

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Programa de Pós-Graduação em Química**

**ANDRÉ SANTOS FERNANDES**

**Caracterização do padrão de fragmentação da  
ciclofosfamida por espectroscopia vibracional de  
íons na fase gasosa**

**Versão corrigida da Dissertação defendida**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:  
**06/01/2023**

ANDRÉ SANTOS FERNANDES

**Caracterização do padrão de fragmentação da  
ciclofosfamida por espectroscopia vibracional de  
íons na fase gasosa**

*Dissertação apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade de São Paulo para  
obtenção do Título de Mestre em Ciências –  
Programa: Química*

*Orientador: Prof. Dr. Thiago Carita Correra*

São Paulo

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

F363c      Fernandes, André Santos  
            Caracterização do padrão de fragmentação da  
            ciclofosfamida por espectroscopia vibracional de  
            íons na fase gasosa / André Santos Fernandes. - São  
            Paulo, 2023.  
            105 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da  
Universidade de São Paulo. Departamento de Química  
Fundamental.

Orientador: Correra, Thiago Carita

1. Espectrometria de massa. 2. Espectroscopia  
IRMPD. 3. Ciclofosfamida. 4. Fragmentação. 5.  
Cálculos teóricos. I. T. II. Correra, Thiago Carita,  
orientador.

"Caracterização do padrão de fragmentação da ciclofosfamida por espectroscopia vibracional de íons na fase gasosa"

**ANDRÉ SANTOS FERNANDES**

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências - no Programa de Química.

**APROVADO(A) POR:**

---

**Prof. Dr. Thiago Carita Correra**  
(Orientador e Presidente)

---

**Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes** (por videoconferência)  
FCFRP - USP

---

**Prof. Dr. Rodinei Augusti** (por videoconferência)  
UFMG

**SÃO PAULO**  
20 de março de 2023

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeira e imensamente, a meus pais. A meu pai, por sempre se entusiasmar com tudo o que faço e a que me dedico e por sempre entrar em contato para saber como estou, mesmo quando eu não estou com muito ânimo para conversar. A minha mãe, por ser a maior base de apoio desde sempre para me possibilitar crescer e me tornar quem sou hoje. Por ser minha inspiração e por todas as vezes em que respondeu “você quem sabe” para as minhas perguntas, encontrando o ponto de equilíbrio que julgo perfeito entre aconselhamento e liberdade para eu tomar minhas próprias decisões e construir meu caminho.

Agradeço a meus queridos amigos de escola e de universidade – Juliana, Barbara, Breno, Marina, Carol, Stephanie, Isabela, Laís, Larissa, Marcelo, Gabriel, João – por se fazerem presentes na minha vida ao longo de todos esses anos e por serem essas companhias tão maravilhosas tanto nos momentos de alegria como nos que precisei de acolhimento.

Agradeço a todos os professores que contribuíram para minha formação com seu trabalho e sua dedicação. Tenham certeza de que foram essenciais para a construção da minha identidade e para minha formação como cidadão, com uma visão social, cultural e científica sem a qual não considero que poderia viver plenamente.

Aos amigos que fiz nos últimos anos, no trabalho como professor da Educação Básica, com quem criei laços muito importantes para mim. Sou muito grato pela presença de vocês no meu dia a dia, pelas risadas, pelas conversas leves e pelas não tão leves, pelas trocas de experiência e, principalmente, por mostrarem todos os dias que não estou sozinho nas angústias, alegrias e lutas do trabalho docente.

A minha família, com quem sei que posso contar, mesmo que estejamos distantes ou que não consigamos ter mantido tanto contato recentemente.

A todos do grupo de pesquisa MCPL, com quem convivi durante os anos de iniciação científica e de mestrado e com quem compartilhei o gosto por fazer ciência.

A meu estimado orientador, Thiago, pelos últimos nove anos, durante os quais tem muito me ensinado, acompanhado e apoiado. Sou grato pelo privilégio de ter sido seu primeiro orientando e, apesar dos períodos em que não estive tão presente e produtivo no laboratório, espero que tenha feito jus à orientação e à formação

científica que me ofereceu. Admiro-o muito, assim como o excelente trabalho que tem construído e desenvolvido como pesquisador e cientista.

Ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo e a todo seu corpo docente e de funcionários.

Por fim, às agências de fomento à pesquisa, sem as quais não apenas esta pesquisa, como praticamente toda a produção científica do país não seria possível. Especificamente, à CAPES (projeto 23038.006960/2014-65) e à FAPESP (projetos 2014/15962-5, 2015/08539-1, 2019/25634-9, 2021/06726-0 e 2022/00498-8), pelos auxílios financeiros destinados ao laboratório.

*As cidades, como os sonhos, são construídas por desejos e medos, ainda que o fio condutor de seu discurso seja secreto, que as suas regras sejam absurdas, as suas perspectivas enganosas, e que todas as coisas escondam uma outra coisa.*

*— Eu não tenho desejos nem medos — declarou o Khan —, e meus sonhos são compostos pela mente ou pelo acaso.*

*— As cidades também acreditam ser obra da mente ou do acaso, mas nem um nem o outro bastam para sustentar as suas muralhas. De uma cidade, não aproveitamos as suas sete ou setenta e sete maravilhas, mas a resposta que dá às nossas perguntas.*

[...]

*Às vezes, basta-me uma partícula que se abre no meio de uma paisagem incongruente, um aflorar de luzes na neblina, o diálogo de dois passantes que se encontram no vaivém, para pensar que partindo dali construirei pedaço por pedaço a cidade perfeita, feita de fragmentos misturados com o resto, de instantes separados por intervalos, de sinais que alguém envia e não sabe quem capta. Se digo que a cidade para a qual tende a minha viagem é descontínua no espaço e no tempo, ora mais rala, ora mais densa, você não deve crer que pode parar de procurá-la. Pode ser que enquanto falamos ela esteja aflorando dispersa dentro dos confins do seu império; [...]*

(Italo Calvino, em *As Cidades Invisíveis*)

## RESUMO

Fernandes, A. S. **Caracterização do padrão de fragmentação da ciclofosfamida por espectroscopia vibracional de íons na fase gasosa**. 2023. 105p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A ciclofosfamida é um dos fármacos mais bem-sucedidos e largamente utilizados como agente quimioterápico para o tratamento de câncer. Em vista do seu potencial ecotoxicológico e da relevância de se ampliar os conhecimentos clínicos e biomédicos a seu respeito, evidencia-se uma necessidade de otimizar as capacidades de identificação e quantificação de espécies químicas relacionadas a essa molécula em diferentes tipos de amostras naturais e biológicas. O estudo apresentado nesta dissertação teve, pois, como objetivo, prover uma compreensão mais aprofundada da estrutura, dos sítios de protonação e do padrão de fragmentação da ciclofosfamida. Fez-se uso de técnicas avançadas de espectrometria de massas, com destaque para a espectroscopia de dissociação por múltiplos fótons no infravermelho (IRMPD), com o subsídio de cálculos teóricos de energia e de frequências vibracionais, que permitiram comparar as propostas estruturais para os íons detectados com os espectros experimentais.

As principais espécies iônicas geradas a partir do fármaco – molécula protonada e aduto de sódio – foram identificadas nos espectros de massas das amostras e tiveram suas assinaturas vibracionais determinadas. A análise da ciclofosfamida protonada indicou a presença de uma mistura de isômeros de protonação, o que foi corroborado por cálculos de energia de solvatação. Por meio da dissociação induzida por colisão (CID), o padrão de fragmentação dos dois íons foi investigado. Os espectros IRMPD registrados de cada fragmento viabilizaram a elucidação estrutural da maioria das espécies, por comparação teórico-experimental. Como resultado, algumas vias se mostraram bastante recorrentes, como a perda de HCl ou NaCl. Sugere-se que tal quebra possa levar à formação do cátion aziridínio, o que representaria uma correlação entre o comportamento químico em fase gasosa e a ação do metabólito da droga no DNA. Outra fragmentação comum foi a perda de etileno ( $C_2H_4$ ), em geral proveniente dos grupos cloroetilais.



A grande valia dos cálculos computacionais deve ser destacada. Embora seja possível extrair informações estruturais diretamente de espectros no infravermelho, conclusões mais acertadas, que prezem pela diferenciação de estruturas similares e confôrmeros, requerem a comparação a espectros vibracionais teóricos de propostas para os íons. Adicionalmente, os cálculos foram empregados para modelar e avaliar a curva de energia potencial de um dos mecanismos de fragmentação apresentados.

No contexto médico, espera-se que os resultados deste estudo possam oferecer contribuições que venham a fundamentar o desenvolvimento de procedimentos qualitativos e quantitativos mais sensíveis e precisos, ajudando a determinar dosagens ideais e respostas terapêuticas à droga.

**Palavras-chave:** ciclofosfamida, espectrometria de massas, fragmentação, espectroscopia IRMPD, cálculos teóricos

## ABSTRACT

Fernandes, A. S. **Characterization of cyclophosphamide fragmentation pattern by vibrational gas-phase ion spectroscopy**. 2023. 105p. Master's Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Cyclophosphamide is one of the most successful and widely used chemotherapeutic agents for cancer treatment. In light of its ecotoxicological potential as well as the relevance of expanding clinical and biomedical knowledge about it, a demand arises for optimizing the identification and quantification capabilities for chemical species related to this molecule in different types of natural and biological samples. The study presented in this thesis had thus as its overall goal to provide a more profound insight of cyclophosphamide's structure, protonation sites and fragmentation pattern. Advanced mass spectrometry techniques were employed, with emphasis on InfraRed Multiple Photon Dissociation (IRMPD) spectroscopy. As a support, theoretical calculations of energy and vibrational frequencies were performed, which allowed comparison amongst structural proposals for the detected ions and with the experimental spectra.

The main ionic species generated from the drug – protonated molecule and sodium adduct – were identified in the mass spectra of the samples and had their vibrational signatures determined. The analysis of protonated cyclophosphamide indicated the presence of a mixture of protonation isomers, which has been corroborated by solvation energy calculations. Through collision-induced dissociation (CID), the fragmentation pattern of both ions was investigated. The recorded IRMPD spectra of each fragment enabled structural elucidation of most of the species, by means of theory/experiment comparisons. As a result, some paths were seen as quite recurrent, namely the loss of HCl or NaCl. The formation of the aziridinium cation is suggested to occur from this breakdown, establishing, if confirmed, a correlation between the chemical gas-phase behavior of the drug and the action of its metabolite on DNA. Another common fragmentation was the loss of ethylene (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>), in general coming from the chloroethyl groups.

The substantial value of computational calculations must be highlighted. Although it is possible to extract structural information directly from infrared spectra,

more accurate conclusions, regarding the differentiation of similar structures and conformers, require a comparison to theoretical vibrational spectra of proposals for the ions. Moreover, calculations were also performed to model and evaluate the potential energy curve for one of the fragmentation mechanisms presented.

In the medical context, the results of this study are expected to provide contributions that shall found the development of more sensitive and accurate qualitative and quantitative procedures, helping to determine ideal dosages and therapeutic responses to the drug.

**Keywords:** cyclophosphamide, mass spectrometry, fragmentation, IRMPD spectroscopy, theoretical calculations

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1.1. Representação das moléculas de: a) iperita (mostarda sulfurada), b) mecloretamina (mostarda nitrogenada) e c) ciclofosfamida.</i> .....	23
<i>Figura 1.2. Mecanismo de alquilação do DNA pela mostarda nitrogenada. A letra G representa a guanina, que atua como nucleófilo.</i> .....	23
<i>Figura 1.3. Representação esquemática das etapas do metabolismo da ciclofosfamida, mostrando a formação da espécie ativa e o principal caminho de desativação da droga.</i> .....	24
<i>Figura 3.1. Representação do espectro de massas sequencial (<math>MS^2</math>), reportado na literatura, que mostra os íons fragmento da ciclofosfamida obtido em um LC-Orbitrap-MS (alta resolução).</i> .....	28
<i>Figura 3.2. Mecanismo proposto para a hidrólise da ciclofosfamida. A ordem de algumas etapas pode não ser exatamente a apresentada, visto que os estudos até o momento não puderam isolar e confirmar todos os intermediários.</i> .....	29
<i>Figura 3.3. Etapas propostas para um outro caminho de hidrólise da ciclofosfamida, envolvendo uma N-alquilação interna. O mecanismo de cada hidrólise foi omitido por questão de simplificação.</i> .....	29
<i>Figura 3.4. Esquema geral dos componentes de um espectrômetro de massas.</i> .....	31
<i>Figura 3.5. Esquema do funcionamento da ionização por eletrospray (ESI).</i> .....	34
<i>Figura 3.6. Ion trap 3D; (a) diagrama esquemático representando os eletrodos e os orifícios de entrada dos íons provenientes da fonte e de saída dos íons em direção ao detector; (b) fotografia de um ion trap cortado ao meio ao longo do eixo de simetria cilíndrica.</i> .....	37
<i>Figura 3.7. Sequência de etapas pelas quais as espécies iônicas passam na espectrometria de massas sequencial no tempo (<math>MS^n</math>).</i> .....	39

<i>Figura 3.8. Representação esquemática do mecanismo da dissociação multifotônica no infravermelho (IRMPD), ilustrando a sequência de absorções de fótons e redistribuições vibracionais intramoleculares que leva a energia interna do íon a aumentar até o limiar de dissociação.</i>	43
<i>Figura 3.9. Esquema comparativo do incremento de energia na IRMPD, na CID e na UVPD. <math>M^+</math> representa o íon precursor, e <math>F_n^+</math>, os vários fragmentos com diferentes barreiras energéticas de dissociação para formação.</i>	44
<i>Figura 3.10. Metodologia de obtenção de espectros vibracionais de íons em fase gasosa (IRMPD).</i>	45
<i>Figura 3.11. Exemplo de superfície de energia potencial para uma espécie química hipotética, mostrando mínimos, máximos e pontos de sela (CC BY-NC; Ümit Kaya via LibreTexts; modificada).</i>	53
<i>Figura 4.1. Esquema simplificado do espectrômetro de massas modificado utilizado nos experimentos.</i>	58
<i>Figura 5.1. Espectro de massas da amostra de ciclofosfamida (10 <math>\mu</math>M em acetonitrila) para análise preliminar de íons em solução.</i>	65
<i>Figura 5.2. Comparação do padrão isotópico experimental (vermelho) e teórico (cinza) para <math>CP+H^+</math>. Fórmula: <math>(C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P)H^+</math></i>	66
<i>Figura 5.3. Comparação do padrão isotópico experimental (vermelho) e teórico (cinza) para <math>2CP+Na^+</math>. Fórmula: <math>(C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P)_2Na^+</math></i>	66
<i>Figura 5.4. Espectro vibracional IRMPD do aduto de sódio da ciclofosfamida (<math>m/z</math> 283) com 17 pulsos do laser, comparado ao espectro teórico da molécula. Frequências teóricas corrigidas pelo fator de escala 0,95.</i>	67
<i>Figura 5.5. Espectro vibracional IRMPD do dímero da ciclofosfamida sodiada (<math>m/z</math> 543) com 5 pulsos do laser, comparado ao espectro teórico da molécula. Frequências teóricas corrigidas pelo fator de escala 0,95.</i>	68

<i>Figura 5.6. Três estruturas possíveis para a ciclofosfamida protonada, diferentes pelo sítio de protonação. (A) – protonação no N endocíclico; (B) – protonação no N exocíclico; (C) – protonação no O exocíclico. ....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 5.7. Espectro vibracional IRMPD da ciclofosfamida protonada (m/z 261) com 20 pulsos do laser, comparado aos espectros teóricos das estruturas putativas. Frequências teóricas corrigidas pelo fator de escala 0,95. Energias das geometrias calculadas no nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p), em fase gasosa, em relação ao menor valor do conjunto. ....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 5.8. Espectro vibracional IRMPD da CP+H<sup>+</sup> (m/z 261) com 25 pulsos do laser, obtido por ionização por nanospray de uma solução 2 μM de ciclofosfamida em água/metanol (8:2). ....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 5.9. Espectro vibracional IRMPD da CP+H<sup>+</sup> (m/z 261) com 25 pulsos do laser, obtido por ionização por nanospray de uma solução 20 μM de ciclofosfamida em água. ....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 5.10. Espectro de massas MS(2) da ciclofosfamida protonada, CP+H<sup>+</sup> (m/z 261). ....</i>	<i>74</i>
<i>Figura 5.11. Espectro de massas MS(2) do aduto de sódio da ciclofosfamida, CP+Na<sup>+</sup> (m/z 283). ....</i>	<i>74</i>
<i>Figura 5.12. Fragmentação de (a) CP+H<sup>+</sup> (m/z 261) e (b) CP+Na<sup>+</sup> (m/z 283) em função da amplitude da radiofrequência de excitação para a CID. ....</i>	<i>75</i>
<i>Figura 5.13. Padrão de fragmentação proposto para a ciclofosfamida protonada (CP+H<sup>+</sup>). ....</i>	<i>77</i>
<i>Figura 5.14. Propostas estruturais iniciais dos fragmentos de m/z 140 e m/z 142. ....</i>	<i>78</i>
<i>Figura 5.15. Espectro de massas MS(2) da ciclofosfamida protonada, CP+H<sup>+</sup>, com dois Cl-37 (m/z 265). ....</i>	<i>78</i>
<i>Figura 5.16. Propostas estruturais atuais dos fragmentos de m/z 140 e m/z 142. ....</i>	<i>79</i>

<i>Figura 5.17. Espectro de massas MS(3) da sequência de íons m/z 261 → m/z 140.</i>	79
<i>Figura 5.18. Espectro de massas MS(3) da sequência de íons m/z 261 → m/z 142.</i>	79
<i>Figura 5.19. Espectro de massas MS(3) da sequência de íons m/z 261 → m/z 106.</i>	80
<i>Figura 5.20. Espectro vibracional IRMPD do fragmento de m/z 106 com 15 pulsos do laser, comparado aos espectros teóricos das estruturas putativas. Frequências teóricas corrigidas pelo fator de escala 0,95. Energias das geometrias calculadas no nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p), em fase gasosa, em relação ao menor valor do conjunto.</i>	81
<i>Figura 5.21. Proposta estrutural inicial do fragmento de m/z 233.</i>	82
<i>Figura 5.22. Espectro de massas MS(3) da sequência de íons m/z 261 → m/z 233.</i>	82
<i>Figura 5.23. Proposta estrutural atual do fragmento de m/z 233.</i>	83
<i>Figura 5.24. Espectro vibracional IRMPD do fragmento de m/z 233 com 5 pulsos do laser, comparado aos espectros teóricos das estruturas putativas. Frequências teóricas corrigidas pelo fator de escala 0,95. Energias das geometrias calculadas no nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p), em fase gasosa, em relação ao menor valor do conjunto.</i>	84
<i>Figura 5.25. Padrão de fragmentação proposto para a ciclofosfamida sodiada (CP+Na<sup>+</sup>).</i>	86
<i>Figura 5.26. Proposta estrutural inicial para o fragmento de m/z 225.</i>	86
<i>Figura 5.27. Propostas estruturais atuais para o fragmento de m/z 225.</i>	87

<i>Figura 5.28. Espectro vibracional IRMPD do fragmento de m/z 225 com 15 pulsos do laser, comparado aos espectros teóricos das estruturas putativas. Frequências teóricas corrigidas pelo fator de escala 0,95. Energias das geometrias calculadas no nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p), em fase gasosa, em relação ao menor valor do conjunto.....</i>	<i>88</i>
<i>Figura 5.29. Propostas estruturais do fragmento de m/z 197, juntamente aos mecanismos de formação. ....</i>	<i>89</i>
<i>Figura 5.30. Espectro vibracional IRMPD do fragmento de m/z 197 com 5 pulsos do laser, comparado aos espectros teóricos das estruturas putativas. Frequências teóricas corrigidas pelo fator de escala 0,95. Energias das geometrias calculadas no nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p), em fase gasosa, em relação ao menor valor do conjunto.....</i>	<i>90</i>
<i>Figura 5.31. Mecanismo de fragmentação proposto para a ciclofosfamida sodiada (CP+Na<sup>+</sup>).....</i>	<i>91</i>
<i>Figura 5.32. Principais geometrias otimizadas para o mecanismo de fragmentação de CP+Na<sup>+</sup>. ....</i>	<i>92</i>
<i>Figura 5.33. Variação da energia (E+ZPE) ao longo da coordenada de reação para a fragmentação da CP+Na<sup>+</sup>. ....</i>	<i>93</i>



## LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 5-1. Energia eletrônica somada à energia do ponto zero (E+ZPE), em kcal/mol, dos protômeros da ciclofosfamida 261A (protonação no N endocíclico), 261B (protonação no N exocíclico) e 261C (protonação no O). Energias relativas ao menor valor do conjunto. ....</i>	<i>71</i>
<i>Tabela 5-2. Principais fragmentos detectados para CP+H<sup>+</sup> e CP+Na<sup>+</sup> .....</i>	<i>75</i>
<i>Tabela 5-3. Energia eletrônica somada à energia do ponto zero para a construção da superfície de energia potencial (PES) da fragmentação de CP+Na<sup>+</sup>. Valores relativos à geometria do íon-pai (reagente). ....</i>	<i>93</i>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CP	Ciclofosfamida
CP+H <sup>+</sup>	Ciclofosfamida protonada
CP+Na <sup>+</sup>	Ciclofosfamida sodiada (aduto de sódio)
CID	Dissociação Induzida por Colisão
DFT	Teoria do Funcional de Densidade
E	Energia Eletrônica
e	Número de Euler ou carga elétrica elementar
ESI	Ionização por eletrospray
EFF	Eficiência de Fotofragmentação
E+ZPE	Energia Eletrônica somada à Energia Vibracional do Ponto Zero
FEL	<i>Laser</i> de Elétrons Livres
FT-ICR	Espectrômetro de massas de ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier
$F_{\lambda}$	Intensidade do íon fragmento após irradiação do precursor por fótons de comprimento de onda $\lambda$ por um tempo determinado
GC-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas
h	Constante de Planck
i	Unidade imaginária
IRMPD	Dissociação por Múltiplos Fótons no Infravermelho
IRPD	Fotodissociação no Infravermelho
IMS	Espectrometria de Mobilidade Iônica
IRC	Coordenada Intrínseca de Reação
IV	Infravermelho
IVR	Redistribuição Vibracional Interna
$k_{\lambda}$	Constante cinética da dissociação induzida por <i>laser</i> no comprimento de onda $\lambda$

LC-MS	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas
$m$	Massa
$m/z$	Razão massa-carga
MS	Espectrometria de Massas
MS/MS ou MS(2)	Espectrometria de massas sequencial de dois estágios
MS(3)	Espectrometria de massas sequencial de três estágios
MS <sup>n</sup>	Espectrometria de massas sequencial ou em <i>tandem</i>
nano-ESI	Nanoeletrospray ou Nanospray
Nd:YAG	Granada de Ítrio Alumínio dopada com Neodímio
OPA	Amplificador Paramétrico Óptico
OPO	Oscilador Paramétrico Óptico
$P_0$	Intensidade inicial do íon precursor antes da irradiação
$P_\lambda$	Intensidade do íon precursor após irradiação por fótons de comprimento de onda $\lambda$ por um tempo determinado
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SMD	Modelo de Solvatação baseado na Densidade
UV	Ultravioleta
UVPD	Fotodissociação no Ultravioleta
$V(\vec{r})$	Potencial elétrico em função da posição no espaço tridimensional
$\tilde{\nu}$	Número de onda da radiação
$\Psi(\vec{r})$	Função de onda do sistema
$\omega$	Velocidade angular associada a uma oscilação harmônica

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	26
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>27</b>
3.1. CICLOFOSFAMIDA .....	27
3.2. ESPECTROMETRIA DE MASSAS .....	30
3.2.1 <i>Princípios da técnica</i> .....	31
3.2.2 <i>Fontes de íons</i> .....	33
3.2.3 <i>Analísadores de massa</i> .....	37
3.2.4 <i>Espectrometria de massas sequencial e elucidação estrutural por fragmentação</i> .....	39
3.3. ESPECTROSCOPIA IRMPD.....	41
3.3.1 <i>Princípios da fragmentação IRMPD</i> .....	42
3.3.2 <i>Espectroscopia vibracional de íons</i> .....	44
3.3.3 <i>Cálculo da eficiência de fotofragmentação</i> .....	47
3.3.4 <i>Fontes de radiação</i> .....	48
3.4. CÁLCULOS COMPUTACIONAIS DE ESTRUTURA ELETRÔNICA .....	50
3.4.1 <i>Metodologias de cálculo computacional</i> .....	51
3.4.2 <i>Otimização de geometrias e cálculo de frequências vibracionais</i> .....	53
3.4.3 <i>Comparações teórico-experimentais dos espectros vibracionais</i> .....	55
3.4.4 <i>Construção de superfícies de energia potencial para reações</i> .....	56
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>58</b>
4.1. ANÁLISES POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL (MS <sup>N</sup> ).....	58
4.2. OBTENÇÃO DE ESPECTROS VIBRACIONAIS DE ÍONS POR IRMPD .....	60
4.3. CÁLCULOS COMPUTACIONAIS .....	62
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>65</b>
5.1. ANÁLISE PRELIMINAR: IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES RELEVANTES .....	65
5.2. ESPECTROS IRMPD DA CICLOFOSFAMIDA.....	66
5.2.1 <i>Análise vibracional de CP+Na<sup>+</sup></i> .....	67
5.2.2 <i>Análise vibracional de CP+H<sup>+</sup></i> .....	69
5.3. PADRÕES DE FRAGMENTAÇÃO .....	73
5.3.1 <i>Espectros MS/MS</i> .....	74
5.3.2 <i>Breakdown curves</i> .....	75
5.4. FRAGMENTAÇÃO DA CICLOFOSFAMIDA PROTONADA (CP+H <sup>+</sup> ).....	77
5.5. FRAGMENTAÇÃO DA CICLOFOSFAMIDA SODIADA (CP+NA <sup>+</sup> ).....	85
5.5.1 <i>Elucidação estrutural dos fragmentos</i> .....	85
5.5.2 <i>Modelagem computacional do mecanismo de fragmentação</i> .....	91
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>95</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>97</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>100</b>

## 1. Introdução

De 1950 até 2016, a média global de expectativa de vida avançou em mais de 26 anos, indo de pouco menos de 46 para 72 anos de idade.<sup>1,2</sup> Esse notório crescimento da longevidade humana é devido, em grande parte, ao desenvolvimento significativo do campo das ciências médicas ao longo do último século. Tal evolução trouxe não apenas um melhor entendimento dos processos biológicos como também a criação de diversos medicamentos e tratamentos para doenças existentes.

Nesse contexto, um importante exemplo é a descoberta da penicilina como antibiótico, em 1942, que foi responsável por salvar inúmeras vidas desde então, ao combater eficazmente infecções bacterianas. Além dela, pode-se citar também a morfina e o ácido acetilsalicílico (para alívio da dor), a insulina (para o controle glicêmico no sangue de diabéticos), os inibidores de protease (para o controle do HIV), os agentes antineoplásicos (para o combate a células tumorais) e as diversas vacinas (para o desenvolvimento de imunidade a doenças virais). Todos, cada um com seu uso específico, permitiram a grande melhora na qualidade e na expectativa de vida da população mundial.

Concomitante e posteriormente ao desenvolvimento desses novos fármacos, surge a necessidade de avaliar detalhadamente tanto os efeitos metabólicos de sua utilização pontual e continuada, como os efeitos ambientais do seu uso em larga escala pela população. No que se refere aos efeitos metabólicos, não basta saber que uma molécula funciona para determinado tratamento; é importante compreender a fundo os mecanismos por meio dos quais os medicamentos agem no organismo, os locais em que agem e os fatores que modulam essa atuação. Esse conhecimento permite que se encontrem ou desenvolvam drogas cada vez mais eficientes e que se descubram e solucionem problemas inerentes ao uso de moléculas específicas.

Já com relação aos efeitos ambientais, tem havido uma preocupação cada vez maior com a presença de fármacos e seus derivados nos cursos de água doce e, conseqüentemente, nas fontes de água potável. Essas moléculas se tornam contaminantes por diversas vias, como o descarte indevido e os efluentes domésticos, industriais e hospitalares, e afetam tanto organismos aquáticos, como até a população humana, por bioacumulação. Por tais motivos, diversos estudos têm sido realizados no sentido de identificar a extensão do problema e possíveis soluções.<sup>3,4</sup> Nesse sentido, a OCDE tem como primeira recomendação, em seu relatório *Pharmaceutical Residues in Freshwater: Hazards and Policy Residues*, o aperfeiçoamento do conhecimento, da compreensão e da comunicação a respeito da ocorrência,

do destino, da toxicidade e dos riscos ecológicos e à saúde humana de resíduos farmacológicos em corpos de água, de maneira a viabilizar futuras medidas para redução da poluição.<sup>5</sup>

No âmbito dessa demanda por análises clínicas e ambientais de medicamentos, a busca por técnicas analíticas rápidas e eficientes é primordial. Tanto para estudos qualitativos, como para quantitativos, faz-se imprescindível a existência e o aperfeiçoamento de técnicas analíticas capazes de, por meio de amostras de sangue, urina, esgoto, rios, entre outras, identificar específica e inequivocamente a droga e seus metabólitos ou produtos de degradação, além de quantificá-los de maneira precisa. Excelentes métodos para fazê-lo são a cromatografia e a espectrometria de massas, em separado e, principalmente, em conjunto, em acoplamentos como CG-MS e LC-MS/MS.<sup>6-8</sup>

A dificuldade de caracterizar drogas e seus derivados advém das baixas concentrações em que se encontram nas amostras e na complexidade das matrizes biológicas. É exatamente nesse contexto que a espectrometria de massas mostra todo seu poder como técnica analítica,<sup>9,10</sup> uma vez que é universal para qualquer sistema molecular – baseada na relação massa/carga das espécies –, além de ser capaz de detectar quantidades muito pequenas de uma espécie presente em uma amostra.

Apesar das evidentes vantagens dessa técnica, há algumas informações que o uso da espectrometria de massas pura e simples não permite obter, como a presença de isômeros, interações intramoleculares e diferentes conformações. Isso ocorre, pois tais características não afetam a razão massa-carga ( $m/z$ ). Entretanto, elas são extremamente importantes, já que podem ter influência na performance e nos efeitos colaterais das drogas, tendo em vista a alta especificidade das reações metabólicas.

Para diferenciar isômeros de espécies relevantes, por exemplo, métodos de espectrometria de massas sequencial podem ser muito úteis, ao se basearem na identificação indireta por meio dos padrões de fragmentação dos íons. Não é sempre, contudo, que essa abordagem tem sucesso. Em diversos casos, a fragmentação dos isômeros e confôrmeros é indistinta.

No âmbito dessa problemática, duas técnicas recentemente desenvolvidas que têm obtido excelentes resultados são a espectrometria de mobilidade iônica (IMS) e a espectroscopia vibracional de íons.<sup>11-13</sup> A primeira permite diferenciar íons a partir de sua mobilidade em um campo elétrico e sua interação com um fluxo de gás neutro, o que dependerá da seção de choque da espécie, ou seja, de sua natureza química, seu formato e sua geometria.<sup>14</sup> Já a segunda técnica viabiliza a identificação de isômeros por meio das diferentes assinaturas

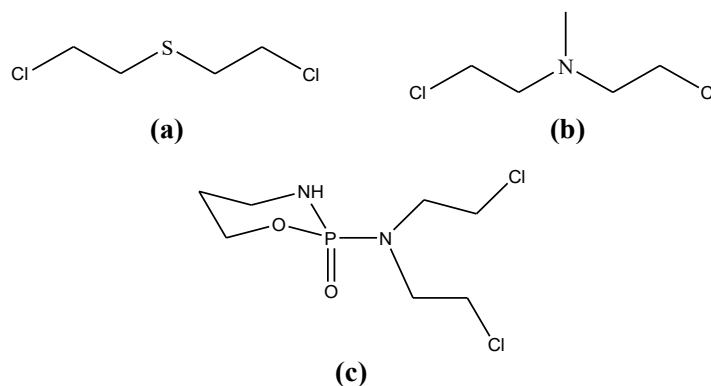
espectrais na fase gasosa, de modo semelhante ao que se faz com a espectroscopia no infravermelho convencional.<sup>15-18</sup>

O acoplamento de uma dessas técnicas, ou das duas, a um espectrômetro de massas pode aumentar substancialmente o poder do equipamento, ao adicionar dimensões analíticas ortogonais extras.<sup>13</sup> Essa montagem seria capaz de diferenciar e caracterizar espécies isoméricas e conformações distintas, fornecendo dados deveras importantes para o estudo de fármacos e seus derivados, assim como de qualquer outro sistema químico em que a razão  $m/z$  das espécies não seja suficiente para obter conclusões.

No que concerne aos diversos avanços da medicina e da biomedicina citados inicialmente, um que merece bastante notoriedade é o tratamento de cânceres. O desenvolvimento de agentes quimioterápicos foi de uma importância ímpar para reduzir a taxa de mortalidade desse tipo de doença. Dentre eles, um dos mais bem-sucedidos e largamente utilizados continua sendo a ciclofosfamida, mesmo atualmente, 60 anos após sua síntese. Essa droga se mostra muito eficiente contra diversos tipos de tumor desde que foi produzida pela primeira vez, em 1958.<sup>19-21</sup>

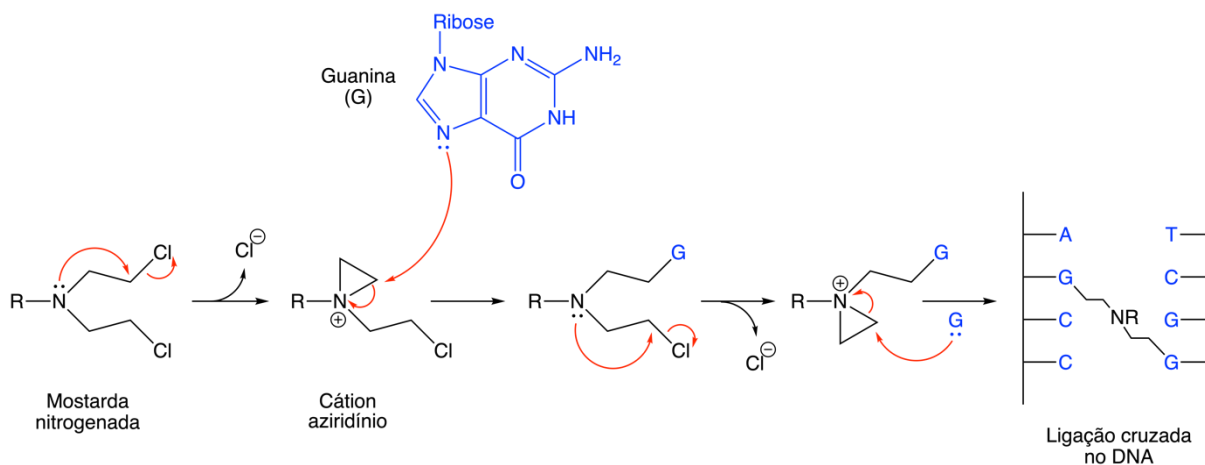
A criação da ciclofosfamida como medicamento contra o câncer remete à Primeira Guerra Mundial. À época, por meio de autópsias de soldados, notou-se que o gás mostarda (Figura 1.1a) utilizado como arma química apresentava propriedades antineoplásicas – capaz de evitar ou inibir o crescimento e a disseminação de tumores.<sup>22,23</sup> Essa descoberta incentivou a investigação de tal substância e a síntese de um composto similar, a mostarda nitrogenada (Figura 1.1b), a qual marcou o começo da quimioterapia de câncer moderna.<sup>24</sup> Sendo assim, paradoxalmente, uma substância desenvolvida para exterminar pessoas teve seu maior e melhor uso no tratamento de doenças.

