BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo
19.069

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE
ANÁLISE POR ELETROFORESE CAPILAR COM DETECÇÃO DE
FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER (LIF) E
ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE
FTALOCIANINAS SULFONADAS METALADAS**

**Marcia Rodrigues dos Santos
Tese de Doutorado**

**Prof. Dr. Joel Camargo Rubim
Orientador
Profa. Dra. Marina F. M. Tavares
Co-orientadora**

São Paulo

6 de Junho de 2000

DEDALUS - Acervo - CQ

30100002909

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

S237d Santos, Marcia Rodrigues dos
Desenvolvimento de método de análise por eletroforese
capilar com detecção de fluorescência induzida por laser (LIF) e
espectrometria de massas de ftalocianinas sulfonadas metaladas
/ Marcia Rodrigues dos Santos. -- São Paulo, 2000.
184p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador : Rubim, Joel Camargo
Co-orientador : Tavares, Marina Franco Maggi

1. Eletroforese capilar : Química analítica 2. Espectrometria
de massa : Química analítica I. T. II. Rubim, Joel Camargo,
orientador III. Tavares, Marina Franco Maggi, co-orientador.

543.0871 CDD

**“Desenvolvimento de Método de Análise por Eletroforese Capilar com
Detecção de Fluorescência Induzida por Laser (LIF) e Espectrometria
de Massas de Ftalocianinas Sulfonadas Metaladas”**

MARCIA RODRIGUES DOS SANTOS

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à
obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área: Físico-Química.

Aprovada por:

Prof. Dr. JOEL CAMARGO RUBIM
IQ - USP
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. CLAUDIMIR LÚCIO DO LAGO
IQ - USP

Prof. Dr. MAURÍCIO DA SILVA BAPTISTA
IQ - USP

Prof. Dr. JOÃO BATISTA FERNANDES
UFSCar

Prof. Dr. EMANUEL CARRILHO
IQSC - USP

SÃO PAULO
06 DE JUNHO DE 2000.

Agradecimentos

Agradeço ao Prof. Dr. Joel Camargo Rubim, orientador sempre, por confiar no meu trabalho e em minha capacidade para desenvolvê-lo.

Agradeço igualmente à Profa. Dra. Marina F. M. Tavares por ser exemplo de profissional e ser humano, por acreditar sempre na minha capacidade de realização. Foi um grande privilégio conhecê-la e trabalhar num objetivo comum.

Aos meus queridos amigos do IQ e em especial ao pessoal do Laboratório de Eletroforese Capilar e Espectroscopia Molecular.

Agradeço especialmente aos professores: Dr. Oswaldo Sala, Profa. Dra. Marcia L. A. Temperini, Profa. Dra. Dalva Lúcia A. Faria, Prof. Dr. Yoshio Kawano, Profa. Dra. Suzana I. C. Torresi, Profa. Dra. Elizabeth Areas, Prof. Dr. Luis Fernando Cappa de Oliveira, Profa. Dra. Rosana Colombara e Prof. Dr. Mauro Carlos Costa Ribeiro

Agradeço igualmente aos funcionários do IQ-USP, Biblioteca e em especial Sr. Paulo P. Silva, Sr. Nivaldo Torres, Sra. Elzita, Rodolfo, Milton, Chico e Jailton.

De uma maneira muito especial agradeço à José Alberto Fracassi Silva pela valiosa ajuda profissional na idealização do sistema de injeção eletrocinética para o sistema implementado e pela amizade sempre e a Maria Carolina pelos espectros de massas. À Anna Regina S. Valentim que apesar da distância foi e é uma amiga sempre presente. Paola Corio e Mônica Barreto minhas parceiras, Valdemir, Marcão, Paula, Zé, Six, Alexandre, Jovem e Regina.

Ao Prof. Dr David M. Goodall cuja colaboração foi vital para a conclusão desta tese.

Ao Prof. Dr. Trevor Dransfield responsável pelo espectrômetro de massas do departamento de química da Universidade de York.

Agradecimentos Especiais

A Deus.

Aos meus pais, irmã & cunhado, avó e familiares que também me apoiaram e foram tão cúmplices nos momentos extremos de alegria e dificuldade.

Há pessoas que conviveram comigo neste período e que não fazem mais parte da minha vida. Agora tenho apenas a mensagem que deixaram e suas lembranças. Injusto seria se a elas também não externasse meu agradecimento.

Ao Prof. Dr. David M. Goodall e sua esposa Denise que tão gentilmente me acolheram em sua residência por ocasião de minha visita à Universidade de York.

To the person that is now part of my life.

Agradeço à FAPESP, Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa e auxílios concedidos.

Ao British Council e CAPES pelos auxílios concedidos.

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE ANÁLISE POR ELETROFORESE CAPILAR
COM DETECÇÃO DE FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER (LIF) E
ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE FTALOCIANINAS SULFONADAS METALADAS**

ABREVIATURAS UTILIZADAS NESTA TESE	i
ABSTRACT	ii
RESUMO	iv
INTRODUÇÃO	1
FOTOTERAPIA DINÂMICA DO CÂNCER	2
ELETROFORESE CAPILAR	6
ESPECTROMETRIA DE MASSAS	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
CAPÍTULO 1 – IMPLEMENTAÇÃO DE UM SISTEMA DE ELETROFORESE CAPILAR COM DETECÇÃO DE FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER	
1.1 INTRODUÇÃO	23
1.2 PARTE EXPERIMENTAL	24
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
1.4 CONCLUSÃO	36
1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
CAPÍTULO 2 – SÍNTESE, PURIFICAÇÃO E ANÁLISE DE CÁTIOS, ÂNIOS E CONTAMINANTES ORGÂNICOS DA FTALOCIANINA SULFONADA DE ZINCO POR ELETROFORESE CAPILAR	39
2.1 INTRODUÇÃO	39
2.2 PARTE EXPERIMENTAL	41
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
2.4 CONCLUSÕES	63
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
CAPÍTULO 3 – ANÁLISE DE FTALOCIANINAS SULFONADAS DE ZINCO, LUTÉCIO E DISPRÓSIO POR ELETROFORESE CAPILAR– SOLUÇÃO LIVRE E ESPECTROMETRIA DE MASSAS	
3.1 INTRODUÇÃO	65
3.2 PARTE EXPERIMENTAL	66
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
3.4 CONCLUSÕES	153
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	158
CAPÍTULO 4 – ANÁLISE DE FTALOCIANINAS DISULFONADAS DE LUTÉCIO E DISPRÓSIO POR CROMATOGRAFIA ELETROKINÉTICA MICELAR	
4.1 INTRODUÇÃO	160
4.2 PARTE EXPERIMENTAL	161
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	163
4.4 CONCLUSÕES	175
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	175
TRABALHOS FUTUROS	176
CURRICULUM VITAE	177
APÊNDICE	179

