a sensibilidade. Entre eles são de salientar o de ressonância ciclotrónica de íons com transformadas de Fourier, FTICR, [11,12] e o de tempo de voo, TOF, [13]. O primeiro é um instrumento

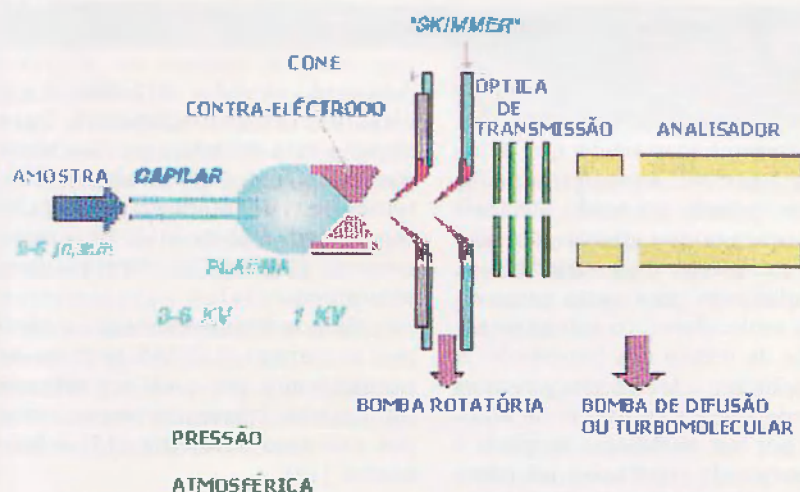


Fig. 2 - Representação esquemática de um instrumento ESI-MS adaptado da Ref. 4 com permissão.

Muitos são os sistemas de electrospray que têm sido construídos [6,7], diferindo entre si nalguns dos componentes, mas na sua essência são constituídos por:

- sistema de introdução de amostra
- região da fonte onde os íons são gerados
- um orifício para amostragem de íons
- um sistema de transferência iônica onde os íons são transportados para o analisador de massa.

Na Fig. 2 podemos ver as principais características de um sistema de electrospray.

Em primeiro lugar temos um capilar de aço inoxidável, mantido a um potencial relativamente elevado em relação a um contra-eléctrodo, onde o analito em solução é introduzido e pulverizado na sua extremidade, sendo que o sinal do potencial aplicado determina a polaridade das gotas e dos íons formados. A pressão entre o capilar e o contra-eléctrodo é a pressão atmosférica, sendo em

Espectrometria de Massa por Electrospray - Técnica do Presente e do Futuro

capaz de fornecer elevado poder de resolução e elevada sensibilidade bem como medida de massa rigorosa e na verdade a combinação de ESI com ETICR está a tornar-se numa das técnicas mais poderosas para análise estrutural de grandes biomoléculas. Esta combinação apresentou até recentemente muitas dificuldades experimentais, basicamente, por causa da pressão muito baixa, 10^{-6} a 10^{-7} Pa, necessária para se obter as melhores condições de funcionamento do instrumento. Presentemente os espectrómetros ESI/FTICR dispõem de 3 a 5 estágios de bombeamento diferencial para conseguir a redução de pressão desejada. Quanto ao segundo, o TOF, existia o problema do acoplamento de uma fonte contínua como a de electrospray a um instrumento pulsado como o TOF sem haver perda de sensibilidade, o que foi conseguido com a chamada injeção iónica ortogonal, assim como foi conseguida uma elevada resolução com o uso de reflectores electrostáticos [14].

4. ELECTROSPRAY COMO INTERFACE EM LC/MS

A cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (GC/MS) tem sido considerada uma técnica analítica adequada para a análise de misturas complexas. Tem, no entanto, a grande limitação de ser aplicável apenas a moléculas relativamente voláteis e termicamente estáveis. Um acoplamento semelhante entre a cromatografia líquida e a espectrometria de massa (LC/MS) era por isso de todo o interesse, para a análise de compostos sem aquelas características, para os quais a análise por GC/MS só podia ser utilizada recorrendo a derivatizações que tornam o processo analítico muito demorado. Uma das maiores dificuldades nesta combinação tem sido a diferença fundamental entre as condições de operação, sendo de salientar, entre elas, os fluxos de líquido do LC incompatíveis com o sistema de vácuo do MS da ordem de 10^{-3} a

