

## ANÁLISE QUIRAL POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DO MÉTODO CINÉTICO

**Daniella Vasconcellos Augusti**

Fundação Ezequiel Dias, Instituto Octávio Magalhães, Divisão de Vigilância Sanitária, 30510-010 Belo Horizonte - MG

**Rodinei Augusti\***

Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, CP 702, 31270-901 Belo Horizonte - MG

Recebido em 17/12/04; aceito em 21/7/05; publicado na web em 20/1/06

CHIRAL ANALYSIS BY MASS SPECTROMETRY USING THE KINETIC METHOD. Novel and quantitative mass spectrometry methods for rapid and accurate enantiomeric excess determination are presented. These methodologies use electrospray ionization (ESI) and mass spectrometry (MS) to detect and analyze, via collision-induced dissociation (CID), mass-selected transition metal complexes that promote enantio specific interactions. The data from CID are conveniently treated by the kinetic method, a sensitive linear free energy method of treating mass spectrometric results. Four different variations of this methodology are described: single ratio method ( $S_R$ ), quotient ratio method ( $Q_R$ ), fixed ligand method ( $S_R^{\text{fixed}}$ ), and quotient ratio method with fixed ligand ( $Q_R^{\text{fixed}}$ ). These individual methods are compared and their main features discussed in detail.

Keywords: enantiomeric excess determination; electrospray ionization mass spectrometry; kinetic method.

### INTRODUÇÃO

A descoberta de moléculas assimétricas por Pasteur<sup>1</sup>, em 1848, foi o ponto inicial para o estudo de moléculas quirais. Poucos tópicos em Química, Biologia ou Ciências Farmacêuticas têm atraído maior interesse que a quiralidade. A presença exclusiva de L-aminoácidos e D-açúcares nos seres vivos, tema que tem intrigado os cientistas há mais de um século, mostra que a quiralidade teve grande influência no desenvolvimento da vida na Terra<sup>2</sup>.

A importância de drogas quirais puras é reconhecida desde o começo dos anos 60, a partir do famoso episódio conhecido como “A Tragédia da Talidomida”, quando se verificou que o enantiômero levôgero deste composto causava má formação nos fetos das gestantes que o consumiam<sup>3</sup>. Deste então, antes que uma droga quiral possa ser comercializada, são exigidos<sup>3</sup> testes farmacológicos e toxicológicos com os enantiômeros puros.

A produção de drogas quirais tem imposto uma demanda crescente no desenvolvimento de métodos rápidos de análise enantiomérica em áreas que envolvem estudos farmacológicos e clínicos<sup>4</sup>. A determinação de excessos enantioméricos em drogas quirais é comumente realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), onde se usa uma coluna quiral contendo ciclodextrina como fase estacionária<sup>5-7</sup>. Sistemas similares têm sido utilizados em eletroforese capilar (CE)<sup>8</sup>, onde as pequenas dimensões da coluna e a rapidez da separação fazem desta técnica um método atrativo para quantificação quiral<sup>9-12</sup>. A ressonância magnética nuclear (NMR) utiliza reagentes quirais, mas requer uma quantidade grande de amostra e não tolera impurezas.

### RESOLUÇÃO QUIRAL POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Dentre as pesquisas por métodos rápidos de determinação de excesso enantiomérico está a espectrometria de massas (MS), uma

técnica muito sensível e seletiva<sup>13</sup>. Nos últimos anos, progressos importantes têm sido obtidos, permitindo que esta técnica se torne uma das principais ferramentas na análise quiral. O reconhecimento quiral e a determinação de excesso enantiomérico (ee) através da espectrometria de massas podem ser classificados em quatro tipos principais de experimentos: (a) ionização química (CI-MS)<sup>14-16</sup> e espectrometria de massas com bombardeamento por átomos rápidos (FAB-MS)<sup>17-21</sup> – adutos diastereoisoméricos são gerados usando-se uma referência quiral e, em seguida, analisados em um espectrômetro de massas de estágio simples. Um enantiômero do analito é isotopicamente marcado e, assim, a mistura correspondente do aduto diastereoisomérico pode ser resolvida. Esses adutos são do tipo hospedeiro-convidado e suas interações são forças não-covalentes, como ligação de hidrogênio ou forças de van der Waals. Recentemente, essa técnica vem sendo ampliada através da utilização da ionização “electrospray” (ESI)<sup>22-25</sup>; (b) reconhecimento quiral baseado em reações íon-molécula na fase gasosa, frequentemente envolvendo reações de troca. Adutos diastereoisoméricos do tipo hospedeiro-convidado são gerados a partir de um hospedeiro quiral, como a  $\beta$ -ciclodextrina<sup>26</sup>. Tais adutos são selecionados por massa e o analito quiral é substituído em uma reação com um gás neutro (quiral ou aquiral). A distinção quiral é possível porque a velocidade de troca varia com a quiralidade do analito incorporado dentro do hospedeiro quiral<sup>23,27-29</sup>; (c) a terceira metodologia é baseada na dissociação induzida por colisão (CID) de adutos diastereoisoméricos formados pelo analito e uma referência quiral em um experimento de espectrometria de massas sequencial (MS/MS)<sup>30-35</sup> e, (d) o assunto explorado neste trabalho, usa também a espectrometria de massas sequencial, mas emprega o método cinético para quantificação dos efeitos quirais<sup>36,37</sup>.

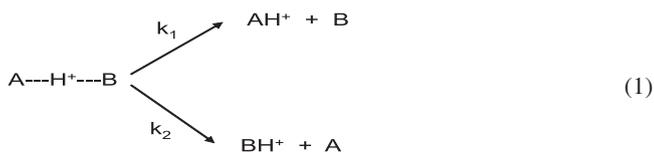
### O MÉTODO CINÉTICO

Em 1977 Cooks e colaboradores<sup>38</sup>, utilizando um equipamento do tipo MIKES “mass-analyzed ion kinetic energy spectroscopy” com fonte de ionização química, estudaram a dissociação

\*e-mail: augusti@ufmg.br

metaestável de dímeros prótonados de amins alifáticas. Como produtos, as respectivas amins protonadas foram obtidas com abundâncias relativas altamente sensíveis à diferença nas afinidades protônicas das amins. Este foi o primeiro trabalho usando o método cinético<sup>39,40</sup>. Desde então, tem sido empregado para estimar valores relativos de quantidades termoquímicas<sup>41-44</sup>, tais como afinidade protônica<sup>39,45</sup>, distinção isomérica<sup>36</sup>, basicidade em fase gasosa<sup>38</sup>, energia de ionização<sup>46</sup>, afinidade por cátions metálicos<sup>43,47</sup> e, mais recentemente, para determinar excessos enantioméricos<sup>37,40</sup>.