Abreviaturas utilizadas nesta tese

ALA	Ácido Amino Leuvulínico
CCD	Dispositivo de Carga Acoplada
CE	Eletroforese Capilar
CEC	Eletrocromatografia
CID	Dissociação Induzida por Colisão
CIEF	Eletroforese Capilar por Focalização Isoelétrica
CGE	Eletroforese Capilar em Gel
CITP	Isotacoforese
CTAB	Cetil Trimetil Amônio
CZE	Eletroforese Capilar de Zona ou Solução Livre
ESI	Electrospray Ionization
DyPcS	Ftalocianina Sulfonada de Disprósio
DyPcS ₂	Ftalocianina Dissulfonada de Disprósio
DyPcS ₄	Ftalocianina Tetrassulfonada de Disprósio
HIBA	Ácido Hidróxi Isobutírico
HCOOH	Ácido Fórmico
HPD	Hematoporfirina
LIF	Fluorescência Induzida por Laser
LuPcS	Ftalocianina Sulfonada de Lutécio
LuPcS ₂	Ftalocianina Dissulfonada de Lutécio
LuPcS ₄	Ftalocianina Tetrassulfonada de Lutécio
MEKC	Cromatografia Eletrocínética Micelar
MeOH	Metanol
MS	Espectro de Massas
M/Z	Massa/Carga
Pcs	Ftalocianinas
PDT	Fototerapia Dinâmica do Câncer
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
ZnPcS ₂	Ftalocianina Dissulfonada de Zinco
ZnPcS ₄	Ftalocianina Tetrassulfonada de Zinco
ZnPcS	Ftalocianina Sulfonada de Zinco

ABSTRACT

In this work, the synthesis, purification and analysis of sulphonated metallo-phthalocyanines, used as therapeutical drugs in the therapy of cancer, were proposed. The analysis was conducted by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection as well as mass spectrometry.

The first chapter discusses the implementation of a capillary electrophoresis system coupled to a Raman spectrometer, comprising a CCD detector, which was actually used as a fluorescence detector. An electronic device was also built to allow electrokinetic injections. Besides the characterization of the homemade system, it is also detailed in this chapter, the effect of the CCD binning on the detection limit of the Zn-tetrasulfonated phthalocyanine, which is in the order of 10^{-11} mol L⁻¹.

Chapter 2 focuses on the synthesis and purification strategies for the Zn-disulfonated phthalocyanine, monitored by capillary electrophoresis. Among the contaminants, inorganic cations and anions were screened as well as organic species in the final product, by using different wavelengths and discrete electrolytes. This study showed that purification procedures known in the literature as salting-out, acid-base wash, Soxhlet extraction and percolation through silica gel column, when used as a single procedure, are not sufficient to purify the synthetic product. Several combinations of two procedures were attempted and the best results were obtained when the acid-base wash followed by a percolation in silica gel column was employed.

In Chapter 3, several electrolyte systems for the capillary electrophoresis and mass spectrometry analysis of zinc, lutecium and dysprosium di- and tetra-sulfonated phthalocyanines were evaluated. An

interesting correlation between the mass spectrometry results and the species in the electropherogram was done for citrate and CAPS buffer, in neutral, basic and acidic media. Moreover, the addition of SDS in the citrate buffer, in the concentration range of 3 to 150 mmol.L⁻¹, revealed an interesting interaction between the phthalocyanine, charged to different degrees, and the micelle. SDS micelles occur in the citrate buffer in a concentration above 7 mmol.L⁻¹ SDS. This interaction was discussed in terms of retention factor, k' and partition coefficient, K .

RESUMO

Neste trabalho sintetizamos e monitoramos a purificação de ftalocianinas sulfonadas de zinco, utilizadas como drogas terapêuticas no tratamento do câncer, utilizando eletroforese capilar com detecção por fluorescência induzida por laser e espectrometria de massas.

O primeiro capítulo discute a implementação de um sistema de eletroforese capilar acoplado a um espectrômetro Raman dotado de um detector do tipo CCD. Para este sistema foi desenvolvido um sistema de injeção eletrocinética próprio. Neste capítulo discutimos também o efeito de binning do CCD permitiu alcançar limites de detecção da ordem de $10^{-11} \text{ mol.L}^{-1}$.

O capítulo 2 enfoca a síntese e purificação das ftalocianinas multisulfonadas de zinco e a análise dos produtos purificados por eletroforese capilar. Foram analisados cátions, ânions e contaminantes orgânicos. Este estudo mostrou que os métodos de purificação descritos na literatura como "salting-out", a lavagem ácido – base, extração por soxhlet e percolação em coluna, quando utilizados independentemente, não são suficientes para purificar as ftalocianinas. É necessário um processo de purificação combinado. Fizemos várias combinações dos processos de purificação e verificamos que o melhor resultado foi obtido para a combinação entre lavagem ácido - base e a percolação em coluna de sílica-gel.

No capítulo 3 foram avaliados vários meios eletrolíticos para a análise das ftalocianinas de zinco, lutécio e disprósio como citrato e CAPS, a utilização de aditivos como SDS ao tampão citrato. A utilização de SDS como aditivo ao citrato numa concentração que variou de 3 a 75 mmol.L^{-1} mostrou uma interessante interação entre as ftalocianinas da amostra com diferentes cargas e as micelas de SDS (as micelas já existem em meio aquoso de citrato com 7 mmol.L^{-1} de SDS como aditivo). Esta interação será discutida em termos de k' (fator capacidade) e conseqüentemente seu coeficiente de partição com as micelas. Neste capítulo também discutiremos a atribuição dos eletroferogramas baseados na espectroscopia de massas obtidos em meio neutro, alcalino e ácido das ftalocianinas sulfonadas de zinco, disprósio e lutécio.

INTRODUÇÃO

A motivação para esta tese, a meu ver, é auto consistente. Após ter escolhido a eletroforese capilar como técnica para desenvolver meu doutoramento, vários temas foram considerados, entretanto o estudo das ftalocianinas sulfonadas metaladas particularmente chamou minha atenção.

Em primeiro lugar trata-se da investigação de um método de análise de ftalocianinas enquanto drogas para o tratamento do câncer. O tipo de tratamento que estamos falando – Fototerapia Dinâmica (PDT) - não é como a quimioterapia convencional, mas sim um método que, entre outras vantagens, apresenta efeitos colaterais infinitamente menos intensos e, principalmente índices bastante encorajadores de sobrevida.