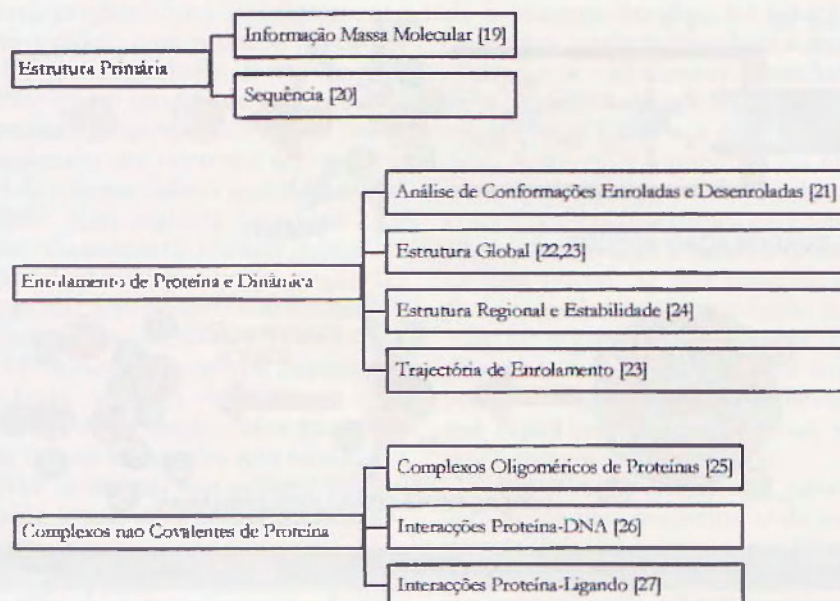


Fig. 3 - Resumo de aplicações de ESI no estudo de proteínas.

10^{-6} Pa. Várias interfaces [7] têm sido desenvolvidas sendo que a interface à pressão atmosférica (API) quando operada no modo electrospray é única no seu grande potencial para a análise de uma variedade de moléculas com uma vasta gama de massas moleculares, com uma sensibilidade da ordem dos femtomole. A ionização por electrospray requer um fornecimento constante de líquido e é por isso facilmente acoplada a um sistema de separação, tal como um cromatógrafo líquido. Uma fonte de electrospray funciona, portanto, como interface para LC/MS. São no entanto vários os parâmetros que afectam a estabilidade do spray: tais como tensão superficial, constante dielétrica, viscosidade, condutividade e velocidade de fluxo do solvente. Conseguem-se, no entanto, condições estáveis do spray com uma gama grande de solventes principalmente com misturas e com velocidades de fluxo da ordem de 1-10 $\mu\text{l}/\text{min}$. As velocidades de fluxo dos efluentes na cromatografia líquida (LC) são maiores, variando de $\sim 1\text{ml}/\text{min}$ para colunas de empacotamento até $\sim 50\mu\text{l}/\text{min}$ para colunas "microbore", velocidades de fluxo

demasiado elevadas para utilizar em electrospray convencional. Para obviar a esta diferença na velocidade dos fluxos foram desenvolvidos diferentes tipos de interfaces de ES [15], como sejam o ES assistido pneumaticamente [15] e o ES assistido ultrasonicamente [16].

Com o desenvolvimento a nível instrumental, LC-MS tornou-se numa técnica que pode ser aplicada num grande número de áreas, como por exemplo ambiente [17] e bio-análise [18].

5. APLICAÇÕES

A ESIMS sofreu um rápido crescimento tornando-se numa técnica analítica fundamental para análise de uma vasta gama de compostos polares, não voláteis e termicamente instáveis, indo de compostos de baixa massa molecular até biopolímeros de elevada massa molecular. Os melhores resultados analíticos são, em geral, obtidos para analitos que são iónicos em solução e é de acreditar que os iões observados na fase gasosa são pelo menos um reflexo qualitativo dos iões na solução amostra original, retendo aspectos da

sua estrutura e associações não covalentes. O maior sucesso da técnica tem sido na sua aplicação na análise de moléculas biológicas não voláteis. Em princípio todas as moléculas que podem ser carregadas são acessíveis a uma análise por ESIMS. Entre estas encontram-se os peptídeos e proteínas que podem ser protonados principalmente nas zonas básicas, ou seja nos grupos terminais amino. Os oligonucleotídeos podem ser carregados no modo iónico negativo; neste caso o grupo fosfato fornece a carga por abstracção do próton. Moléculas neutras, tais como oligossacarídeos, podem também ser detectadas porque se podem ligar a iões Na^+ ou outros metais alcalinos como agente de carregamento.