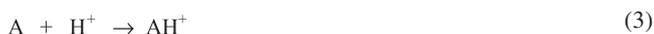
Trata-se de um procedimento aproximado, geralmente aplicado em determinações termoquímicas relativas e tem como base as diferentes velocidades de dissociações unimoleculares competitivas ( $k_1$  e  $k_2$ ) de complexos selecionados por massa. A Equação 1 mostra, por ex., um complexo contendo ligações de hidrogênio (A---H<sup>+</sup>---B) que fornece, após dissociação, os dois monômeros individuais protonados<sup>38,39,48</sup>.



Tratamentos teóricos baseados na teoria de dissociação unimolecular leva à equação simplificada do método cinético (Equação 2)<sup>38,39,45,49-53</sup>

$$\frac{\ln k_1}{\ln k_2} = \ln \frac{[\text{AH}^+]}{[\text{BH}^+]} = \frac{\Delta(\Delta G_B)}{RT_{\text{eff}}} \quad (2)$$

Nesta equação,  $[\text{AH}^+]$  e  $[\text{BH}^+]$  são as abundâncias das bases protonadas,  $\Delta(\Delta G_B)$  é a diferença na basicidade em fase gasosa dos compostos A e B, e  $T_{\text{eff}}$  é a temperatura efetiva. Essa relação é uma simples consequência de se escrever as expressões de velocidades individuais e cancelar para o reagente comum (A---H<sup>+</sup>---B)<sup>54, 55</sup>. A basicidade em fase gasosa ( $\Delta G_B$ ) é definida como o oposto da variação da energia livre ( $-\Delta G$ ) para a reação (Equação 3):



Na equação simplificada do método cinético (Equação 2), as seguintes aproximações estão implícitas: as diferenças de entropia entre os canais de dissociação competitivos são negligenciadas; a energia de ativação para as reações reversas é nula ou desprezível; inexistência de outras formas isoméricas para o complexo ativado.

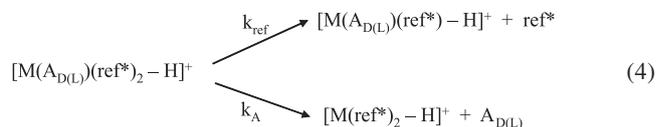
O método é sensível para pequenas diferenças em valores termoquímicos ( $< 1 \text{ KJ mol}^{-1}$ ) e é também aplicável para compostos não voláteis e polares, incluindo peptídeos e outras biomoléculas difíceis de serem analisadas por outros métodos<sup>56</sup>. Além disso, o método não exige que os compostos de interesse estejam puros.

## DETERMINAÇÃO DE EXCESSOS ENANTIOMÉRICOS USANDO O MÉTODO CINÉTICO E ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL COM FONTE DE IONIZAÇÃO "ELECTROSPRAY"

### O método da razão simples ( $S_R$ )

Um enantiômero, D ou L, de um analito quiral ( $A_D$  ou  $A_L$ ) e um composto de referência quiral ( $\text{ref}^*$ ) são complexados com um íon bivalente de metal de transição ( $M^{II}$ ) formando os complexos triméricos  $[\text{M}(A_D)(\text{ref}^*)_2 - \text{H}]^+$  ou  $[\text{M}(A_L)(\text{ref}^*)_2 - \text{H}]^+$ , os quais são detectados através de análise por ESI-MS ("electrospray

ionization mass spectrometry")<sup>57,58</sup>. A seguir, tais complexos são selecionados por massa e dissociados por colisão com um gás inerte ("CID- collision-induced dissociation") produzindo os respectivos íons diméricos  $[\text{M}(\text{ref}^*)_2 - \text{H}]^+$  e  $[\text{M}(\text{ref}^*)(A_{D(L)}) - \text{H}]^+$ , como mostrado na Equação 4:



onde  $k_A$  e  $k_{\text{ref}}$  são as respectivas velocidades de dissociação dos complexos triméricos.

A razão entre as abundâncias destes fragmentos ( $R_D$  e  $R_L$ ) é definida de acordo com as Equações 5 e 6, respectivamente:

$$R_D = \frac{[\text{M}(\text{ref}^*)(A_D) - \text{H}]^+}{[\text{M}(\text{ref}^*)_2 - \text{H}]^+} \quad (5)$$

$$R_L = \frac{[\text{M}(\text{ref}^*)(A_L) - \text{H}]^+}{[\text{M}(\text{ref}^*)_2 - \text{H}]^+} \quad (6)$$

Nestas condições, a razão de seletividade quiral ( $R_C$ ) é definida de acordo com a Equação 7:

$$\begin{array}{l} R_C = \frac{R_D}{R_L} \quad \text{ou seja} \\ R_C = \frac{\frac{[\text{M}(\text{ref}^*)(A_D) - \text{H}]^+}{[\text{M}(\text{ref}^*)_2 - \text{H}]^+}}{\frac{[\text{M}(\text{ref}^*)(A_L) - \text{H}]^+}{[\text{M}(\text{ref}^*)_2 - \text{H}]^+}} \end{array} \quad (7)$$

Quanto maior a diferença de  $R_C$  da unidade, maior o grau de seletividade quiral observado. Se  $R_C = 1$ , não há discriminação quiral, indicando que a combinação específica envolvendo o cátion metálico e o composto de referência não é capaz de promover distinção quiral entre os dois enantiômeros,  $A_D$  e  $A_L$ .

Um diagrama de energia para a dissociação dos complexos  $[\text{M}(A_D)(\text{ref}^*)_2 - \text{H}]^+$  e  $[\text{M}(A_L)(\text{ref}^*)_2 - \text{H}]^+$  é mostrado na Figura 1. Neste diagrama, a diferença em energia  $\Delta(\Delta G)$  entre os íons diastereoisoméricos  $[\text{M}(\text{ref}^*)(A_D) - \text{H}]^+$  e  $[\text{M}(\text{ref}^*)(A_L) - \text{H}]^+$  é responsável pela diferença entre  $R_D$  e  $R_L$ , o que leva a um valor de  $R_C \neq 1$ . Se tal diferença em energia não é observada obtém-se, conseqüentemente, um valor de  $R_C = 1$ .