Embora a PDT ainda seja desconhecida no Brasil, alguns esforços já foram apontados no tratamento do câncer de pele através da utilização do ácido amino-leuvulínico (ALA) na Escola Paulista de Medicina. Nos Estados Unidos, Europa e Japão, drogas como Photofrin, cujo princípio ativo são porfirinas, já vêm sendo utilizadas desde 94 no tratamento de vários tipos de tumores.

Neste ínterim, mais do que um trabalho interessante, interpreto como um dever como ser humano desenvolvê-lo, uma vez que qualquer contribuição no combate ao câncer é justificativa suficiente para o desenvolvimento de um trabalho neste sentido.

A seguir pretendo apresentar sucintamente alguns aspectos importantes que serão discutidos nesta tese. Primeiramente, pretendo descrever o que é e como funciona a fototerapia dinâmica do câncer, em seguida os conceitos básicos sobre eletroforese capilar e uma breve introdução a respeito da espectrometria de massas.

Fototerapia Dinâmica do Câncer

Agentes terapêuticos seletivos constituem um que desejados alvos da farmacologia na atualidade. O desafio de desenvolver medicamentos ou agentes terapêuticos seletivos, que afetem somente o tecido alterado, é o mais árduo a ser alcançado. Em muitas doenças como o câncer, tal seletividade é ainda mais difícil de se atingir¹.

Os primeiros estudos envolvendo o uso de compostos os quais adquirem atividade terapêutica quando irradiados por luz datam do início do século, mas o seu grande crescimento data da década de 70^{2,3}. A este tipo de tratamento dá-se o nome de fototerapia dinâmica (PDT). Neste tratamento, um corante é administrado via intravenosa e como resultado de propriedades ainda não bem esclarecida dos tecidos malignos, o corante é retido preferencialmente pelo tecido de tumores sólidos. A subsequente exposição à luz, engatilha uma cadeia de eventos, resultando na necrose do tumor. Nesta cadeia de eventos tem-se a excitação da molécula sensibilizadora para um estado tripleto de longa vida. No decaimento da fosforescência, a energia é transferida para o oxigênio, levando à formação de oxigênio singleto, espécie responsável pela morte celular.

Os primeiros corantes ou fotosensibilizadores utilizados nos testes clínicos para fototerapia dinâmica do câncer, consistiam de uma mistura de derivados de hematoporfirinas (Figura 1). Mais tarde junto com seus produtos comerciais Photofrin I e II, entre outros, estas drogas conquistaram um lugar de destaque na história da fototerapia dinâmica do câncer. Esta foi a primeira geração de fotosensibilizadores⁴.

Idealmente, uma droga para PDT deve preencher vários pré-requisitos, como por exemplo, além de ser seletivo pelo tecido tumoral deve:

1. absorver na região do vermelho ou infravermelho próximo no espectro eletromagnético onde o tecido humano é transparente;
2. apresentar efeitos colaterais reduzidos ou inexistentes;
3. gerar oxigênio singleto;
4. apresentar um produto final de composição conhecida.

Fig. 1 Estrutura de uma Hematoporfirina

Apesar de terem sido muito utilizados em ensaios clínicos, esta classe de compostos apresentam sérias desvantagens. Não são seletivos como desejado e causam sensibilidade na pele, por várias semanas após a aplicação. A banda de absorção em aproximadamente 630 nm é muito fraca. Estes compostos apresentam-se como uma mistura complexa e variável de lote para lote, impossibilitando o isolamento de pelo menos um componente ativo principal. A complexidade destas misturas vem dos prováveis isômeros de posição e estereoisômeros das HPD, além da formação de agregados alterando a composição de cada lote do produto.

Na tentativa de melhorar os agentes fotosensibilizadores, muitas pesquisas têm sido devotadas a outras moléculas potencialmente candidatas a agentes fotosensibilizadores. Utilizou-se como critérios de avaliação para a segunda geração de fotosensibilizadores, a toxicidade e estabilidade, parâmetros fotofísicos, hidrofobicidade e hidrofiliidade, a intensidade da absorção na região do vermelho e que o medicamento seja preferencialmente constituído de uma substância única e não uma mistura complexa como no caso do Photofrin.

As primeiras observações feitas sobre a afinidade das ftalocianinas (Pcs) por tecidos tumorais datam de 1951⁵, mas apenas recentemente um estudo mais aprofundado foi feito, colocando-se esta classe de corantes como

potenciais candidatos a sensibilizadores para PDT¹. Entretanto, as Pcs vêm sendo utilizadas a mais tempo. Suas propriedades como corantes⁶ são conhecidas desde a década de 30, e têm sido utilizados também como eletrodos modificados para células combustíveis⁷, em dispositivos eletrocromáticos⁸, para citar apenas alguns exemplos.

As ftalocianinas são porfirinas sintéticas com sua porção pirrol condensada com um anel benzênico e ligados por um átomo de N. O extenso sistema pi deslocalizado proporciona à Pc uma banda intensa de absorção entre 630 e 700 nm.

Figura 2 Estrutura da Ftalocianina de ZincoTetrassulfonada (ZnPcS₄)

A Pc pode se complexar com a grande maioria dos metais da tabela periódica e também pode ser substituída, nos seus anéis benzênicos por uma série de grupos funcionais conferindo à molécula hidrofiliabilidade ou hidrofobicidade (Figura 2).

Um dos pré-requisitos fundamentais para a eficiência dos fotosensibilizadores é um tempo de vida relativamente longo para o estado tripleto. Esta condição é encontrada para Pcs complexadas com metais diamagnéticos como Al, Zn, In e Ga. Para os metais paramagnéticos como Cu, Co, Ni, Fe, Cr, Pd, a intensidade dos cruzamentos intersistemas e o menor tempo de vida dos estados tripleto destes compostos os tornam fotoativos¹.

Vários outros compostos tem sido estudados como potenciais candidatos a fotosensibilizadores: naftalocianinas, benzoporfirinas, verdinas, porfírenos, purpurinas, texafirinas e clorinas⁴.

A Fototerapia dinâmica não se restringe unicamente ao tratamento do câncer. Alguns fotosensibilizadores são capazes de seletivamente destruir vírus e células infectadas com vírus, poupando células normais. Derivados de benzoporfirinas foram utilizados para tratar sangue contaminado com o vírus da estomatite vesicular em ratos. Após a ativação com luz vermelha toda a população de vírus foi eliminada⁹. Células infectadas com o vírus de leucemia felina, ou utilizando sangue infectado de gatos, foram destruídos pelos derivados de benzoporfirinas mais a luz na região do vermelho, a população de eritrócitos e leucócitos foram pouco afetados. A eficiência destes derivados de benzoporfirinas foi encontrada somente no caso de vírus encapsulados.