5.1. Macromoléculas Biológicas

A técnica de ESIMS tem sido aplicada em estudos de proteínas quer a nível de estrutura primária, quer secundária, terciária e quaternária como se pode ver no resumo apresentado na Fig.3. No que respeita a estrutura primária a técnica permite não só a determinação da massa molecular como também a determinação da sequência dos peptídeos na molécula. Far-se-á referência à aplicação de ESIMS a esta estrutura, uma vez que a aplicação às outras estruturas sai fora do âmbito deste texto de divulgação.

Determinação de massas moleculares

Biomoléculas de grandes dimensões examinadas por ESIMS apresentam uma distribuição de moléculas multiplamente carregadas e em geral nenhuma ocorrência de fragmentação, a menos que a dissociação seja induzida durante o transporte para o espectrómetro de massa por intermédio de colisões.

Para a determinação da massa molecular de uma macromolécula podem ser usados dois algoritmos [28] em que um deles é designado por algoritmo da média. Neste caso considera-se uma molécula multiplamente carregada dando no espectro de massa um dado valor de m/z que

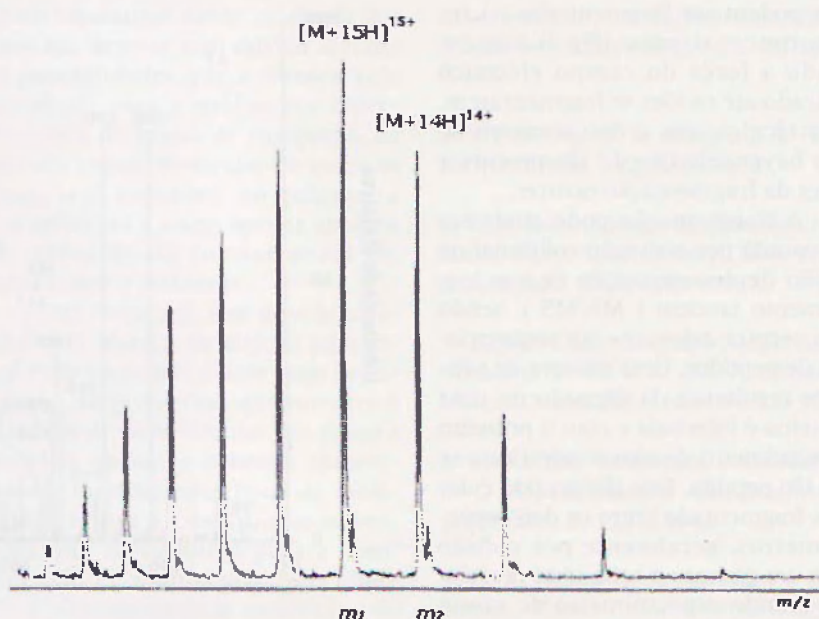


Fig. 4 - Espectro de massa ESI exemplificativo da escolha de iões multiplamente carregados para determinação de M_r .

se vai designar por m_1 com carga z_1 e massa molecular relativa M_r e no caso de se tratar de uma proteína considera-se que a espécie que transporta a carga, M_a , é um próton ($M_a=1,0079$)

$$m_1 z_1 = M_r + M_a z_1 = M_r + 1,0079 M_r \quad (1)$$

Se se considera um outro ião multiplamente carregado a m/z m_2 ($m_2 > m_1$) (Fig.4) que está afastado de m_1 de j picos ($j = 1$ para dois picos consecutivos) tem-se

$$m_2 (z_1 - j) = M_r + 1,0079 (z_1 - j) \quad (2)$$

Estas duas equações podem ser resolvidas dando origem às equações (3) e (4) que permitem calcular o estado de carga e massa molecular da macromolécula

$$z_1 = j (m_2 + 1,0079 / (m_2 - m_1)) \quad (3)$$

$$M_r = z_1 (m_1 - 1,0079)$$

Se o cálculo for feito para sucessivos pares de iões adjacentes obtém-se por último um valor médio para M_r .