A relação entre a razão R ( $R = [\text{M}(A)(\text{ref}^*) - \text{H}]^+ / [\text{M}(\text{ref}^*)_2 - \text{H}]^+$ ) e o excesso enantiomérico (ee) do analito quiral (A) pode ser

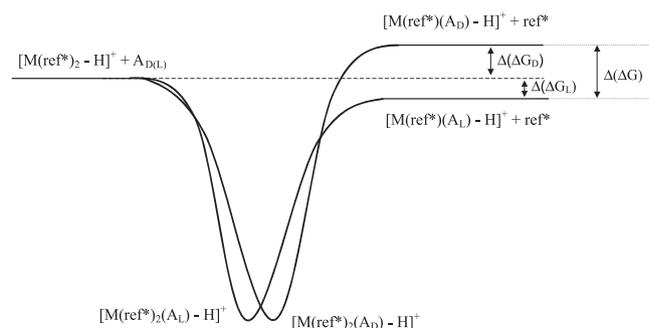
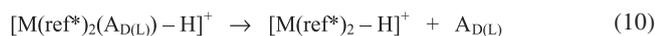


Figura 1. Diagrama de energia para a dissociação dos complexos triméricos  $[\text{M}(A_D)(\text{ref}^*)_2 - \text{H}]^+$  e  $[\text{M}(A_L)(\text{ref}^*)_2 - \text{H}]^+$ . Adaptado da ref. 76

obtida a partir da equação do método cinético (Equação 2). O logaritmo natural da razão  $R$  é proporcional às diferenças de energia livre para as dissociações competitivas que fornecem os dois íons diméricos (Equação 4). Tal relação pode ser visualizada a seguir (Equação 8):

$$\ln \frac{k_A}{k_{ref}} = \ln(R) = \frac{\Delta(\Delta G)}{RT_{eff}} \quad (8)$$

onde  $R$  é a constante dos gases ideais,  $T_{eff}$  é a temperatura efetiva do complexo ativado (temperatura média dos dois complexos ativados para as duas reações competitivas), e  $\Delta(\Delta G)$  (Figura 1) é definido como a diferença nas energias livre entre as reações 9 e 10, para as quais as energias de ativação reversas são consideradas desprezíveis:



Quando o analito  $A$  é constituído por enantiômeros puros,  $D$  ou  $L$ ,  $\Delta(\Delta G)$  torna-se  $\Delta(\Delta G)_D$  ou  $\Delta(\Delta G)_L$ . Para uma mistura enantiomérica com um excesso do enantiômero  $D$ , por ex., pode-se escrever (Equação 11):

$$\begin{aligned} \Delta(\Delta G) &= \Delta(\Delta G_D) \frac{1+ee}{2} + \Delta(\Delta G_L) \frac{(1-ee)}{2} = \\ &= \frac{\Delta(\Delta G_D) + \Delta(\Delta G_L)}{2} + \frac{[\Delta(\Delta G_D) - \Delta(\Delta G_L)] \times ee}{2} \end{aligned} \quad (11)$$

Combinando-se as Equações 11 e 8 obtém-se a expressão que prevê uma relação linear entre o excesso enantiomérico ( $ee$ ) e o  $\ln(R)$  (Equação 12):

$$\ln(R) = \frac{[\Delta(\Delta G_D) + \Delta(\Delta G_L)]}{2RT_{eff}} + \frac{[\Delta(\Delta G_D) - \Delta(\Delta G_L)] \times ee}{2RT_{eff}} \quad (12)$$

Finalmente, combinando-se as Equações 12 e 8 obtém-se a Equação 13, que coloca  $\ln(R)$  como uma função de  $\ln(R_D)$  e  $\ln(R_L)$ :

$$\ln(R) = \frac{\ln(R_D) + \ln(R_L)}{2} + \frac{[\ln(R_D) - \ln(R_L)] \times ee}{2} \quad (13)$$

Deste modo, em um gráfico  $\ln(R)$  versus  $ee$ , o intercepto representa a média entre os valores de  $\ln(R_D)$  e  $\ln(R_L)$ , enquanto que a inclinação corresponde à metade da diferença entre  $\ln(R_D)$  e  $\ln(R_L)$ .

O sucesso do método depende da escolha adequada da referência, bem como do metal de transição. O primeiro passo para quantificar misturas quirais é a construção da curva analítica entre  $\ln(R)$  e o  $ee$  sendo possível determinar rapidamente a relação entre os componentes da mistura, utilizando um espectrômetro de massas seqüencial. Como uma relação linear entre  $\ln(R)$  e o  $ee$  é esperada, em análises rápidas é possível construir a curva analítica com apenas duas amostras com conhecidos  $ee$ , como por ex., os enantiômeros  $D$  e  $L$  puros ou a mistura racêmica.

A Figura 2 mostra, por ex., um espectro ESI-MS<sup>59</sup> de uma solução em água/metanol 1:1, contendo o aminoácido modificado N-Ac-L-Phe, utilizado como referência quiral, o cátion metálico  $Cu^{2+}$  e o açúcar D-ribose. Note a presença do complexo trimérico desejado  $[Cu(N-Ac-L-Phe)_2(D-Ribose)-H]^+$  de  $m/z$  626. Outras espécies também foram detectadas, as quais estão indicadas nesta mesma Figura 2. Um espectro similar (não mostrado) foi obtido a partir de uma solução contendo N-Ac-L-Phe,  $Cu^{2+}$  e L-ribose, onde se verificou, principalmente, a formação do complexo trimérico  $[Cu(N-Ac-L-Phe)_2(L-Ribose)-H]^+$  também de  $m/z$  626.