Eletroforese Capilar

A eletroforese, método de separação de moléculas carregadas ou ionizáveis sob a influência de um campo elétrico, é um processo que tem sido extensivamente utilizado, principalmente no campo da bioquímica, desde a década de 30. A remodelação desta técnica para o formato capilar introduziu inúmeras vantagens no que diz respeito à detecção, resolução e sensibilidade.

A eletroforese capilar é uma técnica relativamente nova, sendo idealizada por Hjertén¹⁰ em 1967. Os primeiros trabalhos publicados datam da década de 70, entretanto, a primeira análise desenvolvida com sucesso em termos de injeção e detecção em linha foi publicada por Everaerts¹¹ e seus colaboradores em 1979, seguida de Jorgenson e Lukacs¹² em 1981. A partir de então, vem sendo utilizada por um número cada vez maior de pesquisadores na área da química¹³, bioquímica¹⁴, ciência forense¹⁵, laboratórios clínicos¹⁶, indústrias farmacêuticas¹⁷ etc., denotando a importância e aceitação desta potente ferramenta analítica.

Eletroforese capilar, na verdade, não é uma única técnica isolada mas uma família de técnicas fundamentadas no mesmo princípio de migração sob ação de um campo elétrico, com mecanismos de separação diferentes.

Atualmente são 6 os membros da família da eletroforese capilar¹⁸ :

1. Eletroforese capilar de zona ou solução livre que é a mais difundida (CZE) ou simplesmente CE;
2. Cromatografia eletrocinética micelar (MEKC);
3. Eletroforese capilar por focalização isoelétrica (CIEF);
4. Eletroforese capilar em gel (CGE);
5. Isotacoforese (CITP);
5. Eletrocromatografia (CEC).

O universo de aplicações da eletroforese capilar tem se mostrado em crescimento exponencial, pois várias classes de compostos são passíveis de serem analisados. Podem ser estudados desde simples íons inorgânicos e orgânicos^{18,19}, até ácidos nucleicos²⁰, proteínas²¹ e células²².

Uma das grandes versatilidades da eletroforese capilar é a possibilidade da utilização de uma ampla gama de detectores. Na eletroforese capilar estão

disponíveis detectores que são basicamente a adaptação dos detectores utilizados nos equipamentos de cromatografia em meio líquido para o formato capilar. Tais detectores podem ser: de absorção no UV-vis²³, fluorescência²⁴, fluorescência induzida por laser²⁵, espectrometria de massas²⁶, condutividade²⁷, amperometria²⁸, radioatividade²⁹, índice de refração³⁰, dicroísmo circular³¹ e Raman³².

Alguns Conceitos Fundamentais^{33,34}

Para melhor entender os mecanismos de separação envolvidos na discussão dos resultados apresentados nesta tese, alguns conceitos teóricos e a terminologia básica da eletroforese capilar serão agora discutidos.

Como foi apresentado no item anterior, a eletroforese capilar baseia-se na migração diferenciada de partículas carregadas sob a influência de um campo elétrico, portanto a mobilidade eletroforética é um parâmetro que governa a separação e é a variável experimental mais importante. Matematicamente pode ser descrita como a razão entre a velocidade eletroforética de um soluto e o campo elétrico aplicado (equação 1). A velocidade eletroforética por sua vez nada mais é do que a razão entre a relação entre a distância do ponto de injeção até a janela de detecção e o tempo de migração (equação 6).

$$\mu_{ef} = v_{ef} / E \quad [1]$$

$$v_{ef} = L_{det} / t_{mig} \quad [2]$$

A mobilidade efetiva de um analito é o parâmetro que obtemos diretamente do eletroferograma e é a somatória da mobilidade eletroforética do analito e o fluxo eletroosmótico. Da forma como as equações 1 e 2 estão escritas, esta mobilidade não é a mobilidade real do soluto mas a mobilidade aparente. Para calcular a verdadeira mobilidade deve-se fazer a correção para uma outra componente que aparece ao se aplicar um campo elétrico no capilar, o fluxo eletroosmótico.

O fluxo eletroosmótico é um dos aspectos mais importantes da eletroforese capilar, que existe devido à carga da superfície do capilar. O capilar é constituído de sílica fundida, que em contato com a água ou soluções alcalinas, os grupos silanol e siloxano são dissociados induzindo a formação de uma dupla camada elétrica.

Os íons mais próximos à superfície do capilar constituem uma camada fortemente ligada à superfície onde permanece imóvel mesmo sob a influência do campo elétrico, esta é a chamada camada fixa. Próxima à camada fixa, outra camada que, embora compacta, é móvel e apresenta um caráter substancialmente catiônico. Esta camada também é conhecida como camada de Stern. A partir desta camada móvel uma outra é formada e estende-se para o seio da solução dentro do capilar, sendo conhecida como camada difusa ou camada de Gouy-Chapman. A uma grande distância da parede do capilar a solução tende a alcançar a eletroneutralidade e o potencial equivale ao potencial da solução.

Sob a influência de um campo elétrico, a camada difusa passa a apresentar uma mobilidade e, tendo um caráter positivo, tende a migrar na direção do catodo ou do eletrodo aterrado. Sendo os íons solvatados pela água, todo o fluído do tampão é mobilizado e migra num contínuo na mesma direção que os íons positivos da camada móvel. A equação que descreve o fluxo eletroosmótico foi definida por Smoluchowski e pode ser escrita assim:

$$v_{eo} = \frac{-\epsilon\epsilon_0\zeta}{\eta} E \quad [3]$$

onde ϵ é a constante dielétrica do meio, ϵ_0 é a permissividade no vácuo, ζ é o potencial zeta do plano de cisalhamento, η é a viscosidade do meio eletrolítico e E é o campo elétrico aplicado.

Como o fluxo eletroosmótico está intimamente ligado à ionização dos grupos silanol, este apresenta uma dependência direta com o pH do eletrólito de corrida e o fluxo eletroosmótico. Para um pH alto, onde todos os grupos silanol estão dissociados, a carga na superfície do capilar é alta e o potencial zeta é alto, gerando uma dupla camada elétrica bastante densa. Como

resultado da aplicação de um campo elétrico, o fluxo eletroosmótico aumenta no mesmo sentido em que o pH também aumenta.