Após os estudos sobre a mostarda nitrogenada, passou-se a investigar possibilidades de sintetizar compostos menos reativos e mais estáveis que pudessem ser usados como agentes anticâncer. Ademais, tentou-se explorar diferenças entre o tecido normal e o tumoral, para conceber uma molécula que atuasse seletivamente apenas no tumor.<sup>25</sup> É nesse contexto que a ciclofosfamida (Figura 1.1c) é criada, na expectativa de que fosse metabolizada intracelularmente para mostarda nitrogenada por ação das fosfamidasases, haja vista os estudos bioquímicos que indicavam índices mais elevados dessas enzimas no tecido tumoral.<sup>26</sup> Cabe, todavia, salientar que, apesar de sua eficiência comprovada ao longo de décadas, descobriu-se posteriormente que tal ativação seletiva no tecido tumoral não ocorre.



**Figura 1.1.** Representação das moléculas de: a) iperita (mostarda sulfurada), b) mecloretamina (mostarda nitrogenada) e c) ciclofosfamida.

Ao se observar as três moléculas da Figura 1.1, torna-se evidente sua semelhança principal: os dois grupos 2-cloroetila. No caso da iperita (1.1.a), eles estão ligados ao enxofre e, na mostarda nitrogenada (1.1.b) e na ciclofosfamida (1.1.c), os dois estão ligados ao nitrogênio, formando o N,N-bis-cloroetilamino. Essa característica é crucial para a atividade antineoplásica desses compostos, uma vez que seu mecanismo de ação predominante envolve a bis-alquilação do DNA para formar ligações cruzadas entre as fitas.<sup>27</sup> Isso feito, a replicação de DNA é comprometida, o que promove a morte da célula tumoral. Na Figura 1.2, pode-se observar o mecanismo da alquilação do DNA por meio da formação de um cátion aziridínio cíclico.

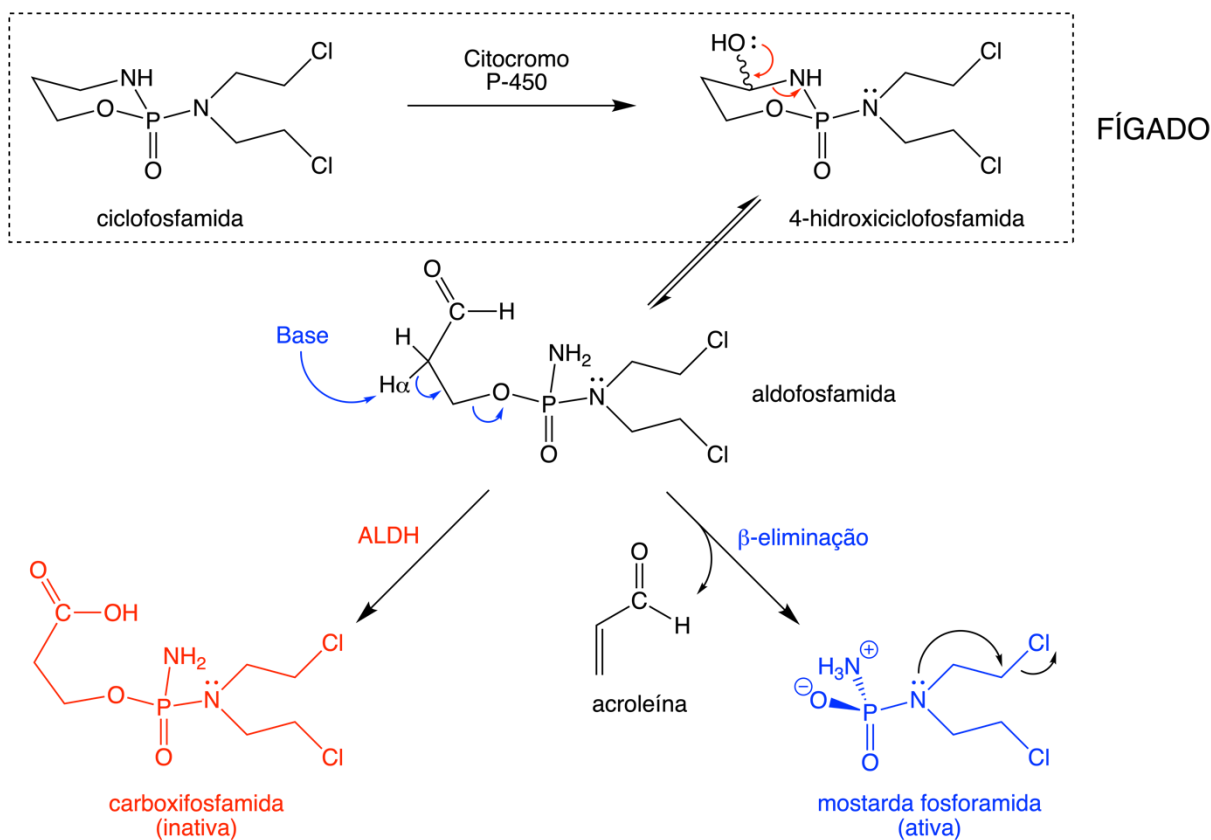


**Figura 1.2.** Mecanismo de alquilação do DNA pela mostarda nitrogenada. A letra G representa a guanina, que atua como nucleófilo.<sup>27</sup>

Não obstante a ciclofosfamida não tenha uma ativação seletiva no tecido tumoral, ela é uma pró-droga, ou seja, é inativa *per se*, em sua forma não-metabolizada. Isso é devido à presença de um grupo retirador de elétrons, que torna a espécie menos nucleofílica se



comparada à mostarda nitrogenada.<sup>22</sup> Para ser, pois, ativada, ela precisa passar por um processo metabólico de algumas etapas, que se inicia no fígado (Figura 1.3).



**Figura 1.3.** Representação esquemática das etapas do metabolismo da ciclofosfamida, mostrando a formação da espécie ativa e o principal caminho de desativação da droga.<sup>27</sup>

Inicialmente, a ciclofosfamida é ativada no fígado, pela família de enzimas hepáticas do citocromo P-450. Nessa etapa, é formada a 4-hidroxiciclofosfamida, a qual está em equilíbrio com seu tautômero de cadeia aberta, a aldofosfamida. Esses precursores instáveis se difundem facilmente para as células do corpo. No meio intracelular, a aldofosfamida decompõe-se em acroleína e mostarda fosforamida, por meio de uma  $\beta$ -eliminação. É esta última espécie que apresenta propriedades citotóxicas e é responsável pela alquilação do DNA, embora a acroleína possa também contribuir para o dano celular, uma vez que é um aldeído altamente reativo.<sup>22,28,29</sup> Por fim, em se tratando do mecanismo de desativação da droga, o principal consiste na oxidação da aldofosfamida a carboxifosfamida pela ação das enzimas aldeído desidrogenase (ALDH).

Assim como para outros fármacos, estudos que ampliem a capacidade de detecção e de quantificação da ciclofosfamida têm um relevante papel em fomentar mais estudos metabólicos e o aperfeiçoamento de métodos de análise clínica e de impacto ambiental desse medicamento

quimioterápico. Com relação ao meio ambiente, por exemplo, há pesquisas que indicam que a ciclofosfamida, assim como outras drogas, pode contaminar ecossistemas e impactar organismos aquáticos, mesmo em concentrações extremamente baixas.<sup>30,31</sup> A literatura indica que ela pode até mesmo ter efeitos mutagênicos em outros organismos, causando câncer.<sup>32</sup>

Tendo em vista esse potencial ecotoxicológico da ciclofosfamida, além da busca constante por aprofundar os conhecimentos clínicos e biomédicos a seu respeito, a compreensão de sua estrutura e dos mecanismos de fragmentação pode se fazer relevante na identificação e quantificação de espécies relacionadas a ela em diferentes tipos de amostra. É nesse contexto que o presente trabalho se insere, ao se propor a esclarecer, com técnicas avançadas de espectrometria de massas e cálculos quânticos, o comportamento da ciclofosfamida em espectrometria de massas em *tandem*.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo Geral

O principal intuito deste trabalho de pesquisa assiste na expansão do conhecimento que se tem a respeito do medicamento quimioterápico ciclofosfamida. Tem-se como objetivo otimizar as capacidades de identificação da ciclofosfamida em diversos tipos de amostras naturais e biológicas, ao prover uma noção mais profunda de sua estrutura, seus sítios de protonação e seu padrão de fragmentação, fazendo-se uso de técnicas avançadas de espectrometria de massas, com destaque para a espectroscopia de dissociação por múltiplos fótons no infravermelho (IRMPD), com subsídio de cálculos teóricos de energias e frequências vibracionais. No contexto médico, esse estudo pode vir a fundamentar o desenvolvimento de procedimentos qualitativos e quantitativos mais sensíveis e precisos, ajudando a determinar dosagens ideais e respostas terapêuticas à droga.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o padrão de fragmentação da ciclofosfamida por espectrometria de massas sequencial ( $MS^n$ ), para que se possa tornar a identificação da droga mais eficiente, ao auxiliar na sua diferenciação.
- Obter os espectros IRMPD tanto da ciclofosfamida – protonada ou aduto de  $Na^+$  – como de possíveis fragmentos a respeito dos quais haja dúvidas sobre estrutura e isomeria.
- Modelar estruturas e geometrias de espécies a serem estudadas por meio de cálculos computacionais, calculando-se sua energia e seu espectro vibracional teórico, de modo a permitir a comparação com os espectros IRMPD obtidos experimentalmente.
- Modelar computacionalmente a superfície de energia potencial para o mecanismo proposto de fragmentação da ciclofosfamida.

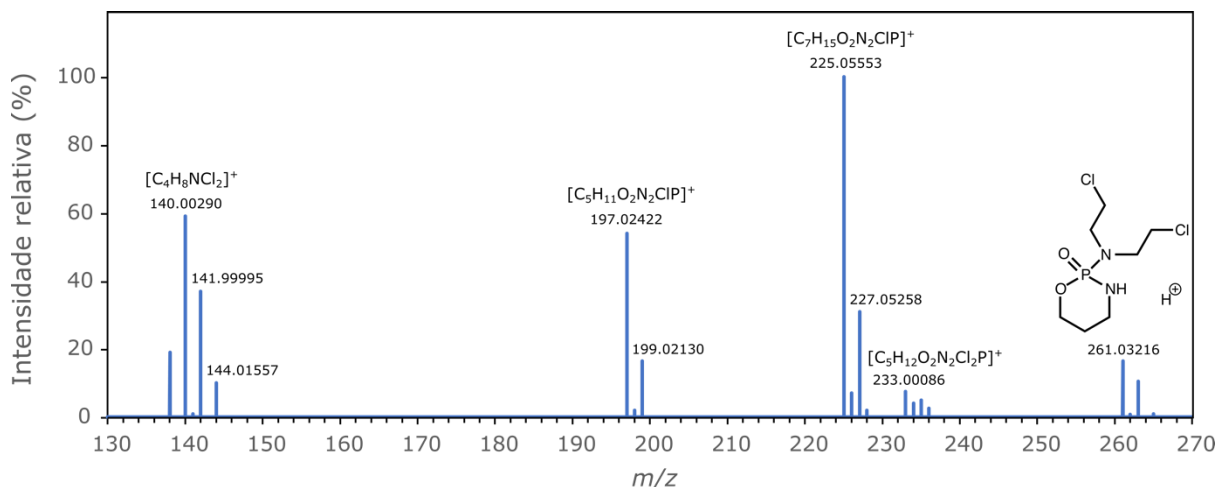
### 3. Referencial Teórico

#### 3.1. Ciclofosfamida

O fármaco ciclofosfamida, como já comentado anteriormente, apresenta um papel bastante importante em alguns tipos de tratamento oncológico, ao obstar a replicação do DNA nas células tumorais. Por isso, assim como para outros medicamentos, o desenvolvimento de metodologias de análise qualitativa e quantitativa para a detecção dessa substância torna-se questão essencial, não só em investigações clínicas, mas também em estudos de impacto ambiental do uso e do descarte da droga pela população. Nesse ínterim, encontram-se trabalhos na literatura em que se utilizou cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) para detectar a ciclofosfamida.<sup>33,34</sup>

Já se discutiu como a espectrometria de massas é de enorme utilidade em análises desse tipo, em matrizes complexas, devido à sua alta sensibilidade e universalidade. Torna-se ainda mais útil se se considera a avaliação do padrão de fragmentação do analito, o que incrementa consideravelmente a especificidade da técnica. A princípio, utilizando fontes de ionização brandas, seria possível obter apenas a relação massa/carga do íon molecular; mas, com o desenvolvimento da espectrometria de massas sequencial ( $MS^n$ ), tem-se acesso a dados sobre como o íon se fragmenta, o que permite diversas inferências estruturais a respeito da espécie em estudo.

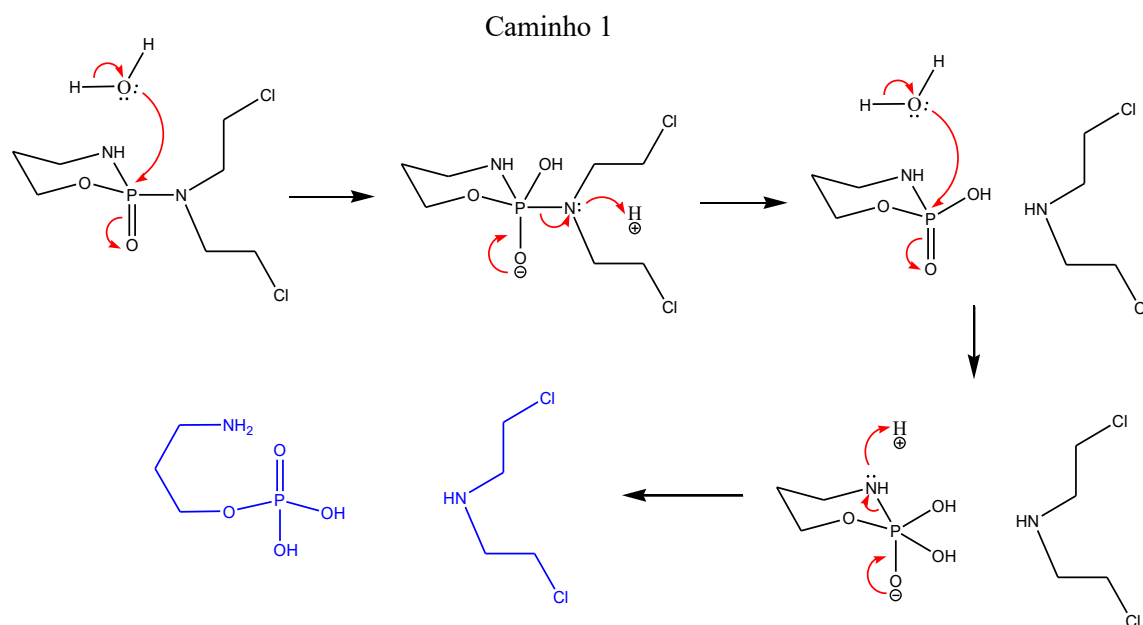
No que tange à ciclofosfamida, informações sobre seu padrão de fragmentação já existem e estão disponíveis, conforme se observa no espectro de massas apresentado na Figura 3.1, publicado por Gómez-Canela et al.<sup>35</sup> As análises, não obstante, geralmente não se aprofundam em determinar as estruturas dos fragmentos ou os mecanismos de dissociação e costumam se focar na determinação das massas das moléculas neutras perdidas na fragmentação. Nesse espectro, por exemplo, são detectados os íons-filho de  $m/z$  233,  $m/z$  225,  $m/z$  197 e  $m/z$  140, originários das perdas de  $C_2H_4$ , de HCl, de  $C_2H_4+HCl$  e de  $C_3H_7NO_2P$  respectivamente.



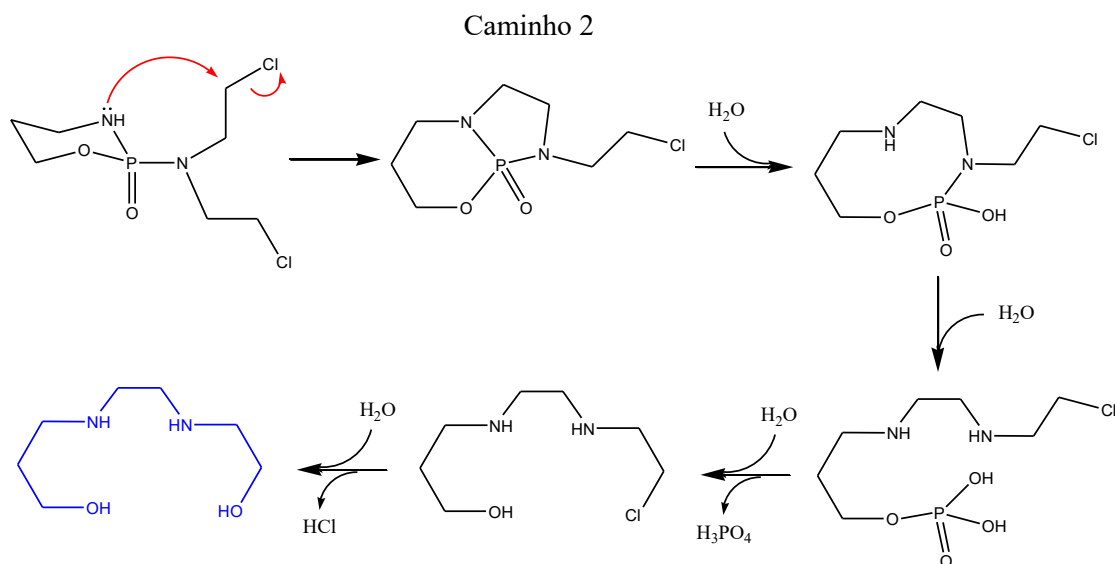
**Figura 3.1.** Representação do espectro de massas sequencial ( $MS^2$ ) reportado na literatura, que mostra os íons fragmentos da ciclofosfamida, obtido em um LC-Orbitrap-MS (alta resolução).<sup>35</sup>

As informações acima – massa molecular e massas dos fragmentos principais – podem, em uma primeira instância, ser suficientes para confirmar a presença e a identidade da substância em alguma amostra, inclusive para quantificá-la. É, todavia, importante que se aprofunde a descrição de como essas dissociações ocorrem, por meio de quais etapas e em quais condições. Esse conhecimento, que é o que será pesquisado e desenvolvido na presente dissertação, pode auxiliar na ampliação dos contextos em que a droga e seus produtos de degradação podem ser identificados. Por exemplo, em amostras ambientais, é possível que parte das moléculas de ciclofosfamida tenha hidrolisado desde seu descarte, o que prejudica a sua quantificação total. Ser capaz, pois, de reconhecer os produtos de hidrólise, assim como os fragmentos comuns à molécula original e a essas espécies secundárias, promoverá um maior poder de análise química e, conseqüentemente, maior capacidade de gerar novas descobertas e conclusões.

Em relação à hidrólise da ciclofosfamida, cabe ressaltar que não se trata de um processo trivial e pode envolver diversas outras etapas além da hidrólise propriamente dita, dentre elas N-alkilação e substituição nucleofílica.<sup>36–38</sup> Ademais, não há, na molécula, apenas um sítio passível de clivagem por ataque de água, mas três – duas ligações N–P e uma P–O. Estudos desse processo, que analisaram os produtos formados por meio de análise elementar, espectroscopia no infravermelho e RMN, indicam que haja dois caminhos principais para a hidrólise, mostrados na Figura 3.2 e na Figura 3.3.<sup>38</sup>



**Figura 3.2.** Mecanismo proposto para a hidrólise da ciclofosfamida. A ordem de algumas etapas pode não ser exatamente a apresentada, visto que os estudos até o momento não puderam isolar e confirmar todos os intermediários.



**Figura 3.3.** Etapas propostas para um outro caminho de hidrólise da ciclofosfamida, envolvendo uma N-alkilação interna. O mecanismo de cada hidrólise foi omitido por questão de simplificação.

A lise da molécula pode ocorrer pela quebra das ligações P–N endo- e exo-cíclicas – Caminho 1 –, com formação de bis(2-cloroetil)amina. Alternativamente, pode começar por uma N-alkilação intramolecular, formando um composto bicíclico, seguida da quebra das ligações P–N e P–O, além de uma  $S_N2$  ocasional que troca o cloreto por uma hidroxila – Caminho 2.

Este segundo mecanismo leva à formação de  $\text{HO}(\text{CH}_2)_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{OH}$  e já foi referido como “mecanismo de Friedman”.

Embora as condições reacionais relatadas na literatura sejam consideravelmente diversas,<sup>36-38</sup> por via de regra, a ocorrência do caminho 1 é preferencial em temperaturas próximas da ambiente e normalmente em meio ácido. Já o caminho 2, mais complexo, ocorre em condições mais extremas de temperatura, normalmente em refluxo. Em solução, ambos os processos podem demorar horas ou dias para que se obtenha uma porcentagem significativa de produto.

Algo que vale ressaltar em se tratando dessas reações consiste na provável existência de intermediários contendo apenas um grupo 2-cloroetilamina. Compostos com essa característica, que são capazes de, dentro das células, alquilar apenas uma fita do DNA, são conhecidos por ter efeitos mutagênicos.<sup>39</sup> É, pois, possível que tais espécies tenham alguma relação com o desenvolvimento de câncer já relatado em organismos aquáticos devido à contaminação da água por ciclofosfamida.

Conforme se nota, trata-se de um processo deveras intrincado, cujas etapas e intermediários não foram ainda completamente confirmados pelas pesquisas anteriores.

### 3.2. Espectrometria de Massas

Tendo em vista as matrizes frequentemente analisadas para detecção e quantificação de ciclofosfamida e, também, de outros fármacos, a espectrometria de massas é uma técnica extremamente útil e adequada devido à sua universalidade e à sua sensibilidade. Trata-se de uma ferramenta analítica imprescindível em diversos campos da Ciência como a Química, a Bioquímica, a Farmácia e a Medicina, e é reconhecida por viabilizar inúmeros estudos que vão desde a elucidação estrutural de espécies desconhecidas e de analitos ambientais ou forenses e o controle de qualidade de drogas, alimentos e polímeros, e podem chegar até proteômica, sequenciamento de biomoléculas, metabolômica e análises de petróleo bruto e derivados.<sup>40-48</sup>

A espectrometria de massas, cuja origem histórica remonta ao trabalho do laureado com o Prêmio Nobel de Física de 1906, Joseph John Thomson, na investigação de espécies eletricamente carregadas em fase gasosa, tem como objetivo principal a identificação de compostos químicos a partir das massas atômicas ou moleculares de seus constituintes. Adicionalmente, graças aos enormes avanços pelos quais essa metodologia analítica passou e ao acoplamento com outras técnicas mais modernas, é possível que, hoje, obtenham-se

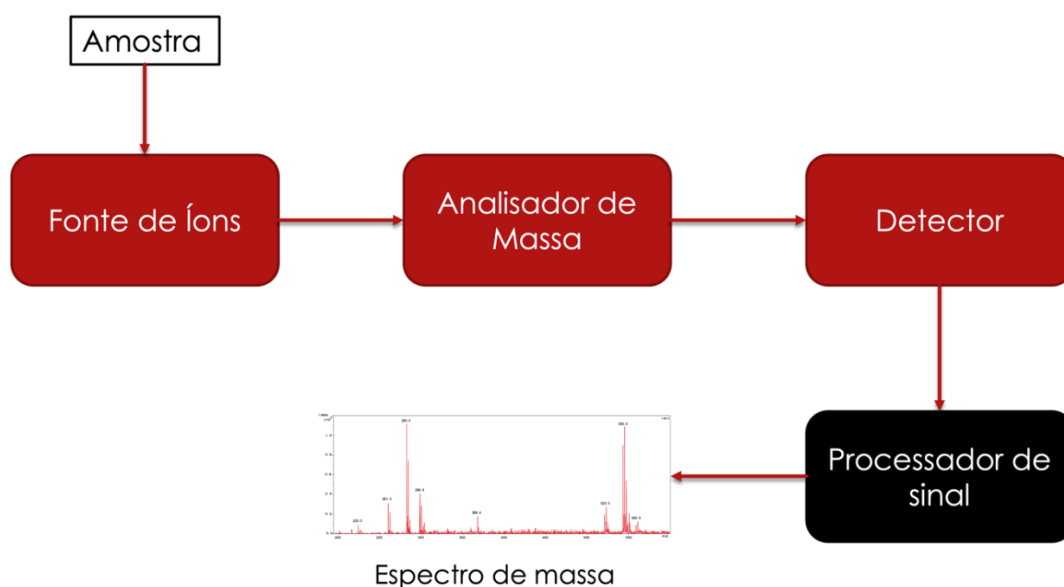
informações a respeito da conectividade dos átomos, da presença de grupos funcionais e até da estrutura tridimensional de espécies químicas.

Ao longo desta seção, serão apresentados os princípios básicos da espectrometria de massas, assim como aspectos específicos – a saber, fontes de ionização e métodos de fragmentação – que são relevantes no presente trabalho.

### 3.2.1 Princípios da técnica

O princípio básico da espectrometria de massas (MS – do inglês *mass spectrometry*) consiste em gerar íons a partir de compostos orgânicos e inorgânicos por algum método adequado, separá-los em função de sua razão massa-carga ( $m/z$ ) e detectá-los qualitativa e quantitativamente por seus respectivos  $m/z$  e abundância.<sup>49</sup> Isso significa que a espécie precisa estar eletricamente carregada para que possa ser analisada, o que não configura necessariamente uma importante restrição ao uso da técnica, haja vista que as espécies da amostra podem ser ionizadas *in loco* antes da análise. Nesse sentido, a geração dos íons, assim como a sua separação em função de  $m/z$ , pode ser realizada de diversas maneiras, a depender do tipo de espectrômetro de massas.

Há uma variedade considerável de equipamentos para a realização de espectrometria de massas, acoplados ou não a outras técnicas analíticas. O esquema genérico, contudo, conta com três componentes principais – fonte de íons, analisador de massa e detector –, que se podem verificar na Figura 3.4.



**Figura 3.4.** Esquema geral dos componentes de um espectrômetro de massas.



Quando a amostra, usualmente muito diluída, é introduzida no equipamento, ela é transferida para a fase gasosa e ionizada por algum método para gerar espécies químicas eletricamente carregadas, passíveis de detecção. Essas espécies podem ser as próprias moléculas intactas, com um elétron a mais ou a menos, ou então fragmentos originados nos processos de ionização. Esses íons, em geral de variadas massas, seguem pelos setores do espectrômetro, já em alto vácuo ou ultra alto vácuo, até chegar ao analisador de massa. Nesse setor, os diversos íons sofrem influência de campos elétricos, magnéticos, ou de uma conjunção dos dois, e são separados espacial ou temporalmente em função de sua razão massa-carga ( $m/z$ ). Tal separação permite que se detecte diferencialmente as espécies e que se construa um gráfico, denominado espectro de massas.

O espectro de massas representa cada espécie iônica detectada no equipamento como um pico no gráfico bidimensional de “intensidade do sinal” por “ $m/z$ ”. A intensidade do sinal, isto é, a altura do pico, está relacionada à abundância da espécie, uma vez que, quanto mais íons ativando o detector, maior o sinal elétrico produzido. Esse valor apresenta unidade arbitrária e pode mudar a depender do espectrômetro e, portanto, é comum que se normalize a intensidade em relação ao íon mais abundante – chamado de pico base. Já a posição do pico no eixo das abscissas indica qual é a razão  $m/z$  de determinado íon. A unidade utilizada para essa medição não é a do Sistema Internacional ( $\text{kg}\cdot\text{C}^{-1}$ ), mas sim adimensional por definição; calcula-se a razão a partir do valor numérico da massa em unidades de massa atômica (u.m.a.) e do número de cargas elétricas elementares. Isso significa que, se a espécie for monocarregada – o que ocorre na grande maioria dos íons detectados –, a escala de  $m/z$  reflete diretamente a escala de massa atômica.<sup>49</sup>

Geralmente, no caso de análises de amostras de uma única substância, o pico de maior  $m/z$  no espectro refere-se ao íon molecular,  $M^+$ , ao passo que os picos de  $m/z$  menores indicam íons fragmentos, gerados na fonte de íons ou já presentes na amostra. Em alguns casos, porém, a depender das particularidades do processo de ionização utilizado, podem-se detectar também espécies de  $m/z$  maior do que o íon molecular, advindas da protonação ( $M+H^+$ ), da formação de adutos com íons comuns ( $M+Na^+$ , por exemplo), da dimerização ( $2M+Na^+$ , por exemplo), da formação de clusters, ou de outras transformações.

No que tange à interpretação dos espectros de massas, vale também salientar que se trata de uma análise fundamentalmente estatística a respeito dos possíveis caminhos das espécies da amostra nas suas respectivas superfícies de energia potencial. Sendo assim, considerando a presença de milhares de íons no analisador de massa, um caminho de formação ou fragmentação

mais provável gerará, conseqüentemente, mais íons, o que culminará em um pico de maior intensidade no espectro.

### 3.2.2 Fontes de íons

Na atualidade, existe uma miríade de fontes de íons diferentes para serem utilizadas em espectrometria de massas. Sua função principal consiste em transferir espécies moleculares da fase condensada (amostra) para a fase gasosa e ionizá-las no processo. Essas fontes podem se diferenciar em vários aspectos, como a pressão sob a qual operam (alto vácuo, pressão atmosférica), o modo de transferir as espécies para a fase gasosa (evaporação, nebulização, dessorção por *laser*), o método de ionização (química, impacto eletrônico, induzida por fóton, eletrospray) e a energia interna conferida aos íons (branda ou dura).<sup>50</sup> Assim como outras particularidades podem dar origem a subcategorias de fontes.

Elencadas abaixo estão as principais categorias de fontes de íons utilizadas nos espectrômetros de massas:

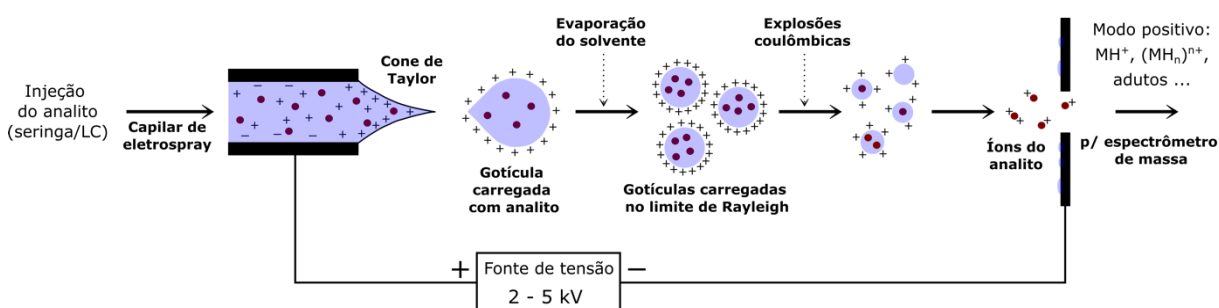
- Ionização por elétrons (EI, do inglês *electron ionization*),
- Ionização química (CI, do inglês *chemical ionization*),
- Fotoionização (PI, do inglês *photoionization*),
- Ionização por eletrospray (ESI, do inglês *electrospray ionization*), e
- Ionização/dessorção a *laser* (LDI, do inglês *laser desorption ionization*).

A metodologia mais amplamente utilizada nas últimas décadas e, provavelmente, até hoje é a de ionização por eletrospray (ESI) e suas variações.<sup>51</sup> Esse tipo de fonte de íons, deveras versátil, é capaz de lidar com uma vasta variedade de analitos, desde pequenos íons inorgânicos até polímeros, ácidos nucleicos, proteínas e peptídeos ionizados, que podem ter massas moleculares de milhares a centenas de milhões de Daltons (1 kDa – 10<sup>2</sup> MDa).<sup>52</sup> Além de espécies químicas já previamente iônicas em solução, também é possível extrair para a fase gasosa moléculas neutras a partir da sua associação com um ou mais íons presentes na solução (Na<sup>+</sup>, H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>). Nesse sentido, trata-se de mais um método de transferência de íons do que um verdadeiro método de ionização – de alguma forma, os íons já precisam estar disponíveis em solução para que o processo se efetue.<sup>49</sup>

A ESI é uma técnica branda de ionização a pressão atmosférica, cujo desenvolvimento teve como principal expoente o químico John Fenn, na década de 1980,<sup>53</sup> o qual já descreveu a

descoberta como a capacidade de “dar asas a elefantes moleculares”.<sup>54</sup> O método tem origem no trabalho de Malcolm Dole na década de 1960, inicialmente na tentativa de determinação da massa molecular de polímeros sintéticos. Ao adaptar essa técnica para a espectrometria de massas, Dole e seus colaboradores desenvolveram um aparato que produzia moléculas de poliestireno eletricamente carregadas na fase gasosa, na faixa de massa de kilo-Daltons.<sup>55</sup>

A ionização por eletrospray envolve a nebulização de um fluxo de líquido contendo a amostra. Aplica-se um intenso potencial elétrico, usualmente da ordem de 3 a 4 kV, entre a solução que passa por um capilar e a entrada do equipamento. O campo elétrico provoca a acumulação de carga na superfície do líquido na ponta do capilar, o que leva à formação de um cone de Taylor, conforme se observa na Figura 3.5. Eventualmente, o cone se rompe para liberar pequenas gotículas altamente carregadas que se dispersam pelo fluxo de gás. A formação dos íons ocorre, então, a partir da dessolvatação das gotículas ao passarem por uma cortina de gás inerte aquecido e de subseqüentes colisões e explosões Coulômbicas.<sup>50</sup>



**Figura 3.5.** Esquema do funcionamento da ionização por eletrospray (ESI).<sup>50</sup>

Em resumo, as três principais etapas desse processo de ionização são estas: (1) produção de gotículas carregadas na ponta do capilar; (2) diminuição das gotículas devido à evaporação do solvente e a repetidas desintegrações induzidas por acúmulo de carga; e (3) mecanismo pelo qual os íons em fase gasosa são produzidos a partir dessas gotículas submicroscópicas.<sup>52</sup> Há duas principais propostas de mecanismo na literatura para explicar essa última etapa. A primeira, proposta por Dole e mais adequada para macromoléculas, se chama “modelo da carga residual”.<sup>55</sup> Já a segunda, mais provável para a formação de íons de menor massa, é denominada “modelo da evaporação iônica” e foi apresentada nos trabalhos de Iribarne e Thomson.<sup>56</sup>

Pelo fato de que há pouca ou nenhuma fragmentação na transferência das espécies da solução para a fase gasosa, a ESI é considerada um método brando de ionização, ao contrário de outros como a clássica EI. Essa característica é importante, pois propicia uma avaliação mais fiel das espécies químicas presentes em solução. Não há garantia, evidentemente, que as

espécies serão extraídas para o analisador de massa totalmente inalteradas, pois a energia fornecida no processo pode ser suficiente para ativar algum caminho reacional ou alguma modificação conformacional; mas, ainda assim, é uma das melhores metodologias para analisar os analitos intactos. Ademais, a depender do ajuste de parâmetros da fonte – como temperatura e fluxo de gás –, é possível também observar na fase gasosa *clusters* formados pelas espécies de interesse entre si ou, outrossim, com moléculas de solvente.