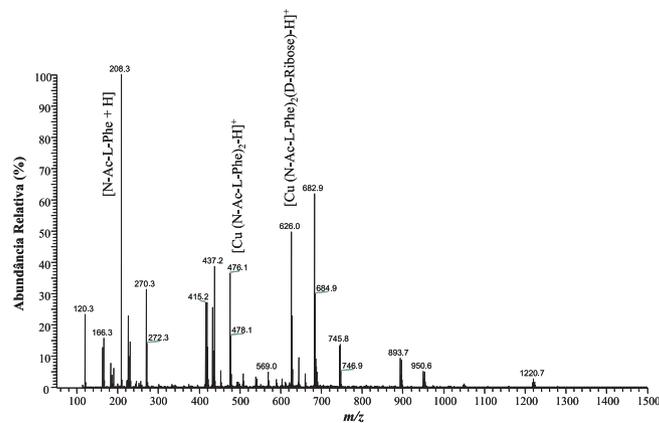


Figura 2. Espectro de massas total (ESI-MS) de uma solução em água/metanol 1:1 contendo  $Cu^{2+}$ , N-Ac-L-Phe (referência quiral,  $ref^*$ ) e D-ribose (analito, A)

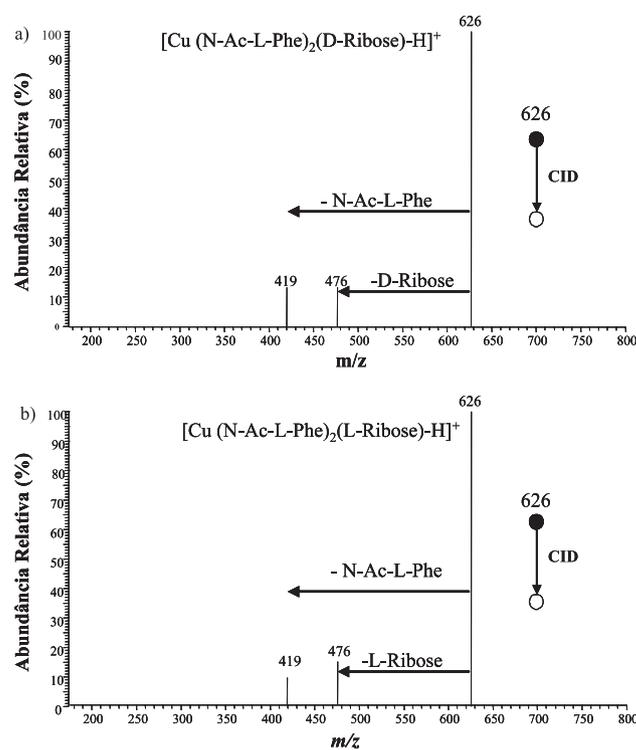


Figura 3. Espectros ESI-MS/MS dos complexos triméricos  $[Cu(N-Ac-L-Phe)_2(ribose) - H]^+$  de  $m/z$  626: a)  $[Cu(N-Ac-L-Phe)_2(D-Ribose) - H]^+$ ; b)  $[Cu(N-Ac-L-Phe)_2(L-Ribose) - H]^+$ . Para maiores detalhes sobre a terminologia "círculos cheios-círculos vazios" ver ref. 82

A seleção por massa dos complexos  $[Cu(N-Ac-L-Phe)_2(D-Ribose)-H]^+$  e  $[Cu(N-Ac-L-Phe)_2(L-Ribose)-H]^+$  e fragmentação por colisão com hélio (CID) gerou os espectros MS/MS mostrados na Figura 3.

Em ambos os espectros observa-se a presença de dois fragmentos provenientes da perda de ribose,  $[Cu(N-Ac-L-Phe)_2-H]^+$  de  $m/z$  476, e de N-Ac-L-Phe,  $[Cu(N-Ac-L-Phe)(L-Ribose)-H]^+$  de  $m/z$  419. As diferentes razões ( $R$ ) entre as intensidades dos íons de  $m/z$  419 e 476 para cada complexo trimérico são causadas pelas diferentes interações entre analito ( $D$  e  $L$ -ribose) e referência quiral (N-Ac-L-Phe). O fator de seletividade quiral ( $R_c$ ) pode ser calculado medindo-se as intensidades dos íons de  $m/z$  419 e 476 em ambos os espectros e aplicando-se a Equação 7. A razão  $R$  entre as intensidades dos íons de  $m/z$  419 e 476

depende da proporção dos enantiômeros do analito quiral em solução. Deste modo, preparando-se várias soluções com excessos enantioméricos ee conhecidos e medindo-se as respectivas razões R, pode-se facilmente construir uma curva de calibração entre  $\ln(R)$  versus ee. Finalmente, esta curva de calibração pode ser utilizada para determinação do excesso enantiomérico de soluções desconhecidas. A principal desvantagem do método da razão simples envolve a necessidade de se utilizar, para construção da curva analítica, duas amostras do analito com proporções enantioméricas exatamente conhecidas as quais, em muitas situações, não podem ser obtidas.

O método da razão simples<sup>60</sup> tem sido aplicado com sucesso na determinação de excessos enantioméricos de soluções de aminoácidos<sup>61-64</sup>,  $\alpha$ -hidroxi-ácidos<sup>65,66</sup>, peptídeos<sup>67-70</sup>, drogas quirais<sup>71-74</sup>, vitaminas<sup>75</sup>, açúcares<sup>76</sup> e outras substâncias<sup>77</sup>.

## VARIAÇÕES DO MÉTODO

Existem alguns casos em que o método da razão simples ( $S_R$ ) não pode ser aplicado. Visando superar tais limitações, trabalhos recentes foram publicados empregando métodos alternativos para determinação de excessos enantioméricos, os quais são descritos a seguir.

### Método do quociente ( $Q_R$ )

O método do quociente ( $Q_R$ ) foi introduzido por Cooks e Tao<sup>78</sup>, em 2002. Neste método, complexos triméricos  $[M(\text{ref}^*_D)(A)_2 - H]^+$  e  $[M(\text{ref}^*_L)(A)_2 - H]^+$  são gerados a partir de duas soluções contendo um íon metálico ( $M^{II}$ ), um analito quiral (A) e uma referência quiral ( $\text{ref}^*_D$  ou  $\text{ref}^*_L$ ). A seleção por massa e dissociação (CID) de tais complexos, em dois experimentos MS/MS distintos realizados em condições idênticas, gera os íons diméricos  $[M(A)_2 - H]^+$  e  $[M(\text{ref}^*_{D(L)})(A) - H]^+$  pela perda da referência ou do analito, respectivamente. A diferença de energia requerida para gerar as formas diastereoisoméricas  $[M(\text{ref}^*_D)(A) - H]^+$  e  $[M(\text{ref}^*_L)(A) - H]^+$  resulta em diferentes abundâncias, as quais são medidas em relação à abundância do fragmento  $[M(A)_2 - H]^+$ . O quociente das razões (RR), equivalente ao R no método da razão simples, depende da composição enantiomérica do analito A (Equação 14):

$$RR = \frac{\frac{[M(A)(\text{ref}^*_D) - H]^+}{[M(A)_2 - H]^+}}{\frac{[M(A)(\text{ref}^*_L) - H]^+}{[M(A)_2 - H]^+}} \quad (14)$$