Numa condição de pH 9 do tampão borato 20 mmol. L⁻¹, para uma tensão de 30 kV, o fluxo eletroosmótico observado é tipicamente em torno de 2 mm/s. Considerando-se um capilar de 50 µm de diâmetro interno e 50 cm de comprimento (que possui um volume total de 980 nL), este fluxo corresponde a uma vazão de 235 nL/min ou aproximadamente 25% do volume total do capilar por minuto. Utilizando-se um pH ao redor de 3, os grupos silanol estão em sua maioria protonados e o fluxo eletroosmótico é muito mais baixo, atingindo valores da ordem de 30 nL / min.

A eletroforese capilar é conhecida por apresentar uma alta eficiência na separação, entretanto inúmeras são as variáveis que afetam o fluxo eletroosmótico e eletroforético, influenciando diretamente a separação.

A eficiência de uma separação pode ser expressa pelo número de pratos N:

$$N = \mu V / 2D \quad [4]$$

onde μ é a mobilidade aparente, V é a voltagem aplicada e D é o coeficiente de difusão do soluto.

Desta equação podemos verificar que quanto maior a voltagem aplicada, maior o número de pratos incrementando a separação, entretanto, há um limite para o aumento da voltagem aplicada, esse limite é a ineficiência na dissipação do calor pelo efeito Joule.

O aquecimento pelo efeito Joule depende do diâmetro do capilar, da concentração do tampão e do campo elétrico aplicado.

A geração de calor pelo efeito Joule é uma consequência direta da voltagem aplicada, pois o aumento da corrente elétrica que passa pela solução eletrolítica implica no aumento da mobilidade dos íons da solução. Muitas vezes o aumento da temperatura pode levar à ebulição do eletrólito, e portanto, à formação de bolhas dentro do capilar, interrompendo a condução de corrente.

Quando a dissipação do calor não é mais eficiente tem-se, o aparecimento de um gradiente de temperatura dentro do capilar. A temperatura maior na região interior do capilar diminuindo à medida que se aproxima das

paredes onde a dissipação do calor se torna mais eficiente. A equação que define o gradiente de temperatura, mostra que há uma dependência direta entre o gradiente e o quadrado do raio interno do capilar. Portanto, maneira quanto menor o raio interno do capilar maior a dissipação do calor.

Tampões muito concentrados são mais condutores, levando a correntes mais altas e, portanto, a um aumento do calor e, conseqüentemente, à diminuição na viscosidade do tampão. A expressão de Smoluchowski para o fluxo eletroosmótico (equação 3), mostra que a velocidade do fluxo eletroosmótico aumenta com a diminuição da viscosidade. Como a viscosidade é dependente da temperatura, a dissipação eficiente de calor é muito importante na definição de parâmetros fundamentais para uma boa separação por eletroforese capilar, como força do campo elétrico, concentração de tampão e diâmetro do capilar.

Uma breve descrição dos mecanismos eletroforéticos de separação

Eletroforese Capilar de Zona ou Solução Livre (CZE)

CZE é o modo de eletroforese capilar mais amplamente utilizado. Pode ser utilizado para a separação de solutos aniônicos e catiônicos numa simples análise. Enquanto os cátions e ânions migram em direções opostas desde que o fluxo eletroosmótico seja significativamente maior do que a velocidade do soluto (devido à sua migração), eles são todos arrastados na direção do catodo. O fluxo eletroosmótico é um dos parâmetros mais importantes na eletroforese capilar. Sua origem vem da formação de uma dupla camada elétrica próxima à parede do capilar. A dupla camada elétrica apresenta carga oposta à carga da superfície do capilar que é negativa. Sob a influência do campo elétrico, esta camada é mobilizada e por apresentar um caráter essencialmente positivo migra na direção do catodo. Detalhes sobre a formação da dupla camada elétrica e fluxo eletroosmótico serão convenientemente discutidos adiante. Numa análise típica, os cátions migram primeiro desde que ambas as direções da migração do soluto e do fluxo eletroosmótico sejam as mesmas. Solutos neutros são os próximos, embora não sejam discriminados pelo campo elétrico, são apenas arrastados pelo

fluxo. Os ânions são os últimos a serem detectados pois migram na direção oposta ao fluxo eletroosmótico.

Cromatografia Eletrocinética Micelar (MEKC)

A eletrocromatografia micelar ou MECK foi introduzida por Terabe³⁵ e se aplica, principalmente, na análise de analitos neutros. Este mecanismo de separação, assim como na cromatografia líquida, está baseado na partição dos solutos entre a fase móvel, representada pelo eletrólito responsável pelo fluxo eletroosmótico, e uma fase semi estacionária que são as micelas, cuja migração é feita segundo a influência do fluxo eletroosmótico e da migração eletroforética. Esta partição entre os solutos neutros e a fase móvel e estacionária é que determina a separação.

Micelas são agregados moleculares de surfactantes onde os analitos fazem partição baseados na hidrofobicidade, atração iônica e ligação de hidrogênio. Os surfactantes são moléculas que apresentam uma porção com características hidrofóbicas e uma outra com características hidrofílicas. As micelas existem, em meio aquoso, a partir de uma concentração mínima de moléculas do surfactante, a esta concentração se dá o nome de concentração micelar crítica (CMC). Acima da CMC, as partes hidrofóbicas das moléculas de surfactantes passam a se alinhar, excluindo a água, enquanto que as cabeças carregadas (hidrofílicas) se orientam através da superfície dos agregados. A micela resultante é hidrofílica na sua superfície mas hidrofóbica na sua porção interior. Para o SDS (que constitui o surfactante mais utilizado em MEKC), a CMC em meio aquoso é 8 mmol.L^{-1} porém, a presença de sais e solventes orgânicos alteram este valor. Sais e solventes decrescem o valor da CMC e, se muito concentrados, impedem completamente a formação da micela.

Número de agregação é o número de moléculas de surfactante utilizados para formar uma micela. Para o SDS esse valor, em meio aquoso, é 64, sendo que esse valor é uma média e não um número exato.

A separação por MEKC apresenta uma série de vantagens e desvantagens. A presença das micelas permite incrementar diferenças na mobilidade eletroforética de compostos iônicos ao mesmo tempo em que se dá diferenças de partição entre a fase pseudo estacionária e os solutos neutros.

Uma limitação da técnica é a baixa capacidade de picos da faixa útil de separação, restringindo seu uso a amostras não muito complexas.

Sob a ação do campo elétrico observa-se tanto o aparecimento do fluxo eletroosmótico, como também o fluxo das micelas. No caso de uma separação em meio micelar de SDS cujo caráter é fortemente aniônico, as micelas tendem a migrar na direção do anodo, enquanto que o fluxo se move na direção do catodo. Entretanto, como o fluxo eletroosmótico é superior à mobilidade eletroforética das micelas, como movimento final temos a lenta migração das micelas na direção do catodo. Portanto, a faixa útil de separação, ou janela de migração, pode ser descrita como o intervalo entre o tempo de migração da micela e o tempo do fluxo eletroosmótico.