A desconvolução é outro modo de extrair informação do espectro, na qual uma sequência de picos é transformada num único pico carregado, localizado numa escala de m/z à massa molecular relativa M_r do composto. Na prática é utilizado um algoritmo de desconvolução [28] em que o cálculo é executado pelo sistema de dados do espectrómetro de massa.

Determinação estrutural

As principais características dos espectros de massa de biomoléculas são a predominância de iões moleculares multiplamente carregados e a ausência de fragmentação o que permite a determinação rigorosa de massas moleculares. No entanto, no que respeita a estrutura molecular pouca informação é, em geral, obtida.

Para se obter informação estrutural há que proceder à fragmentação dos iões multiplamente carregados ou na ESI, ou na região de colisão de um instrumento tandem ou ainda numa armadilha iónica.

Embora ES possa ser considerado uma fonte de ionização suave, os

iões podem ser fragmentados na região cone – skimmer (Fig.2) aumentando a força do campo eléctrico aplicado até os iões se fragmentarem. Esta técnica tem a desvantagem de não haver selecção do ião precursor antes da fragmentação ocorrer.

A fragmentação pode ainda ser provocada por activação colisional na região de decomposição de um instrumento tandem (MS/MS), sendo esta técnica relevante na sequenciação de peptidos. Uma mistura de peptidos resultante da digestão de uma proteína é injectada e com o primeiro espectrómetro de massa selecciona-se um ião peptido. Este ião peptido é depois fragmentado entre os dois espectrómetros, geralmente por colisão com um gás raro a uma certa pressão. O segundo espectrómetro de massa separa e mede as massas dos iões fragmento produzidos pelo ião peptido. Como a fragmentação ocorre preferencialmente nas ligações amida, o espectro consiste numa série de picos diferindo nas massas dos resíduos dos aminoácidos.

Por último a fragmentação pode ter origem na activação colisional, que ocorre em instrumentos que disponham de uma armadilha iónica ou em instrumentos de ressonância ciclotrónica de iões, o que também permite a realização de experiências de MS/MS.

5.2. Ambiente

A técnica de ionização por electrospray não é só importante para o estudo de macromoléculas, como também é de reconhecido interesse para a resolução de problemas ambientais em que os contaminantes não são, em geral, constituídos por moléculas de grandes dimensões.

Um exemplo de problema ambiental envolve a especiação de compostos organometálicos e inorgânicos de estanho e arsénio porque o potencial tóxico destes compostos está fortemente dependente da sua especiação química e do processamento biogeoquímico pelos ecossistemas.