Quando o analito é enantiomericamente puro, RR torna-se  $RR_D$  ou  $RR_L$ . Deste modo, o fator de seletividade quiral  $RR_C$  é calculado pelo quociente das razões RR (Equações 15 e 16):

$$RR_C = \frac{RR_D}{RR_L} \quad (15)$$

ou seja,

$$RR_C = \frac{\left[ \frac{M(A_D)(\text{ref}^*_D) - H]^+}{[M(A_D)_2 - H]^+} \right]}{\left[ \frac{M(A_L)(\text{ref}^*_D) - H]^+}{[M(A_L)_2 - H]^+} \right]} \quad (16)$$

Quanto mais distante o valor de  $RR_C$  estiver da unidade, melhor será a seletividade quiral. Se  $RR_C = 1$ , temos um sistema que não consegue distinguir as interações estereoquímicas nas condições empregadas.

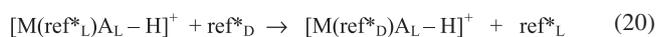
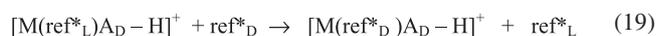
A relação entre RR e o ee é derivada do método cinético. Por analogia com o método da razão simples,  $\ln(RR)$  é proporcional à diferença de energia livre para as dissociações competitivas, que fornecem os produtos diméricos (Equação 17):

$$\ln(RR) = \frac{\Delta(\Delta G)}{RT_{\text{eff}}} \quad (17)$$

onde R é a constante dos gases ideais,  $T_{\text{eff}}$  é a temperatura efetiva média dos dois complexos ativados para as duas reações competitivas e  $\Delta(\Delta G)$  é definido como a diferença na energia livre da Equação 18, para a qual a energia de ativação reversa é considerada desprezível:



Quando uma mistura dos dois enantiômeros de A ( $A_D$  e  $A_L$ ) é examinada,  $\Delta(\Delta G)$  é a soma das trocas de energia livre  $\Delta(\Delta G)_D$  ou  $\Delta(\Delta G)_L$  das duas reações independentes, Equações 19 e 20, respectivamente.



Os complexos diméricos  $[M(\text{ref}^*_L)A_D - H]^+$  e  $[M(\text{ref}^*_D)A_L - H]^+$ , bem como  $[M(\text{ref}^*_D)A_D - H]^+$  e  $[M(\text{ref}^*_L)A_L - H]^+$ , são pares enantioméricos. Portanto, as reações acima possuem o mesmo valor absoluto de  $\Delta(\Delta G)$ , porém com sinais opostos (Equação 21):

$$\Delta(\Delta G_D) = -\Delta(\Delta G_L) \quad (21)$$

Para uma mistura enantiomérica, em que o excesso enantiomérico do enantiômero D é expresso por ee<sup>62</sup>, pode-se escrever (Equação 22):

$$\Delta(\Delta G) = \Delta(\Delta G_D) \frac{1+ee}{2} + \Delta(\Delta G_L) \frac{1-ee}{2} = \frac{[\Delta(\Delta G_D) + \Delta(\Delta G_L)]}{2} + \frac{[\Delta(\Delta G_D) - \Delta(\Delta G_L)]}{2} ee \quad (22)$$

e a relação entre RR e o ee pode ser expressa combinando as Equações 17 e 22, para se obter a Equação 23:

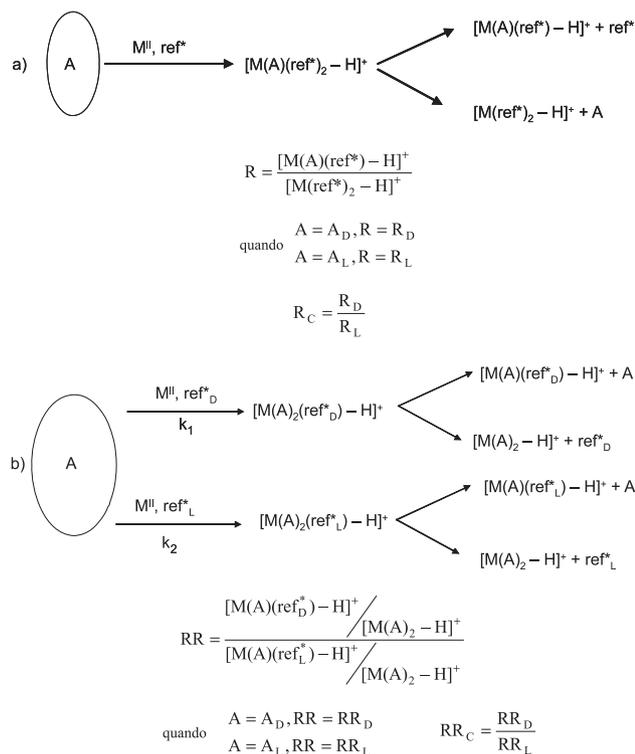
$$\ln(RR) = \frac{\Delta(\Delta G_D) + \Delta(\Delta G_L)}{2RT_{\text{eff}}} + \frac{\Delta(\Delta G_D) - \Delta(\Delta G_L)}{2RT_{\text{eff}}} ee \quad (23)$$

Quando a amostra é uma mistura racêmica (ee = 0%), de acordo com as Equações 21 e 23,  $\ln(RR)$  será sempre zero (Equação 24):

$$\ln(RR)_{ee=0\%} = \frac{\Delta(\Delta G_D) + \Delta(\Delta G_L)}{2RT_{\text{eff}}} = 0 \quad (24)$$

A Equação 23 prevê a relação linear do  $\ln(RR)$  e o ee. A inclinação da curva analítica depende da magnitude de  $\Delta(\Delta G_D)$  ou  $\Delta(\Delta G_L)$ . Uma distinção quiral adequada (valores de  $\Delta(\Delta G_D)$  ou  $\Delta(\Delta G_L)$  elevados) fornece uma inclinação elevada. Análogo ao método da razão simples, uma curva analítica com dois pontos pode ser usada para análises de amostras desconhecidas, ressaltando-se

que neste método toda mistura racêmica fornecerá  $\ln(RR) = 0$ . Ou seja, na prática precisa-se apenas de uma amostra com pureza óptica conhecida para a construção da curva analítica, o que vem a ser a maior vantagem do método, uma vez que nem sempre os dois enantiômeros puros estão disponíveis comercialmente. O Esquema 1 mostra uma comparação sucinta entre os métodos da razão simples (a) e do quociente (b). No método do quociente, duas referências enantiomericamente puras são empregadas em dois experimentos consecutivos, enquanto que no método da razão simples uma única referência quiral é necessária.