Para analitos neutros a janela de migração é definida pelo tempo do fluxo eletroosmótico, (t_o) e o tempo de migração da micela (t_{mc}). O analito neutro, que não sofre partição com a micela, vai migrar com a mesma velocidade do fluxo eletroosmótico. Por outro lado, os analitos que interajam completamente com a micela, ou que nela têm um maior tempo de residência (lembrando que a interação entre soluto e micela é um equilíbrio), migrarão com o tempo de migração da própria micela.

Existem duas equações fundamentais dentro da eletrocromatografia micelar, que são o fator capacidade e a equação da resolução.

O fator capacidade é expresso assim;

$$k' = \frac{t_r - t_o}{t_o (1 - t_r / t_{mc})} \quad [5]$$

onde t_o é o tempo do fluxo eletroosmótico ou o tempo de migração de um soluto não retido, t_r é o tempo de retenção do soluto e t_{mc} é o tempo de migração da micela.

Esta equação também pode ser usada para compostos carregados. O único termo que muda é t_o pois os compostos carregados que não interagem com a micela não migrarão com a velocidade do fluxo eletroosmótico.

A outra equação fundamental é a equação da resolução:

$$R_s = (N^{1/2} / 4) [(\alpha - 1) / \alpha] [k_2 / (k_1 + 1)] \{ [1 - (t_o / t_{mc})] / [1 + (t_o / t_{mc})k_1] \} \quad [6]$$

onde N é o número de pratos teóricos, α é o termo seletividade termodinâmica, k é o fator capacidade, t_o é o tempo de migração do fluxo eletroosmótico e t_{mc} é o tempo de migração da micela. O t_o é marcado com um composto neutro, como um solvente orgânico ou óxido de mesitila, por exemplo. T_{mc} por sua vez é marcado utilizando-se um composto hidrofóbico, como o por exemplo Sudam III que é neutro e, portanto, interage completamente com a micela.

O fator capacidade pode ser calculado apartir do coeficiente de distribuição (K) como mostra a equação a seguir:

$$k' = K (V_{mc} / V_{aq}), \quad [7]$$

onde V_{mc} / V_{aq} é a razão da fase e V_{mc} e V_{aq} são os volumes da micela e da fase aquosa. O fator capacidade é aproximadamente relacionado à concentração do surfactante pela relação:

$$k' = K \bar{v} (C_{sf} - CMC), \quad [8]$$

onde $\bar{v}$ é o volume parcial específico da micela e C_{sf} é a concentração do surfactante.

Desta relação tiramos que o fator capacidade aumenta linearmente com o aumento da concentração do surfactante. Esta equação sugere também que podemos variar facilmente o fator capacidade, ajustando a concentração do surfactante, desde que saibamos a CMC do surfactante em questão. A faixa de concentração do surfactante freqüentemente utilizada em MECK é de 20 a 200 mmol.L⁻¹.

A tabela 1 mostra alguns dos surfactantes mais comumente empregados em MECK.

Tabela 1 Surfactantes empregados em MEKC.

Surfactante	Caráter	CMC	Nº de Agregação
SDS	aniônico	8,1 mmol.L ⁻¹	62
SOS (octil sulfato de sódio)	aniônico	136 mmol.L ⁻¹	20
CTAC (cloreto de hexadecil-trimetil-amônio)	catiônico	1,3 mmol.L ⁻¹	78
DTAB (brometo de dodecil-trimetil-amônio)	catiônico	15 mmol.L ⁻¹	50
SB-12 (N-dodecil sultaína)	anfotérico	1,2 mmol.L ⁻¹	-
NADC (deoxicolato de sódio)	aniônico	6,4 mmol.L ⁻¹	14
Triton X-100	Não iônico	0,2 mmol.L ⁻¹	143

Eletroforese Capilar em Gel (CGE)

CGE é o análogo do CE para a tradicional eletroforese em gel. Ela é usada para a separação baseada no tamanho de macromoléculas biológicas como os oligonucleotídeos, fragmentos de DNA e proteínas. A separação é feita preenchendo o capilar com uma matriz polimérica como poliacrilamida, agarose ou até mesmo soluções de polímeros lineares. A maior vantagem sobre a eletroforese de gel é que uma gama muito maior de matrizes de géis é disponível, detecção em linha, análise quantitativa melhorada e automação de todo o processo.

Focalização Isoelétrica Capilar (CIEF)

CIEF é utilizada para separar biomoléculas, principalmente proteínas, baseadas no seu ponto isoelétrico (pI). CIEF é feito preenchendo o capilar com uma mistura de anfólitos e a amostra de modo a promover um gradiente de pH.

Colocando uma solução básica no catodo e uma solução ácida no anodo e em seguida aplicando-se um campo elétrico, os anfólitos e os solutos vão migrar até que eles encontrem uma região onde sua carga total é neutra (ou quando atingirem o seu pI). Os anfólitos e as zonas de solutos permanecem extremamente estreitas desde que a difusão para zona de diferentes pHs resulta na geração de carga e conseqüentemente a sua migração de volta para a zona apropriada.

Isotacoforese (ITP)

ITP emprega dois diferentes sistemas de tampão. Os solutos da amostra ficam confinados entre duas regiões de tampão eletrolítico, um eletrólito líder (cuja mobilidade deve ser maior que o mais veloz componente da amostra) e o eletrólito terminador (cuja mobilidade é menor do que o mais lento componente da amostra) criando um estado estacionário no qual as zonas de solutos migram, uma depois da outra, em ordem decrescente de mobilidade. Dois únicos aspectos de ITP são que todas as zonas migram na mesma velocidade e que todas elas adotam uma concentração do eletrólito líder. Esta última característica faz da ITP uma técnica importante e bastante útil na análise de soluções diluídas. Amostras podem ser concentradas em muitas ordens de magnitude.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS^{36,37,38,39,40}

Espectrometria de massas é uma técnica microanalítica onde os átomos ou moléculas da amostra são ionizados, separados de acordo com a sua relação massa / carga (M/Z). Esta técnica requer apenas poucos nanomoles de amostra para obter informações sobre a estrutura e peso molecular do analito. É uma técnica destrutiva onde a amostra é consumida durante a análise. Na maioria dos casos o íon molecular nascente do analito “explode” numa grande variedade de fragmentos de íons; o padrão resultante dessa fragmentação constitui o espectro de massas. A princípio, o espectro de massas de cada composto é único e pode ser usado como uma impressão digital que caracteriza a amostra.