No respeitante aos compostos alquilo e arilo estânicos, altamente

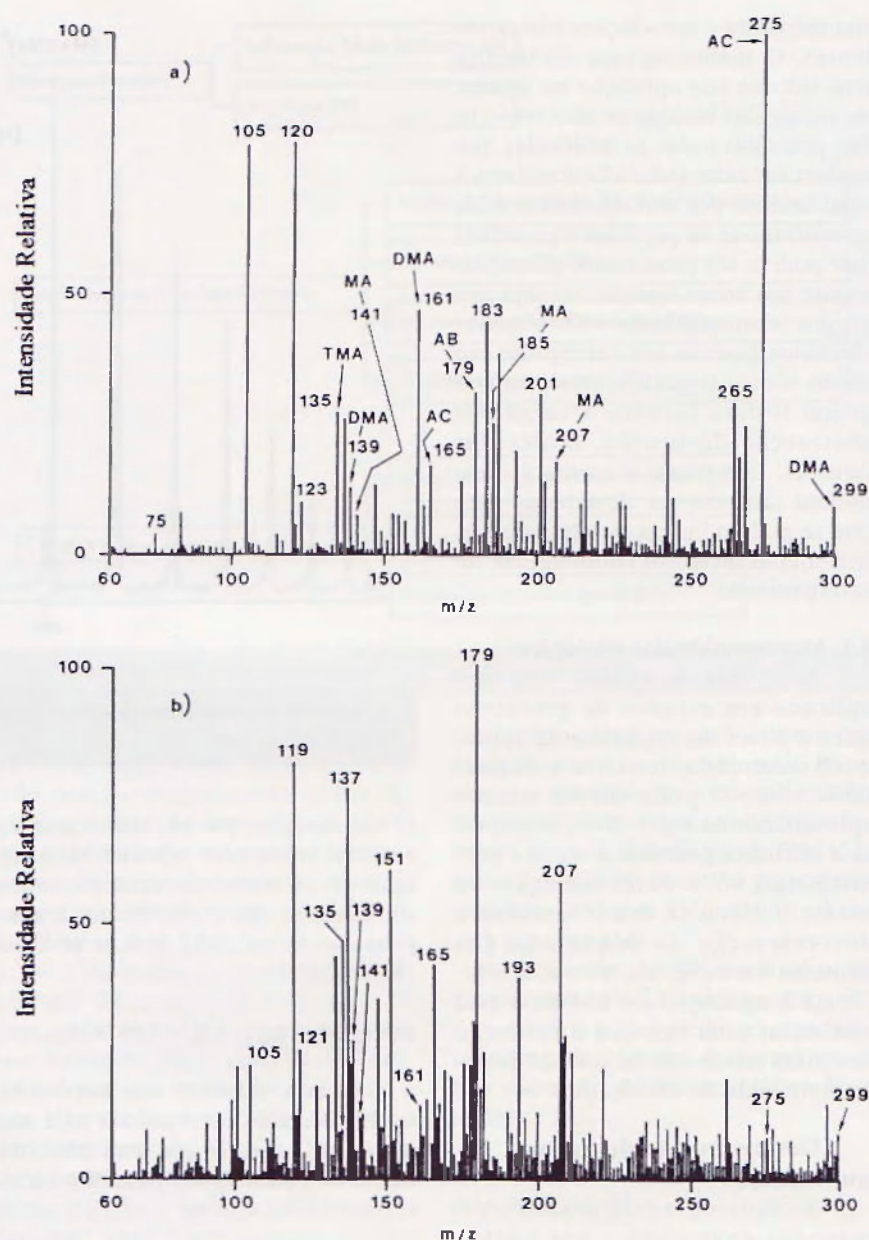


Fig. 5 - Espectros de massa ESI de: a) uma mistura de padrões de compostos organoarsenicais (MA, DMA, AB, AC, TMA); b) um extracto de água do estuário do Tejo.

tóxicos, eles foram estudados por ESIMS acoplada à LC [29], sob condições de ionização positiva e os resultados obtidos levaram a considerar que a técnica tem o potencial para se tornar uma ferramenta importante para monitorar e medir este tipo de compostos no ambiente.

Quanto aos compostos de arsénio, quantidades elevadas de arsénio

têm sido medidas nas águas do estuário do Tejo [30] resultantes em parte da fundição de pirites. Particularmente importantes parecem ser as formas de arsénio que não formam hidretos e têm sido designadas de "refractárias" ou "ocultas" [31] e que constituem cerca de 50% do As nas águas do estuário.

É de todo o interesse o desenvolvimento de técnicas analíticas con-

vententes para a identificação e quantificação destas espécies no ambiente. Um certo número de dificuldades surgem, no entanto, devido aos baixos níveis em que estas formas ocorrem associadas aos efeitos da matriz complexa da água do estuário. Foi possível identificar, por ESIMS (Fig.5), uma série de compostos contendo arsénio nas águas do estuário do Tejo por comparação com um espectro de massa ESI de uma mistura de padrões, arsenobetaína, AB, arsenocolina, AC, ácido metilarsónico, MA, ácido dimetilarsónico, DMA, e ião tetrametilarsónio, TMA [32].

Recorrendo a nanoelectrospray, foram também identificados arseno-açúcares [33], no modo negativo o que permitiu serem detectados ao nível do picograma, tendo sido ainda identificado um arseno-açúcar num extracto de uma alga.