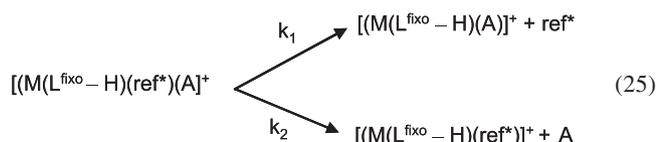


**Esquema 1.** Determinação quantitativa do excesso enantiomérico através: (a) do método da razão simples ( $S_R$ ); (b) do método do quociente ( $Q_R$ ). Adaptado da ref. 78

### Método do ligante fixo ( $S_R^{\text{fixo}}$ )

Uma nova versão do método da razão simples foi desenvolvida por Cooks e Wu<sup>79</sup>, em 2003. Como no método da razão simples, os autores prepararam uma solução em água/metanol 1:1 contendo um analito quiral (A), uma referência quiral (ref\*), um metal bivalente ( $M^{II}$ ) e um ligante quelante ligado fortemente ao metal (ligante fixo,  $L^{\text{fixo}}$ ).

Neste experimento, complexos do tipo  $[(M(L^{\text{fixo}}-H)(ref^*)(A))]^+$  foram gerados por ESI, selecionados por massa e fragmentados por CID. Tal processo levou a dois produtos de dissociação competitivos, através da perda da referência (ref\*) ou do analito (A), como mostrado na Equação 25:



As mesmas considerações e analogias empregadas no método

da razão simples também são válidas para o método do ligante fixo, levando a uma relação análoga entre  $\ln R$  e  $ee$  (Equações 26 a 28)

$$R^{\text{fixo}} = \frac{[(M(L^{\text{fixo}}-H)(A))]^+}{[(M(L^{\text{fixo}}-H)(ref^*))^+]} \quad (26)$$

$$R_C^{\text{fixo}} = \frac{R_D^{\text{fixo}}}{R_L^{\text{fixo}}} = \frac{[(M(L^{\text{fixo}}-H)(A_D))]^+ / [(M(L^{\text{fixo}}-H)(ref^*))^+]}{[(M(L^{\text{fixo}}-H)(A_L))]^+ / [(M(L^{\text{fixo}}-H)(ref^*))^+]} \quad (27)$$

$$\ln(R^{\text{fixo}}) = \frac{\ln(R_D^{\text{fixo}}) + \ln(R_L^{\text{fixo}})}{2} + \frac{[\ln(R_D^{\text{fixo}}) - \ln(R_L^{\text{fixo}})] \times ee}{2} \quad (28)$$

Em comparação com o método da razão simples, o complexo trimérico  $[(M(L^{\text{fixo}}-H)(ref^*)(A))]^+$  perde os mesmos fragmentos neutros, i.e. A e ref\*, em um experimento CID. O diferencial deste método é que o ligante fixo permanece ligado ao cátion metálico central, mesmo após a fragmentação do complexo trimérico. A vantagem está na facilidade de otimização do sistema e, portanto, um reconhecimento quiral superior é prontamente obtido. Comparando-se os mesmos sistemas, o método do ligante fixo mostrou uma maior seletividade quiral em relação ao da razão simples<sup>79</sup>.

### Método do quociente com ligante fixo ( $Q_R^{\text{fixo}}$ )

Mais recentemente, Cooks e Wu<sup>80</sup> publicaram uma nova metodologia para determinação de excesso enantiomérico, denominada método do quociente com ligante fixo ( $Q_R^{\text{fixo}}$ ). Nesta metodologia, aplica-se o método do quociente fazendo-se uso de um ligante fixo, como sucintamente demonstrado no Esquema 2.

O método  $Q_R^{\text{fixo}}$  requer duas análises consecutivas em experimentos MS/MS. Assim como no método do quociente ( $Q_R$ ), somente uma amostra com  $ee$  conhecido é necessária para construção da curva de calibração, já que toda mistura racêmica fornecerá  $\ln(RR^{\text{fixo}}) = 0$ .

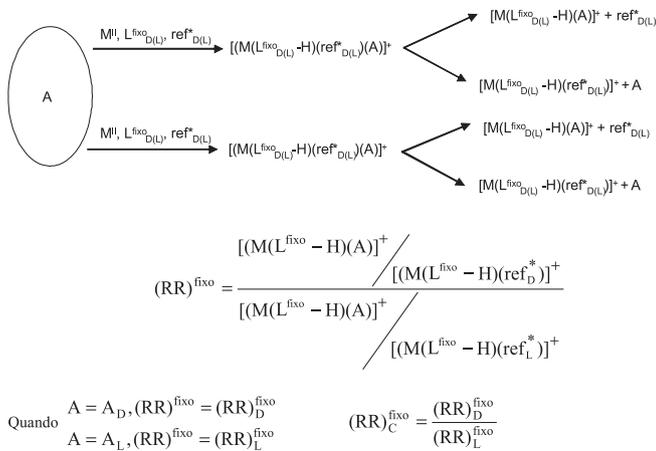
Em comparação com o método do quociente, o método  $Q_R^{\text{fixo}}$  apresenta as seguintes vantagens: melhor exatidão na quantificação devido à simplicidade da cinética de dissociação e melhor seletividade quiral, através da alteração de propriedades, tais como tamanho e funcionalidade do ligante fixo; possibilidades múltiplas para a construção de curvas de calibração com dois pontos que podem ser usadas para averiguar os dados, um ponto importante em aplicações farmacêuticas. Por ex., a utilização do dipeptídeo Ala-Ala como ligante fixo em suas quatro configurações (Ala<sub>L</sub>-Ala<sub>L</sub>; Ala<sub>L</sub>-Ala<sub>D</sub>; Ala<sub>D</sub>-Ala<sub>L</sub>; Ala<sub>D</sub>-Ala<sub>D</sub>) permite a geração de quatro curvas de calibração que podem ser analisadas e a melhor delas utilizada na determinação do excesso enantiomérico de um analito quiral (A), através da determinação da respectiva razão  $RR^{\text{fixo}}$  (Equação 29):

$$RR^{\text{fixo}} = \frac{\frac{[M(A)(Ala_{D(L)}-Ala_{D(L)})(ref^*_D) - H]^+}{[M(A)_2 - H]^+}}{\frac{[M(A)(Ala_{D(L)}-Ala_{D(L)})(ref^*_L) - H]^+}{[M(A)_2 - H]^+}} \quad (29)$$

e, pelas trocas de quiralidade dos ligantes fixos ou das referências, as interações quirais no complexo são refinadas, permitindo maximizar a diferenciação quiral.

### CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os métodos para determinação de excesso enantiomérico descritos neste artigo envolvem uma aplicação original e genial do método cinético. Tais metodologias, de acordo com as características descri-



**Esquema 2.** Determinação quantitativa de excessos enantioméricos através do método do quociente com ligante fixo ( $Q_R^{\text{fixo}}$ ). Adaptado da ref. 80

tas a seguir, apresentam grande potencial de aplicação, embora estudos adicionais com amostras reais sejam necessários para que possam ser definitivamente validadas e aplicadas pelos laboratórios de análise: são métodos rápidos, onde cada análise tem duração de cerca de 3 min; são métodos simples pois não se utilizam análises por via úmida, não havendo necessidade de derivatizações e pré-concentrações; não há necessidade da utilização de colunas quirais; são de baixo custo, desde que um espectrômetro de massas comercial com uma fonte ESI e capacidade para realizar experimentos MS/MS possa ser utilizado; sensíveis, pois podem ser utilizados na determinação de amostras contendo uma pequena fração de um dos enantiômeros; podem ser empregados em condições totalmente adversas, como na superfície de outros planetas e meteoros, onde a detecção de um excesso enantiomérico de moléculas vitais, como açúcares e aminoácidos, pode ser uma prova definitiva da presença de vida. Trabalhos recentes<sup>81</sup> já mostram a possibilidade de se ampliar tal metodologia na quantificação de misturas contendo três constituintes, como por ex. D, L e meso-ácido tartárico. Porém, trabalhos futuros serão necessários para averiguar a possibilidade de quantificação de outras misturas multi-componentes, contendo enantiômeros e diastereoisômeros.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e FAPEMIG pelas bolsas e auxílio financeiro concedidos.

## REFERÊNCIAS

- Pasteur, L. C. R.; *Hebd. Seance Acad. Sci.* **1848**, 26, 535.
- Stryer, L.; *Biochemistry*, Spectrum: Heidelberg, 1996.
- Barreiro, E. J.; Ferreira, V. F.; Costa, P. R. R.; *Quim. Nova* **1997**, 20, 647.
- Kyranos, J. N.; Hogan, J. C.; *Anal. Chem.* **1998**, 70, 389a.
- Armstrong, D. W.; Ward, T. J.; Armstrong, R. D.; Beesley, T. E.; *Science* **1986**, 232, 1132.
- Schurig, V.; Nowotny, H. P.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **1990**, 29, 939.
- Glausch, A.; Hahn, J.; Schurig, V.; *Chemosphere* **1995**, 30, 2079.
- Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D.; *J. Chromatogr.* **1981**, 218, 209.
- Penn, S. G.; Bergstrom, E. T.; Goodall, D. M.; Loran, J. S.; *Anal. Chem.* **1994**, 66, 2866.
- Snopeck, J.; Jelineck, L.; Smolková, E.; *J. Chromatogr., A* **1992**, 609, 1.
- Kuhn, R.; Hoffstetterkuhn, S.; *Chromatographia* **1992**, 34, 505.
- Terabe, S.; Otsuka, K.; Nishi, H.; *J. Chromatogr., A* **1994**, 666, 295.
- Hoffmann, E.; Stroobant, V.; *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, John Wiley & Sons: Chichester, 2002.
- Fales, H. M.; Wright, G. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 2339.
- Nikolaev, E. N.; Denisov, E. V.; Nikolaeva, M. I.; Futrell, J. H.; Rakov, V. S.; Winkler, F. J.; *Adv. Mass Spectrom.* **1998**, 14, 279.