O diagrama abaixo mostra o conceito geral da análise por espectrometria de massas:

A ilustração mostra também a maneira pela qual o espectro de massas é adquirido. Para se obter o espectro, a molécula do analito (M), este em fase gasosa, deve ser ionizada. O processo de ionização mais comum é o “electron – impact ionization (EI)”, que é alcançado pelo bombardeamento com elétrons. O processo de ionização, nada mais é do que a transferência de energia para a

molécula neutra no estado de vapor, dando à molécula neutra energia suficiente para ejetar um dos seus próprios elétrons, tornando a molécula, antes neutra, agora carregada com uma massa residual positiva. Este processo produz um íon molecular carregado positivamente ($M^{+•}$). Este íon molecular ainda contém um considerável excesso de energia e muito da energia pode ser dissipada por fragmentação das ligações químicas. A decomposição de várias ligações químicas leva à produção de fragmentos iônicos cuja massa é igual à soma das massas atômicas do grupo de átomos que retém a carga positiva durante o processo de decomposição. É importante salientar que nesta etapa nem todos os íons moleculares se decompõem em fragmentos iônicos. As moléculas que produzem um íon molecular estável tendem a sobreviver, ou não fragmentar, e um pico intenso molecular pode ser registrado. Durante a análise de um composto que tem um íon molecular instável, aproximadamente todos os íons moleculares se decompõem em fragmentos iônicos, e nestes casos o espectro de massas contém apenas um pequeno pico do íon molecular.

Os íons positivos produzidos no impacto de elétrons são atraídos para dentro da fenda do espectrômetro de massas onde eles são separados de acordo com a razão massa / carga. É importante notar que o pico mais intenso no espectro é chamado pico base e a ele é atribuído o valor 100% onde a altura de todos os outros picos do espectro são computados com relação a ele.

As fontes de ionização pertencem a duas categorias, a fonte de fase gasosa e a fonte de desorção. Na primeira categoria, a amostra é primeiro vaporizada e depois ionizada, na segunda categoria a amostra pode ser um sólido ou uma solução, que são convertidos diretamente em íons no estado gasoso. A grande vantagem da ionização por desorção é que este modo pode ser aplicado a espécies não voláteis e amostras termicamente instáveis.

Existem vários tipos de fontes de ionização por desorção, como field desorption (FD), electrospray ionization (ESI), matrix-assisted laser desorption / ionization (MALDI), plasma desorption (PD), fast atom bombardment (FAB), secondary ion mass spectrometry (SIMS), termospray ionization (TS).

Nesta tese utilizamos como fonte de ionização a electrospray ionization (ESI). Este tipo de ionização acontece sob pressão atmosférica e temperatura ambiente. A solução da amostra é bombeada através de uma agulha capilar de

ação inoxidável a uma vazão de apenas alguns microlitros / min. Esta agulha é mantida a um potencial de vários kilovolts com relação ao um eletrodo que circunda a agulha. O spray carregado, formado por micro-gotas, passa por um capilar de desolvatação onde o solvente é evaporado. As gotas ficam menores ainda pela perda do solvente, desta forma a densidade de carga aumenta, e a desorção dos íons no ambiente gasoso.

O processo de ionização eletrospray é vantajoso pois observa-se pouca fragmentação da molécula do analito, característica importante na análise de compostos termicamente instáveis como biomoléculas.

Outra importante característica da ionização eletrospray é que este processo pode ser facilmente adaptado à introdução direta da amostra proveniente de instrumentos como eletroforese capilar ou de um cromatógrafo.

O processo eletrospray

A essência do processo eletrospray pode ser descrito com alguma simplicidade. A solução de analito passa através de um capilar que é mantido num potencial alto. O efeito do alto campo elétrico, quando a solução emerge na ponta do capilar, é formar uma névoa de gotículas altamente carregadas que atravessam um gradiente de potencial e pressão na direção da porção do analisador do espectrômetro de massas. Durante essa transição, as gotas reduzem em tamanho pela evaporação do solvente ou pela explosão coulômbica (subdivisão da gota resultante da alta densidade de carga). Íons completamente desolvatados resultam de uma completa evaporação do solvente.

A nebulização da solução emergente do capilar pode ser facilitada pelo fluxo do gás nebulizador. Na prática, a facilidade de usar um gás nebulizador é comumente incorporada em instrumentos comerciais, a necessidade ou não do seu uso, depende da velocidade do fluxo empregado, da composição do solvente e do sinal do potencial aplicado à ponta do capilar (para o potencial negativo, em particular, pode levar a uma descarga corona a não ser que seja suprimido pelo uso de um gás nebulizador apropriado). Um fluxo de gás é freqüentemente utilizado na interface para promover a evaporação da gota; o aquecimento controlado da interface proporciona uma aproximação alternativa.

A análise de íons completamente ou parcialmente desolvatados é feita utilizando um capilar ou um dispositivo chamado "skimmer".

O processo electrospray pode ser dividido em 3 estágios: formação da gota, encolhimento da gota e a formação do íon gasoso.

A solução que sai da ponta do capilar eletrospray experimenta um campo elétrico associado com a manutenção da ponta em alto potencial. Assumindo um potencial positivo, íons positivos na solução serão acumulados na superfície, o qual é direcionado para fora formando o cone de Taylor. O diâmetro das gotas formadas dependem de vários parâmetros entre eles o potencial aplicado, o fluxo da solução e das propriedades do solvente.

Ao atravessarem o gradiente de pressão, a evaporação do solvente das gotas inicialmente formadas, levam à sua redução em diâmetro. Fissão (ou explosão Coulombica) acontecerá onde a magnitude da carga é suficiente para superar a tensão superficial que mantém a gota junta. A depleção contínua em tamanho da gota pela fissão e evaporação do solvente podem levar eventualmente à formação de um íon.

No segundo mecanismo de formação de íon na fase gasosa, a evaporação do íon ocorre de gotas pequenas e altamente carregadas; a força principal é a repulsão entre o íon carregado e outras cargas da gota. Uma extensão deste modelo acomoda a formação de íons de fase gasosa multicarregados.

A separação iônica na ponta do capilar eletrospray é essencialmente eletroforética, e a interface pode ser considerada como uma célula eletrolítica onde parte do transporte da carga ocorre em fase gasosa. A oxidação eletroquímica que ocorre no capilar eletrospray, tem implicações analíticas onde cátions radicais podem ser gerados de analitos neutros, permitindo no entanto, em alguns casos, o uso de eletrospray como um verdadeiro método de ionização ao invés da transferência de íons na fase gasosa de íons pré-formados.