Apesar de inúmeras e inequívocas vantagens da ionização por eletrospray, vale destacar algumas de suas limitações e desvantagens. A primeira delas se refere ao consumo da amostra. Em vista do *modus operandi* da espectrometria de massas, já se é conhecido que a amostra analisada é perdida ao final do processo. Mesmo que se trabalhe com baixas concentrações de analito, na faixa de  $10^{-7}$  a  $10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>, e que um volume de 500  $\mu$ L de uma seringa comum para eletrospray possa ser usado para registrar tipicamente milhares de espectros, ainda é desejável minimizar ao máximo o consumo de amostra.<sup>49</sup> Há casos, inclusive, em que se deseja analisar substâncias presentes em quantidades traço na amostra, como intermediários reativos ou biomoléculas, e até mesmo as baixas concentrações necessárias para o ESI podem ser difíceis de se conseguir.

Outra limitação a se considerar assiste nos solventes adequados para geração eficiente do eletrospray. O fato de a água ter uma tensão superficial alta faz com que seu uso puro na fonte ESI seja menos indicado, por aumentar a chance de ocorrerem descargas elétricas a partir da ponta do capilar do spray. Essas descargas tendem a reduzir a performance e a sensibilidade da análise por espectrometria de massas, com os íons do analito aparecendo com intensidades bem menores no espectro e com o surgimento de grande quantidade de íons gerados nas descargas.<sup>57</sup> Por essa razão, geralmente quando se é necessário utilizar água como solvente, faz-se uma mistura com algum outro mais compatível com o eletrospray, como o metanol. Não obstante, há amostras que precisam estar em água; por exemplo, proteínas, que desnaturariam em outros solventes.

Tais desvantagens pontuais relacionadas à ionização por eletrospray levaram, naturalmente, a diversas tentativas de aperfeiçoamento e de desenvolvimento de técnicas análogas mais adequadas para resolver percalços específicos. É o caso da fonte de nanoeletrospray (nano-ESI), que pode ser considerada, de maneira simplista, uma miniaturização do eletrospray tradicional e que foi desenvolvida e descrita por Wilm e Mann.<sup>58,59</sup>

Na fonte nano-ESI, capilares de vidro com pontas de diâmetros extremamente pequenos (1–10  $\mu\text{m}$ ) são utilizados para produzir o eletrospray sem a necessidade de bomba de seringa ou qualquer outro sistema gerador de fluxo da amostra. Os capilares são preenchidos com alguns poucos microlitros da solução da amostra, posicionados a milímetros da entrada do contra eletrodo, e o contato elétrico com a fonte de alta tensão é realizado por meio de revestimento com material condutor ou da inserção de um fio metálico ao longo do capilar. A própria aplicação de potenciais entre 0,5 e 1 kV é responsável por gerar as gotículas do spray, a um fluxo de 20 a 50 nL/min, que é a característica que dá o prefixo “nano” à técnica.<sup>60</sup>

A primeira e mais notória vantagem dessa fonte é a quantidade ínfima de amostra necessária para realizar uma análise. Cada capilar pode conter apenas de 1 a 5  $\mu\text{L}$  e, considerando o limite inferior desse volume e uma concentração da ordem de  $10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>, esse 1 pmol de amostra pode ser suficiente para até meia hora de análise, tendo em vista o pequeno fluxo necessário. Já para a aquisição de um único espectro de massas utilizando uma fonte nano-ESI, é possível fazê-lo a partir de quantidades tão pequenas que chegam à ordem dos attomols.<sup>60</sup> Outra vantagem advém do uso único dos capilares do nanospray, o que evita contaminação e efeitos de memória observados no eletrospray pela utilização repetida e para amostras diferentes de uma mesma seringa.

Cabe salientar também as diferenças resultantes das sutilezas do mecanismo de ionização por nanoeletrospray: as gotículas geradas nessa técnica são uma ordem de grandeza menores do que as gotículas do ESI convencional – 150 nm de diâmetro em vez de 1,5  $\mu\text{m}$ . Essa característica faz com que se requeira uma etapa a menos de evaporação do solvente seguida de fissão para gerar os íons em fase gasosa. Essas etapas têm a desvantagem de promover a concentração excessiva de contaminantes iônicos que podem prejudicar a análise. Consequentemente, com a redução do número de passos de evaporação e fissão até a liberação dos íons, consegue-se obter espectros de massas muito satisfatórios mesmo com soluções de analito contendo concentrações de até  $10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup> de sais. Ademais, obtém-se uma sensibilidade maior para diversos tipos de amostras, principalmente as não-tensoativas, uma vez que se evita a perda de grande quantidade de analito no resíduo das gotículas iniciais, o que aconteceria no eletrospray convencional.

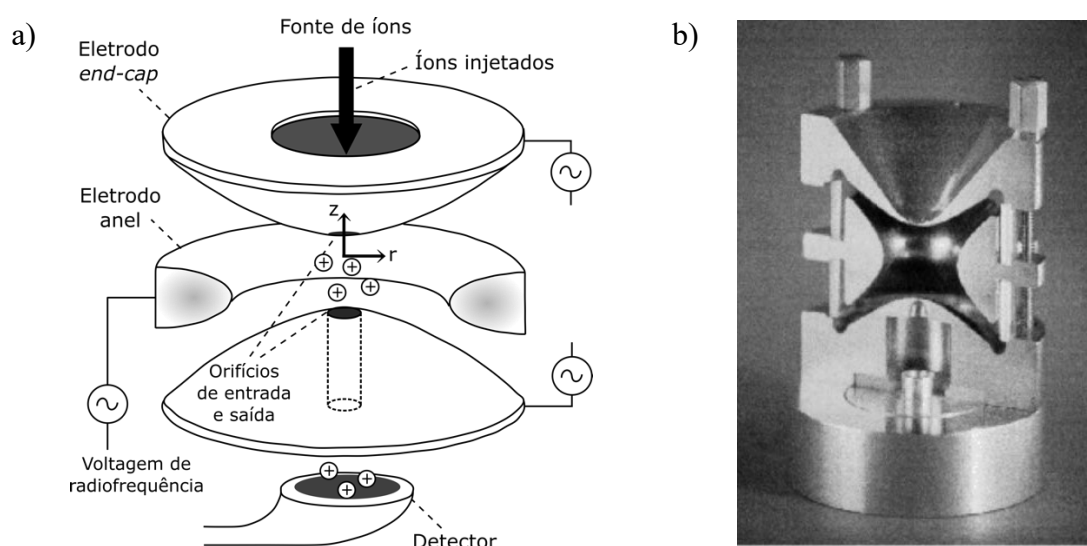
Por fim, há igualmente o ponto positivo de ser possível, por meio dessa metodologia, produzir sprays estáveis com solventes de alta tensão superficial, como água e soluções aquosas salinas, o que viabiliza a análise de diversas amostras importantes.

### 3.2.3 Analisadores de massa

Após a produção ou a extração de íons de uma amostra e sua transferência para a região de alto vácuo do espectrômetro, vem a etapa mais importante e precípua da espectrometria de massas: a separação espacial ou temporal dos íons em função de sua razão  $m/z$  para subsequente detecção e construção do espectro de massas. Para tal mister, há uma variedade de analisadores de massa disponíveis, que fazem uso de tecnologias diferentes.

Há analisadores de massa que separam as espécies carregadas a partir do tempo que demoram para percorrer um determinado trajeto no equipamento – tempo de voo –, a partir da sua deflexão diferencial pela influência de um campo magnético – setor magnético –, a partir da sua seleção por meio de trajetórias estáveis ao passarem por campos elétricos oscilantes – quadrupolos lineares –, a partir da ressonância ciclotrônica ou da oscilação axial dos íons em diferentes frequências – FT-ICR e *Orbitrap* respectivamente – e a partir de seu aprisionamento em armadilhas de íons e posterior ejeção seletiva – *ion trap*.

Em se tratando da última técnica apresentada, as armadilhas de íons, pode-se citar a tecnologia do *ion trap* com campo quadrupolo tridimensional. Também conhecido como *ion trap* 3D ou QIT (*quadrupole ion trap*), foi originalmente desenvolvido por Wolfgang Paul em 1953, apesar de só ter atingido considerável potencial analítico cerca de três décadas depois.<sup>61,62</sup> Essa armadilha de íons é formada por dois eletrodos hiperbólicos como tampas (*end caps*) e um eletrodo em forma de anel que substitui duas hastes de um quadrupolo linear. Um esquema e uma fotografia desse aparelho podem ser vistos na Figura 3.6.



**Figura 3.6.** *Ion trap* 3D; (a) diagrama esquemático representando os eletrodos e os orifícios de entrada dos íons provenientes da fonte e de saída dos íons em direção ao detector;<sup>63</sup> (b) fotografia de um *ion trap* cortado ao meio ao longo do eixo de simetria cilíndrica.<sup>64</sup>

O princípio desse analisador de massa consiste em criar trajetórias estáveis no interior do *trap* para os íons com uma determinada razão  $m/z$  ou em um intervalo de  $m/z$  por meio da aplicação de uma combinação de potenciais elétricos de corrente contínua e de radiofrequência entre os eletrodos.<sup>49</sup> As espécies iônicas são mantidas aprisionadas em oscilações tridimensionais estáveis da mesma forma que uma bola pode ficar sem cair de uma sela de cavalo contanto que esta seja rotacionada a uma certa velocidade angular.<sup>62</sup> De modo a atenuar o movimento dos íons, diminuindo a amplitude das oscilações e focalizando-os para o centro do *trap*, faz-se uso de um gás inerte como Hélio ou Argônio a uma pressão por volta de 0,1 Pa. Esse gás ajuda a mantê-los longe da superfície dos eletrodos, além de ser essencial para a utilização do equipamento para espectrometria de massas sequencial (MS<sup>n</sup>).

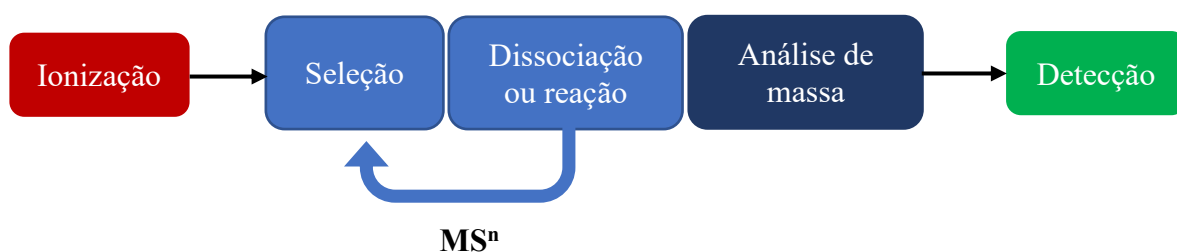
O ajuste dos potenciais elétricos é capaz de remover espécies iônicas não desejadas com base na razão  $m/z$  ao desestabilizar suas trajetórias e fazê-las colidir com as paredes ou ejetá-las axialmente do *trap*. É justamente essa ejeção axial, em direção ao detector, que possibilita a construção dos espectros de massas. Pode-se empregar uma voltagem de radiofrequência suplementar, com o intuito de entrar em ressonância e amplificar a oscilação no eixo z dos íons de uma  $m/z$  específica. Isso provoca a ejeção ressonante desses íons e sua detecção. Se se realiza uma varredura dessa radiofrequência suplementar, de forma a ejetar sequencialmente íons de  $m/z$  cada vez maiores, poder-se-á registrar o sinal do detector em função da radiofrequência aplicada e, por conseguinte, da razão massa/carga correspondente, obtendo-se, pois, o espectro.<sup>49</sup>

A tecnologia do *ion trap* 3D pode não fornecer, no geral, uma resolução tão alta quanto um espectrômetro por tempo de voo ou um FT-ICR; não obstante, trata-se de um instrumento excelente tanto para o simples aprisionamento de íons como para a performance de espectrometria de massas, com resolução de massa variável, alta sensibilidade e considerável rapidez de análise. A notória adaptabilidade da técnica é, também, uma de suas grandes vantagens. É possível utilizar o instrumento para estudar reações dos íons com moléculas neutras introduzidas na cela ou para analisar fragmentações por colisões. Pode-se, ademais, associar temporalmente diversas etapas experimentais dentro do *trap*, como, por exemplo, isolamento de uma espécie, reação com neutro, isolamento do produto, fragmentação subsequente por colisões, e assim por diante. Essa sequência pode ser repetida facilmente dezenas de vezes em poucos segundos para fornecer resultados espectrais satisfatórios. Modificações estruturais também são viáveis; é o caso da realização de perfurações no eletrodo

do anel para a irradiação da nuvem de íons por *lasers* no ultravioleta ou no infravermelho, o que amplia sobremaneira as possibilidades analíticas do equipamento.<sup>65</sup>

### 3.2.4 Espectrometria de massas sequencial e elucidação estrutural por fragmentação

Uma capacidade extremamente relevante nos analisadores de massa atuais é a realização de espectrometria de massas sequencial (MS/MS ou MS<sup>n</sup>), também conhecida como espectrometria de massas em *tandem*. Essa técnica consiste no acoplamento espacial ou temporal de duas ou mais etapas de análise de massa consecutivas, o que permite a seleção de íons de acordo com sua razão  $m/z$ , sua ativação – para reação ou fragmentação – e a análise dos produtos iônicos igualmente pela  $m/z$ .<sup>49</sup> A importância de tal acoplamento, por meio de diversos métodos de ativação dos íons, assiste na busca por mais informações estruturais a respeito das espécies, algo que por décadas era facilmente obtido em espectros de massas de ionização por elétrons, que apresentavam uma miríade de sinais de fragmentos.



**Figura 3.7.** Sequência de etapas pelas quais as espécies iônicas passam na espectrometria de massas sequencial no tempo (MS<sup>n</sup>).

O desenvolvimento de métodos de ionização branda foi deveras vantajoso ao permitir a transferência de íons praticamente intactos de analitos para a fase gasosa. Contudo, perdeu-se muito em informações a respeito da estrutura das espécies analisadas. Nesse cenário, a espectrometria de massas sequencial surge como uma alternativa para não dispensar os avanços dos novos métodos de ionização, ao mesmo tempo em que se continua a obter dados concernentes à fragmentação e à estrutura dos íons.<sup>49</sup> Não apenas isso, a MS<sup>n</sup> abre espaço para variados estudos termodinâmicos, cinéticos e espectroscópicos envolvendo os íons isolados.

Alguns equipamentos são capazes de fazer espectrometria de massas sequencial no espaço (“*tandem* no espaço”), ao se acoplar dois ou mais analisadores de massa um após o outro. É o caso, por exemplo, do espectrômetro triplo quadrupolo, em que se faz a



seleção/isolamento dos íons no primeiro quadrupolo, a ativação no segundo e a análise dos produtos iônicos no terceiro. Há instrumentos, alternativamente, que substituem o terceiro quadrupolo por um analisador com maior resolução, como o de tempo de voo.<sup>66</sup> Já outros equipamentos, cada vez mais comuns, são “*tandem* no tempo”, como é o caso do *ion trap* descrito na subseção anterior. A vantagem desse segundo tipo de montagem instrumental reside na capacidade de repetir as etapas de isolamento e de fragmentação ou reação diversas vezes, uma vez que todas as etapas ocorrem no mesmo analisador de massa, em sequência. Assim, é viável isolar uma espécie de interesse (precursor), fragmentá-la, analisar os produtos iônicos, selecionar algum dos produtos para isolar e realizar fragmentações ou reações subsequentes.

No tocante à ativação dos íons para induzir a fragmentação ou alguma reação, há variados métodos desenvolvidos para fazê-la. O princípio-base resume-se em aumentar a energia interna dos íons de modo que atinjam o limiar de dissociação ou a energia de ativação da reação. A forma mais comum de ativação na espectrometria de massas é a dissociação induzida por colisão (CID – do inglês *collision-induced dissociation*), que permite a fragmentação de íons bastante estáveis no estado gasoso, sendo, pois, especialmente útil para o estudo de espécies de baixa energia interna como as geradas ou extraídas por métodos de ionização branda como o eletrospray.<sup>49</sup>

A CID é geralmente realizada ao se passar um feixe de íons através de uma célula de colisão contendo um gás inerte como He, N<sub>2</sub> ou Ar, a uma pressão consideravelmente acima da do alto vácuo estabelecido ao redor. Já em instrumentos do tipo *ion trap*, utilizam-se as radiofrequências aplicadas aos eletrodos para estimular oscilações de maior amplitude da nuvem de íons e fazê-los colidir com as moléculas neutras de gás já presentes na armadilha sem, todavia, excitá-los o suficiente para que sejam expelidos do *trap*.

A alta energia translacional dos íons precursores (AB<sup>+</sup>), em função das múltiplas colisões com as moléculas ou os átomos neutros do gás (N), converte-se em energia interna vibracional e/ou eletrônica e forma a espécie ativada (AB<sup>+\*</sup>). Em seguida, essa energia se distribui randomicamente pelos modos normais de vibração do íon, o que o leva a dissociar por alguma das vias de fragmentação acessíveis na hipersuperfície de energia potencial. Nesse processo, independentemente da via pela qual cada íon seguiu, uma espécie neutra é perdida (B) e um produto iônico é formado (A<sup>+</sup>), este último passível de detecção.<sup>49,67,68</sup> O processo da CID pode, isso posto, ser resumido e generalizado nas duas seguintes etapas.



Apesar da diferente natureza do processo, os espectros CID de íons moleculares estáveis exibem equivalências marcantes aos espectros obtidos por ionização por elétrons a 70 eV dos mesmos compostos.<sup>67</sup>

Entre as informações obtidas em uma análise de espectrometria de massas sequencial, pode-se elencar as razões  $m/z$  dos fragmentos produzidos por CID – ou outro método de ativação –, as massas das espécies neutras perdidas no processo de fragmentação – a partir do deslocamento no espectro em relação ao precursor –, assim como as intensidades relativas dos fragmentos. A avaliação combinada desses dados permite não apenas investigar a estrutura das espécies iônicas, corroborando ou descartando propostas para a conectividade dos átomos e para a geometria, como também inferir mecanismos de fragmentação.<sup>69</sup> Isso porque as maneiras como um íon fragmenta dependem intrinsecamente da sua configuração molecular e, inclusive, da sua conformação em menor grau.

No que se refere à identificação de espécies isoméricas, por exemplo, é raro que dois isômeros gerem exatamente os mesmos fragmentos por MS/MS e com as mesmas intensidades, a menos que sejam muito similares ou apenas confômeros. Sendo assim, esse tipo de técnica é capaz de diferenciá-los e até quantificá-los separadamente. Em uma perspectiva mais analítica, para a detecção de compostos presentes em baixas concentrações, especialmente em matrizes complexas, a espectrometria de massas em *tandem* possibilita um aumento na detectabilidade, além de minimizar a interferência espectral de outros compostos da matriz. Assim, aumenta-se significativamente o grau de confiança na identificação de substâncias em relação à espectrometria de massas convencional ou a técnicas cromatográficas.<sup>66</sup>

### 3.3. Espectroscopia IRMPD

Embora seja uma excelente técnica analítica em questão de universalidade, sensibilidade e rapidez, a espectrometria de massas isoladamente, geralmente, não é capaz de fornecer muita informação além da razão  $m/z$ . É bem verdade que métodos de fragmentação como a CID podem dar informações estruturais, mas se se deseja determinar a conectividade e a conformação de uma espécie iônica, eles podem não ser suficientes. Nesse contexto, apesar

de a espectroscopia no infravermelho produzir esse tipo de dado, a baixa densidade de íons da cela do espectrômetro impede o uso de qualquer espectroscopia de absorção, uma vez que é insuficiente para resultar em um valor de absorbância adequado para ser detectado.

A espectroscopia de dissociação por múltiplos fótons no infravermelho (IRMPD), por outro lado, consiste em uma espectroscopia de ação, que mede o efeito ocasionado pela absorção de radiação pelos íons, e não a mudança de intensidade em si. Por isso, o acoplamento dessa técnica à espectrometria de massas tem se mostrado cada vez mais promissor e poderoso no estudo estrutural de espécies de interesse, como, por exemplo, metabólitos e intermediários reativos.

Nesta seção, portanto, serão discutidos os princípios básicos tanto do método de fragmentação subjacente como da técnica espectroscópica em si, assim como aspectos mais técnicos – fontes de radiação e correlação entre absorbância e eficiência de fotofragmentação.

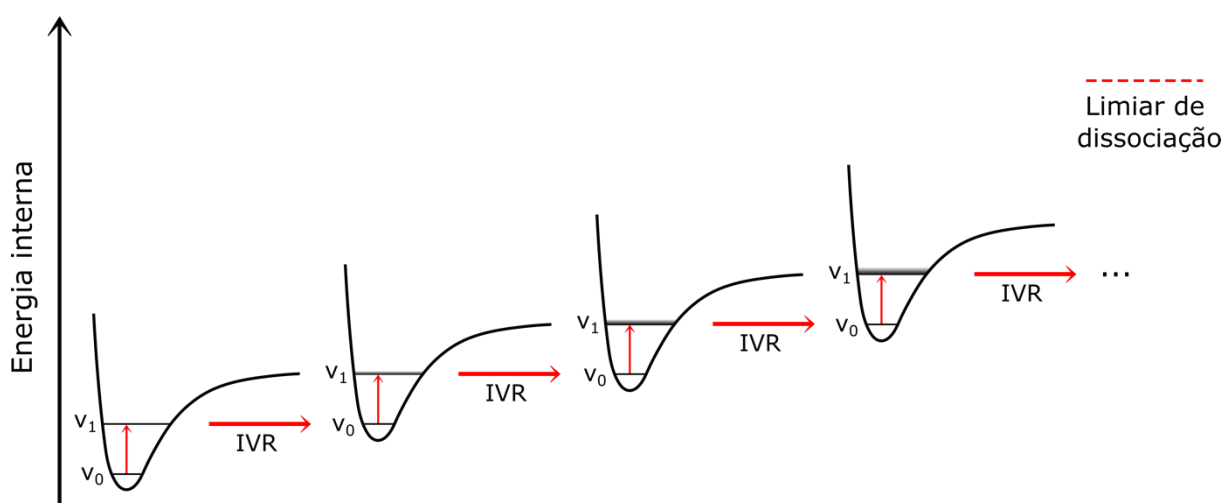
### 3.3.1 Princípios da fragmentação IRMPD

A dissociação por múltiplos fótons no infravermelho (IRMPD – do inglês *InfraRed Multiple Photon Dissociation*) constitui, antes de ser uma técnica espectroscópica, um método de ativação e fragmentação de íons na espectrometria de massas em *tandem*, como é o caso da CID. Diferentemente, contudo, da dissociação induzida por colisão, a IRMPD consiste na fragmentação de íons a partir da absorção sequencial de múltiplos fótons na região do infravermelho. O processo inicia-se com a irradiação das espécies iônicas analisadas com uma fonte de radiação infravermelha, ajustada para uma frequência que esteja em ressonância com algum modo normal de vibração do íon.

A princípio, pode-se imaginar que o processo ocorra por meio de excitações vibracionais consecutivas de um mesmo modo normal até a eventual fragmentação nessa mesma coordenada estrutural. Conquanto seja simples e direta, essa explicação é incompatível com o fenômeno observado e com a anarmonicidade de sistemas moleculares. Primeiramente, o que se detecta experimentalmente são os mesmos produtos de fragmentação qualquer que seja a frequência ressonante incidida e, por conseguinte, o modo normal excitado. Em segundo lugar, os desvios naturais conhecidos em relação a um oscilador harmônico fazem com que a transição  $\nu_1 \rightarrow \nu_2$  e todas as subsequentes envolvam *quanta* de energia cada vez menores em relação à primeira excitação vibracional  $\nu_0 \rightarrow \nu_1$ . Logo, se a radiação for ressonante com a

transição a partir do estado fundamental, não o será com as demais transições, o que reduz significativamente a seção de choque para absorções consecutivas.<sup>15,70</sup>

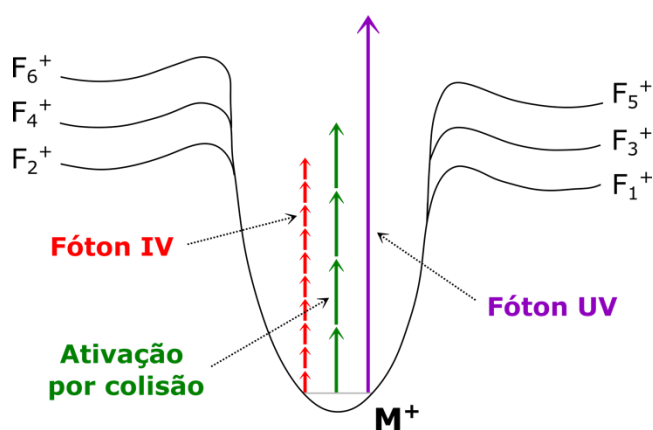
O mecanismo aceito, assim, para a IRMPD envolve um fenômeno denominado redistribuição vibracional intramolecular (IVR – do inglês *intramolecular vibrational energy redistribution*). Após a absorção do primeiro fóton pelo íon, se a energia não for perdida por emissão ou por colisões com moléculas de gás, ela se dissipará rapidamente pelo banho de graus de liberdade vibracionais do íon por meio da IVR, graças ao acoplamento entre os modos normais. Com o retorno do modo normal excitado ( $v_1$ ) ao estado fundamental ( $v_0$ ), a espécie estará novamente sujeita a outras absorções de fótons, seguidas de respectivas redistribuições intramoleculares.<sup>71,72</sup> Esse processo tem como resultado o aumento paulatino da energia interna, ao mesmo tempo em que mantém o modo vibracional ressonante relaxado, o que termina por levar a espécie a ultrapassar algum dos limiares de dissociação e a se fragmentar.<sup>73</sup>



**Figura 3.8.** Representação esquemática do mecanismo da dissociação multifotônica no infravermelho (IRMPD), ilustrando a sequência de absorções de fótons e redistribuições vibracionais intramoleculares que leva a energia interna do íon a aumentar até o limiar de dissociação.<sup>15</sup>

Considerando-se o mecanismo apresentado, compreende-se o porquê de os fragmentos gerados independem da frequência da radiação incidente – e, portanto, do modo vibracional estimulado. A energia não se concentra naquele modo específico, mas, sim, se dispersa por todos. Por conseguinte, o sistema simplesmente prosseguirá pela via de dissociação cuja barreira energética for mais baixa, tendo em vista o aumento gradual da energia interna. Assim, tipicamente é a ligação mais lábil que é quebrada para gerar os fragmentos, e os caminhos de fragmentação que requerem maior energia ficam inacessíveis.<sup>70</sup>

Tanto a ativação dos íons por colisões (CID) como a por fótons no infravermelho (IRMPD) são processos de várias etapas. Não é o caso da fotodissociação no ultravioleta (UVPD – do inglês *Ultraviolet Photodissociation*), conforme se vê na Figura 3.9. Como a energia dos fótons no ultravioleta é muito maior, da ordem de transições eletrônicas, o limiar de dissociação do íon precursor é facilmente atingido com a absorção de apenas um fóton UV. A depender da energia do fóton, então, a UVPD pode acessar múltiplas vias de fragmentação de diferentes barreiras energéticas, e não somente a mais baixa.<sup>73</sup>



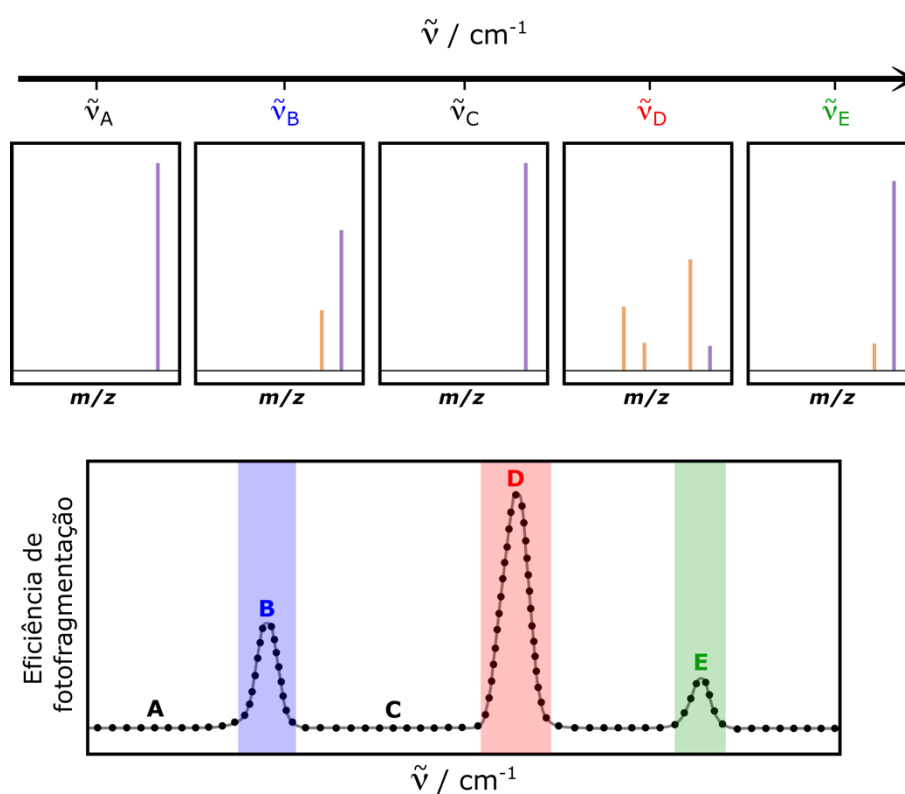
**Figura 3.9.** Esquema comparativo do incremento de energia na IRMPD, na CID e na UVPD.  $M^+$  representa o íon precursor, e  $F_n^+$ , os vários fragmentos com diferentes barreiras energéticas de dissociação para formação.<sup>74</sup>

### 3.3.2 Espectroscopia vibracional de íons

A aplicação da IRMPD estende-se para muito além da fragmentação de íons isolados na cela do espectrômetro de massas. Se se tem um *laser* monocromático continuamente sintonizável na faixa do espectro infravermelho, é possível utilizar a fragmentação ou não da espécie nos vários comprimentos de onda para inferir a absorbância da radiação e, assim, construir um espectro vibracional do íon. É o que se denomina espectroscopia IRMPD, e trata-se de uma espectroscopia de ação, uma vez que não mede diretamente a absorção da radiação, mas sim um efeito provocado por ela.<sup>70</sup> Nesse caso, o efeito é a dissociação, uma vez que os sinais dos íons-produto podem ser detectados por MS/MS.

Para efetuar essa análise, uma determinada espécie iônica de interesse é isolada no espectrômetro e, em seguida, é irradiada pelo *laser* monocromático. Faz-se, então, uma varredura de comprimentos de onda da radiação no IV, enquanto se registra a eficiência de fotofragmentação ao longo da varredura. Nos momentos em que a frequência do *laser* coincidir

com algum dos modos normais de vibração molecular, a seção de choque de absorção aumentará e, outrossim, a intensidade de sinal de fragmentos produzidos. Já quando a frequência não for ressonante com alguma vibração do íon, a absorção será mínima ou nula e não se observará sinal de fragmentos no espectro de massas.<sup>73</sup> Na parte superior da Figura 3.10, esse fenômeno é ilustrado em cinco espectros de massas registrados para diferentes números de onda (em  $\text{cm}^{-1}$ ) no infravermelho. No primeiro ( $\tilde{\nu}_A$ ) e no terceiro ( $\tilde{\nu}_C$ ), não há dissociação, e apenas o pico do precursor hipotético (lilás) é observado. Nos outros três, há absorção da radiação e consequente fragmentação, sendo que o quarto ( $\tilde{\nu}_D$ ) é o que exibe íons-produto em maior quantidade (picos laranja), o que indica para uma maior absortividade nessa condição.



**Figura 3.10.** Metodologia de obtenção de espectros vibracionais de íons em fase gasosa (IRMPD).<sup>70</sup>

Ao se registrar a eficiência de fotofragmentação em função do número de onda da radiação incidente, obtém-se o espectro vibracional do íon em fase gasosa, conforme é ilustrado na parte inferior da Figura 3.10, em que as bandas de absorção são destacadas em azul, vermelho e verde, cada uma correspondendo a um dos três espectros de massas acima em que são produzidos fragmentos.

A respeito do espectro IRMPD, cabe destacar duas características importantes. A primeira se refere às intensidades das bandas. Não é esperado que as intensidades relativas,

referentes às eficiências de fotofragmentação, apresentem comportamento linear com a seção de choque de absorção da transição vibracional, tampouco com a potência do *laser*.<sup>15</sup> Isso ocorre por conta do mecanismo de múltiplas etapas, precípua desse método de ativação. Ademais, transições vibracionais pouco intensas ( $< \sim 40 \text{ km.mol}^{-1}$ ) não costumam ser detectadas, haja vista a janela cinética do processo – com a absorção menos provável de fótons, a taxa de incremento de energia interna não é suficiente para atingir o limiar de dissociação antes de processos dissipativos esfriarem os íons.<sup>15</sup>

A segunda característica relevante versa sobre a largura das bandas. Devido à distribuição térmica da população de íons analisada, o analito está presente no espectrômetro como uma mistura de diversas conformações, cada uma com frequências vibracionais ligeiramente diferentes entre si. Um espectro IRMPD será, pois, uma superposição das absorções dessas variedades do analito, o que resulta no alargamento das bandas. Por essa razão e também por conta do aquecimento dos íons durante a absorção por múltiplos fótons, as bandas do espectro costumam ter larguras a meia-altura maiores que  $15 \text{ cm}^{-1}$ .<sup>70</sup>

Abordagens de aprisionamento de íons, no que concerne à eficiência IRMPD, apresentam vantagens dignas de nota em comparação a metodologias de feixes de íons. Em um *ion trap* 3D, por exemplo, a mesma população iônica pode ser irradiada pelo *laser* de maneira mais prolongada, o que aumenta a eficiência de fotofragmentação e, conseqüentemente, a sensibilidade da técnica.<sup>15</sup> Além disso, uma nuvem de íons mais concentrada espacialmente permite maior sobreposição do feixe do *laser* à nuvem e, assim, reduz a quantidade de pulsos necessários para promover a dissociação.<sup>17</sup>

Localização da carga, sítio de protonação, presença ou ausência de grupos funcionais, simetria molecular, estrutura secundária polimérica, interações por ligação de Hidrogênio. Essas são algumas em meio a uma miríade de informações estruturais acerca de uma espécie química que os espectros vibracionais têm potencial para fornecer, muitas das quais são difíceis de se averiguar com outras técnicas analíticas.<sup>15</sup> Nesse quadro, a relevância da espectroscopia IRMPD é enorme, posto que permite direcionar todo esse poder analítico para um sistema cujo estudo vibracional era outrora inviável: uma nuvem de íons de baixíssima densidade no alto vácuo de um espectrômetro de massas. Essa técnica é, pois, capaz de auxiliar no estudo estrutural de espécies químicas presentes apenas em quantidades-traço em amostras, como é o caso de contaminantes ou de intermediários reativos. Combinada, adicionalmente, a cálculos computacionais de estrutura eletrônica e de frequências vibracionais teóricas de geometrias putativas, tem-se uma metodologia ímpar e deveras robusta.