Muitos outros problemas ambientais poderão ser resolvidos recorrendo a ESI quer acoplado a LC ou não. Um exemplo do 1º caso foi a sua aplicação à quantificação de herbicidas imidazolinona em amostras de solos e águas naturais. Embora tenham sido usadas duas técnicas, LC/UV e LC/ESIMS, no caso dos solos, dada a complexidade da matriz e as concentrações vestigiais da ordem de fracções do ng/g de solo, as análises foram apenas efectuadas por LC/ESIMS por ser uma técnica mais sensível e específica do que LC/UV [34]. Recentemente foi publicado um artigo [35] em que a técnica ESI/MS, dado o baixo limite de detecção, foi considerada uma técnica a ter em conta para, associada com resultados obtidos por outras técnicas, aumentar a confiança no rigor das determinações de perclorato, contaminante ambiental de águas da rede de consumo, que faz parte da Lista de Candidatos de Contaminantes de Água de Beber da Agência de Protecção Ambiental dos EUA.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O enorme sucesso da técnica de ESIMS que se desenvolveu a um

ritmo espantoso desde os finais dos anos 80, deve-se sem dúvida alguma às possibilidades que a técnica veio introduzir para a análise por espectrometria de massa de compostos de elevada massa molecular de todos os tipos, sem esquecer, no entanto, a sua aplicação a outro tipo de analitos de importância fundamental em áreas como o ambiente.

Esta técnica é, sem dúvida alguma, uma técnica de eleição para estudos de proteínas e toda uma investigação de problemas que envolvem este tipo de biomoléculas tais como a maneira como se dobram, interatuam com diferentes tipos de moléculas e levam a cabo funções específicas que contribuem para a compreensão de muitos processos biológicos. Outras técnicas analíticas não podem fornecer o mesmo nível de informação detalhada no respeitante a massas moleculares e estruturas a partir de quantidades extremamente pequenas de amostras.

É de crer que, pelo menos nos próximos anos, esta técnica que atingiu já elevados níveis de sensibilidade e de especificidade continuará a ser de importância fundamental para a espectrometria de massa analítica com desenvolvimentos futuros principalmente na área de acoplamento a técnicas de separação.

* Departamento de Química e Bioquímica,
Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa,
Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal

REFERÊNCIAS

1. M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson e M. B. Alice, *J. Chem. Phys.*, **49**, 2240 (1968).
2. M. Yamasbata e J. B. Fenn, *J. Phys. Chem.*, **88**, 4451 (1984).
3. J. V. Iribarne e B. A. Thomson, *J. Chem. Phys.*, **64**, 2287 (1976).
4. L. Esteban, *La Espectrometría de Masas en imágenes*, ACK Editores (1993).
5. S. F. Wong, C. K. Meng e J. B. Fenn, *J. Phys. Chem.*, **92**, 546 (1988).
6. R. B. Cole (Editor), *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, John Wiley & Sons Inc., Chichester (1997).
7. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, 2ª Ed., W. M. A. Niessen. Marcel Dekker Inc., New York (1999).
8. R. B. Cody, J. Tamura, J. W. Finch e B. D. Musselman, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **5**, 194 (1994).
9. C. K. Meng, C. N. McEwen e B. S. Larsen, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **4**, 147 (1990).
10. R. T. Gallagher, J. R. Chapman e M. Mann, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **4**, 369 (1990).
11. K. D. Henry, *Org. Mass Spectrom.*, **25**, 490 (1990).
12. E. R. Williams, *Anal. Chem. News & Features*, March 1, 179A (1998).
13. J. G. Boyle e C. M. Whitehouse, *Anal. Chem.*, **64**, 2084 (1992).
14. I. V. Chermishevich, W. Ens e K. G. Standing, *Anal. Chem. News & Features*, 452A, July (1999).
15. A. P. Bruins, T. R. Covey e J. D. H. Henion, *Anal. Chem.*, **59**, 2642 (1987).
16. A. Hirabayashi, M. Sakairi e H. Koizumi, *Anal. Chem.*, **66**, 4557 (1994).
17. J. Slobodnik, B. L. M. van Baar e U. A. Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A*, **703**, 81 (1985).
18. E. Gelpi, *J. Chromatogr. A*, **703**, 59 (1995).
19. R. Feng e Y. Konishi, *Anal. Chem.*, **64**, 2090 (1992).