- Kostyanovsky, R. G.; Nikolaev, E. N.; Kharybin, O. N.; Kadorkina, G. K.; Kostyanovsky, V. R.; *Mendelev Commun.* **2003**, 97.
- Sawada, M.; *Mass Spectrom. Rev.* **1997**, 16, 73.
- Sawada, M.; Takai, Y.; Yamada, H.; Hirayama, S.; Kaneda, T.; Tanaka, T.; Kamada, K.; Mizooka, T.; Takeuchi, S.; Ueno, K.; Hirose, K.; Tobe, Y.; Naemura, K.; *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 7726.
- Pocsfalvi, G.; Liptak, M.; Huszthy, P.; Bradshaw, J. S.; Izatt, R. M.; Vekey, K.; *Anal. Chem.* **1996**, 68, 792.
- Sawada, M.; Yamaoka, H.; Takai, Y.; Kawai, Y.; Yamada, H.; Azuma, T.; Fujioka, T.; Tanaka, T.; *Int. J. Mass Spectrom.* **1999**, 193, 123.
- Sawada, M.; Shizuma, M.; Takai, Y.; Yamada, H.; Kaneda, T.; Hanafusa, T.; *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 4405.
- Sawada, M.; Shizuma, M.; Takai, Y.; Adachi, H.; Takeda, T.; Uchiyama, T.; *Chem. Commun.* **1998**, 1453.
- Ahn, S.; Ramirez, J.; Grigorean, G.; Lebrilla, C. B.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2001**, 12, 278.
- Sawada, M.; Takai, Y.; Yamada, H.; Yoshikawa, M.; Arakawa, R.; Tabuchi, H.; Takada, M.; Tanaka, J.; Shizuma, M.; Yamaoka, H.; Hirose, K.; Fukuda, K.; Tobe, Y.; *Eur. J. Mass Spectrom.* **2004**, 10, 27.
- Sawada, M.; Takai, Y.; Yamada, H.; Nishida, J.; Kaneda, T.; Arakawa, R.; Okamoto, M.; Hirose, K.; Tanaka, T.; Naemura, K.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1998**, 701.
- He, P.; Lu, H. J.; Guo, Y. L.; *Anal. Lett.* **2003**, 36, 493.
- Chu, I. H.; Dearden, D. V.; Bradshaw, J. S.; Huszthy, P.; Izatt, R. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4318.
- Dearden, D. V.; Dejsupa, C.; Liang, Y. J.; Bradshaw, J. S.; Izatt, R. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 353.
- Ramirez, J.; He, F.; Lebrilla, C. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 7387.
- Smith, G.; Leary, J. A.; *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 3293.
- Ho, Y. H.; Squires, R. R.; *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 10961.
- Tabet, J. C.; *Tetrahedron* **1987**, 43, 3413.
- Lu, H. J.; Guo, Y. L.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, 14, 571.
- Lu, H. J.; Guo, Y. L.; *Anal. Chim. Acta* **2003**, 482, 1.
- Gronert, S.; Fagin, A. E.; Okamoto, K.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, 15, 1509.
- Shen, W. Y.; Wong, P. S. H.; Cooks, R. G.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, 11, 71.
- Vekey, K.; Czira, G.; *Anal. Chem.* **1997**, 69, 1700.
- Cooks, R. G.; Kruger, T. L.; *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 1279.
- Cooks, R. G.; Patrick, J. S.; Kotiaho, T.; McLuckey, S. A.; *Mass Spectrom. Rev.* **1994**, 13, 287.
- Cooks, R. G.; Wong, P. S. H.; *Acc. Chem. Res.* **1998**, 31, 379.
- Augusti, R.; Turowski, M.; Cooks, R. G.; *J. Mass Spectrom.* **2004**, 39, 558.
- Meurer, E. C.; Gozzo, F. C.; Augusti, R.; Eberlin, M. N.; *Eur. J. Mass Spectrom.* **2003**, 9, 295.
- Eberlin, M. N.; Kotiaho, T.; Shay, B. J.; Yang, S. S.; Cooks, R. G.; *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 2457.
- Denault, J. W.; Feng, W.; Cooks, R. G.; Gozzo, F. C.; Eberlin, M. N.; *J. Phys. Chem. A* **2000**, 104, 11290.
- McLuckey, S. A.; Cameron, D.; Cooks, R. G.; *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 1313.
- Wong, P. S. H.; Ma, S. G.; Cooks, R. G.; *Anal. Chem.* **1996**, 68, 4254.
- Yang, S. S.; Wong, P.; Ma, S. G.; Cooks, R. G.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1996**, 7, 198.
- Armentrout, P. B.; *J. Mass Spectrom.* **1999**, 34, 74.
- Wright, L. G.; McLuckey, S. A.; Cooks, R. G.; Wood, K. V.; *Int. J. Mass Spectrom.* **1982**, 42, 115.
- Boand, G.; Houriet, R.; Gaumann, T.; *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 2203.
- Brodeltustig, J. S.; Cooks, R. G.; *Talanta* **1989**, 36, 255.
- Majumdar, T. K.; Clairet, F.; Tabet, J. C.; Cooks, R. G.; *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 2897.
- Klots, C. E.; *J. Phys. Chem. A* **1997**, 101, 5378.
- Ervin, K. M.; *Int. J. Mass Spectrom.* **2000**, 196, 271.
- Cooks, R. G.; Koskinen, J. T.; Thomas, P. D.; *J. Mass Spectrom.* **1999**, 34, 85.
- Caprioli, R. M.; *J. Mass Spectrom.* **1999**, 34, 73.
- Cole, R. B.; *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, John Wiley & Sons Inc.: Chichester, 1997.
- Moraes, M. C. B.; do Lago, C. L.; *Quim. Nova* **2003**, 26, 556.
- Augusti, D. V.; Augusti, R.; resultados não publicados.
- Tao, W. A.; Cooks, R. G.; *Anal. Chem.* **2003**, 75, 25a.
- Tao, W. A.; Cooks, R. G.; Nikolaev, E. N.; *Eur. J. Mass Spectrom.* **2002**, 8, 107.
- Tao, W. A.; Zhang, D. X.; Nikolaev, E. N.; Cooks, R. G.; *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 10598.
- Tao, W. A.; Zhang, D. X.; Wang, F.; Thomas, P. D.; Cooks, R. G.; *Anal. Chem.* **1999**, 71, 4427.

64. Wu, L. M.; Tao, W. A.; Cooks, R. G.; *J. Mass Spectrom.* **2003**, *38*, 386.
65. Tao, W. A.; Wu, L. M.; Cooks, R. G.; *Chem. Commun.* **2000**, 2023.
66. Wu, L. M.; Tao, W. A.; Cooks, R. G.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *373*, 618.
67. Tao, W. A.; Cooks, R. G.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 757.
68. Tao, W. A.; Wu, L. M.; Cooks, R. G.; *J. Am. Soc. Mass Spectr.* **2001**, *12*, 490.
69. Wu, L. M.; Lemr, K.; Aggerholm, T.; Cooks, R. G.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, *14*, 152.
70. Wu, L. M.; Meurer, E. C.; Young, B.; Yang, P. X.; Eberlin, M. N.; Cooks, R. G.; *Int. J. Mass Spectrom.* **2004**, *231*, 103.
71. Tao, W. A.; Gozzo, F. C.; Cooks, R. G.; *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1692.
72. Shizuma, M.; Takai, Y.; Kawamura, M.; Takeda, T.; Sawada, M.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2001**, 1306.
73. Augusti, D. V.; Augusti, R.; Carazza, F.; Cooks, R. G.; *Chem. Commun.* **2002**, 2242.
74. Tao, W. A.; Wu, L. M.; Cooks, R. G.; Wang, F.; Begley, J. A.; Lampert, B.; *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3541.
75. Augusti, D. V.; Lago, R. M.; Augusti, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, *15*, 786.
76. Augusti, D. V.; Carazza, F.; Augusti, R.; Tao, W. A.; Cooks, R. G.; *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 3458.
77. Yu, C. T.; Guo, Y. L.; Chen, G. Q.; Zhong, Y. W.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, *15*, 795.
78. Tao, W. A.; Clark, R. L.; Cooks, R. G.; *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 3783.
79. Wu, L. M.; Cooks, R. G.; *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 678.
80. Wu, L. M.; Meurer, E. C.; Cooks, R. G.; *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 663.
81. Wu, L. M.; Clark, R. L.; Cooks, R. G.; *Chem. Commun.* **2003**, 136.
82. Eberlin, M. N.; *Mass Spectrom. Rev.* **1997**, *16*, 113.