### 3.3.3 Cálculo da eficiência de fotofragmentação

Supracitada diversas vezes, a eficiência de fotofragmentação é usada como intensidade (eixo das ordenadas) nos espectros IRMPD, para simular um espectro de absorção no infravermelho. Embora não haja, *a priori*, uma dependência linear entre a fotofragmentação e a absorbância, essa grandeza é largamente utilizada por possibilitar uma comparação mais direta e fidedigna com as intensidades de espectros de absorção teóricos calculados, além de permitir correções descomplicadas em função da potência do *laser* e dos tempos de irradiação dos íons.<sup>75</sup>

Para garantir essas vantagens, a eficiência de fotofragmentação (EFF) a um determinado comprimento de onda é definida a partir da constante cinética da dissociação induzida por *laser* ( $k_\lambda$ ). Ao se fazer algumas aproximações a respeito do complexo processo da IRMPD e ao se considerar que o rendimento do processo é limitado pela população inicial do íon precursor que é irradiada e pela potência do *laser*, pode-se atribuir à fotofragmentação uma cinética de pseudo-primeira ordem em relação à concentração e, por extensão, à intensidade do precursor.<sup>70,75</sup> A lei de velocidade integrada do processo apresentará, logo, um perfil logarítmico, conforme se observa abaixo, em que se apresenta, simplificada, a fragmentação de um íon precursor  $P^{+/-}$  ao ser irradiado a um comprimento de onda  $\lambda$ , para formar um fragmento genérico  $F^{+/-}$  e uma espécie neutra N. Nas equações,  $P_\lambda$  e  $F_\lambda$  representam, respectivamente, as intensidades do íon precursor e do íon fragmento no espectro de massas quando da irradiação da nuvem de íons por um certo tempo  $t$ .



$$\frac{dP_\lambda}{dt} = -k_\lambda \cdot P_\lambda \Rightarrow \int_{P_0}^{P_\lambda} \frac{1}{P_\lambda} dP_\lambda = - \int_0^t k_\lambda dt \Rightarrow k_\lambda \cdot t = -(\ln P_\lambda - \ln P_0) \Rightarrow k_\lambda \cdot t = -\ln \frac{P_\lambda}{P_0}$$

O tempo de irradiação depende de cada experimento realizado e, para não ser necessário incluir esse valor no cálculo, pode-se integrá-lo na definição da eficiência de fotofragmentação:  $EFF_\lambda \equiv k_\lambda \cdot t$ . Levando em conta, ainda, que cada íon precursor dissociado forma apenas um íon fragmento, é possível escrever a intensidade inicial do precursor ( $P_0$ ) em termos das intensidades finais – no tempo  $t$  de detecção – tanto do precursor ( $P_\lambda$ ) como do fragmento ( $F_\lambda$ ). Assim,  $P_0 = P_\lambda + F_\lambda$ . É bem verdade, no entanto, que não é incomum observar mais de um íon



fragmento diferente, devido ou à existência de mais de uma via de dissociação acessível na superfície de energia ou a fragmentações em sequência. Em vista disso, deve-se considerar o somatório das intensidades de todos esses fragmentos originados dos íons do precursor:

$$P_0 = P_\lambda + \sum F_\lambda.$$

Chega-se, enfim, à fórmula para calcular as intensidades utilizadas no espectro IRMPD, em função do comprimento ou do número de onda da radiação.<sup>70,75,76</sup>

$$EFF_\lambda = -\ln\left(\frac{P_\lambda}{P_\lambda + \sum F_\lambda}\right)$$

(Equação 3.4)

### 3.3.4 Fontes de radiação

Métodos de fotodissociação de íons requerem dois aspectos vitais das fontes de radiação empregadas nos experimentos. Em primeiro lugar, elas precisam prover luz de alta intensidade para as espécies irradiadas, especialmente em processos envolvendo absorção de múltiplos fótons como a IRMPD. Por este motivo, é necessário a utilização de *lasers*. Adicionalmente, para que se possa registrar espectros de ação dos íons, a fonte de radiação também precisa ser continuamente sintonizável em toda a faixa espectral que se deseja investigar.<sup>77</sup> Esse segundo requisito restringe sobremaneira as opções disponíveis.

Para a espectroscopia IRMPD, portanto, é fundamental o emprego de um *laser* sintonizável ao longo da região do infravermelho, especialmente na faixa de frequências relativas às vibrações moleculares. A opção mais simples e factível nesse cenário são os osciladores/amplificadores óticos paramétricos (OPO/OPA), um sistema de bancada baseado em ótica não-linear.<sup>78-80</sup>

Quando uma onda eletromagnética se propaga por um meio, a oscilação dos dipolos presentes ou criados no sistema gera efeitos de polarização, cuja dependência é, em primeira instância, linear em relação ao campo elétrico incidente. Entretanto, campos mais fortes como os de *lasers* intensificam efeitos de polarização não-lineares, de segunda ordem principalmente.<sup>77</sup> Para acessar esses efeitos de maneira mais proeminente, um exemplo de material com propriedades óticas adequadas são os cristais de niobato de lítio (LiNbO<sub>3</sub>), que são não-centrossimétricos e têm alta transmissividade e alto limite de dano ótico.<sup>15</sup>

Comumente, o sistema OPO/OPA produz radiação de alta intensidade no infravermelho a partir da irradiação de cristais de LiNbO<sub>3</sub> com um *laser* de granada de ítrio alumínio dopada

com neodímio (Nd:YAG). Esse *laser* de estado sólido emite no comprimento de onda fundamental de 1064nm. De modo simplificado, esses fótons primários ( $\nu_p$ ), nos cristais, são aniquilados e convertidos em dois fótons denominados “sinal” ( $\nu_s$ ) e “ocioso” ( $\nu_o$ ). Nesse processo, a energia é conservada:  $h\nu_p = h\nu_s + h\nu_o$ . Mantendo-se a restrição dessa relação matemática, é possível sintonizar as duas frequências de saída de algumas formas: modificação da frequência de entrada ou da temperatura dos cristais ou, principalmente, ajuste dos ângulos de incidência nos cristais.

No sistema supracitado, por meio de alterações na orientação espacial dos cristais, pode-se produzir fótons “sinal” entre 1,38 e 2  $\mu\text{m}$  de comprimento de onda e fótons “ociosos” entre 2,28 e 4,67  $\mu\text{m}$ . Em termos de número de onda, esses últimos valores equivalem à faixa de 2140 a 4380  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>15</sup> OPO/OPAs bombeados por *laser* Nd:YAG são, dessa forma, eficientes em viabilizar a obtenção de espectros IRMPD justamente na região espectral correspondente à vibração de estiramento da maioria dos principais grupos funcionais das moléculas. Essa montagem experimental, contudo, não consegue cobrir toda a região dos grupos funcionais – carbonilas, nomeadamente, estão fora do intervalo de detecção – e tampouco alcança a região de impressão digital (650 – 1300  $\text{cm}^{-1}$ ).

Uma alternativa para expandir as frequências alcançáveis pelo OPO/OPA para a faixa de 1400 a 2100  $\text{cm}^{-1}$  é acrescentar, na saída do conjunto de cristais, um outro cristal, de AgGaSe<sub>2</sub>.<sup>81</sup> Há, entretanto, a desvantagem da perda de potência acarretada pelo processo de conversão, obtendo-se uma ordem de magnitude a menos de energia por pulso de *laser*. Apesar de impedir a realização de espectroscopia IRMPD, essa opção ainda é útil, por exemplo, para estudos de pré-dissociação de complexos fracamente ligados (*van-der-Waals tagging*) em condições criogênicas, quando é necessária a absorção de apenas um fóton.

Ampliando-se o campo de possibilidades para além dos osciladores óticos paramétricos, encontra-se o *laser* de elétrons livres (FEL – do inglês *free-electron laser*), extremamente conveniente para a espectroscopia vibracional de íons, haja vista a larga e contínua faixa espectral em que é sintonizável, somada à sua alta potência. O princípio básico de funcionamento de um FEL consiste na aceleração linear de um feixe de elétrons até velocidades relativísticas e sua posterior passagem por uma estrutura periódica de ímãs denominada ondulador.<sup>77,82</sup> O movimento oscilatório dos elétrons livres no campo magnético variável da estrutura estimula-os a emitir fótons a cada mudança de direção. A frequência da radiação emitida pode ser continuamente ajustada por meio de dois parâmetros: a energia cinética do feixe de elétrons livres e a intensidade do campo magnético.<sup>15</sup> Este segundo parâmetro é o que

garante a agilidade necessária para varrer uma extensa faixa de comprimentos de onda a tempo de se registrar um espectro IRMPD, uma vez que é possível utilizar motores para variar rapidamente a distância entre os ímãs e o feixe de elétrons relativísticos, mantendo-se sua energia cinética fixa.

A restrição ao uso em larga escala desse tipo de *laser* está nas exigências de capital e de espaço para construir e manter a estrutura necessária, visto que o FEL está longe de ser um equipamento de bancada. Por conta disso, há poucas instalações no mundo que fazem uso dessa fonte de radiação para a realização de espectroscopia IRMPD. Dessas, apenas duas funcionam como instalações multiusuários, permitindo pesquisadores visitantes: o *Centre Laser Infrarouge d'Orsay (CLIO)*,<sup>83</sup> na França, e o *Free Electron Laser for Infrared eXperiments (FELIX)*,<sup>84</sup> nos Países Baixos. De maneira geral, esses FELs, a depender de ajustes internos, conseguem prover radiação de alta potência entre 500 e 2500  $\text{cm}^{-1}$ , cobrindo justamente uma região importante do espectro infravermelho a que o OPO/OPA não chega.<sup>15</sup>

Por fim, vale também citar o *laser* de  $\text{CO}_2$ . Essa fonte de radiação não é continuamente sintonizável no infravermelho como as outras duas apresentadas acima, uma vez que se restringe às linhas do espectro vibro-rotacional da molécula de dióxido de carbono (925–1085  $\text{cm}^{-1}$ ).<sup>15</sup> No entanto, além de ter sido, historicamente, o primeiro tipo de *laser* a ser empregado em experimentos IRMPD com íons aprisionados,<sup>85</sup> ele ainda pode ser utilizado atualmente em conjunção com o OPO/OPA para aquecer os íons até o limiar de dissociação por meio de excitação vibracional não-ressonante. Esse recurso costuma ser utilizado em casos de fragmentações mais difíceis, quando se combina a absorção ressonante da radiação do OPO/OPA com a não-ressonante do *laser* de  $\text{CO}_2$  para suprir o incremento de energia interna necessário para produzir os fragmentos.

### 3.4. Cálculos Computacionais de Estrutura Eletrônica

A Química Computacional constitui tanto um campo de pesquisa independente como um complemento substancial a estudos experimentais, que é o caso neste trabalho. Ela simula numericamente estruturas e reações químicas, baseando-se total ou parcialmente nas leis fundamentais da Física, e instrumentaliza cientistas para estudar fenômenos químicos ao efetuar cálculos em computadores (*in silico*) em vez de examiná-los experimentalmente. Alguns métodos são capazes, inclusive, de prover informações sobre moléculas e reações que seriam

impossíveis de se obter por meio da observação, uma vez que se podem modelar não apenas espécies estáveis, mas também intermediários instáveis e até estados de transição.<sup>86</sup>

O uso de cálculos computacionais na presente pesquisa tem dois intuitos principais, complementares um ao outro: a obtenção de espectros vibracionais teóricos de estruturas e geometrias putativas e a modelagem de superfícies de energia potencial para os mecanismos de fragmentação propostos. Para tanto, nesta seção, serão discutidas, primeiramente, as metodologias de cálculo computacionais mais utilizadas e os princípios fundamentais da otimização de geometrias moleculares e do cálculo de frequências vibracionais teóricas. Em seguida, explicar-se-á como tais princípios permitem tanto comparações teórico-experimentais para avaliar propostas estruturais das espécies iônicas detectadas como estudos de perfis energéticos de mecanismos reacionais.

#### 3.4.1 Metodologias de cálculo computacional

No campo da Química Computacional, há duas áreas gerais devotadas à descrição da estrutura e da reatividade de moléculas: Mecânica Molecular e Teoria da Estrutura Eletrônica. Ambas têm como base primária o cálculo da energia de uma determinada geometria molecular, isto é, um certo arranjo espacial de átomos – núcleos e elétrons. O que as diferencia justamente é a metodologia por meio da qual esse cálculo é realizado.

A Mecânica Molecular faz uso das leis da Física clássica para prever estruturas e propriedades das espécies químicas. As moléculas são tratadas a partir da posição e da interação entre os núcleos, mediada por campos de força que simulam implicitamente os efeitos eletrônicos. Esses campos de força são parametrizados – com variações entre diferentes métodos – a partir de dados empíricos como tipos de elemento, comprimentos, ângulos e forças de ligação, hibridização e carga.<sup>86</sup> Apesar de ser pouco custosa computacionalmente e permitir a avaliação de sistemas extremamente grandes de milhares de átomos, esse arcabouço metodológico apresenta diversas limitações, definidas pela não-universalidade dos parâmetros utilizados para constituir o método e pela impossibilidade de lidar com efeitos eletrônicos explícitos, como, por exemplo, a quebra e a formação de ligações.

Já os Métodos de Estrutura Eletrônica se servem das leis da mecânica quântica como alicerce para os cálculos. Assim, a energia de uma molécula ou de qualquer arranjo de átomos é obtida a partir da resolução da equação de Schrödinger:

$$\left[ \frac{-\hbar^2}{2m} \nabla^2 + V(\vec{r}) \right] \Psi(\vec{r}) = E \Psi(\vec{r}) \quad (\text{Equação 3.5})$$

Como é bem sabido, no entanto, essa equação fundamental só pode ser resolvida analítica e exatamente para sistemas de apenas um elétron, em que não há o percalço matemático da correlação eletrônica – elétrons em um sistema molecular reagem às trajetórias uns dos outros. Os métodos variados são, então, caracterizados pelos diferentes artifícios matemático-conceituais que empregam para obter soluções aproximadas para a equação. Dentre esses métodos de estrutura eletrônica, podem-se destacar três grandes classes, apresentadas abaixo.<sup>86</sup>

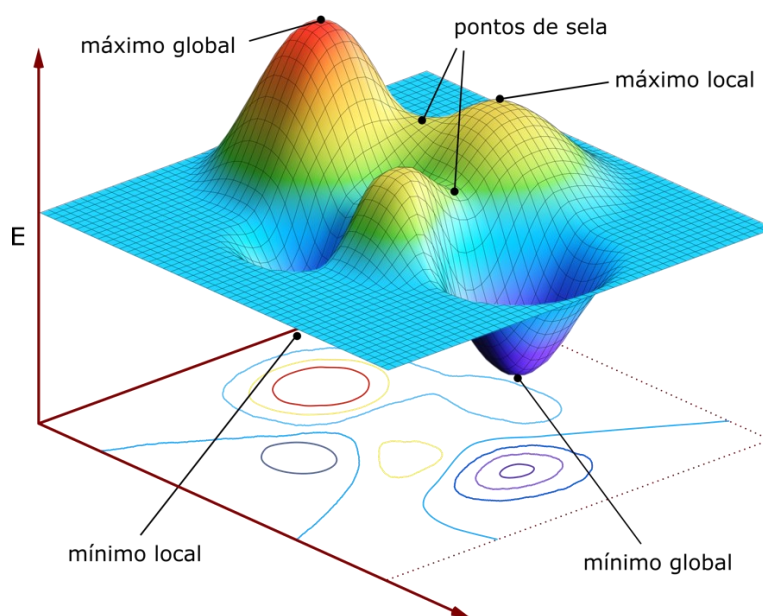
- Semiempíricos: utilizam parâmetros derivados de dados experimentais para simplificar e resolver uma forma aproximada da equação de Schrödinger. Empregam parâmetros diferentes a depender do sistema químico investigado. São exemplos AM1 e PM3.
- Ab initio: diferentemente da Mecânica Molecular e dos semiempíricos, estes não utilizam nenhum dado experimental em suas computações; os únicos valores inseridos para resolver a equação e calcular a energia são constantes físicas universais ( $h$ ,  $c$ ,  $e$ ,  $\varepsilon$ ) e as massas das partículas subatômicas. Uma série de aproximações matemáticas rigorosas são aplicadas para chegar a uma solução. Os dois representantes mais conhecidos e utilizados dessa classe são os métodos Hartree-Fock (HF) e de perturbação Møller-Plesset (MP2, entre outros).
- Teoria do funcional de densidade (DFT): constrói funções de um elétron para descrever a densidade eletrônica total e, assim, considerar indiretamente a correlação eletrônica. Oferece resultados mais aceitáveis e próximos aos de métodos *ab initio* mais dispendiosos computacionalmente, como o MP2, mas a um custo baixo, parecido ao do HF.<sup>87</sup> Exemplos populares na comunidade científica da área são B3LYP e M06-2X.

Nos cálculos de estrutura eletrônica, além da escolha do método mais adequado para o problema a ser estudado entre os diferentes níveis de teoria – quanto mais preciso, mais computacionalmente custoso –, há também que se definir o conjunto de base (*basis set*) a ser

usado para representar o sistema. Trata-se da representação matemática dos orbitais moleculares considerados para descrever a molécula. Pode-se interpretar o conjunto de base como uma delimitação de cada elétron a certa região do espaço ao redor dos núcleos. Sendo assim, quanto maior o conjunto, menos restrições matemáticas aos elétrons e, por conseguinte, mais próximo o cálculo estará da situação real.<sup>86</sup>

### 3.4.2 Otimização de geometrias e cálculo de frequências vibracionais

Quando se realiza o cálculo computacional de energia de alguma espécie química, é necessário fornecer uma geometria específica; isto é, as coordenadas cartesianas do núcleo de cada átomo constituinte. Entretanto, sabe-se que qualquer mudança estrutural em uma molécula acarreta alterações de energia, assim como de outras propriedades. A forma como a energia varia a depender da estrutura molecular pode ser representada matematicamente por uma hipersuperfície de energia potencial, em que se avalia a energia como função de cada um dos graus de liberdade – comprimentos de ligação, ângulos entre ligações, ângulos diedros etc. A Figura 3.11 ilustra essa superfície, com o eixo z (altura) representando a energia, e os eixos x e y, dois graus de liberdade da estrutura.



**Figura 3.11.** Exemplo de superfície de energia potencial para uma espécie química hipotética, mostrando mínimos, máximos e pontos de sela (CC BY-NC; Ümit Kaya via LibreTexts; modificada).

Cada ponto nessa superfície representa uma geometria particular do sistema, definida pelos valores de cada variável estrutural. As geometrias de equilíbrio, ao redor das quais o

sistema pode se estabilizar, são os pontos de mínimo, uma vez que qualquer mudança estrutural, independentemente da direção, leva a um aumento na energia do sistema e, por conseguinte, a uma força restaurativa de sentido oposto. Esses mínimos, a depender do sistema estudado, podem corresponder a confôrmeros, isômeros, reagentes ou produtos.

Não se pode, contudo, assumir que a geometria dada como *input* para o cálculo de energia seja precisamente um ponto de mínimo e, portanto, represente uma das geometrias de equilíbrio do sistema. Então, uma etapa importante e igualmente custosa dos cálculos computacionais é a otimização de geometria, que consiste em se variar os parâmetros estruturais do sistema em busca de um mínimo de energia, que pode ser local ou global.

Há alguns algoritmos desenvolvidos para encontrá-los, como, por exemplo, calcular a força resultante – o negativo da primeira derivada da energia em relação às coordenadas espaciais dos núcleos – e movimentar a molécula na sua direção. Mas, de maneira geral, o programa utilizado para fazer o cálculo alterará a geometria ao longo de vários pequenos passos, calculando a energia de cada um, até encontrar uma configuração espacial que satisfaça alguns critérios pré-estabelecidos; essencialmente, que as forças e o próximo passo de cálculo estejam abaixo de um certo valor, interpretado como zero. Satisfeitos os critérios, o programa considera a geometria otimizada e fornece sua energia e as coordenadas de todos os átomos.<sup>86</sup>

O processo de otimização de geometria, todavia, não necessariamente localiza pontos de mínimo, mas, sim, pontos estacionários na superfície de energia potencial. Apesar de, na maioria dos casos, serem mínimos, deve-se confirmar que não se trata de um máximo ou de um ponto de sela (máximo em uma coordenada e mínimo nas demais). Esse é um dos motivos pelos quais também se tem o hábito de realizar cálculos de frequências vibracionais após a otimização. As frequências dos modos normais de vibração da espécie ou sistema químico permitem verificar se um ponto estacionário constitui um mínimo de energia, pois todas elas terão valores reais nesse caso.

Se se toma a superfície de energia potencial como uma analogia mecânica, oscilações reais só são possíveis nos pontos de mínimo. Já nos pontos de sela, por exemplo, que são interpretados como os estados de transição, ter-se-á uma frequência imaginária e todas as outras frequências reais. O valor imaginário corresponde justamente a uma oscilação – impossível fisicamente – na coordenada estrutural em que o ponto é um máximo de energia. Essa interpretação pode ser demonstrada matematicamente a partir da função horária complexa ( $f(t)$ ) para um movimento harmônico simples.

$$f(t) = e^{i\omega t} = \cos \omega t + i \cdot \sin \omega t \quad (\text{Equação 3.6})$$

$$\omega = 2\pi\nu = 2\pi c\tilde{\nu} \quad (\text{Equação 3.7})$$

A vibração é descrita pela parte real ( $\cos \omega t$ ) da função exponencial complexa  $e^{i\omega t}$ , em que  $\omega$  é a velocidade angular associada à oscilação. Essa grandeza será usada para simplificar a leitura, mas, como mostra a Equação 3.7, poder-se-ia substituí-la pela frequência  $\nu$  ou pelo número de onda  $\tilde{\nu}$ , já que são todos diretamente proporcionais. Se a frequência for imaginária,  $\omega$  também o será e, assim, será possível escrevê-lo como  $\omega = i \cdot r$ , em que  $r$  é um valor real. Isso posto, tem-se:

$$f(t) = e^{i\omega t} = e^{i \cdot i \cdot r \cdot t}$$

$$f(t) = e^{-rt} \quad (\text{Equação 3.8})$$

Logo, na Equação 3.8, vê-se que a função horária se tornou apenas real. Ademais, o que era uma oscilação descrita por uma função trigonométrica converteu-se em uma exponencial decrescente, coerente com um sistema saindo de um ponto de máximo: ele não vai oscilar em torno dele, mas sim decair para algum mínimo local próximo. É assim que o cálculo de frequências auxilia na determinação da natureza dos pontos estacionários localizados.

Há, adicionalmente, outras utilidades importantes para esse cálculo, dentre as quais vale destacar a obtenção de grandezas termodinâmicas, como a energia do ponto zero, a entalpia, a entropia e a energia de Gibbs por meio da função de partição vibro-rotacional e, principalmente, a predição de espectros infravermelho e Raman de absorção de moléculas.

### 3.4.3 Comparações teórico-experimentais dos espectros vibracionais

O principal objetivo para o cálculo de frequências neste trabalho de pesquisa assiste em construir espectros de absorção teóricos para as propostas estruturais das espécies identificadas por espectrometria de massas. Isso feito, a comparação destes com os espectros IRMPD obtidos experimentalmente permite a avaliação de quais estruturas putativas são corroboradas e quais precisam ser descartadas ou repensadas por estarem em desacordo com as bandas experimentais. É bem verdade que, para a região de grupos funcionais, pode nem ser necessária às vezes a comparação com cálculos computacionais. Porém, para aproveitar as informações da região do *fingerprint* no espectro IRMPD, os cálculos são de suma importância.



É preciso, no entanto, ponderar que o espectro de absorção fornecido pelos cálculos computacionais é para uma única geometria do íon isolado; não considera a mobilidade conformacional que existe naturalmente num conjunto de íons de uma espécie. No contexto do experimento, no espectrômetro, os íons estão isolados, mas têm energia térmica significativa, tanto antes como durante a excitação pelo *laser*, para que haja flutuações nas frequências ressonantes. Além disso, o cálculo de frequências também trata os modos de vibração do íon como osciladores perfeitamente harmônicos, o que não é exato. Há, pois, um alargamento e um *redshift* das bandas que deve ser levado em conta na comparação. O alargamento pode ser simulado por curvas Gaussianas, geralmente se estipulando uma largura a meia-altura de 20  $\text{cm}^{-1}$ . Já com relação ao *redshift*, tem-se como costume multiplicar as frequências calculadas por fatores de escala pré-definidos para garantir o ajuste ao experimento.

A comunidade de espectroscopia em fase gasosa aceita, de maneira geral, o uso de cálculos DFT B3LYP/6-31+G(d,p) para a predição de frequências, acompanhados da aplicação de fatores de correção duplos – valores diferentes para as região de alta e de baixa frequência.<sup>88</sup> Já um estudo mais recente mostrou que os níveis de teoria M06-2X/aug-cc-pVTZ e CAM-B3LYP/6-311+G(d,p) podem oferecer resultados similares com melhor predição de geometria e energia.<sup>89</sup>

#### 3.4.4 Construção de superfícies de energia potencial para reações

Outro uso importante dos cálculos computacionais, nesse contexto, consiste em construir superfícies de energia potencial para mecanismos de reação ou fragmentação. A partir da identificação das espécies presentes na amostra e de seus produtos, e da atribuição de estruturas putativas coerentes com o espectro IRMPD, propõem-se vias de fragmentação com o auxílio de intuição química e de mecanismos já conhecidos. Essas vias podem, então, ser modeladas por cálculos computacionais para a construção de suas superfícies de energia potencial. Isso feito, é possível avaliar a plausibilidade dos mecanismos em termos das energias de ativação calculadas.

Assim como a termodinâmica usualmente nos dá informações sobre os estados inicial e final – em equilíbrio – de um processo, enquanto a cinética analisa o decorrer do processo em si, a espectroscopia IRMPD e a modelagem computacional têm uma relação análoga na presente pesquisa. A espectroscopia IRMPD garante acesso a dados experimentais a respeito de estrutura, geometria e energia de precursores e produtos. Já a modelagem dos mecanismos

reacionais traz um retrato teórico de como a fragmentação pode estar acontecendo e por que etapas. Nesse sentido, o passo mais importante é a otimização da geometria correta para os intermediários e, principalmente, para os estados de transição do mecanismo.

Há alguns algoritmos para se encontrar o ponto de sela do estado de transição na superfície de energia potencial. A maioria envolve fornecer as geometrias dos mínimos locais do reagente e do produto – ou intermediário – para o programa computacional, de modo que ele analise a coordenada de reação que os conecta e proponha um ponto intermediário que possa ser otimizado. Também é possível incluir no *input* do cálculo uma geometria tentativa para o estado de transição a fim de auxiliar o programa a encontrar o ponto de sela buscado. Feito isso, é preciso confirmar que se trata efetivamente do estado de transição para a reação. Um modo comum de fazê-lo é avaliando o modo de vibração da frequência imaginária – a oscilação deve mostrar a quebra e a formação das ligações envolvidas na reação.

Um método deveras recomendado para corroborar a geometria do estado de transição é, então, performar um cálculo IRC, que consiste em seguir o caminho de diminuição da energia em ambos os sentidos, partindo do ponto de sela, e otimizando a geometria do sistema molecular a cada pequeno passo.<sup>86</sup> Assim, verifica-se se os mínimos locais conectados pelo estado de transição identificado são realmente as espécies envolvidas na reação que se deseja modelar.

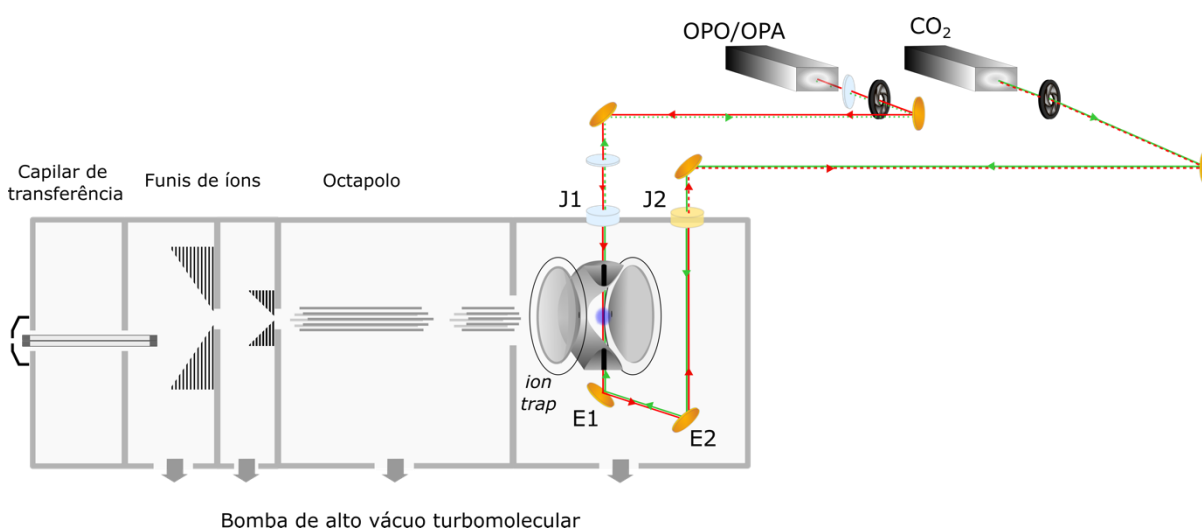
Construída a superfície de energia potencial para uma reação, além do cálculo da energia de ativação, pode-se obter outros dados termodinâmicos como as variações de entalpia, de entropia e de energia de Gibbs do processo. No caso de reações em solução, esses valores são mais úteis para analisar a plausibilidade do mecanismo proposto. Já em se tratando de reações em fase gasosa, como é o caso de fragmentações de íons no espectrômetro de massas, costuma-se analisar apenas a energia eletrônica, somada à energia vibracional do ponto zero.

## 4. Metodologia

### 4.1. Análises por espectrometria de massas sequencial ( $MS^n$ )

Para a realização das análises no espectrômetro de massas, as amostras foram preparadas a partir da ciclofosfamida sólida (Sigma-Aldrich CAS:6055-19-2). Prepararam-se soluções-estoque de  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/L em acetonitrila (Merck – LC/MS), que são mantidas no refrigerador para evitar possível degradação. Anteriormente às análises, recolhem-se alíquotas da solução-estoque, que são diluídas entre 100 e 1000 vezes em acetonitrila para produzir soluções de ciclofosfamida nas concentrações de 1  $\mu$ M a 10  $\mu$ M. Dependendo do experimento, também se adiciona de 1  $\mu$ L a 3  $\mu$ L de ácido fórmico para favorecer a formação da espécie protonada. Nos poucos casos em que se utilizou o nanospray, utilizou-se água como solvente e atingiram-se concentrações de até 20  $\mu$ M.

Os experimentos de espectrometria de massas e, também, os de espectroscopia IRMPD, descritos da próxima seção, foram performados num equipamento Bruker Daltonics AmaZon SL modificado.<sup>76</sup> Seu método de ionização da amostra é o eletrospray (ESI), que extrai as espécies da solução com pouca ou nenhuma fragmentação. Esses íons são, em seguida, analisados em um *ion trap* 3D, que permite fragmentações e análises sequenciais ( $MS^n$ ). As modificações realizadas no equipamento consistem na confecção de dois orifícios diametralmente opostos no eletrodo do anel da armadilha de íons e a colocação de duas janelas (J) na carcaça do espectrômetro, para permitir a passagem da radiação do *laser*, além da instalação de dois espelhos (E) abaixo do *ion trap* para guiar os feixes.



**Figura 4.1.** Esquema simplificado do espectrômetro de massas modificado utilizado nos experimentos. Adaptado da referência <sup>76</sup>.

Os experimentos de ESI-MS<sup>n</sup> foram conduzidos em modo positivo, ou seja, com aplicação de um potencial da faixa de  $-4,5$  kV, de modo que apenas íons positivos sejam ejetados da solução na direção da entrada do equipamento. Alguns parâmetros da fonte e do instrumento foram, naturalmente, alterados de uma análise para outra com o intuito de se otimizar o sinal dos íons de interesse a cada vez; porém, de maneira geral, as condições foram as seguintes:

- Temperatura do gás de secagem:  $180$  °C
- Pressão do gás de nebulização (N<sub>2</sub>):  $7,25$  psi
- Fluxo do gás de secagem (N<sub>2</sub>):  $4$  L/min
- Janela de varredura:  $m/z$   $100 - m/z$   $600$
- Média de  $20$  espectros para registro

Nos momentos em que a fonte de nanoeletrospray foi usada no lugar da ESI comum, a voltagem aplicada ficou entre  $-2,5$  e  $-3,5$  kV, mantendo-se uma distância, entre o capilar com a amostra e a entrada do espectrômetro, de  $0,9$  a  $1,1$  cm. Para essa técnica, também foi necessário alterar a pressão do gás de nebulização e o fluxo do gás de secagem, para  $2$  psi e  $1$  L/min respectivamente, haja vista a maior sensibilidade do spray formado no processo.

Em se tratando da dissociação induzida por colisão (CID), as fragmentações são provocadas por colisões com o gás Hélio, presente na cela da armadilha de íons. Primeiramente, a espécie que se deseja estudar é isolada, com a ejeção das outras razões massa/carga. Em seguida, uma radiofrequência de excitação é aplicada nos eletrodos de forma que os íons dessa espécie oscilem e colidam com os átomos de He, acumulando energia para dissociarem. Por fim, é feita a varredura para registrar o espectro. Fazendo-se esse processo uma vez, tem-se um espectro MS(2) ou MS/MS. Se se realiza tal sequência duas vezes, para investigar como se quebra algum dos fragmentos primários do precursor, obtém-se um espectro MS(3); e assim por diante.

Ao se variar a amplitude da radiofrequência aplicada nos experimentos de CID, é possível controlar a porcentagem de fragmentação da espécie precursora. Neste trabalho, as intensidades dos fragmentos foram, também, avaliadas, em função da amplitude CID, e os dados foram plotados e ajustados matematicamente no programa Origin 9.0,<sup>90</sup> para gerar *breakdown curves*. Isso permite representar graficamente o efeito da amplitude de excitação e, por conseguinte, no caso de comparações com resultados de outros equipamentos com parâmetros diferentes, levá-lo em conta na análise.

## 4.2. Obtenção de espectros vibracionais de íons por IRMPD

A espectroscopia IRMPD, por se tratar de uma técnica física e conceitualmente atrelada à espectrometria de massas, requer a conjugação dos sistemas de controle tanto das fontes de radiações como do espectrômetro. Informações mais detalhadas de como tal integração foi realizada podem ser encontradas na literatura.<sup>76</sup>

Os experimentos foram estruturados de modo que a nuvem de íons seja irradiada pelo feixe do *laser* no período de operação do instrumento destinado à CID, após a etapa de isolamento. Isso feito, o sistema registra o espectro de massas [MS(2)] como se os íons estivessem sendo fragmentados com colisões com o gás Hélio; mas, em realidade, a amplitude da radiofrequência de excitação é zerada e o tempo é destinado à absorção dos fótons e eventual e subsequente dissociação. Ao se configurar o programa que controla os *lasers* para realizar a varredura de frequências no infravermelho, é possível compilar a sequência de espectros de massas, cada um obtido sob a irradiação de um comprimento de onda, na forma de um cromatograma de íons, para posterior tratamento de dados.