20. A. Shevchenko, I. Chernushevich, W. Ens, K. G. Standing, B. Thomson, M. Wilm e M. Mann, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **11**, 1015 (1997).
21. V. Katta e B. T. Chait, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 8534 (1991).
22. V. Katta e B. T. Chait, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 6317 (1993).
23. A. Miranker, C. V. Robinson, S. E. Radiford, R. T. Aplin e C. M. Dobson, *Science*, **262**, 896 (1993).
24. D. L. Smith, Y. Deng e Z. Zhang, *J. Mass Spectrom.*, **32**, 135 (1997).
25. B. L. Schwartz, J. E. Bruce, G. A. Anderson, S. A. Hofstadler, A. L. Rockwood, R. D. Smith, A. Chilkoti e P. S. Stayton, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **6**, 459 (1995).
26. X. Cheng, P. E. Morin, A. C. Harms, J. E. Bruce, Y. Ben-David e R. D. Smith, *Anal. Biochem.*, **239**, 35 (1996).
27. M. Ishigai, J. I. Langridge, R. S. Bordoli e S. J. Gaskell, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **11**, 606 (2000).
28. M. Mann, C. K. Meng e J. B. Fenn, *Anal. Chem.*, **61**, 1702 (1989).
29. T. L. Jones e L. D. Betowski, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **7**, 1003 (1993).
30. A. M. deBettencourt, M. H. Florêncio, M. F. N. Duarte, M. L. R. Gomes e L. F. C. Vilas Boas, *Appl. Organometal. Chem.*, **8**, 45 (1994).
31. A. G. Howard e S. W. D. Comber, *Appl. Organometal. Chem.*, **3**, 509 (1989).
32. M. H. Florêncio, M. F. Duarte, S. Facchetti, M. L. Gomes, W. Goessler, K. J. Irgolic, H. A. van't Klooster, L. Montanarella, R. Ritsema, L. F. Vilas-Boas e A. M. M. de Bettencourt, *Anal. Chem.*, **25**, 226 (1997).
33. S. A. Pergantis, S. Wangkarn, K. A. Francesconi e J. E. Thomas-Oates, *Anal. Chem.*, **72**, 357 (2000).
34. A. Laganà, G. Fago e A. Marino, *Anal. Chem.*, **70**, 121 (1998).
35. M. L. Magnuson, E. T. Urbansky e C. A. Ketty, *Anal. Chem.*, **72**, 25 (2000).



APCER Certificado
de Conformidade

Certificate of Registration

NÚMERO/Modelo: **96/CEP-110**

A Associação Portuguesa de Certificação (APCER)
The Portuguese Association for Certification (APCER)
certifica que o sistema da qualidade da
empresa está de acordo com o

**SOQUÍMICA - SOCIEDADE DE REPRESENTAÇÕES DE
QUÍMICA, LDA.**
Rua Coronel Santos Pedrosa, 15
1500 - 207 LISBOA
PORTUGAL

Implementado na comercialização, manutenção e calibração de
equipamentos de laboratório, cumpre os requisitos da
implemented in the supply, servicing and calibration of laboratory equipment, meets the requirements of

NP EN ISO 9002:1995

Sistemas da Qualidade. Modelo de garantia da qualidade na
produção, instalação e assistência pós-venda.
Quality Systems. Model for quality assurance in production, installation and servicing.

O presente certificado é emitido no âmbito do Sistema Português da Qualidade.
This certificate is issued within the Portuguese System for Quality.

Data de emissão/issue: 1999-06-18 Válido até/valid until: 2002-06-17

Lura Figueira
Director Geral/General Director



SOQUÍMICA

Sociedade de Representações de Química, Lda

R. Coronel Santos Pedrosa 15 - 1500-207 Lisboa Tel 21 716 5160 - Fax 21 716 5169

R. 5 de Outubro 269 - 4100-175 Porto Tel 22 609 3069 - Fax 22 600 0834

E-mail: soquimica@mail.telepac.pt

www.soquimica.pt