Como já foi discutido, há algumas fontes de radiação que podem ser utilizadas nesse tipo de metodologia. Para este estudo, tinha-se disponível o *laser* de CO<sub>2</sub> e o sistema OPO/OPA, ambos sistemas ópticos de bancada. O primeiro, cuja radiação monocromática em 10,6 μm é ocasionalmente empregada para aquecer os íons e promover maior ou alguma dissociação, não se mostrou necessário na maioria dos casos analisados do sistema químico de interesse. Já quando se requereu essa radiação extra para a fragmentação de alguma espécie investigada, não se obteve resultados significativamente melhores.

No que concerne ao sistema OPO/OPA, usado para todos os espectros IRMPD deste trabalho, trata-se de um equipamento da *Laservision*, alimentado por um *laser* de estado sólido Nd:YAG (1064 nm, pulsado, 530 mJ/pulso, 10 Hz, 10 ns de largura do pulso), cujos cristais são de KTP e KTA – *Potassium Titanyle Phosphate* (KTiOPO<sub>4</sub>) e *Potassium Titanyle Arsenate* (KTiOAsO<sub>4</sub>). A óptica não-linear dos cristais e a variação mecânica dos ângulos de incidência são capazes de gerar radiação infravermelha continuamente sintonizável entre 2000 e 4200 cm<sup>-1</sup>, com energia variando de 2 a 15 mJ por pulso, a depender do número de onda.

Com o objetivo de ajustar a eficiência de fotofragmentação, para evitar a depleção completa do íon precursor, assim como para minimizar quebras de segunda ordem, alterou-se o número de pulsos da radiação para cada experimento. Em função da energia de dissociação de cada espécie estudada, variou-se a quantidade entre 5 e 25 por evento de fragmentação. Íons

mais estáveis e difíceis de dissociar requereram um número maior de pulsos do *laser*, para, então, absorverem mais fótons e conseguirem atingir a energia interna suficiente para produzir fragmentos. Na prática, o procedimento de ajuste resumia-se a controlar os tempos de duração da CID e de abertura do obturador para deixar passar apenas o número de pulsos desejado, levando-se em conta a frequência de 10 Hz. Por exemplo, 1500ms de irradiação da nuvem de íons equivalem a 15 pulsos.

Referente à varredura de frequências da radiação, é necessário buscar uma conciliação entre melhor resolução das bandas e tempo adequado para registro do espectro vibracional. Nesse sentido, os parâmetros a serem ajustados são o intervalo espectral, o tamanho dos passos de varredura e a média de análises de massa por passo. Em geral, manteve-se a faixa de números de onda entre 2800 e 3800  $\text{cm}^{-1}$ , tendo em vista as vibrações características esperadas. Com relação ao tamanho dos passos, o padrão foi de 2  $\text{cm}^{-1}$ ; isto é, após cada registro de massas, programou-se a radiação do *laser* para mudar de 2 em 2 unidades. Com passos maiores, perde-se resolução; com menores, a duração para completar o experimento pode chegar a mais de uma hora, além de não necessariamente trazer melhora, uma vez considerada a limitação de resolução da própria saída do *laser*. Por fim, pode-se variar a média de quantas análises de massa são realizadas para cada passo. Via de regra, fez-se a média de 5 espectros.

O resultado primário de um experimento de espectroscopia IRMPD é, como já mencionado, o cromatograma de íons, em que se registram as intensidades de todas as espécies iônicas detectadas ao longo do tempo de análise. Nesse caso, há também os valores temporais da frequência e da potência do *laser*, de extrema importância. O tratamento de dados inicia-se, então, pela extração das informações relevantes do arquivo, por meio de um *script* desenvolvido para organizar, em uma planilha, as intensidades de íons selecionados – precursor e todos os fragmentos – e o número de onda da radiação a cada passo da varredura.

Em posse da planilha de dados extraídos, calcula-se a eficiência de fotofragmentação ( $EFF_{\lambda}$ ), a partir da Equação 3.4. A construção da curva de intensidade, representada pela  $EFF_{\lambda}$ , em função do número de onda ( $\bar{\nu}$ ) irradiado gera, enfim, o espectro IRMPD da espécie iônica analisada. Esse processo é feito, neste trabalho, no programa gráfico Origin 9.0<sup>90</sup> e, com o intuito de melhorar a visualização das bandas e reduzir possíveis ruídos, utilizou-se algoritmos implementados no *software* para suavizar os dados (*smoothing*), geralmente a partir da média de 5 pontos.

### 4.3. Cálculos Computacionais

Os cálculos teóricos de estrutura eletrônica e de frequências vibracionais foram incluídos neste estudo com o objetivo primordial de apoiar as atribuições de bandas dos espectros IRMPD. Então, propostas estruturais para os íons analisados nos experimentos puderam ser modeladas computacionalmente e ter seus espectros teóricos de absorção vibracional gerados e comparados aos dados empíricos de fotofragmentação. Executou-se esses cálculos usando o funcional de densidade B3LYP e o conjunto de bases 6-31+G(d,p). A escolha por tal metodologia e nível de teoria deveu-se à sua ampla adoção e aceitação em estudos de espectroscopia na fase gasosa, pela capacidade de prever corretamente frequências vibracionais quando combinadas a fatores de correção duplos – 0,98 para as frequências mais baixas (até  $2000\text{ cm}^{-1}$ ) e 0,95 para as mais altas.<sup>88,89</sup> Neste caso, uma vez que os espectros IRMPD foram registrados na região mais alta, dos grupos funcionais, os valores foram corrigidos pelo fator 0,95.

As geometrias iniciais das estruturas putativas consideradas em cada análise foram desenhadas com base em intuição química e preparadas pelo *software* Chemcraft.<sup>91</sup> Em seguida, efetuou-se as otimizações de geometrias e os cálculos termoquímicos e de vibrações harmônicas por meio do pacote computacional Gaussian09 (revisão D.01).<sup>92</sup> Todas as geometrias resultantes desse procedimento foram, então, confirmadas como verdadeiros mínimos de energia na superfície de energia potencial – posições de equilíbrio com nenhuma frequência imaginária de oscilação.

No que tange às comparações teórico-experimentais, resta um percalço a ser examinado. Uma vez que, dentre outros fatores, os cálculos computacionais realizados consideram uma única espécie química isolada, e não um conjunto de moléculas/íons com flutuações naturais de geometria, não se obtêm espectros de bandas vibracionais, mas sim de linhas. Portanto, como forma de facilitar a comparação visual do espectro IRMPD com os espectros teóricos, aplicou-se a estes um alargamento artificial com uso de funções Gaussianas. As larguras a meia altura das bandas traçadas foram fixadas em  $20\text{ cm}^{-1}$ , para se assemelharem ao que se costuma obter nos experimentos.

Outro fator apreciado nas análises comparativas das estruturas putativas foi a estabilidade termodinâmica. Os valores utilizados para as avaliações de plausibilidade das propostas correspondem à energia eletrônica (E) somada à energia de ponto zero (ZPE) sem correções. Optou-se por essa grandeza, em vez da entalpia ou da energia de Gibbs, por conta

de os sistemas descritos estarem em fase gasosa, na condição de alto-vácuo do espectrômetro de massas, apesar do objetivo de espelhar o comportamento em solução. As energias extraídas dos cálculos, inicialmente em Hartrees por partícula, foram convertidas para  $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$  e apresentadas em conjunto com o respectivo espectro teórico da estrutura.

A utilização do recurso dos cálculos computacionais teve, ademais, outros dois papéis neste trabalho: pontualmente, na análise da estabilização por solvatação, e, destacadamente, na construção da curva de energia potencial do mecanismo de fragmentação da ciclofosfamida. Em ambos os casos, não havia o objetivo de comparar as frequências vibracionais. Sendo assim, selecionou-se um funcional de densidade mais em voga em estudos recentes, além de um maior nível de teoria para uma descrição mais acertada das geometrias e, principalmente, das energias: M06-2X/aug-cc-pVDZ.

Para os cálculos de solvatação, as interações com o solvente foram modeladas de maneira implícita com o método SMD.<sup>93</sup> Trata-se o sistema como se a molécula ou íon estivesse envolto por um meio contínuo, de constante dielétrica dependente do solvente escolhido. A perturbação mútua advinda das polarizações de soluto e solvente é resolvida por meio da sistemática do Campo de Reação Autoconsistente (SCRF – do inglês *Self-Consistent Reaction Field*).<sup>86</sup>

Já na modelagem da curva de energia potencial da via de fragmentação da ciclofosfamida, seguiu-se o procedimento explicado nas seções 3.4.2 e 3.4.4 para identificação de reagente, intermediário, estados de transição e produtos da reação. O mecanismo proposto para representar o processo químico foi desenhado e as coordenadas espaciais de todas as estruturas foram preparadas no Chemcraft.<sup>91</sup> No caso das geometrias de equilíbrio – mínimos de energia –, procedeu-se a otimização e o cálculo de energia no Gaussian09,<sup>92</sup> similarmente à modelagem das estruturas putativas. Em se tratando dos estados de transição, contudo, é necessário localizar pontos de sela, e não mínimos. Para tanto, utilizam-se como opções computacionais de otimização os métodos TS, QST2 ou QST3, que se diferenciam no tocante à quantidade de informação estrutural fornecida ao programa a fim de encontrar a geometria de transição correta entre reagente e produto de cada etapa.

Para conferir a validade da geometria dos estados de transição, verificou-se a existência de uma frequência vibracional imaginária, que representa a oscilação em torno de um ponto de máximo de energia. A visualização da movimentação da espécie nesse modo normal é um excelente indicativo para averiguar se ela está associada à etapa reacional modelada. Entretanto, para aumentar a segurança na identificação da geometria, realizam-se os cálculos de IRC, que



---

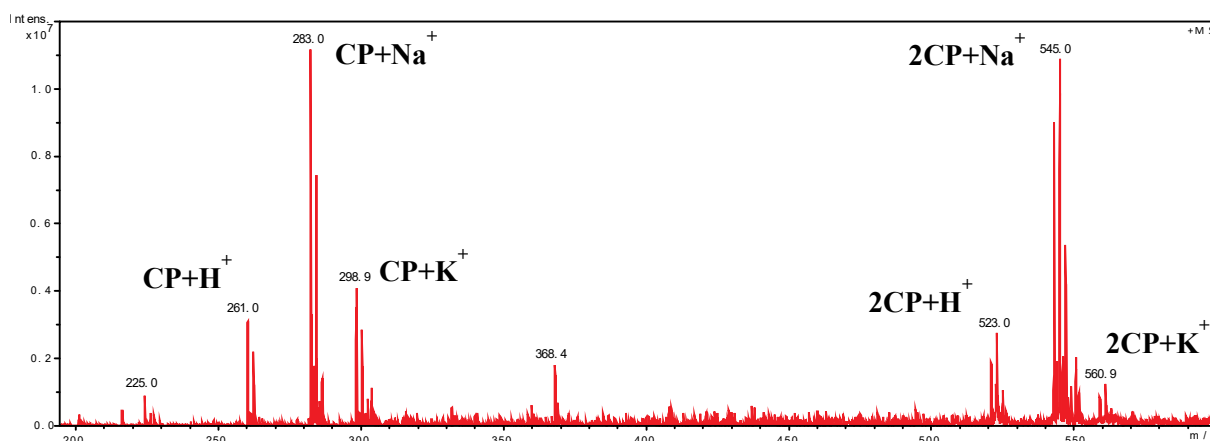
seguem a curva de energia para ambos os lados, conectando cada estado de transição aos respectivos reagente e produto.

Por fim, calculados os valores de energia de todos as geometrias presentes no mecanismo, organiza-se os dados num gráfico de  $E+ZPE$  em função dos passos na coordenada de reação e obtém-se a curva de energia potencial ao longo do processo de fragmentação. Vale ressaltar que, nesta metodologia da qual se fez uso, o que se modelou computacionalmente foram alguns pontos ao longo da superfície. O traçado que os conecta é um esboço de como se supõe que a curva de energia seja.

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Análise preliminar: identificação de espécies relevantes

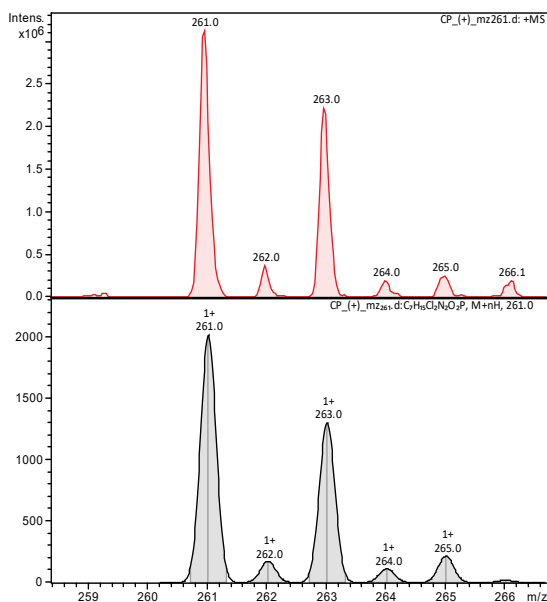
Em primeira instância, a solução de ciclofosfamida (CP)  $1 \times 10^{-5}$  mol/L em acetonitrila foi analisada por espectrometria de massas simples, de modo a verificar quais espécies iônicas podem ser detectadas na solução amostrada por eletrospray.



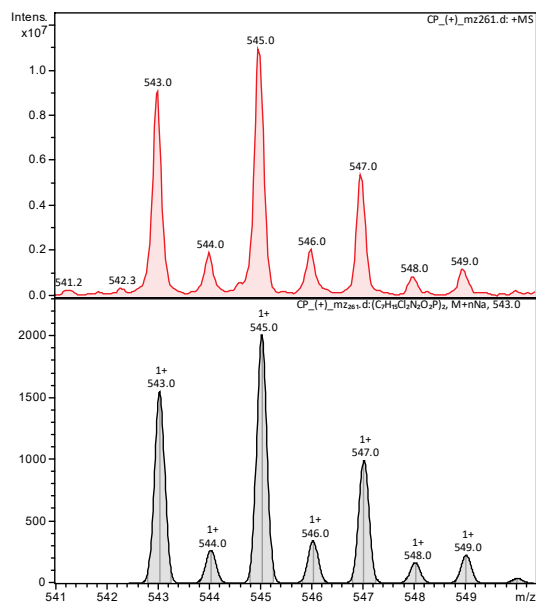
**Figura 5.1.** Espectro de massas da amostra de ciclofosfamida ( $10 \mu\text{M}$  em acetonitrila) para análise preliminar de íons em solução.

Na Figura 5.1, destacam-se algumas espécies relevantes na amostra, como a ciclofosfamida protonada ( $\text{CP}+\text{H}^+$  –  $m/z$  261), seu aduto de sódio ( $\text{CP}+\text{Na}^+$  –  $m/z$  283), assim como o aduto de potássio ( $\text{CP}+\text{K}^+$  –  $m/z$  299). Já na região de massas mais altas, foram detectadas espécies diméricas da molécula-alvo, análogas às menores, a saber, o dímero protonado ( $2\text{CP}+\text{H}^+$  –  $m/z$  521) e os adutos de sódio ( $2\text{CP}+\text{Na}^+$  –  $m/z$  543) e de potássio ( $2\text{CP}+\text{K}^+$  –  $m/z$  559). Todas as massas consideram a situação de dois átomos de Cl-35.

Como elemento de verificação importante da atribuição dos picos, principalmente na presença de elementos como o Cloro, pode-se utilizar o padrão isotópico da espécie. Dessa forma, para a espécie protonada ( $\text{CP}+\text{H}^+$ ) e para o dímero sodiado ( $2\text{CP}+\text{Na}^+$ ), compararam-se os sinais obtidos no experimento com a expectativa teórica baseada na razão isotópica (Figura 5.2 e Figura 5.3). Como se pode notar, a inequívoca correspondência permite comprovar a designação dos picos como sendo da ciclofosfamida. Inclusive, vale ressaltar que, no caso dos dímeros, por haver 4 átomos de Cloro, a massa mais provável para  $2\text{CP}+\text{Na}^+$  não é  $m/z$  543, correspondente a quatro átomos Cl-35, mas sim  $m/z$  545, referente a três átomos Cl-35 e a um átomo Cl-37.



**Figura 5.2.** Comparação do padrão isotópico experimental (vermelho) e teórico (cinza) para CP+H<sup>+</sup>. Fórmula: (C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P)H<sup>+</sup>



**Figura 5.3.** Comparação do padrão isotópico experimental (vermelho) e teórico (cinza) para 2CP+Na<sup>+</sup>. Fórmula: (C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P)<sub>2</sub>Na<sup>+</sup>

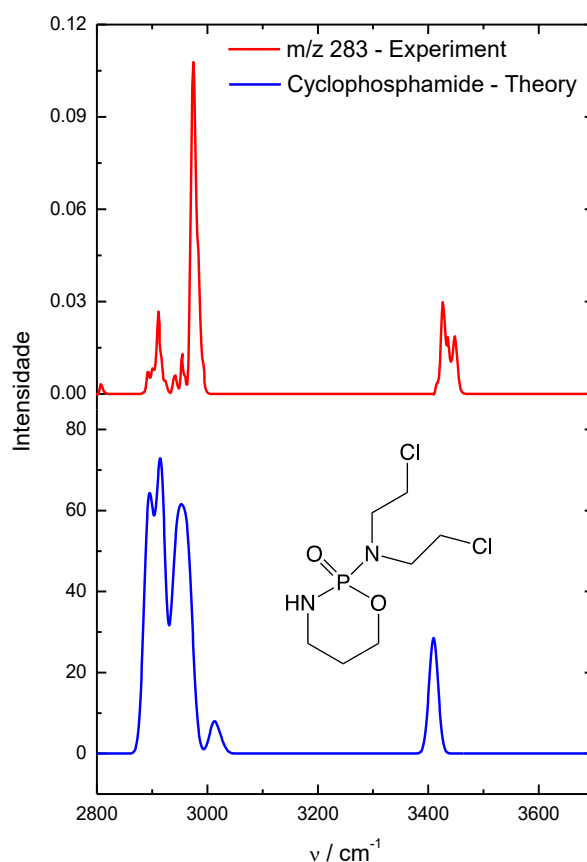
Essa primeira análise, além de confirmar a presença e a prevalência da droga a ser estudada na amostra, sem fragmentação significativa, também permitiu identificar as principais formas catiônicas nas quais ela foi extraída da solução. Trata-se de um conhecimento essencial para a proposição de análises subsequentes, uma vez que é por meio dessas informações que será possível selecionar as razões massa/carga de interesse. Ademais, sob a ótica de análises clínicas e ambientais, quanto mais sinais espectrais relativos ao analito forem detectados e atribuídos, maior tenderá a ser a eficiência da metodologia, tanto qualitativa como quantitativa.

## 5.2. Espectros IRMPD da ciclofosfamida

Antes de avaliar as fragmentações das principais espécies iônicas associadas à ciclofosfamida, coube primeiramente estudar a própria molécula intacta presente em solução. Fez-se uso da espectroscopia vibracional de íons em fase gasosa (IRMPD), na região de grupos funcionais, de forma a investigar dados estruturais da ciclofosfamida nas suas formas protonada (CP+H<sup>+</sup>) e sodiada (CP+Na<sup>+</sup>). Para isso, cada uma foi isolada na armadilha de íons para a realização da fragmentação induzida pelo *laser* no infravermelho. Os resultados e as discussões adjacentes destas análises vibracionais são apresentados a seguir.

### 5.2.1 Análise vibracional de CP+Na<sup>+</sup>

Conforme se nota na Figura 5.1, os adutos de sódio são as espécies com maior intensidade detectadas, tanto com uma como com duas moléculas de ciclofosfamida. Isso posto, foram registrados os espectros IRMPD das espécies de  $m/z$  283 (CP+Na<sup>+</sup>) e  $m/z$  543 (2CP+Na<sup>+</sup>). Esses espectros são mostrados abaixo, comparados ao espectro teórico esperado para a ciclofosfamida neutra, com base em cálculos de estrutura eletrônica e vibracionais utilizando a metodologia B3LYP/6-31+G(d,p). As comparações foram feitas com a molécula neutra, sem considerar a presença do cátion Na<sup>+</sup>, justamente para avaliar a validade desse procedimento, que se mostrou profícuo. Conforme se nota, os espectros analisados evidenciaram que a interação eletrostática, ao menos no sistema estudado, não alterou de forma perceptível as bandas vibracionais esperadas.

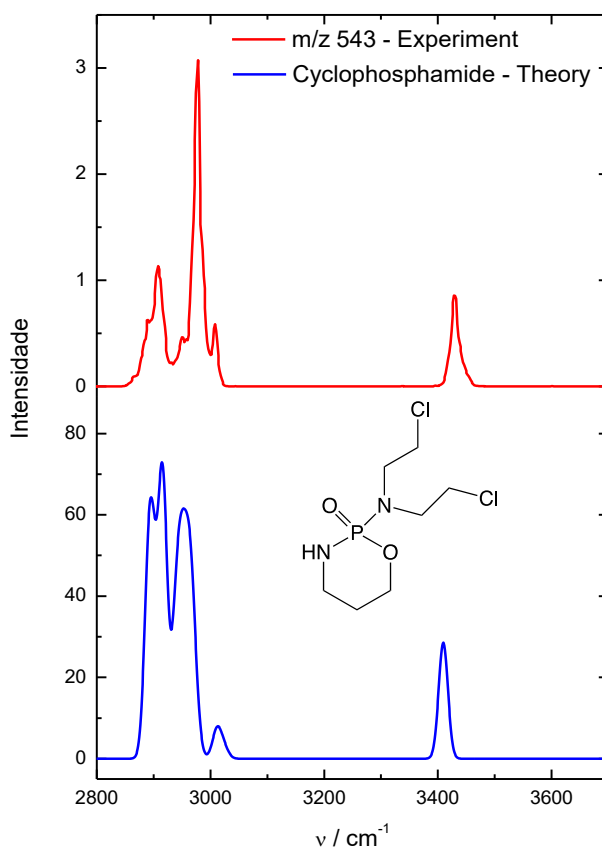


**Figura 5.4.** Espectro vibracional IRMPD do aduto de sódio da ciclofosfamida ( $m/z$  283) com 17 pulsos do *laser*, comparado ao espectro teórico da molécula. Frequências teóricas corrigidas pelo fator de escala 0,95.

A análise da Figura 5.4 mostra uma boa concordância entre as frequências vibracionais calculadas para a espécie e as bandas experimentais do espectro IRMPD. A banda em

3410  $\text{cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento N–H endocíclico, e as bandas de 2870 a 3030  $\text{cm}^{-1}$  referem-se aos vários estiramentos C–H da molécula.

Como já se comentou na seção de metodologia, as frequências teóricas são corrigidas por um fator de escala, em função da anarmonicidade das vibrações não considerada nos cálculos, de modo a proporcionar melhor previsão experimental. Já no que tange às intensidades de absorção previstas teoricamente, vale enfatizar que não se pode esperar uma concordância com as intensidades das bandas dos espectros IRMPD. Os cálculos são desenvolvidos para tentar prever a absorvidade da espécie em diferentes frequências; contudo, a dissociação multifotônica no infravermelho envolve, além das absorções subsequentes de fótons, vários outros processos, como as redistribuições intramoleculares da energia vibracional e a eventual concentração da energia no modo vibracional mais lábil para levar à fragmentação. Ao ignorarem as questões estatísticas desses outros processos, os cálculos são ineficientes em prever as intensidades para essa técnica de análise espectroscópica, o que, todavia, não compromete o mais importante – a comparação das frequências das bandas.



**Figura 5.5.** Espectro vibracional IRMPD do dímero da ciclofosfamida sodiada ( $m/z$  543) com 5 pulsos do *laser*, comparado ao espectro teórico da molécula. Frequências teóricas corrigidas pelo fator de escala 0,95.

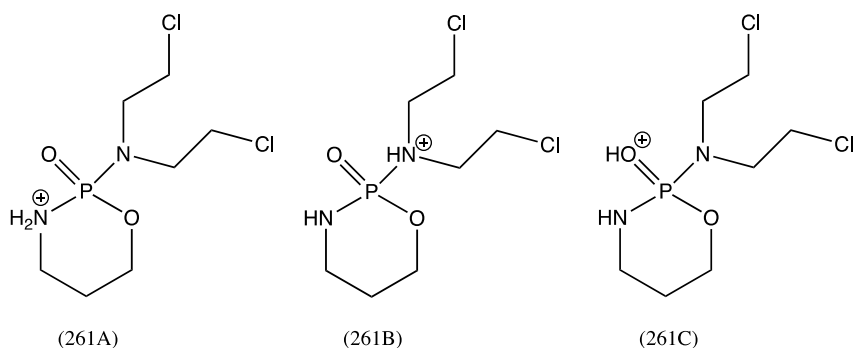
No caso da Figura 5.5, que apresenta o espectro IRMPD do dímero  $2\text{CP}+\text{Na}^+$ , observam-se as mesmas bandas presentes na Figura 5.4, uma vez que se trata da mesma molécula. As bandas experimentais, não obstante, mostraram-se significativamente mais intensas, resultado de maior eficiência de fotofragmentação, haja vista a menor energia de dissociação do dímero – não covalentemente ligado –, que facilmente se fragmenta para formar  $\text{CP}+\text{Na}^+$ .

A observação dessas bandas mais definidas e intensas melhora de maneira notória o ajuste com o espectro teórico da CP, sendo possível atribuir até bandas menores de estiramento C–H. Mais relevante ainda é a confirmação de uma banda única de estiramento N–H, conforme esperado. No espectro IRMPD do aduto de  $m/z$  283, parecia haver mais de uma banda na região de  $3400\text{ cm}^{-1}$ ; porém, pode-se inferir que se tratava apenas de um artefato do experimento em função da baixa eficiência de fragmentação. Essa observação é digna de nota, uma vez que há outras espécies com alta energia de dissociação no sistema estudado em que esses artefatos podem aparecer.

Além de corroborarem a atribuição do íon identificado como sendo da ciclofosfamida, esses primeiros espectros IRMPD são importantes para validar a efetividade do método espectroscópico em fornecer elementos extras de análise estrutural, que serão úteis sobremaneira na elucidação dos fragmentos nas próximas seções do presente trabalho.

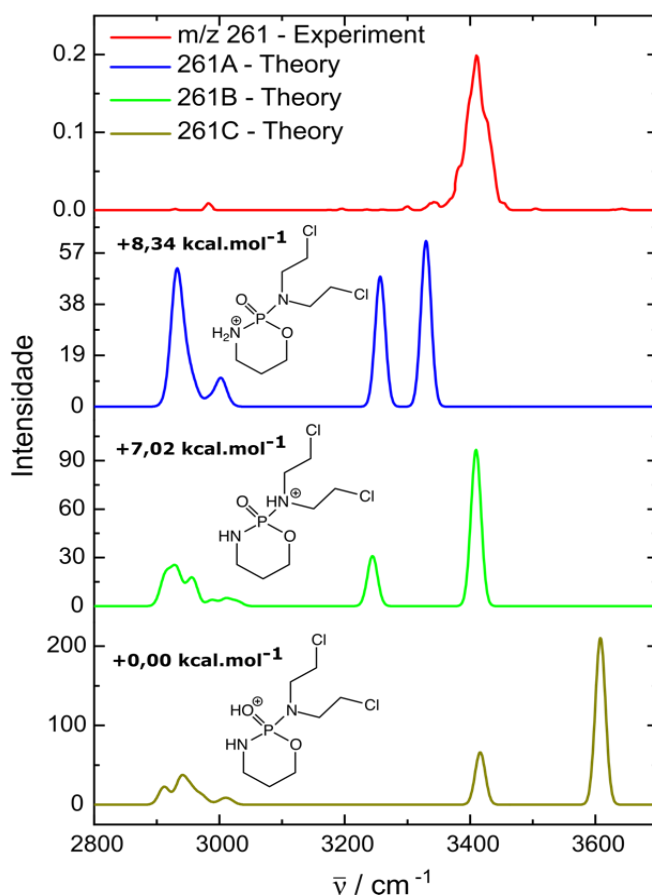
### 5.2.2 Análise vibracional de $\text{CP}+\text{H}^+$

No que tange à espécie protonada ( $\text{CP}+\text{H}^+$ ), a situação torna-se mais complexa. Diferentemente dos adutos de sódio, a protonação da molécula pode alterar as vibrações observadas no espectro, ao formar uma nova ligação química. No caso da ciclofosfamida, consideraram-se três sítios principais passíveis de protonação – o Nitrogênio endocíclico, o Nitrogênio exocíclico e o Oxigênio do grupo P=O –, e cada uma das três espécies produziriam bandas diferentes. A entrada de  $\text{H}^+$  no N endocíclico formaria o grupo  $-\text{NH}_2$ , que seria identificado pelos estiramentos simétrico e antissimétrico que lhe são característicos. Já a protonação no N exocíclico levaria ao surgimento de uma banda de estiramento N–H, em uma frequência significativamente diferente do N–H já presente nativamente na molécula, devido à carga positiva no Nitrogênio. Por fim, protonação no Oxigênio daria origem a uma banda de estiramento O–H na região de  $3600\text{ cm}^{-1}$ . A seguir, na Figura 5.6, constam as estruturas para as três possibilidades de  $\text{CP}+\text{H}^+$ .



**Figura 5.6.** Três estruturas possíveis para a ciclofosfamida protonada, diferentes pelo sítio de protonação. (A) – protonação no N endocíclico; (B) – protonação no N exocíclico; (C) – protonação no O exocíclico.

Considerando-se as características distintas de cada espécie, ao se registrar o espectro IRMPD da ciclofosfamida protonada, esperava-se que os dados obtidos permitissem determinar claramente o sítio de protonação. Os resultados, no entanto, não foram tão inequívocos, conforme se pode notar na Figura 5.7.



**Figura 5.7.** Espectro vibracional IRMPD da ciclofosfamida protonada ( $m/z$  261) com 20 pulsos do *laser*, comparado aos espectros teóricos das estruturas putativas. Frequências teóricas corrigidas pelo fator de escala 0,95. Energias das geometrias calculadas no nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p), em fase gasosa, em relação ao menor valor do conjunto.

A expectativa inicial era de que, em comparação com o espectro do aduto de sódio, o espectro IRMPD da CP protonada apresentasse uma banda a mais, porém o que ocorreu foi o desaparecimento da banda de estiramento C–H – o que não era inesperado, já que ela é dificilmente observável por meio desta técnica. Além disso, houve um alargamento da banda e um pequeno *redshift* do estiramento N–H já presente na molécula neutra. O fato de não terem surgido evidências empíricas definitivas para alguma das três estruturas propostas faz com que não se possa afirmar, com segurança, onde é o sítio de protonação preferencial da ciclofosfamida, apesar da maior estabilidade energética da proposta 261C.

Há que se levar em conta, todavia, que os valores de energia na Figura 5.7 foram calculados considerando as espécies em fase gasosa – como elas estão no espectrômetro – e não solvatadas – como elas são extraídas da amostra. Então, se se incluir a estabilização por solvatação, seria possível que essa diferença energética entre os protômeros (isômeros de protonação) diminuísse. Foram, pois, realizados mais cálculos de estrutura eletrônica das estruturas propostas para a CP+H<sup>+</sup> tanto em fase gasosa como solvatadas em água, etanol e acetonitrila, no nível de teoria M06-2X/aug-cc-pVDZ, cujos resultados são apresentados na Tabela 5-1. Para os cálculos de solvatação, as interações com o solvente foram modeladas por meio da metodologia SCRF, na variação SMD.

**Tabela 5-1.** Energia eletrônica somada à energia do ponto zero (E+ZPE), em kcal/mol, dos protômeros da ciclofosfamida 261A (protonação no N endocíclico), 261B (protonação no N exocíclico) e 261C (protonação no O). Energias relativas ao menor valor do conjunto.

<i>Protômero</i>	<i>E+ZPE</i> <i>(fase gasosa)</i>	<i>E+ZPE</i> <i>(em água)</i>	<i>E+ZPE</i> <i>(em etanol)</i>	<i>E+ZPE</i> <i>(em acetonitrila)</i>
<b>261A</b>	11,09	0,03	0,76	0,00
<b>261B</b>	9,98	2,86	4,04	3,22
<b>261C</b>	0,00	0,00	0,00	0,27

Em comparação às energias em fase gasosa, é notório que a solvatação das espécies reduz consideravelmente o espaçamento energético entre elas. Tal constatação torna plausível que haja uma mistura de isômeros coexistindo em solução e que, ao serem extraídas para a fase gasosa pelo eletrospray, poderiam se manter intactas, a depender das energias de ativação para a migração do próton entre os sítios.

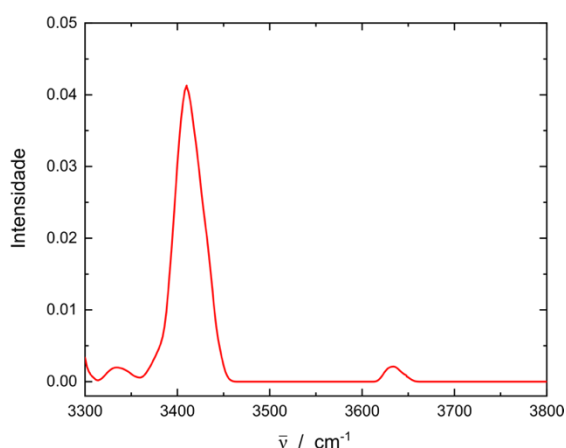
Persiste, não obstante, o impasse de o espectro IRMPD da CP+H<sup>+</sup> da Figura 5.7 não apresentar qualquer banda característica de diferenciação dos isômeros, apenas a banda original



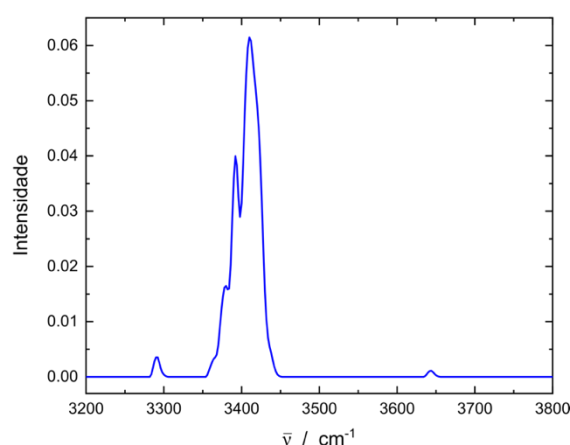
de N–H. Uma explicação estaria relacionada à maior resistência dessa espécie em sofrer dissociação, tanto por CID como por IRMPD, o que pode ser evidenciado pela baixa eficiência de fotofragmentação observada. Devido a essa baixa eficiência, que pode também resultar de outros fatores relacionados à IVR, bandas de absorção menos intensas podem não estar sendo detectadas.

Para aumentar a fotofragmentação e, assim, tentar visualizar mais bandas no espectro vibracional, foram utilizados alguns recursos. O mais simples é aumentar o número de pulsos do *laser* para fornecer mais energia para a fragmentação, além de modificar parâmetros do *ion trap* para diminuir a dissipação de energia por colisão. Apesar de esses recursos melhorarem a qualidade do espectro IRMPD, não foram suficientes para a visualização de outras bandas.

Outro recurso a que se recorreu foi a mudança da fonte de ionização da amostra para aumentar a quantidade de íons extraídos da solução e, por conseguinte, aumentar o sinal dos fragmentos gerados no experimento. Nesse âmbito, usou-se a fonte de *nanospray* no lugar da já tradicional ionização por *electrospray*. Esse novo tipo de fonte é conhecido por produzir gotículas de aerossol menores, o que a torna mais eficiente em concentrar o analito durante o processo e, portanto, aumenta a sensibilidade da técnica. Essa tentativa obteve um bom resultado, ao aumentar significativamente o sinal da ciclofosfamida protonada, o que, combinado com um número elevado de pulsos do *laser*, permitiu a visualização de outras bandas, como se pode verificar na Figura 5.8 e na Figura 5.9.



**Figura 5.8.** Espectro vibracional IRMPD da  $CP+H^+$  ( $m/z$  261) com 25 pulsos do *laser*, obtido por ionização por nanospray de uma solução  $2 \mu M$  de ciclofosfamida em água/metanol (8:2).



**Figura 5.9.** Espectro vibracional IRMPD da  $CP+H^+$  ( $m/z$  261) com 25 pulsos do *laser*, obtido por ionização por nanospray de uma solução  $20 \mu M$  de ciclofosfamida em água.

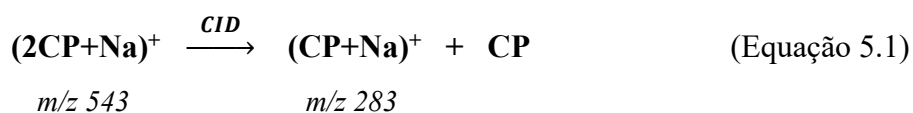
Nesses espectros registrados, é possível reparar pequenas bandas vibracionais tanto na região de estiramento O–H como na região de estiramento N–H, além da banda principal, conquanto tenha sido necessário, para tal, aumentar muito o número de pulsos, o que potencializa a diminuição geral do sinal. Na comparação com os espectros teóricos apresentados na Figura 5.7, esses dados corroboram a proposta de que deve haver uma mistura de protômeros (isômeros de protonação), com uma fração das moléculas protonadas no Oxigênio e outra fração com protonação no Nitrogênio exocíclico.

Para confirmar essa inferência, poder-se-ia, futuramente, realizar experimentos de mobilidade iônica de modo a separar os isômeros e obter seus espectros IRMPD separadamente. Ademais, experimentos de espectroscopia IRPD por pré-dissociação também permitiriam aumentar significativamente a eficiência de fotofragmentação, uma vez que a dissociação a ser avaliada nesse caso não é da molécula em si, mas sim de uma interação não-covalente dela com uma molécula neutra pequena como água ou até átomos de He. Entretanto, no momento, ainda não é possível realizar esses experimentos localmente. Tentou-se obter a espécie iônica hidratada por *nanospray* para realizar a pré-dissociação, mas tal espécie não foi observada.

### 5.3. Padrões de fragmentação

O principal enfoque deste trabalho, como já apresentado, é o estudo das principais vias de fragmentação da ciclofosfamida com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre as espécies que a droga pode gerar na espectrometria de massas. Já existem dados na literatura que apresentam as massas e as fórmulas moleculares das espécies produzidas por CID a partir deste fármaco,<sup>35</sup> mas ainda há bastante espaço para complementação, principalmente no que se refere a informações estruturais dos fragmentos e a modelagens dos mecanismos de reação.

Em um primeiro momento, é preciso avaliar de quais espécies iônicas detectadas no espectro de massas da amostra vale investigar o padrão de fragmentação. Com relação aos íons diméricos, a dissociação ocorre conforme já antecipado, com a formação da espécie monomérica análoga, a exemplo do que se vê na equação simplificada abaixo. Depois, as vias de fragmentação seguem, evidentemente, da mesma forma que as das espécies monoméricas.



A partir disso, escolheu-se, portanto, restringir a análise às duas principais formas contendo apenas uma molécula de ciclofosfamida: a protonada ( $\text{CP}+\text{H}^+$ ) e a sodiada ( $\text{CP}+\text{Na}^+$ ).

A seguir, os produtos de fragmentação são apresentados de dois modos diferentes e complementares. Primeiramente, com os espectros MS(2) e, posteriormente, por meio de gráficos denominados *breakdown curves*.

### 5.3.1 Espectros MS/MS

A primeira característica que se notou nesta fase do estudo foi a diferença considerável entre o padrão da ciclofosfamida protonada e o do aduto de sódio, que formam íons-filho bem distintos e, por isso, serão discutidos separadamente nas próximas seções. A Figura 5.10 e a Figura 5.11 apresentam os espectros de massas MS(2) gerados a partir do isolamento e da fragmentação por CID dos íons de  $m/z$  261 e de  $m/z$  283 respectivamente.

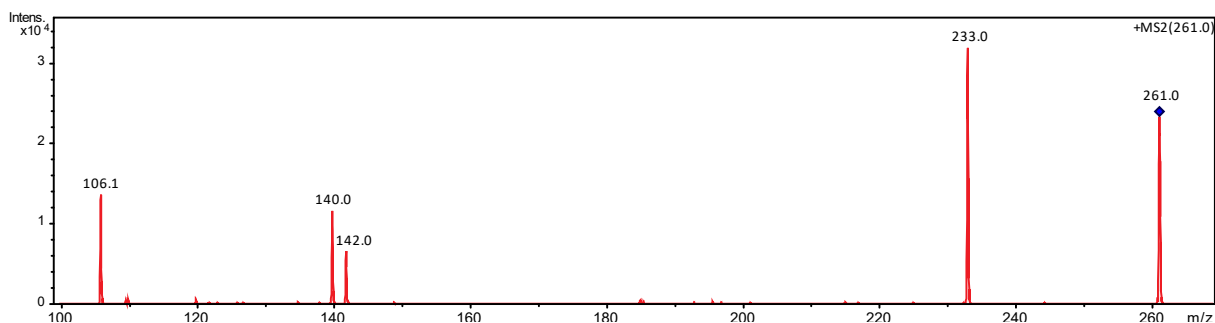


Figura 5.10. Espectro de massas MS(2) da ciclofosfamida protonada,  $\text{CP}+\text{H}^+$  ( $m/z$  261).

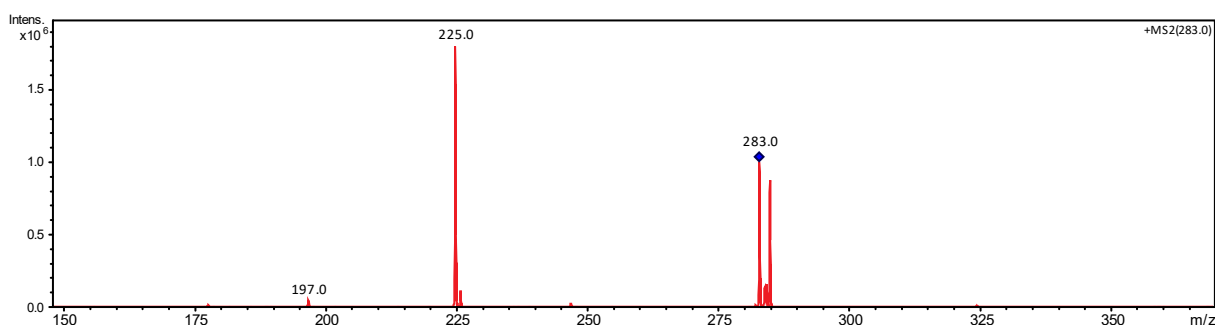


Figura 5.11. Espectro de massas MS(2) do aduto de sódio da ciclofosfamida,  $\text{CP}+\text{Na}^+$  ( $m/z$  283).

Para melhor observar as perdas de massa nas fragmentações e as propostas de interpretação para essas perdas, organizaram-se os dados na Tabela 5-2.

Tabela 5-2. Principais fragmentos detectados para CP+H<sup>+</sup> e CP+Na<sup>+</sup>

<i>CP+H<sup>+</sup></i> <i>m/z</i> 261			<i>CP+Na<sup>+</sup></i> <i>m/z</i> 283		
Massa do fragmento	Perda de massa	Proposta química	Massa do fragmento	Perda de massa	Proposta química
<i>m/z</i> 233	M – 28	M – C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	<i>m/z</i> 225	M – 58	M – NaCl
<i>m/z</i> 142	M – 119	M – C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> NP	<i>m/z</i> 197	M – 86	M – (NaCl+C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> )
<i>m/z</i> 140	M – 121	M – C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> NP			
<i>m/z</i> 106	M – 155	M – (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> NP+HCl)			

### 5.3.2 Breakdown curves

Em geral, estudos de espectrometria de massas sequencial restringiriam suas análises ao que foi apresentado acima. Entretanto, também é possível, antes da análise por espectroscopia IRMPD, construir o que se conhece como *breakdown curves*, gráficos que apresentam a intensidade relativa das espécies iônicas – precursor e fragmentos – em função da voltagem aplicada ao *ion trap* no momento da dissociação induzida por colisão (CID). Tal experimento foi realizado para ambos os íons isolados da ciclofosfamida, e as curvas da Figura 5.12 apresentam os resultados.

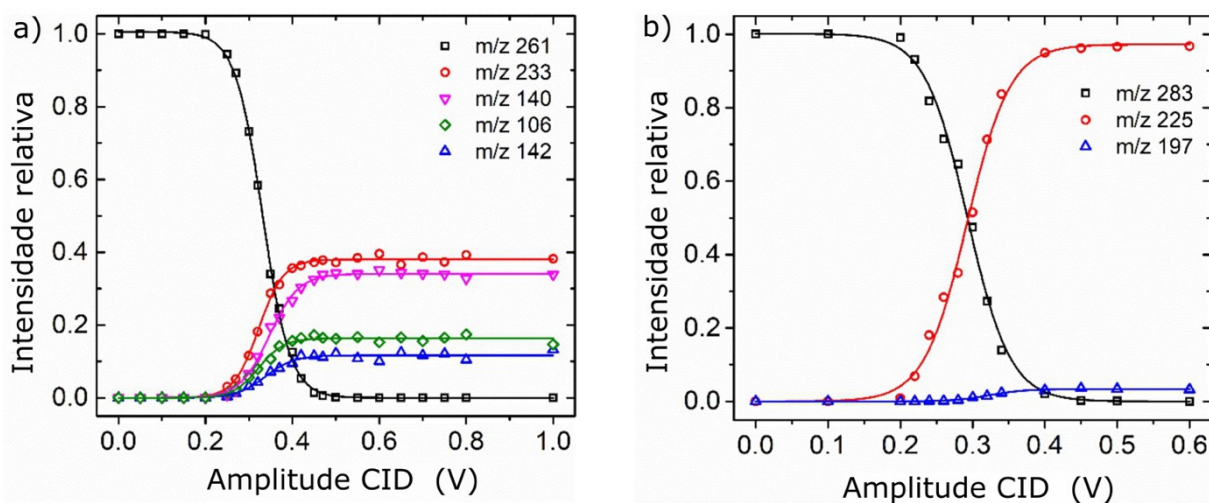


Figura 5.12. Fragmentação de (a) CP+H<sup>+</sup> (*m/z* 261) e (b) CP+Na<sup>+</sup> (*m/z* 283) em função da amplitude da radiofrequência de excitação para a CID.

A análise dessas curvas permite, inicialmente, determinar a distribuição de intensidades dos produtos de dissociação. Considerando-se vias concorrentes de fragmentação, pode-se inferir, a partir da maior intensidade de um produto, menor energia de ativação do caminho para formá-lo. Além disso, quanto mais deslocada a inflexão da curva do precursor estiver para a direita, entende-se que ele é mais resistente à fragmentação. Neste caso, os dois íons da CP parecem ter tendências similares, com os pontos de inflexões ao redor de 0,3 V de amplitude, apesar de vias reacionais distintas.

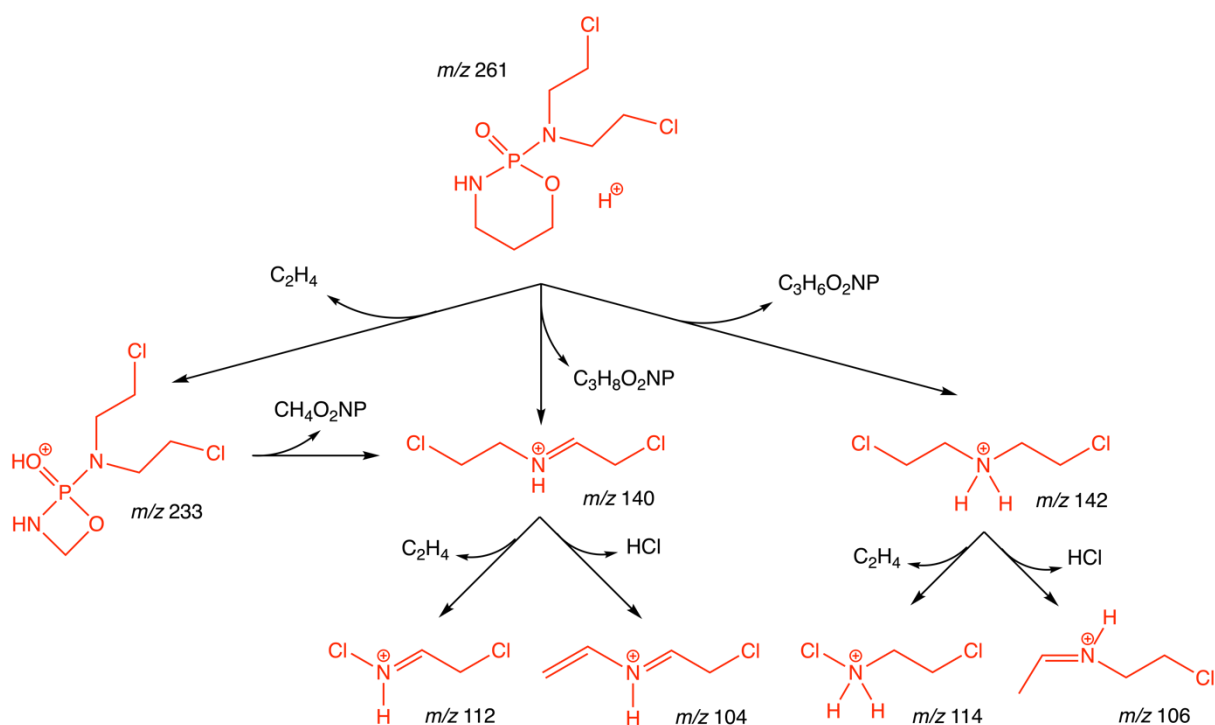
Com essas curvas, esperava-se, também, diferenciar os fragmentos de 1<sup>a</sup> e de 2<sup>a</sup> ordem de cada um dos precursores. Seria possível fazê-lo ao comparar, para cada fragmento, a posição no eixo *x* do ponto em que a intensidade relativa é metade da máxima – desvios para a direita poderiam indicar íons produzidos em fragmentações subsequentes à inicial. No caso da ciclofosfamida, todavia, não houve elementos experimentais para fazer essa diferenciação. Faria sentido supor, por exemplo, que o produto de *m/z* 197 seja um fragmento de 2<sup>a</sup> ordem, gerado a partir do íon de *m/z* 225, como será discutido e proposto posteriormente; mas a intensidade mais baixa dificulta verificar esse fato pela curva da Figura 5.12(b).

Um outro passo, para extrair mais informações desses dados, seria traduzir a voltagem da cela para a energia fornecida ao íon pela CID. Assim, seria possível construir espectros de massas resolvidos em função da energia interna da espécie. Mas, devido a especificidades de cada espécie e de cada equipamento utilizado, essa conversão de um parâmetro do espectrômetro para um dado energético dos íons não é trivial.

Nas próximas duas seções de resultados, as vias de fragmentação de ambas as espécies catiônicas da ciclofosfamida serão analisadas mais a fundo, por meio da elucidação estrutural dos produtos de dissociação e, em um dos casos, da modelagem computacional do mecanismo reacional proposto. Tal estudo foi conduzido, como já explicitado, pela integração da espectroscopia IRMPD com os cálculos computacionais de estrutura eletrônica e frequências vibracionais.

#### 5.4. Fragmentação da ciclofosfamida protonada ( $CP+H^+$ )

O esquema da Figura 5.13 apresenta o padrão de fragmentação detectado para a ciclofosfamida protonada. Esta proposta foi construída com base nas informações reunidas por fragmentações sequenciais [MS(3)], espectros IRMPD das espécies e cálculos teóricos de estruturas putativas. A discussão que segue é referente ao processo de construção desse esquema, em que se eliminou ou se corroborou propostas estruturais a partir das evidências experimentais.

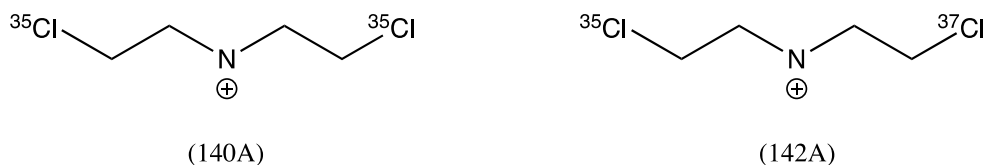


**Figura 5.13.** Padrão de fragmentação proposto para a ciclofosfamida protonada ( $CP+H^+$ ).

No espectro de  $CP+H^+$ , na Figura 5.10, observa-se que os íons-filho correspondem a perdas de massa de 28 Da, 119 Da, 121 Da e 155 Da, conforme também organizado na Tabela 5-2.

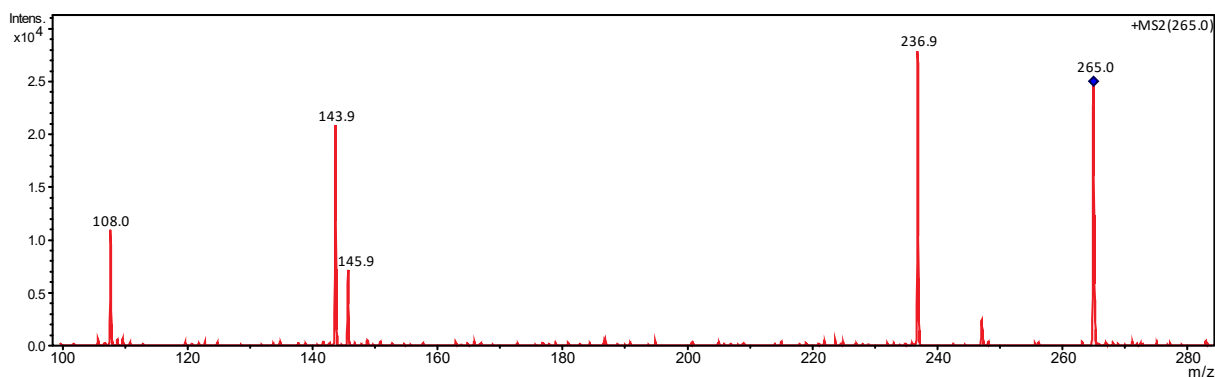
Por uma questão de facilidade para a discussão, a análise será iniciada pelos íons de  $m/z$  140 e  $m/z$  142. Preliminarmente, imaginou-se que seriam as espécies da Figura 5.14, formadas pela perda da parte cíclica da molécula. A existência de dois íons seria devida ao padrão isotópico do Cloro. No entanto, ao se tentar verificar essa hipótese, isolando apenas a ciclofosfamida protonada com dois Cl-35 para dissociar, notou-se que ambos os fragmentos

continuavam sendo formados, o que não se esperava, pois não se poderia explicar o surgimento de um Cl-37.



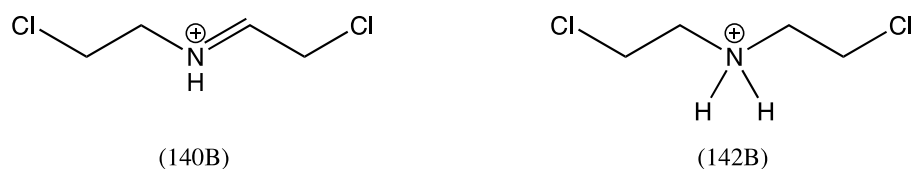
**Figura 5.14.** Propostas estruturais iniciais dos fragmentos de  $m/z$  140 e  $m/z$  142.

Para, então, confirmar-se que não se tratava de padrão isotópico, procedeu-se o isolamento e a fragmentação da espécie de  $m/z$  265 –  $\text{CP}+\text{H}^+$  com dois Cl-37 –, a qual originou o espectro MS(2) a seguir.



**Figura 5.15.** Espectro de massas MS(2) da ciclofosfamida protonada,  $\text{CP}+\text{H}^+$ , com dois Cl-37 ( $m/z$  265).

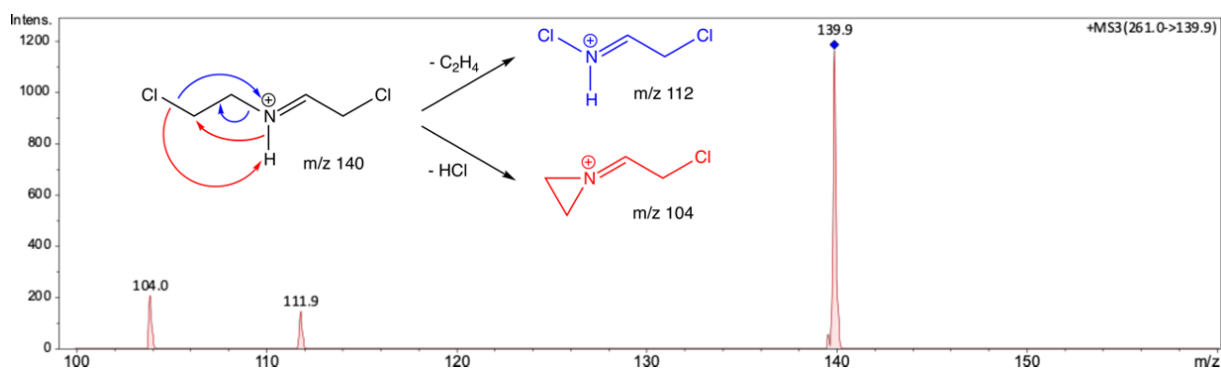
Neste experimento, foram obtidos, como fragmentos análogos aos anteriormente discutidos, os íons de  $m/z$  144 e  $m/z$  146. Tal observação demonstra inequivocamente que não se trata apenas do padrão isotópico, uma vez que, trocando os dois Cl-35 por dois Cl-37, ter-se-ia, no máximo, uma diferença de massas entre as espécies de 4 Da. Portanto, a detecção do íon de  $m/z$  146, com uma massa 6 Da a mais que a do íon de menor massa ( $m/z$  140), mostra que são realmente espécies diferentes. Sendo assim, uma outra proposta para explicar esses fragmentos é apresentada abaixo, voltando a considerar apenas o isótopo Cl-35. Neste caso, a diferença entre as duas espécies seria dois átomos de Hidrogênio.



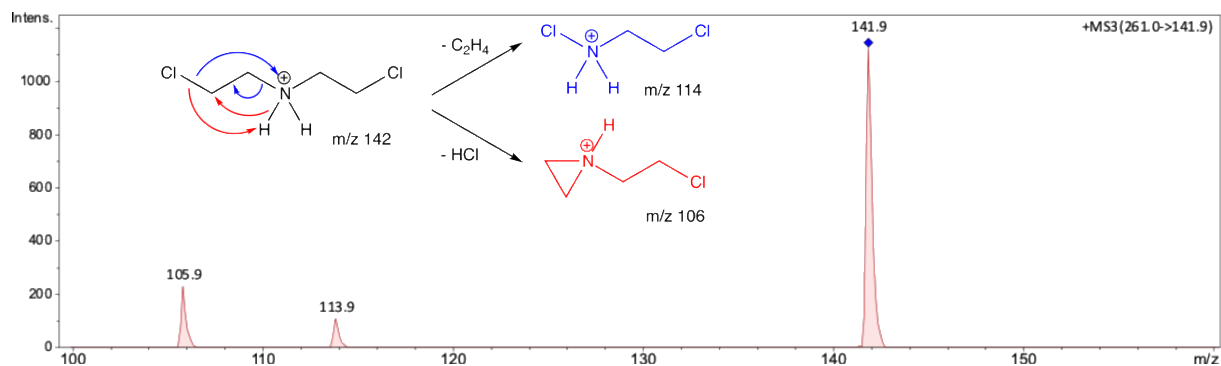
**Figura 5.16.** Propostas estruturais atuais dos fragmentos de  $m/z$  140 e  $m/z$  142.

Para esses dois íons, não se observou dissociação suficiente para prover qualquer informação estrutural, mesmo se combinando o *laser* de  $\text{CO}_2$  com o OPO/OPA para promover o aquecimento dos íons. Assim, como não foi possível registrar seus espectros IRMPD, o teste dessas estruturas putativas, especificamente, foi realizado por meio unicamente de seu padrão de fragmentação CID.

Os íons de  $m/z$  140 e  $m/z$  142 foram, pois, isolados e fragmentados no espectrômetro e seus espectros de massas MS(3) são mostrados a seguir, na Figura 5.17 e na Figura 5.18. Também são apresentados esquemas das fragmentações, que expõem as proposições estruturais para os íons-filho e corroboram as estruturas 140B e 142B como as mais plausíveis no âmbito dos dados que se pôde obter. A proposta de formação do cátion aziridínio concomitante à saída do neutro  $\text{HCl}$  inspirou-se e embasou-se nas características químicas da atuação da droga no DNA (Figura 1.2).



**Figura 5.17.** Espectro de massas MS(3) da sequência de íons  $m/z$  261  $\rightarrow$   $m/z$  140.

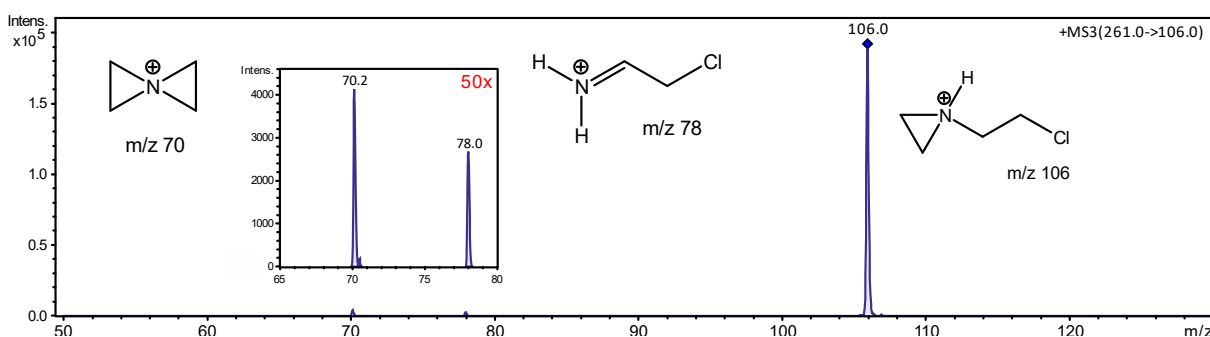


**Figura 5.18.** Espectro de massas MS(3) da sequência de íons  $m/z$  261  $\rightarrow$   $m/z$  142.



Para ambos os íons, nota-se que o padrão de fragmentação é evidentemente análogo, formando espécies com diferença de massa de 2 Da. Ou seja, para ambos, as perdas de neutros são as mesmas: 28 Da, referente ao C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>, e 36 Da, referente ao HCl.

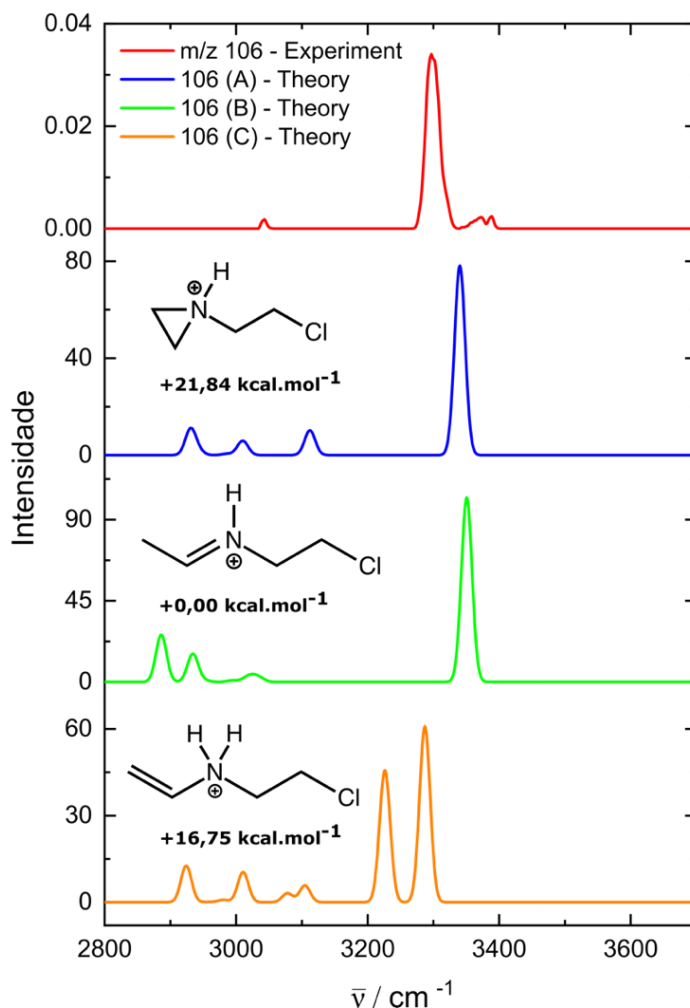
Dentre os fragmentos mostrados acima, cabe salientarmos um, em específico, que já fora observado no espectro inicial da Figura 5.10:  $m/z$  106. Além de ser um fragmento secundário da ciclofosfamida protonada, com a espécie de  $m/z$  142 como intermediário, ele se mostrou outrossim originário diretamente de CP+H<sup>+</sup>, algo sugerido para curva de fragmentação da Figura 5.12a. Para, mais uma vez, corroborar a estrutura proposta, cabe apresentar seu padrão de fragmentação. Na Figura 5.19, consta o espectro de massas que mostra os produtos CID do íon de  $m/z$  106. As recorrentes perdas de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> e de HCl continuam sendo observadas.



**Figura 5.19.** Espectro de massas MS(3) da sequência de íons  $m/z$  261 →  $m/z$  106.

Apesar de não ter sido viável obter espectros vibracionais das espécies anteriores, em se tratando deste fragmento, foi possível registrar o espectro IRMPD. O íon mostrou-se mais facilmente dissociável pelos pulsos do *laser*, enquanto também foi o único dessa faixa de massas – abaixo de 140 Da – a aparecer já em MS(2). A Figura 5.20 contém o espectro experimental do íon isolado, junto dos espectros vibracionais teóricos de duas estruturas propostas para ele.

Inicialmente, e por considerável parte deste trabalho, tinha-se o cátion aziridínio como a única estrutura putativa para o íon de  $m/z$  106, a qual foi modelada computacionalmente. Entretanto, estudos recentes propuseram outras possibilidades, como uma que envolve uma migração de H<sup>-</sup> e o estabelecimento de uma dupla ligação N=C para a formação do cátion imínio.<sup>94,95</sup> Logo, essas outras propostas foram também calculadas e incluídas na comparação com o espectro IRMPD.



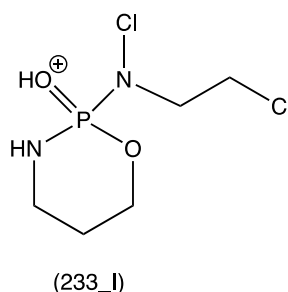
**Figura 5.20.** Espectro vibracional IRMPD do fragmento de  $m/z$  106 com 15 pulsos do *laser*, comparado aos espectros teóricos das estruturas putativas. Frequências teóricas corrigidas pelo fator de escala 0,95. Energias das geometrias calculadas no nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p), em fase gasosa, em relação ao menor valor do conjunto.

A banda principal detectada no experimento é a do estiramento N–H em  $3300\text{ cm}^{-1}$ , que mostra um razoável ajuste com as estruturas 106A e 106B. Este estiramento normalmente aparece na faixa de  $3400\text{ cm}^{-1}$ , porém a carga positiva no Nitrogênio enfraquece um pouco a ligação, o que acarreta a diminuição da frequência vibracional. No tocante à proposta 106C, a presença do grupo  $\text{-NH}_2$  faz com que haja duas vibrações de estiramento, a simétrica e a antissimétrica, observáveis no respectivo espectro teórico. Essas bandas características, contudo, não estão presentes no espectro experimental, ausência esta que restringe as possibilidades de atribuição estrutural do íon às duas primeiras.

Quanto às propostas 106A e 106B, a primeira, do cátion aziridínio, apresenta uma energia quase  $22\text{ kcal/mol}$  maior que a segunda. A forma aberta, do íon imínio, (106B) é, pois, a mais plausível energeticamente, além de ter um bom ajuste à banda experimental. Por isso,

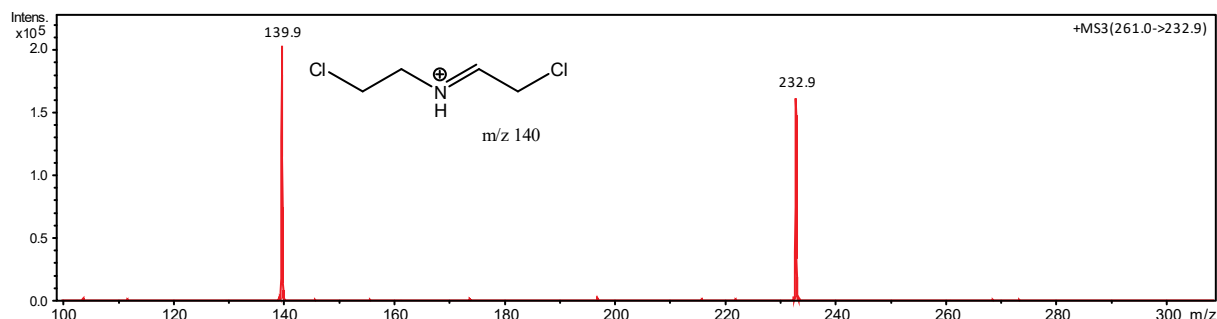
trocou-se as estruturas putativas inicialmente consideradas para os íons  $m/z$  104 e  $m/z$  106 (Figura 5.17 e Figura 5.18), da forma cíclica para a forma aberta. No entanto, é importante ressaltar que valeria, em eventual prosseguimento desta pesquisa, avaliar as energias de ativação para a formação das espécies 106A e 106B, para se ter o elemento cinético além do termodinâmico. Apesar da menor energia da estrutura 106B, o mecanismo para sua formação, em primeira análise, parece mais complexo e, possivelmente, teria uma barreira energética maior, com uma migração de  $H^-$ .

Em se tratando da formação do íon de maior massa ( $m/z$  233) no espectro da Figura 5.10, a fragmentação poderia se referir à perda de CO ou de  $C_2H_4$ , sendo esta segunda possibilidade mais provável, se se considera a estrutura da molécula e o que já foi estudado até então. Em um primeiro momento, imaginou-se que a perda de  $C_2H_4$  seria, como nos diversos casos anteriores, da parte não-cíclica da molécula, que está relacionada à ação antineoplásica. A Figura 5.21 apresenta, assim, a proposta inicial de estrutura para essa espécie.



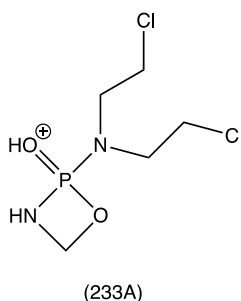
**Figura 5.21.** Proposta estrutural inicial do fragmento de  $m/z$  233.

Apesar de a proposta acima ser muito plausível, ela não se sustentou no decorrer do estudo, uma vez que o fragmento que este íon gera não poderia ser explicado a partir da estrutura 233\_I, como se observa no espectro abaixo.



**Figura 5.22.** Espectro de massas MS(3) da sequência de íons  $m/z$  261  $\rightarrow$   $m/z$  233.

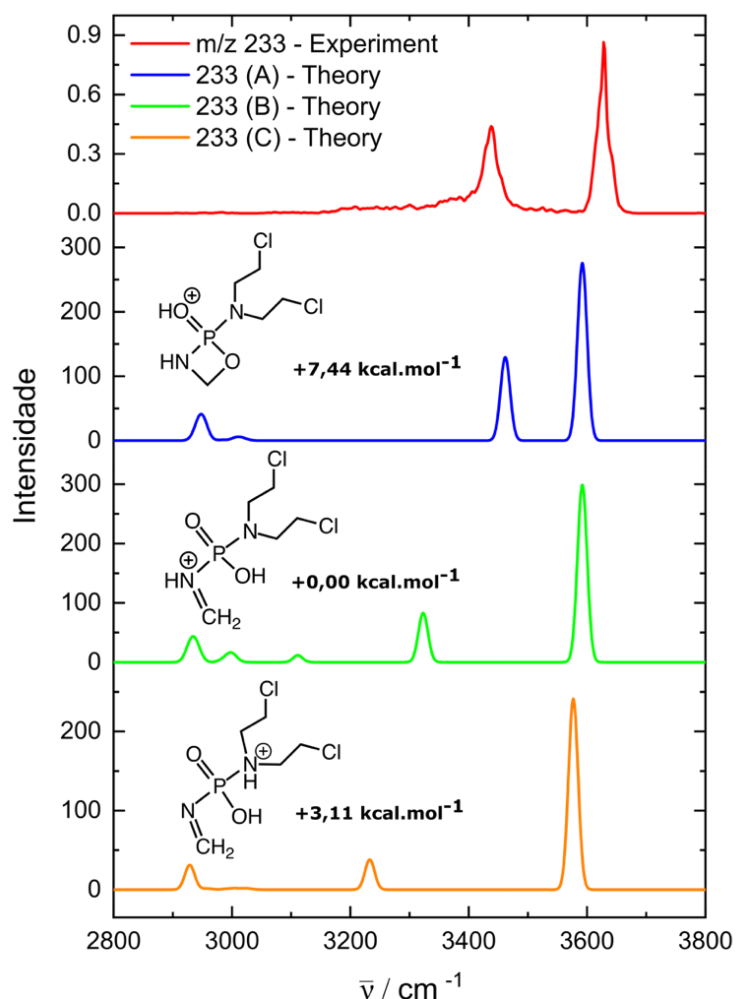
A fragmentação do íon produz a espécie de  $m/z$  140, já discutida aqui anteriormente, e isso contradiz a proposta 233\_I, visto que, para formar este íon-filho, não seria possível que o íon de  $m/z$  233 tivesse perdido etileno da parte não-cíclica. Assim, a outra possibilidade seria a saída de  $C_2H_4$  do ciclo, formando um ciclo com quatro membros (Figura 5.23). Esta não aparenta ser a estrutura mais estável que se poderia propor, mas, em realidade, tem uma energia um pouco mais baixa que a 233\_I – menos de 1 kcal/mol. Apesar de não se ter ainda informações sobre a barreira energética, sabendo-se do comportamento na dissociação, essa é a proposta que se considera a mais plausível.



**Figura 5.23.** Proposta estrutural atual do fragmento de  $m/z$  233.

Com base em publicação recente, mais possibilidades foram incorporadas na análise vibracional comparativa, incluindo-se uma dupla ligação  $N=C$  em vez de um anel fechado, e variando-se a posição da protonação.<sup>95</sup> Em todas as estruturas propostas, o que se procurou manter foi o grupo  $O-H$ , pois se notou a presença desse estiramento no experimento.

Abaixo, apresenta-se o espectro IRMPD da espécie, juntamente aos espectros teóricos das três propostas estruturais e suas respectivas energias relativas.



**Figura 5.24.** Espectro vibracional IRMPD do fragmento de  $m/z$  233 com 5 pulsos do *laser*, comparado aos espectros teóricos das estruturas putativas. Frequências teóricas corrigidas pelo fator de escala 0,95. Energias das geometrias calculadas no nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p), em fase gasosa, em relação ao menor valor do conjunto.

Neste resultado, detectaram-se tanto a banda de estiramento N–H, em  $3440\text{ cm}^{-1}$ , como a de estiramento O–H, em  $3620\text{ cm}^{-1}$ . Enquanto a banda da hidroxila é bastante similar para as três estruturas, a banda de N–H já permite diferenciá-las bem mais quanto ao ajuste ao espectro experimental. No caso da 233A, trata-se de um grupo NH com carga formal zero no Nitrogênio, que costuma absorver radiação com número de onda acima de  $3400\text{ cm}^{-1}$ . Já as outras propostas apresentam o Nitrogênio protonado com carga positiva, o que enfraquece a ligação química em relação à 233A e, por conseguinte, diminui a frequência de vibração do estiramento.

O que difere as estruturas 233B e 233C é o sítio de protonação e a hibridização do Nitrogênio em cada um, o que interfere também na frequência. Na 233B, a vibração N–H envolve um N  $sp^2$ , o que resulta em uma constante de força maior para a ligação em relação ao

mesmo estiramento da estrutura 233C, cuja protonação se dá no Nitrogênio  $sp^3$  ligado às cloroetilias. Por esse motivo, o número de onda dessa banda na última estrutura é ainda menor.

Quando se considera o fator energético, a estrutura 233B pode parecer a mais plausível, por ser a mais estável termodinamicamente. Entretanto, as diferenças de energia são pouco significativas – abaixo de 10 kcal/mol –, e o mais importante a se considerar é a correspondência ao espectro experimental. Como tudo em Ciências da Natureza, a base deve ser a evidência experimental. Nesse aspecto, nota-se um ajuste claramente melhor para a proposta 233A, com o anel de 4 membros. Portanto, para este estudo, considerou-se esta a estrutura putativa mais plausível.

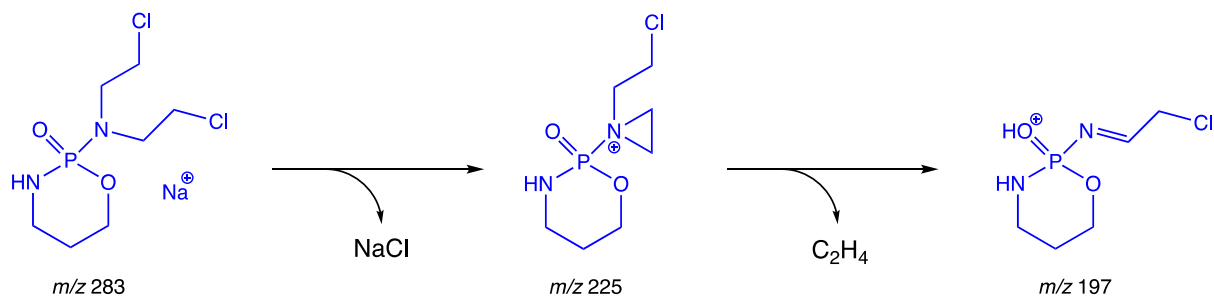
Discutidos todos os fragmentos detectados na dissociação da ciclofosfamida protonada, construiu-se o esquema já apresentado na Figura 5.13.

### 5.5. Fragmentação da ciclofosfamida sodiada ( $CP+Na^+$ )

O trabalho volta-se, por fim, ao padrão de fragmentação do aduto de sódio da ciclofosfamida ( $CP+Na^+$ ), evidenciado no espectro de massas sequencial da Figura 5.11. Devido à maior simplicidade deste sistema em relação às diversas vias de dissociação da  $CP+H^+$ , neste caso, foi viável ir além da elucidação estrutural dos fragmentos por meio da espectroscopia IRMPD. Também foi realizada a modelagem computacional da curva de energia potencial do mecanismo proposto, de modo a avaliar a plausibilidade cinética da via. Ambas as análises são apresentadas nas próximas subseções.

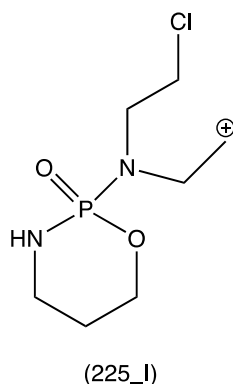
#### 5.5.1 Elucidação estrutural dos fragmentos

A partir da análise do espectro de massas  $MS(2)$  de  $CP+Na^+$ , verificou-se que o padrão de fragmentação da espécie consiste nas perdas de massa de 58 Da e 86 Da, as quais se referem à saída de NaCl e à de  $C_2H_4$  e NaCl respectivamente. Com base na metodologia já explicitada previamente, a proposta apresentada na Figura 5.25, abaixo, foi construída para a estrutura dos fragmentos. A discussão que segue explica o processo que levou a tal conclusão.



**Figura 5.25.** Padrão de fragmentação proposto para a ciclofosfamida sodiada (CP+Na<sup>+</sup>).

Com relação à formação da espécie de  $m/z$  225 a partir da perda de NaCl, uma primeira proposta foi considerar a carga positiva mantendo-se no Carbono que estava diretamente ligado ao Cloro que sai, para formar um carbocátion primário, conforme a estrutura da Figura 5.26.

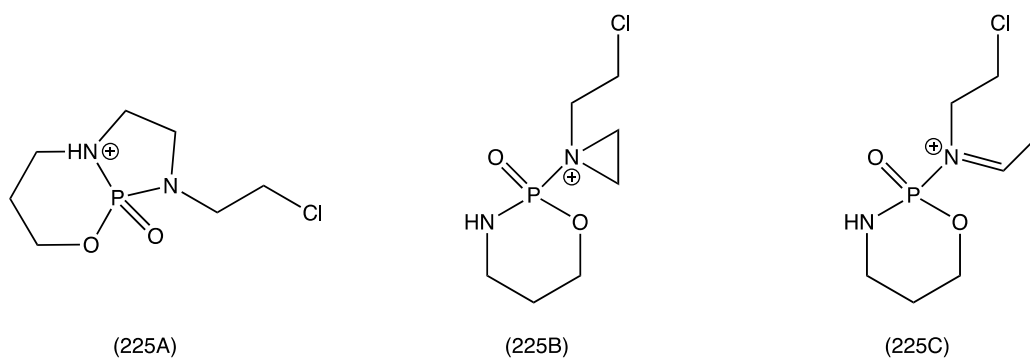


**Figura 5.26.** Proposta estrutural inicial para o fragmento de  $m/z$  225.

Entretanto, como já se poderia supor, esta não é uma configuração das mais estáveis; tanto que o próprio cálculo teórico, na otimização da sua geometria para um mínimo local da superfície de energia, indicou outra possibilidade. Ocorreria, na dissociação da ciclofosfamida, uma N-alkilação intramolecular no Nitrogênio exocíclico, com a formação do cátion aziridínio, que é visto na proposta 225B da Figura 5.27. Essa estrutura, que surgiu naturalmente do cálculo computacional, mimetizou um comportamento correlato ao que acontece com a molécula na formação das ligações cruzadas no DNA (Figura 1.2), o que chamou bastante atenção. É, inclusive, em função desta observação do resultado teórico e de sua similaridade à atuação bioquímica da droga que o cátion aziridínio foi proposto mais vezes na presente pesquisa, na seção 5.4, que trata dos fragmentos de CP+H<sup>+</sup>.

Motivado pela discussão da N-alkilação semelhante ao comportamento bioquímico da CP, decidiu-se, outrossim, propor uma outra possibilidade estrutural para o íon, em que também

haveria uma N-alquilação intramolecular, mas no Nitrogênio endocíclico, deixando ali a carga positiva e formando um biciclo – estrutura 225A. Seria uma forma alternativa de estabilização da carga positiva, inspirada no mecanismo proposto na literatura para o processo de hidrólise da ciclofosfamida (Figura 3.3). Nesse caso, observar-se-ia uma alteração no espectro vibracional, com o *redshift* da banda de estiramento N–H, em decorrência da carga formal não-nula nesse grupo, como já se discutiu na avaliação do íon de  $m/z$  233 anteriormente.

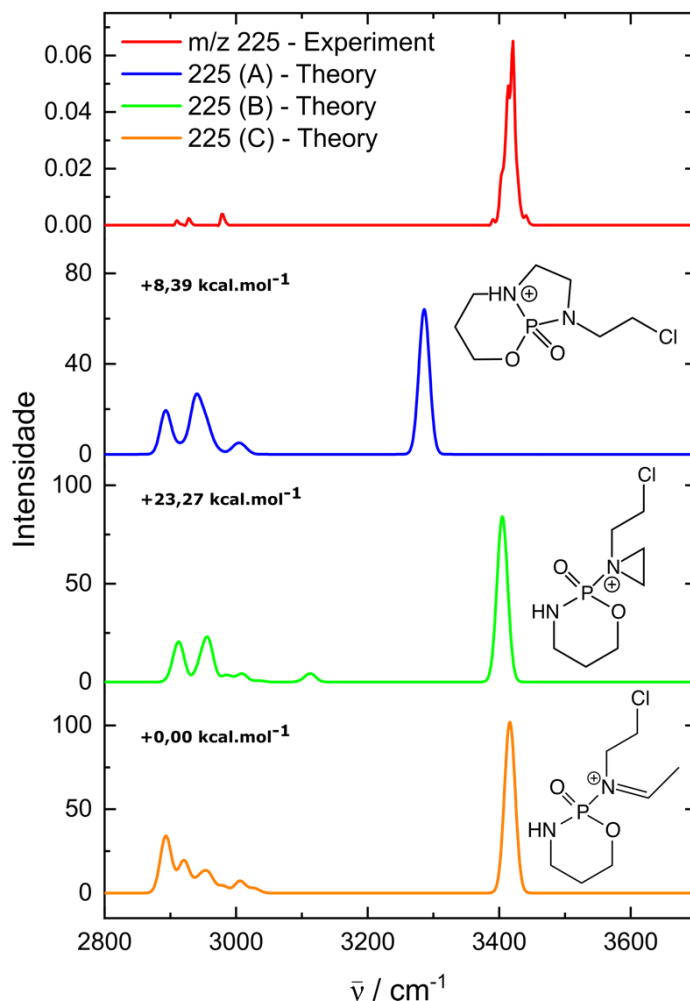


**Figura 5.27.** Propostas estruturais atuais para o fragmento de  $m/z$  225.

No que concerne à proposta 225C, trata-se de uma alternativa ao cátion aziridínio, instigada pela análise de literatura recente que gerou o impasse na atribuição do íon de  $m/z$  106.<sup>94</sup>

Contando com essas três possibilidades, o espectro IRMPD do fragmento de  $m/z$  225 foi comparado aos espectros teóricos, o que se mostra na Figura 5.28.





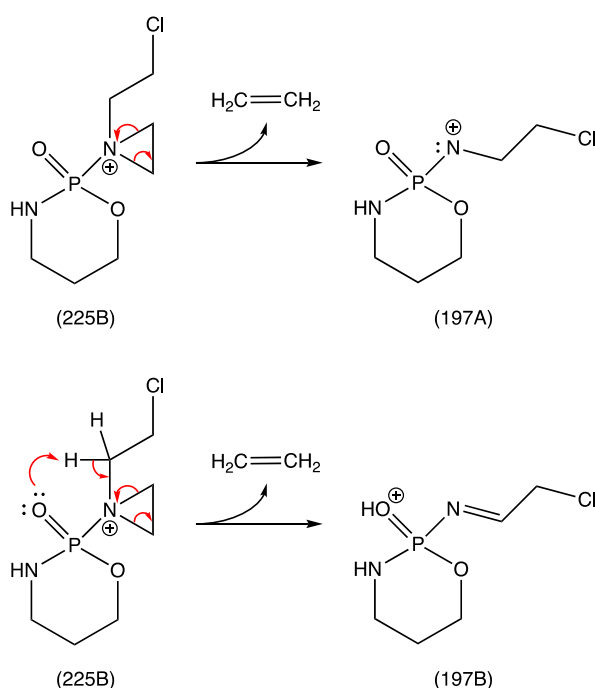
**Figura 5.28.** Espectro vibracional IRMPD do fragmento de  $m/z$  225 com 15 pulsos do *laser*, comparado aos espectros teóricos das estruturas putativas. Frequências teóricas corrigidas pelo fator de escala 0,95. Energias das geometrias calculadas no nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p), em fase gasosa, em relação ao menor valor do conjunto.

Avaliando-se os resultados no tocante às frequências vibracionais, é possível eliminar a estrutura 225A, do biciclo, haja vista o desacordo da frequência do estiramento N–H. Não houve o *redshift* esperado para essa proposta; a banda experimental manteve-se em  $3420\text{ cm}^{-1}$ . Restaram, pois, as alternativas 225B e 225C, para as quais houve o ajuste entre experimento e teoria. Nesse contexto, é pertinente utilizar o valor de energia para definir a estrutura mais plausível; no caso, seria a 225C, com o íon imínio em vez do aziridínio, visto que é  $23\text{ kcal/mol}$  mais estável que a 225B.

Conquanto a estabilidade energética seja um fator deveras relevante, há que se levar em conta, ademais, a viabilidade de formação da espécie – mecanismo e energias de ativação – e a adequação ao prosseguimento da via de fragmentação. Nesse sentido, depara-se com uma questão similar à do íon de  $m/z$  106, porque a estrutura 225C tem menor energia, mas propor e

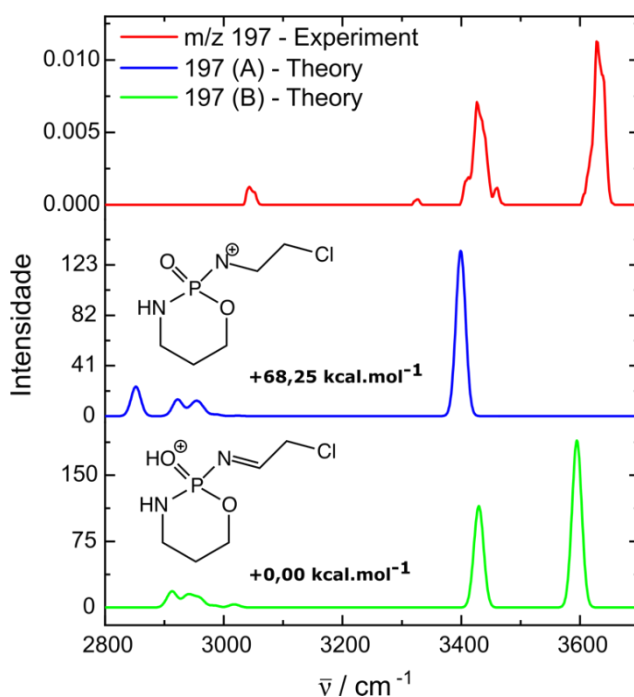
explicar as etapas reacionais que levam à subsequente perda de etileno ( $C_2H_4$ ) observada experimentalmente é muito mais intrincado. Teria de envolver, entre outras etapas, a quebra de uma ligação dupla ( $\pi$  e  $\sigma$ ) de alguma forma. Por isso, escolheu-se por atribuir a 225B, do cátion aziridínio, como a estrutura putativa do íon, mesmo que ainda haja espaço para futuras investigações.

Já no que se refere ao outro fragmento ( $m/z$  197), formado a partir da posterior perda de etileno ( $C_2H_4$ ), considerou-se plausível que a quebra ocorreria na estrutura do cátion aziridínio e que a carga positiva ficaria no Nitrogênio. Entretanto, a carga em um Nitrogênio elétron-deficiente – íon nitrênio –, sabe-se não ser muito estável; há evidências do papel desse íon como intermediário reativo na literatura.<sup>96</sup> Logo, propôs-se uma alternativa, com a migração de um próton para o Oxigênio exocíclico e a formação de uma ligação dupla  $C=N$  para estabilizar o Nitrogênio. Na Figura 5.29, evidenciam-se as duas estruturas propostas, assim como seu mecanismo de formação.



**Figura 5.29.** Propostas estruturais do fragmento de  $m/z$  197, juntamente aos mecanismos de formação.

Em relação às frequências vibracionais, as duas estruturas seriam claramente diferentes, visto que a 197A manteria apenas o estiramento  $N-H$ , enquanto a 197B teria os estiramentos  $N-H$  e  $O-H$ . Isso pode ser visualizado a seguir, na comparação do espectro IRMPD do fragmento de  $m/z$  197 com os espectros teóricos.



**Figura 5.30.** Espectro vibracional IRMPD do fragmento de  $m/z$  197 com 5 pulsos do *laser*, comparado aos espectros teóricos das estruturas putativas. Frequências teóricas corrigidas pelo fator de escala 0,95. Energias das geometrias calculadas no nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p), em fase gasosa, em relação ao menor valor do conjunto.

Como pode ser visto na Figura 5.30, a estrutura plausível para este fragmento é a 197B, uma vez que foram observados os dois modos de estiramento esperados para essa espécie. Além disso, a 197B é quase 70 kcal/mol mais estável que a 197A, como já se esperava qualitativamente.

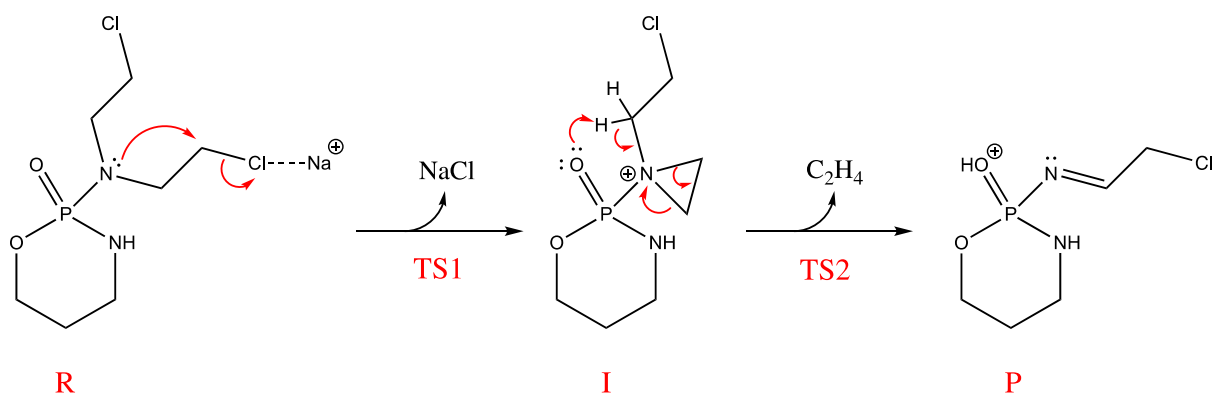
Nestas análises do padrão de fragmentação CID da ciclofosfamida, é notória a essencial contribuição da técnica de espectroscopia IRMPD na elucidação das estruturas das espécies formadas. Apenas com a razão massa-carga dos íons, podem-se fazer inferências. Não obstante, muitas estruturas distintas têm a mesma massa, e é nesse momento que a espectroscopia vibracional se apresenta para proporcionar outra dimensão ortogonal de análise.

Embora essa metodologia seja excelente, há a possibilidade de aprimorar ainda mais a descrição dos sistemas químicos por meio da modelagem computacional dos mecanismos de reação. Assim, o estudo não fica delimitado à avaliação termodinâmica das posições de equilíbrio e pode evidenciar o perfil energético do caminho proposto para a fragmentação – abordagem cinética. Isso traria mais um elemento para descartar ou corroborar propostas para as estruturas dos íons detectados. No caso da fragmentação de  $\text{CP}+\text{Na}^+$ , mais simples, como já exposto, houve a possibilidade de realizar esse estudo cinético teórico, discutido a seguir.

### 5.5.2 Modelagem computacional do mecanismo de fragmentação

Foi realizada a modelagem da superfície de energia potencial do mecanismo de fragmentação proposto para  $CP+Na^+$ , a partir dos resultados dos espectros IRMPD dos fragmentos e da comparação com as frequências teóricas das estruturas putativas. O mecanismo considerado envolve duas etapas: a perda do par iônico NaCl para formação do cátion aziridínio e a subsequente perda de etileno, concomitante à migração de um próton para a formação de uma ligação  $\pi$  entre N e C. Pode-se visualizá-lo na Figura 5.31.

Como, nesta etapa da pesquisa, não mais se objetivava gerar espectros vibracionais teóricos, os cálculos foram realizados com outra metodologia e nível de teoria, mais adequados para previsões de valores de energia eletrônica: M06-2X/aug-cc-pVDZ. Também se manteve o cálculo em fase gasosa, em vista de ser essa a condição da dissociação na cela do espectrômetro.



**Figura 5.31.** Mecanismo de fragmentação proposto para a ciclofosfamida sodiada ( $CP+Na^+$ ).

As geometrias e energias obtidas por cálculos computacionais referem-se aos mínimos locais de reagente (R), intermediário (I), produto (P) e dos neutros NaCl e  $C_2H_4$ , além dos pontos de sela do primeiro e do segundo estados de transição (TS1 e TS2). Em se tratando do TS2, muitos cálculos foram realizados na busca do processo concertado de saída de  $C_2H_4$  e de migração do próton. Contudo, não foi possível localizá-lo exatamente; o TS2 apresentado se refere apenas à migração do próton para o Oxigênio, sem que seja observada a saída de etileno. Pode-se, pois, esperar que haja alguma pequena diferença de energia, provavelmente para baixo, para o TS2 exato do processo.

A seguir, são apresentadas as principais geometrias otimizadas e as energias eletrônicas somadas à energia do ponto zero ( $E+ZPE$ ), na Figura 5.32 e na Tabela 5-3 respectivamente.

Nelas, a notação “I --- NaCl” indica o fragmento intermediário I interagindo com o neutro NaCl que acabou de ser perdido na dissociação; a notação “I + NaCl” significa que as espécies já estão completamente separadas, e a energia foi obtida a partir da soma de dois cálculos independentes.

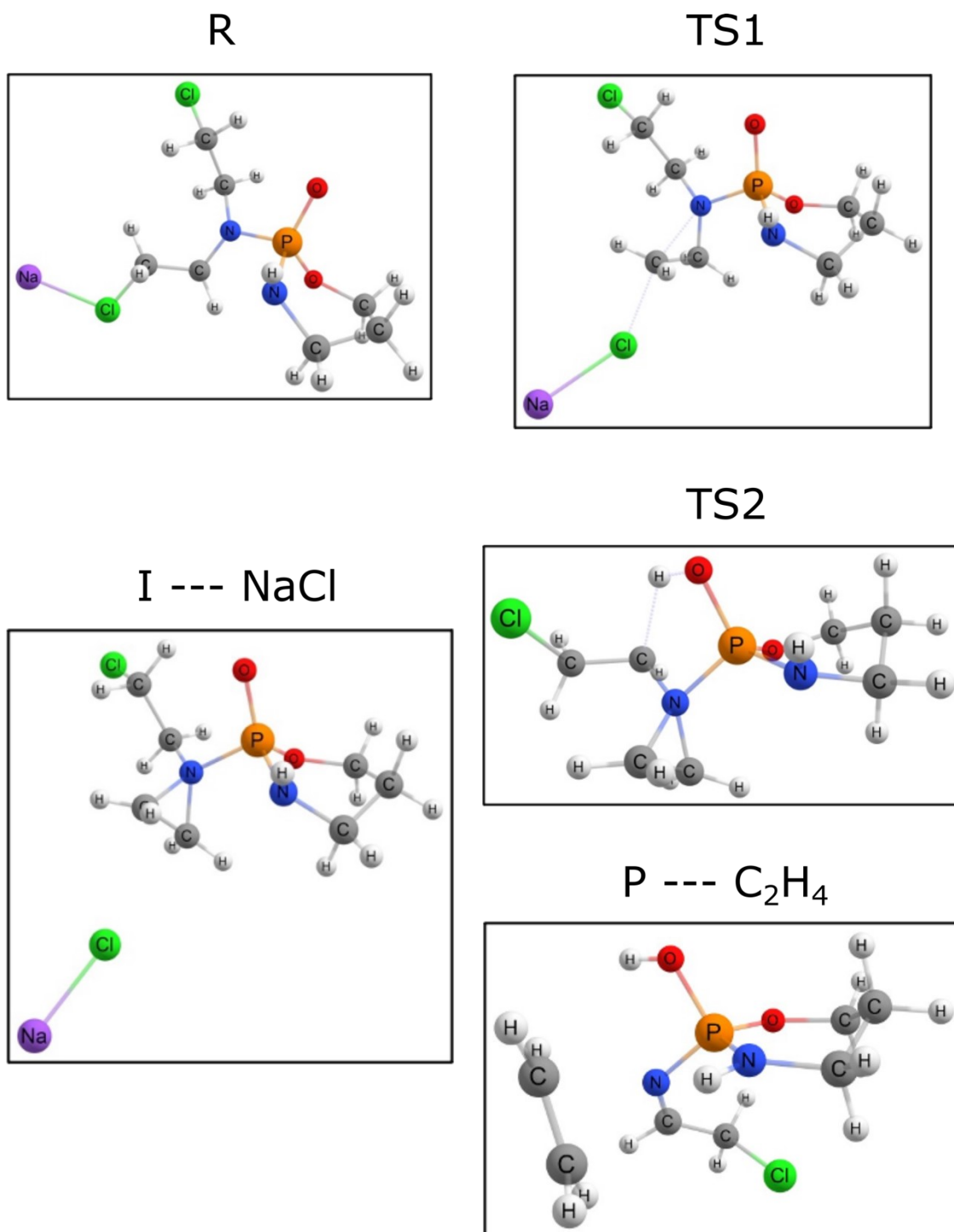
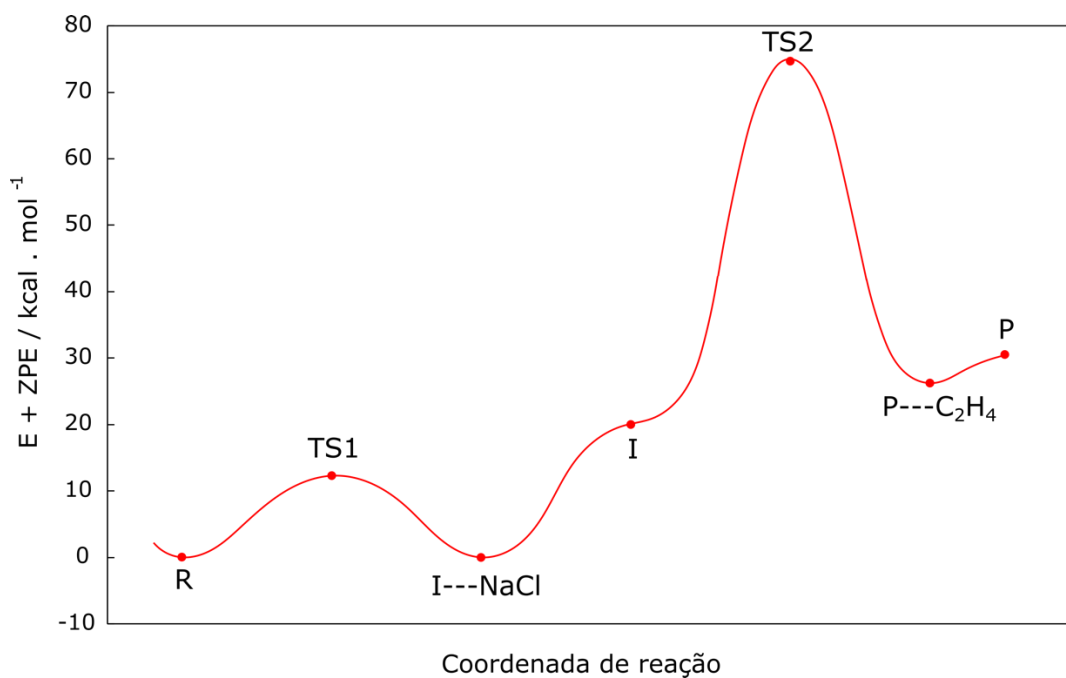


Figura 5.32. Principais geometrias otimizadas para o mecanismo de fragmentação de CP+Na<sup>+</sup>.

**Tabela 5-3.** Energia eletrônica somada à energia do ponto zero para a construção da superfície de energia potencial (PES) da fragmentação de CP+Na<sup>+</sup>. Valores relativos à geometria do íon-pai (reagente).

<i>Pontos na PES</i>	<i>E+ZPE / kcal . mol<sup>-1</sup></i>
R	0,00
TS1	12,25
I --- NaCl	-0,95
I + NaCl	19,94
TS2 + NaCl	74,69
P --- C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> + NaCl	26,23
P + C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> + NaCl	30,53

A seguir, apresenta-se uma ilustração gráfica da curva de energia para o mecanismo de fragmentação.



**Figura 5.33.** Variação da energia (E+ZPE) ao longo da coordenada de reação para a fragmentação da CP+Na<sup>+</sup>.

A análise da primeira etapa do mecanismo evidencia uma energia de ativação relativamente baixa, de 12,25 kcal/mol. Além disso, apesar da discussão prévia sobre o cátion aziridínio ter energia mais alta do que a outra proposta estrutural do íon de  $m/z$  225 (Figura 5.28), nota-se que a energia do complexo do intermediário (I---NaCl) é muito próxima e até um pouco abaixo da do complexo do reagente ( $R = CP---Na^+$ ). Isso posto, confere-se maior credibilidade a essa proposta estrutural: ela é facilmente alcançada a partir da CP sodiada, ao ter uma barreira reacional baixa e estar próxima desse precursor em energia e em coordenadas estruturais.

Não basta que a energia do mínimo local da estrutura proposta seja a mais baixa, como é o caso da 225C na Figura 5.27. É necessário que este mínimo esteja próximo do precursor na superfície de energia potencial (PES), de maneira a tornar a via de fragmentação factível – viabilidade de o sistema percorrer o caminho reacional. Nesse sentido, a proposta 225B do aziridínio, modelada aqui, mostra-se bastante coerente, o que, contudo, ainda poderia ser reforçado pela modelagem e comparação com o perfil energético do mecanismo de dissociação considerando a outra estrutura, do íon imínio.

Já em se tratando da segunda etapa, antes se considera a separação do complexo com o par iônico NaCl, para formar “I”. Em seguida, tem-se a migração de  $H^+$  para o Oxigênio, passando por TS2, e a saída de etileno para formar o produto, com uma energia de ativação de 54,75 kcal/mol. Há, portanto, uma barreira energética significativamente maior que a primeira, o que não é de todo um impeditivo para a dissociação. Essa alta energia de ativação pode, inclusive, explicar as intensidades relativas do espectro de massas MS(2) do aduto de sódio (Figura 5.11), no qual o sinal do fragmento secundário “P”, de  $m/z$  197, apresenta intensidade ínfima frente aos outros. Poucos íons do intermediário ( $m/z$  225) se formariam, na CID, com energia suficiente para ultrapassar o TS2 e formar “P”.

## 6. Conclusões

No desenvolvimento deste projeto, realizou-se o estudo da ciclofosfamida por espectrometria de massas sequencial e espectroscopia IRMPD para identificá-la e caracterizá-la, tanto por sua assinatura vibracional como por seu padrão de fragmentação. Nesse sentido, procedeu-se uma investigação mais minuciosa de cada um dos fragmentos formados, com o intuito de ampliar o conhecimento a respeito da molécula e de seu comportamento. Procurou-se, também, analisar o sítio de protonação do medicamento por meio das frequências vibracionais, o que indicou a presença de uma mistura de isômeros de protonação, inferência esta corroborada por cálculos de solvatação.

A elucidação dos fragmentos, tanto da ciclofosfamida protonada como do aduto de sódio, foi empreendida por dissociação induzida por colisão (CID) e, principalmente, por espectroscopia IRMPD. Os dados empíricos providos por essas técnicas ou embasaram propostas estruturais já existentes ou, ao contrário, descartaram propostas que se acreditavam muito plausíveis. No que concerne ao padrão de quebra da molécula, algumas vias mostraram-se bastante recorrentes, como a perda de HCl – ou NaCl no caso do aduto de sódio. Defende-se que essa via possa levar à formação do cátion aziridínio, um comportamento deveras interessante, tendo em vista a notória correlação com o que ocorre na ação do metabólito da droga no DNA. Outra fragmentação comum é a perda de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>, geralmente proveniente dos grupos cloroetilais e podendo ser resultado da quebra do cátion aziridínio.

Nesse contexto, vale salientar a relevância da utilização de cálculos teóricos de otimização de geometria e de frequências vibracionais. Embora seja possível obter algumas informações a partir de espectros vibracionais sem o auxílio dos cálculos de estrutura, uma análise mais aprofundada, que preze pela diferenciação de estruturas similares e confôrmeros, requererá a comparação a espectros vibracionais teóricos de propostas estruturais para extrair conclusões mais acertadas.

O conhecimento adquirido das vias comuns de fragmentação da ciclofosfamida é algo importante de se ressaltar, pois auxilia na previsão de como essa molécula pode agir em outros contextos. Tendo isso em vista, decidiu-se aprofundar a descrição de uma dessas vias ao modelar computacionalmente a superfície de energia potencial do mecanismo da reação.

O presente projeto finaliza-se com uma descrição significativamente aprofundada a respeito da estrutura da ciclofosfamida e de seu comportamento em fase gasosa no espectrômetro de massas, o que será útil no aperfeiçoamento de técnicas analíticas para detectar



---

e quantificar este fármaco em diferentes contextos amostrais. Há, contudo, bastante espaço para prosseguir a pesquisa desse sistema químico, como foi já demonstrado. Poder-se-á, por exemplo, realizar a modelagem teórica dos mecanismos para outras vias de fragmentação, estudar computacionalmente o processo de dissociação dos íons por meio de dinâmica molecular, performar experimentos de espectroscopia IRMPD na região do *fingerprint* e IRPD criogênico por pré-dissociação para aumentar a robustez dos dados empíricos. Ademais, eventuais outras estruturas putativas podem surgir e serem consideradas para avaliação. Este trabalho não é, pois, definitivo, nem se encerra em si mesmo, similarmente a todo o conjunto de conhecimento científico até hoje construído.

## 7. Considerações finais

Seria ingenuidade de um cientista achar que encontrará respostas completas e definitivas para suas perguntas de pesquisa. Essa ilusão, todavia, costuma ser bastante difundida na comunidade científica, por uma tendência cultural e histórica de adesão à visão indutivista do fazer ciência. A noção de indução como o método de construção do conhecimento, proposta por Francis Bacon (séc. XVII) e John Stuart Mill (séc. XIX), pode ser resumida à busca de conclusões e verdades universais por meio de inferências a partir do acúmulo imparcial de fatos experimentais, sem hipóteses prévias. À época, tratava-se de uma tentativa de contraponto à preponderância de especulações metafísicas e abstratas, com a busca pela objetividade e pela valorização do conhecimento empírico.<sup>97</sup>

O ideal indutivista, porém, é falho em descrever uma metodologia verossímil para a ciência e para como ela lida com a investigação do mundo natural; além de ser ineficaz para, logicamente, alcançar asserções universais.<sup>98</sup> Cientistas têm, irremediavelmente, um viés teórico ao escolherem quais observações fazer e quais experimentos planejar e executar. Não existindo, assim, imparcialidade na coleta de dados empíricos, já que sempre há uma preconcepção direcionando as investigações científicas. Ademais, a maioria das teorias e hipóteses formuladas descrevem a natureza em termos abstratos, não identificáveis diretamente na simples descrição de eventos observados, como é o caso da seleção natural, da gravidade e do magnetismo. Não é possível, por indução, extrair essas teorias de observações e experimentos, uma vez que não são meras generalizações; são modelos, criações da mente, propostas intuitivas de como o mundo possivelmente funciona.<sup>97</sup>

Uma descrição mais fidedigna do *modus operandi* da ciência assiste no método hipotético-dedutivista, cujo expoente defensor é Karl Popper.<sup>99</sup> Nesse modelo, essencialmente, a busca por asserções de validade universal e inequívoca é abandonada, e o avanço do conhecimento científico se dá pela formulação de hipóteses a respeito de algum fenômeno ou característica do mundo natural. Essas conjecturas, obtidas de maneira heurística e por um processo lógico denominado abdução, devem ser, então, testadas quanto à sua plausibilidade teórica e ao seu poder explicativo e, principalmente, preditivo no campo experimental.

Na epistemologia popperiana, o princípio fundamental do método científico seria a refutação. A partir de uma hipótese a ser investigada, extraem-se previsões por meio da dedução, que são, por sua vez, contrastadas com os resultados de experimentos desenhados para colocá-la à prova. Isso posto, se os dados empíricos coletados não correspondem à previsão

deduzida, a hipótese é falseada, e é necessário buscar outra para dar conta de explicar o fenômeno. Se, no entanto, os resultados confirmam a previsão, não se pode dizer que a conjectura está correta, mas sim que ela, até o momento, continua plausível e coerente com os fatos. O conhecimento científico é, pois, um arcabouço de teorias que não podem ser efetivamente comprovadas como verdadeiras e que se sustentam, em suma, pela funcionalidade e eficácia em explicar o mundo. A demarcação de ciência para esse filósofo é justamente que as hipóteses sejam passíveis de refutação por observação e experimentação (falseabilidade); se não há essa possibilidade, um conhecimento não seria científico.<sup>98</sup>

Essa discussão filosófica pode parecer supérflua no dia a dia da pesquisa acadêmica em Ciências da Natureza, porém está longe de sê-lo. O trabalho relatado nesta dissertação conta com diversos indícios desse intrincado processo de construção de conhecimento. As massas das espécies iônicas e as de seus fragmentos e as bandas vibracionais dos espectros IRMPD constituem os dados empíricos do estudo. A partir deles, são propostas as hipóteses a respeito das estruturas dessas espécies. É bem verdade que se tem como pilares as observações experimentais, mas há, também, uma contribuição humana interpretativa e inventiva na formulação. Essas conjecturas estruturais são, então, utilizadas para deduzir, por modelagem teórica, previsões vibracionais e termodinâmicas que possam, por sua vez, ser contrastadas com os espectros para refutação ou corroboração. Não se tratam, de todo, de conclusões indiscutíveis advindas da análise neutra dos fatos, mas, sim, de um movimento lógico hipotético-dedutivo, conquanto muitos acreditem ser indutivo.

O caráter humano e o contorno sócio-histórico-cultural a que o conhecimento científico está submetido é evidente. O solene trabalho de Thomas Kuhn em *Filosofia da Ciência* aborda habilmente tal complexidade, de como evolui o sistema de crenças da comunidade científica. Na maioria do tempo, a pesquisa se caracterizaria pelo esforço contumaz e leal de forçar a natureza e as observações a se adequarem aos paradigmas teóricos que os cientistas da época foram moldados a acreditar e defender.<sup>100</sup> Não se pode, entretanto, afirmar que as posições da Ciência equivalem a crenças sem embasamento empírico como astrologia ou homeopatia. Existe um lastro na realidade, nos fatos observáveis, que coloca o método científico em outro patamar de credibilidade. Nesse sentido, vale citar outro filósofo, Imre Lakatos, que propõe um modelo bastante estruturado para melhor descrever essa dialética, em sua obra *A Metodologia dos Programas de Pesquisa Científicos*.<sup>101</sup>

O reconhecimento da complexidade epistemológica envolvida no fazer ciência é essencial aos membros da comunidade acadêmica. Ao compreendermos que há uma incerteza

precípua de qualquer conhecimento, por mais estabelecido, corroborado e estruturado que seja, estaremos mais preparados para lidar com correções e para nos permitirmos considerar paradigmas teóricos diversos do nosso próprio.

Mais primordial ainda, principalmente na atualidade, é o entendimento, mesmo que basal, dessas noções filosóficas pelo público geral. Quando se lhe explicita o poder e, igualmente, os limites da Ciência, fortalece-se o combate a pseudociências e a movimentos anticientíficos. Isso pode ser parcialmente efetivado pela divulgação mais ativa e inteligível, por parte das instituições de pesquisa, dos conhecimentos produzidos para fora de seus muros; mas o campo central de empenho e de transformação é a educação básica. Se se alcança uma alfabetização científica verdadeiramente civilizatória, que faça frente a visões equivocadas a respeito da construção dos saberes humanos, os futuros adultos constituirão uma sociedade que admite que todo conhecimento pode ser questionado, modificado ou complementado, mas que também entenda de que forma isso deve proceder.

## 8. Referências

1. Roser, M. Life Expectancy. *OurWorldInData.org* <https://ourworldindata.org/life-expectancy> (2019).
2. World Health Organization. Mortality and global health estimates. *Global Health Observatory*.: *World Health Organization* 1 [https://www.who.int/gho/mortality\\_burden\\_disease/en/](https://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/en/) (2018).
3. Patel, M. *et al.* Pharmaceuticals of Emerging Concern in Aquatic Systems: Chemistry, Occurrence, Effects, and Removal Methods. *Chem. Rev.* **119**, 3510–3673 (2019).
4. Aragão, R. B. de A., Semensatto, D., Calixto, L. A. & Labuto, G. Pharmaceutical market, environmental public policies and water quality: the case of the São Paulo Metropolitan Region, Brazil. *Cad. Saude Publica* **36**, (2020).
5. *Pharmaceutical Residues in Freshwater*. (OECD, 2019). doi:10.1787/c936f42d-en.
6. Bertholf, R. L. Gas Chromatography and Mass Spectrometry in Clinical Chemistry. in *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (John Wiley & Sons, Ltd, 2006). doi:10.1002/9780470027318.a0532.
7. Ternes, T. A. Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *TrAC Trends Anal. Chem.* **20**, 419–434 (2001).
8. Ferrando-Climent, L., Rodriguez-Mozaz, S. & Barceló, D. Development of a UPLC-MS/MS method for the determination of ten anticancer drugs in hospital and urban wastewaters, and its application for the screening of human metabolites assisted by information-dependent acquisition tool (IDA) in sewage samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 5937–5952 (2013).
9. Yuan, M., Breitkopf, S. B., Yang, X. & Asara, J. M. A positive/negative ion-switching, targeted mass spectrometry-based metabolomics platform for bodily fluids, cells, and fresh and fixed tissue. *Nat. Protoc.* **7**, 872–881 (2012).
10. Wang, Y., Liu, S., Hu, Y., Li, P. & Wan, J.-B. Current state of the art of mass spectrometry-based metabolomics studies – a review focusing on wide coverage, high throughput and easy identification. *RSC Adv.* **5**, 78728–78737 (2015).
11. C. Corraera, T. *et al.* Probing the geometry reorganization from solution to gas-phase in putrescine derivatives by IRMPD, 1H-NMR and theoretical calculations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **19**, 24330–24340 (2017).
12. Santos Fernandes, A., Maître, P. & Carita Corraera, T. Evaluation of the Katsuki–Sharpless Epoxidation Precatalysts by ESI-FTMS, CID, and IRMPD Spectroscopy. *J. Phys. Chem. A* **123**, 1022–1029 (2019).
13. Hernandez, O., Isenberg, S., Steinmetz, V., Glish, G. L. & Maitre, P. Probing Mobility-Selected Saccharide Isomers: Selective Ion–Molecule Reactions and Wavelength-Specific IR Activation. *J. Phys. Chem. A* **119**, 6057–6064 (2015).
14. Schneider, B. B., Nazarov, E. G., Londry, F., Vouros, P. & Covey, T. R. Differential mobility spectrometry/mass spectrometry history, theory, design optimization, simulations, and applications. *Mass Spectrom. Rev.* **35**, 687–737 (2016).
15. Polfer, N. C. Infrared multiple photon dissociation spectroscopy of trapped ions. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 2211–2221 (2011).

16. Reilly, J. P. Ultraviolet photofragmentation of biomolecular ions. *Mass Spectrom. Rev.* **28**, 425–447 (2009).
17. MacAleese, L. & Maître, P. Infrared spectroscopy of organometallic ions in the gas phase: From model to real world complexes. *Mass Spectrom. Rev.* **26**, 583–605 (2007).
18. Valle, J. J. *et al.* Free electron laser-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry facility for obtaining infrared multiphoton dissociation spectra of gaseous ions. *Rev. Sci. Instrum.* **76**, 023103 (2005).
19. Friedman, O. M. & Seligman, A. M. Preparation of N-Phosphorylated Derivatives of Bis- $\beta$ -chloroethylamine. *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 655–658 (1954).
20. Brock, N. & Wilmanns, H. Wirkung eines zyklischen N-Lost-Phosphamidesters auf experimentell erzeugte Tumoren der Ratte 1. *DMW - Dtsch. Medizinische Wochenschrift* **83**, 453–458 (1958).
21. Arnold, H., Bourseaux, F. & Brock, N. Chemotherapeutic Action of a Cyclic Nitrogen Mustard Phosphamide Ester (B 518-ASTA) in Experimental Tumours of the Rat. *Nature* **181**, 931–931 (1958).
22. Fleming, R. A. An Overview of Cyclophosphamide and Ifosfamide Pharmacology. *Pharmacother. J. Hum. Pharmacol. Drug Ther.* **17**, 146S-154S (1997).
23. Ludeman, S. M. The chemistry of the metabolites of cyclophosphamide. *Curr. Pharm. Des.* **5**, 627–43 (1999).
24. Goodman, L. S. *et al.* NITROGEN MUSTARD THERAPY: Use of Methyl-Bis(Beta-Chloroethyl)amine Hydrochloride and Tris(Beta-Chloroethyl)amine Hydrochloride for Hodgkin's Disease, Lymphosarcoma, Leukemia and Certain Allied and Miscellaneous Disorders. *J. Am. Med. Assoc.* **132**, 126–132 (1946).
25. Brock, N. Oxazaphosphorine cytostatics: past-present-future. *Cancer Res.* **49**, 1–7 (1989).
26. Gomori, G. Histochemical Demonstration of Sites of Phosphamidase Activity. *Exp. Biol. Med.* **69**, 407–409 (1948).
27. Emadi, A., Jones, R. J. J. & Brodsky, R. A. A. Cyclophosphamide and cancer: Golden anniversary. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **6**, 638–647 (2009).
28. Brock, N. & Hohorst, H.-J. Metabolism of cyclophosphamide. *Cancer* **20**, 900–904 (1967).
29. De Jonge, M. E., Huitema, A. D. R., Rodenhuis, S. & Beijnen, J. H. Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. *Clin. Pharmacokinet.* **44**, 1135–1164 (2005).
30. Buerge, I. J., Buser, H.-R., Poiger, T. & Müller, M. D. Occurrence and Fate of the Cytostatic Drugs Cyclophosphamide and Ifosfamide in Wastewater and Surface Waters †. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 7242–7250 (2006).
31. Grzesiuk, M. *et al.* How cyclophosphamide at environmentally relevant concentration influences *Daphnia magna* life history and its proteome. *PLoS One* **13**, 1–14 (2018).
32. Araújo, A. P. C. *et al.* Anti-cancer drugs in aquatic environment can cause cancer: Insight about mutagenicity in tadpoles. *Sci. Total Environ.* **650**, 2284–2293 (2019).
33. Ekhardt, C. *et al.* Simultaneous quantification of cyclophosphamide and its active metabolite 4-hydroxycyclophosphamide in human plasma by high-performance liquid

- chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC–MS/MS). *J. Chromatogr. B* **854**, 345–349 (2007).
34. Kasel, D., Jetter, A., Harlfinger, S., Gebhardt, W. & Fuhr, U. Quantification of cyclophosphamide and its metabolites in urine using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**, 1472–1478 (2004).
  35. Gómez-Canela, C. *et al.* Occurrence of cyclophosphamide and epirubicin in wastewaters by direct injection analysis–liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **19**, 3210–3218 (2012).
  36. Friedman, O. M., Bien, S. & Chakrabarti, J. K. Studies on the Hydrolysis of Cyclophosphamide. I. Identification of N-(2-Hydroxyethyl)-N'-(3-hydroxypropyl)ethylenediamine as the Main Product. *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 4978–4979 (1965).
  37. Chakrabarti, J. K. & Friedman, O. M. Studies on the hydrolysis of cyclophosphamide II. Isolation and characterization of intermediate hydrolytic products. *J. Heterocycl. Chem.* **10**, 55–58 (1973).
  38. Gilard, V. *et al.* Chemical and Biological Evaluation of Hydrolysis Products of Cyclophosphamide. *J. Med. Chem.* **37**, 3986–3993 (1994).
  39. Friedman, O., Myles, A. & Colin, M. Cyclophosphamide and related phosphoramidate mustards: current status and future prospects. *Adv. Cancer Chemother.* **1**, 143–204 (1979).
  40. He, F., Hendrickson, C. L. & Marshall, A. G. Baseline Mass Resolution of Peptide Isobars: A Record for Molecular Mass Resolution. *Anal. Chem.* **73**, 647–650 (2001).
  41. Cooper, H. J. & Marshall, A. G. Electrospray Ionization Fourier Transform Mass Spectrometric Analysis of Wine. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5710–5718 (2001).
  42. Hughey, C. A., Rodgers, R. P. & Marshall, A. G. Resolution of 11 000 Compositionally Distinct Components in a Single Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrum of Crude Oil. *Anal. Chem.* **74**, 4145–4149 (2002).
  43. Glish, G. L. & Vachet, R. W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 140–150 (2003).
  44. Zuccato, E. *et al.* Cocaine in surface waters: a new evidence-based tool to monitor community drug abuse. *Environ. Heal.* **4**, 14 (2005).
  45. Maux, D., Enjalbal, C., Martinez, J., Aubagnac, J.-L. & Combarieu, R. Static secondary ion mass spectrometry to monitor solid-phase peptide synthesis. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **12**, 1099–1105 (2001).
  46. Amantonico, A., Urban, P. L. & Zenobi, R. Analytical techniques for single-cell metabolomics: state of the art and trends. *Anal. Bioanal. Chem.* **398**, 2493–2504 (2010).
  47. Aebersold, R. A mass spectrometric journey into protein and proteome research. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **14**, 685–695 (2003).
  48. Klitzke, C. F. *et al.* Petroleomics by Ultrahigh-Resolution Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Energy & Fuels* **26**, 5787–5794 (2012).
  49. Gross, J. H. *Mass Spectrometry*. (Springer International Publishing, 2017). doi:10.1007/978-3-319-54398-7.
  50. Bhardwaj, C. & Hanley, L. Ion sources for mass spectrometric identification and imaging

- of molecular species. *Nat. Prod. Rep.* **31**, 756–767 (2014).
51. Covey, T. R., Thomson, B. A. & Schneider, B. B. Atmospheric pressure ion sources. *Mass Spectrom. Rev.* **28**, 870–897 (2009).
  52. Kebarle, P. & Verkerk, U. H. Electrospray: From ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. *Mass Spectrom. Rev.* **28**, 898–917 (2009).
  53. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. & Whitehouse, C. M. Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. *Science (80-. )*. **246**, 64–71 (1989).
  54. Robinson, C. V. John Fenn (1917–2010). *Nature* **469**, 300–300 (2011).
  55. Dole, M. *et al.* Molecular Beams of Macroions. *J. Chem. Phys.* **49**, 2240–2249 (1968).
  56. Iribarne, J. V. & Thomson, B. A. On the evaporation of small ions from charged droplets. *J. Chem. Phys.* **64**, 2287 (1976).
  57. Ikonomou, M. G., Blades, A. T. & Kebarle, P. Electrospray mass spectrometry of methanol and water solutions suppression of electric discharge with SF 6 gas. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2**, 497–505 (1991).
  58. Wilm, M. S. & Mann, M. Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last? *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* **136**, 167–180 (1994).
  59. Wilm, M. & Mann, M. Analytical Properties of the Nanoelectrospray Ion Source. *Anal. Chem.* **68**, 1–8 (1996).
  60. Karas, M., Bahr, U. & Dülcks, T. Nano-electrospray ionization mass spectrometry: addressing analytical problems beyond routine. *Fresenius. J. Anal. Chem.* **366**, 669–676 (2000).
  61. Paul, W. & Steinwedel, H. Notizen: Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld. *Zeitschrift für Naturforsch. A* **8**, 448–450 (1953).
  62. Paul, W. Electromagnetic Traps for Charged and Neutral Particles(Nobel Lecture). *Angew. Chemie Int. Ed. English* **29**, 739–748 (1990).
  63. Yoshinari, K. Theoretical and numerical analysis of the behavior of ions injected into a quadrupole ion trap mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**, 215–223 (2000).
  64. March, R. E. & Todd, J. F. J. *Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry*. (John Wiley & Sons, Inc., 2005).
  65. March, R. E. Quadrupole ion traps. *Mass Spectrom. Rev.* **28**, 961–989 (2009).
  66. Chiaradia, M. C., Collins, C. H. & Jardim, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Quim. Nova* **31**, 623–636 (2008).
  67. Levsen, K. & Schwarz, H. Stoßaktivierungsmassenspektrometrie - eine neue Sonde zur Strukturbestimmung von Ionen in der Gasphase. *Angew. Chemie* **88**, 589–599 (1976).
  68. Shukla, A. K. & Futrell, J. H. Tandem mass spectrometry: dissociation of ions by collisional activation. *J. Mass Spectrom.* **35**, 1069–1090 (2000).
  69. Kind, T. & Fiehn, O. Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry. *Bioanal. Rev.* **2**, 23–60 (2010).



70. Stedwell, C. N. & Polfer, N. C. Spectroscopy and the Electromagnetic Spectrum. in *Laser Photodissociation and Spectroscopy of Mass-separated Biomolecular Ions* (eds. Polfer, N. C. & Dugourd, P.) vol. 83 1–20 (Springer International Publishing, 2013).
71. Grant, E. R., Schulz, P. A., Sudbo, A. S., Shen, Y. R. & Lee, Y. T. Is Multiphoton Dissociation of Molecules a Statistical Thermal Process? *Phys. Rev. Lett.* **40**, 115–118 (1978).
72. Lupo, D. W. & Quack, M. IR-laser photochemistry. *Chem. Rev.* **87**, 181–216 (1987).
73. Bayat, P., Lesage, D. & Cole, R. B. TUTORIAL: ION ACTIVATION IN TANDEM MASS SPECTROMETRY USING ULTRA-HIGH RESOLUTION INSTRUMENTATION. *Mass Spectrom. Rev.* **39**, 680–702 (2020).
74. Brodbelt, J. S. Photodissociation mass spectrometry: new tools for characterization of biological molecules. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 2757–2783 (2014).
75. Prell, J. S., O'Brien, J. T. & Williams, E. R. IRPD spectroscopy and ensemble measurements: Effects of different data acquisition and analysis methods. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **21**, 800–809 (2010).
76. Penna, T. C. *et al.* Development of a photoinduced fragmentation ion trap for infrared multiple photon dissociation spectroscopy. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **34**, (2020).
77. Roehr, N. P. & Polfer, N. C. Light Sources. in *Laser Photodissociation and Spectroscopy of Mass-separated Biomolecular Ions* (eds. Polfer, N. C. & Dugourd, P.) 21–47 (Springer International Publishing, 2013). doi:10.1007/978-3-319-01252-0\_2.
78. Giordmaine, J. A. & Miller, R. C. Tunable Coherent Parametric Oscillation in LiNbO<sub>3</sub> at Optical Frequencies. *Phys. Rev. Lett.* **14**, 973–976 (1965).
79. Bosenberg, W. R. & Guyer, D. R. Broadly tunable, single-frequency optical parametric frequency-conversion system. *J. Opt. Soc. Am. B* **10**, 1716–1722 (1993).
80. van Outersterp, R. E. *et al.* Evaluation of table-top lasers for routine infrared ion spectroscopy in the analytical laboratory. *Analyst* **146**, 7218–7229 (2021).
81. Gerhards, M. High energy and narrow bandwidth mid IR nanosecond laser system. *Opt. Commun.* **241**, 493–497 (2004).
82. Svelto, O. Gas, Chemical, Free Electron, and X-Ray Lasers. in *Principles of Lasers* 431–474 (Springer US, 2010). doi:10.1007/978-1-4419-1302-9.
83. Lemaire, J. *et al.* Gas Phase Infrared Spectroscopy of Selectively Prepared Ions. *Phys. Rev. Lett.* **89**, 273002 (2002).
84. Oepts, D., van der Meer, A. F. G. & van Amersfoort, P. W. The Free-Electron-Laser user facility FELIX. *Infrared Phys. Technol.* **36**, 297–308 (1995).
85. Woodin, R. L., Bomse, D. S. & Beauchamp, J. L. Multiphoton dissociation of molecules with low power continuous wave infrared laser radiation. *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 3248–3250 (1978).
86. Foresman, J. B. & Frisch, A. *Exploring Chemistry With Electronic Structure Methods.* (Gaussian Inc., 1996).
87. Morgon, N. H. & Coutinho, K. *Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular.* (Editora Livraria da Física, 2007).

88. Halls, M. D., Velkovski, J. & Schlegel, H. B. Harmonic frequency scaling factors for Hartree-Fock, S-VWN, B-LYP, B3-LYP, B3-PW91 and MP2 with the Sadlej pVTZ electric property basis set. *Theor. Chem. Acc.* **105**, 413–421 (2001).
89. Rodrigues-Oliveira, A. F., M. Ribeiro, F. W., Cervi, G. & C. Correra, T. Evaluation of Common Theoretical Methods for Predicting Infrared Multiphotonic Dissociation Vibrational Spectra of Intramolecular Hydrogen-Bonded Ions. *ACS Omega* **3**, 9075–9085 (2018).
90. Origin(Pro), Version 9.0. OriginLab Corporation, Southampton, MA, USA.
91. Zhurko, G. A. Chemcraft - Graphical Program for Visualization of Quantum Chemistry Computations. (2018).
92. Frisch, M. J. *et al.* *Gaussian 09, Revision D.01.* (2013).
93. Marenich, A. V., Cramer, C. J. & Truhlar, D. G. Universal Solvation Model Based on Solute Electron Density and on a Continuum Model of the Solvent Defined by the Bulk Dielectric Constant and Atomic Surface Tensions. *J. Phys. Chem. B* **113**, 6378–6396 (2009).
94. MAEKAWA, M. *et al.* A Direct Injection LC/ESI-MS/MS Analysis of Urinary Cyclophosphamide as an Anticancer Drug for Monitoring Occupational Exposure. *CHROMATOGRAPHY* **39**, 41–47 (2018).
95. Korany, M., Ritacco, I., Dabbish, E., Sicilia, E. & Shoeib, T. Analysis of the Fragmentation Pathways for the Collision-Induced Dissociation of Protonated Cyclophosphamide: A Mass Spectrometry and Quantum Mechanical Study. *J. Chem. Inf. Model.* **62**, 4411–4419 (2022).
96. Mota, C. J. A. Íons nitrênio. *Quim. Nova* **21**, 453–458 (1998).
97. Ayala, F. J. Darwin and the scientific method. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 10033–10039 (2009).
98. Papineau, D. Methodology: The Elements of the Philosophy of Science. in *Philosophy I: A Guide Through the Subject* (ed. Grayling, A. C.) (Oxford University Press, 1998).
99. Popper, K. R. *Conjectures and Refutations: The Growth of Scientific Knowledge.* (Routledge, 1962).
100. Kuhn, T. S. *The Structure of Scientific Revolutions.* (University of Chicago Press, 1962).
101. Lakatos, I. *The Methodology of Scientific Research Programmes: Volume 1: Philosophical Papers.* (Cambridge University Press, 1978).

## SÚMULA CURRICULAR

**Nome:** André Santos Fernandes

**Local e data de nascimento:** São Paulo, SP, 21/07/1995

### 1. EDUCAÇÃO

Período	Título ou atividade	Instituição
2010 – 2012	Ensino Médio	Colégio Albert Sabin
2013 – 2017	Bacharelado em Química	Instituto de Química - USP
2013 – 2017	Licenciatura em Química	Instituto de Química - USP
2019 – presente	Mestrado em Química	Instituto de Química - USP

**Prêmio Lavoisier** – agosto 2017

Láurea concedida pelo Conselho Regional de Química – IV Região (CRQ-IV) – Melhor Aluno do Curso de Bacharelado em Química, no Instituto de Química da Universidade de São Paulo, no período de 2013 a 2017.

**Prêmio Lavoisier** – abril 2018

Láurea concedida pelo Conselho Regional de Química – IV Região (CRQ-IV) – Melhor Aluno do Curso de Licenciatura em Química, no Instituto de Química da Universidade de São Paulo, no período de 2013 a 2017.

### 2. FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

- Workshop of Advanced Mass Spectrometry, *MCPL – IQ-USP*, 21 horas (9h teoria e 12h prática), 2018.
- Avaliação educacional: teoria e prática, *Academia Primeira Escolha*, 26 horas, 2019.
- Neurociência na Escola: Formação para Educadores, *Instituto Conectomus*, 24 horas, 2020.
- Oficina de Elaboração de Rubricas, *Academia Primeira Escolha*, 16 horas, 2020.
- As relações interpessoais e a convivência ética na escola, *GPEM - Grupo de Estudos e Pesquisas em Educação Moral - UNICAMP/UNESP*, 16 horas, 2022.

### 3. HISTÓRICO PROFISSIONAL

#### a) Acadêmico

- Mestrado em Química, Instituto de Química da Universidade de São Paulo.
  - janeiro/2019 – presente
  - *Caracterização do padrão de fragmentação da ciclofosfamida por espectroscopia vibracional de íons na fase gasosa*
- Estágio de Pesquisa no Exterior, Université Paris-Sud, Laboratoire de Chimie Physique, Orsay, França.
  - março/2016 – julho/2016
  - *Characterization of Sharpless reaction intermediates by IRMPD spectroscopy at CLIO free-electron laser facility*
  - Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE-IC/FAPESP)
- Iniciação Científica, Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Molecular Chemical Physics Laboratory.
  - agosto/2015 – novembro/2016
  - *Isolamento de intermediários reativos da epoxidação de Sharpless e caracterização dessas espécies por cálculos teóricos*
  - Bolsa IC/FAPESP
- Iniciação Científica, Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Molecular Chemical Physics Laboratory.
  - agosto/2014 – julho/2015
  - *Estudo de mecanismos de reação de espécies organometálicas*
  - Bolsa PIBIC/CNPq

#### b) Relacionado ao ensino

- Professor de Química, Colégio Albert Sabin.
  - 2018 – presente
  - *Aulas de Química da grade curricular do Ensino Médio; cursos preparatórios para as olimpíadas de Química; aulas do programa de módulo de aprofundamento para alunos com alto desempenho; orientação, coordenação e avaliação de projetos de pré-iniciação científica.*

- Professor Voluntário, Escola Olímpica de Química.
  - 2014 – 2015 e 2018 – 2020
  - *Curso realizado no Instituto de Química da USP no mês de julho com duração de uma semana, para alunos de Ensino Médio participantes de Olimpíadas de Química.*
- Professor Voluntário, Cursinho do Núcleo de Consciência Negra da USP.
  - 2017 – 2018
  - *Aulas semanais de Química preparatórias para o vestibular em um cursinho popular.*

#### 4. PUBLICAÇÕES

##### a) Artigos

- SANTOS FERNANDES, ANDRÉ; MAÎTRE, PHILIPPE; CARITA CORRERA, THIAGO. *Evaluation of the Katsuki-Sharpless Epoxidation Pre-catalysts by ESI-FTMS, CID and IRMPD Spectroscopy*. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 123, n. 5, p. 1022-1029, 2019.
- CARITA CORRERA, THIAGO; SANTOS FERNANDES, ANDRÉ; MOTA REGINATO, MARCELO; DUCATI, LUCAS C; BERDEN, GIEL; OOMENS, JOS. *Probing the geometry reorganization from solution to gas phase in putrescine derivatives by IRMPD, H-NMR and theoretical calculations*. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 19, p. 24330-24340, 2017.
- CARITA CORRERA, THIAGO; SANTOS FERNANDES, ANDRÉ; RIVEROS, JOSE M. *Dynamic/Thermochemical Balance Drives Unusual Alkyl/F Exchange Reactions in Siloxides and Analogs*. **The Journal of Physical Chemistry A**, p. 1644-1651, 2016.
- BARBEIRO, CRISTIANE S.; VASCONCELOS, STANLEY N. S.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, JÚLIO; CARACELLI, IGNEZ; PIMENTA, DANIEL C.; RODRIGUES, ANA CLARA B.; FERNANDES, ANDRÉ S.; CORRERA, THIAGO C.; BASTOS, ERICK L.; STEFANI, HÉLIO A. *Chlorinated 2-hydroxynaphthalenoxazolines: Synthesis, Reaction Mechanism and Fluorescence Properties*. **ChemistrySelect**, v. 1, p. 5647-5652, 2016.

##### b) Apresentações de trabalho

- SANTOS FERNANDES, ANDRÉ; MAÎTRE, PHILIPPE; CARITA CORRERA, THIAGO. *Sharpless Epoxidation Catalyst Studied by ESI-MS and IRMPD Spectroscopy*. (46th World Chemistry Congress, 2017).
- SANTOS FERNANDES, ANDRÉ; MAÎTRE, PHILIPPE; CARITA CORRERA, THIAGO. *Evaluation of Sharpless epoxidation by ESI-MS and IRMPD spectroscopy*. (21st International Mass Spectrometry Conference, 2016).
- SANTOS FERNANDES, ANDRÉ; CARITA CORRERA, THIAGO. *Estudo de Mecanismos de Reação de Espécies Organometálicas*. (23º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP – SIICUSP 2015).