O fluxo de solução da amostra na interface eletrospray é comumente de 3 a 20 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$. Para sua adaptação e direta compatibilidade a instrumentos como HPLC onde o fluxo é muito maior, fez-se necessária a incorporação de um escudo metálico aterrado entre a agulha do eletrospray e o capilar. O dispositivo permitiu registrar um espectro de massas completo a nível de

nanograma. Limites ótimos de detecção são atingidos utilizando eletrospray distribuindo um fluxo reduzido.

Propriedades dos íons eletrospray

Os mecanismos do processo eletrospray tem implicações significativas nas propriedades dos íons produzidos na fase gasosa. Três aspectos são importantes:

1. A carga do íon gasoso reflete a carga da fase condensada, salvo colisões na interface; portanto espécies multicarregadas são comumente observadas.
2. A transferência de íons para a fase gasosa não é um processo energético; na verdade a dessolvatação é um processo de “resfriamento” dos íons. Sob condições apropriadas no entanto, íons de baixa energia interna são introduzidos no espectrômetro para análise convencional ou na seleção de íons precursores na análise tandem MS. Condições especiais na interface do eletrospray pode proporcionar a ativação colisional efetiva. Isto significa que a aplicação de uma diferença de potencial entre componentes numa região de pressão intermediária, permite aos íons atingirem energias cinéticas consistentes com o potencial aplicado e então sofrer colisões de ativação.
3. O processo eletrospray envolve uma etapa de ruptura de interações não covalentes (principalmente na remoção de moléculas de solvatação); a intercepção deste processo pode permitir a preservação de interações não covalentes fortes de relevância analítica.

As interações não covalentes podem ser categorizadas como:

- Interações intra-iônicas que influenciam na estrutura iônica tri-dimensional;
- Espécies multiméricas idênticas ou componentes estruturalmente similares;
- Interações específicas entre espécies dissimilares estruturalmente os quais estão diretamente relacionados pelas funções biológicas.

O estudo de associações não covalentes de espécies dissimilares estruturalmente, representam uma área bastante fértil utilizando MS. Um bom exemplo inclui a detecção de íons correspondentes aos complexos ligante-

receptor e ao complexo ternário entre uma enzima dimérica e um inibidor substrato. Íons em fase gasosa correspondentes ao complexo ligante-alvo não covalente que sobrevivem ao processo eletrospray, são seletivamente acumulados, detectados e rejeitados e sujeitos a ativação colisional para liberar uma ligação. O aprisionamento subsequente e a ativação colisional do íon ligante produz íons que indicam a estrutura.

Referências Bibliográficas

1. Rosenthal, I.; Photochem. Photobiol., 53(1991)859
2. Dougherty, T.J.; Am. Chem. Soc. Abstr.; (1973) abstract.
3. Dougherty, T. J.; J. Natl. Cancer Inst, 51(1974)1333.
4. Van Lier J. E.; New Sensitizers for Photodynamic Therapy of Cancer in Light in Biology Medicine, vol.1, 1988, Plenum Press, NY.
5. Wrenn Jr., F. R., Good, M. L. e Handler, P.; Science, 113(1951)525.
6. Moser, F.H., Thomas A.L.; The Phthalocyanines – Manufacture and Applications, vol. II, Boca Raton, FL; CRC Press; 1983.
7. Zagal, J. H. ; Coord. Chem. Rev., 119 (1992)89.
8. Collins, G.C.S.; D.J. Schiffrin; J. Electroanal. Chem.; 139(1982)335.
9. Dougherty, T.J.; Photochem. And Photobiol., 58(1993)895.
10. Hjertén S., J. Chromatogr., 347(1985)191.
11. Mikkers, F.E.P.; Everaerts F.M.; Verheggen,Th. P.E. M.; J. Chromatogr., 69(1979)11.
12. Jorgenson, J. W., Lukacs, K. D. Anal. Chem., 53(1981)1298.
13. Tavares, M.F.M., McGuffin, V. L.; Anal. Chem., 67(1995)3687.
14. Piatak, M., Jr., Luk, K.-C., Williams, B., and Lifson, J.D.; Biotechniques, 14(1993)70.
15. Northrop, D.M., McCord, B.R. e Butler, J. M.; J. Cap. Elec., 1 (1994)158.
16. Gordon, M.J., Lee, K.J. Arias, A.A., and Zare, R.N.; Anal. Chem., 6(1991)63.
17. Frenz,J., Wu, S.L., and Hancock, W.S.; J. Chromatogr., 480(1989)370.
18. Tavares, M.F., Quim. Nova, 20(1997)493.
19. Jones W.R. e Jnadik P.J.; J. Chromatogr., 608(1992)385.
20. Weston A.; Brown P; Jandik P.; Jones W.R.; J. Chromatogr., 608(1992)395.
21. Pentoney S.L.; Konrad K.D. e Kaye,W.; Electrophoresis, 13(1992)467.
- Chen, D.Y. Harke; H.R. e Dovichi N.J.; Nucleic Acids Res., 20(1992)4873.
22. Chen F-T.A.; J. Chromatogr. 1994, 680, 419. Rush R.S.; Derby P.L.; Strickland T.W. e Rohde M.F.; Anal. Chem., 65(1993)1834.
- Strege; M.A. e Lagu A.L.; Electrophoresis, 16(1995)642.

-
23. Lee T.T; e Yeung E.S.; *Anal. Chem.*, 64(1992)3045. Xue; Q. e Yeung; E.S., *J. Chromatogr. B*, 677(1996)233. Hoyt Jr. A.M.; Beale S.C.; Larmann Jr. J.P. e Jorgenson J.W.; *J. Microcol. Sep.*, 5(1993)325.
 24. Walbroehl Y. e Jorgenson J.W.; *J. Chromatogr.*, 315(1984)135.
 25. Albin M.; Weinberger R.; Sapp E. e Moring S.; *Anal. Chem.*, 63(1991)417.
 26. Chen D.Y.; Swerdlow H.P.; Harke H.R.; Zhang J. Z. e Dovichi N.J.; *J. Chromatogr.*, 559(1991)237.
 27. Moseley M.A.; Deterding L.J.; Tomer K.B. e Jorgenson J.W.; *J. Chromatogr.*, 63(1991)109.
 28. Ackermans M.T.; Everaerts F.M. e Beckers J.L.; *J. Chromatogr.*, 593(1991)289.
 29. Huang X.; Zare R.N.; Loss S. e Ewing A.G.; *Anal. Chem.*, 63(1991)189.
 30. Altria K.D.; Simpson C.F.; Bharig A.K. e Theovald A.E.; *Electrophoresis*, 11(1990)732.
 31. Bruno A.E.; Krattiger B.; Maystre F. e Widmer H.M.; *Anal. Chem.*, 63(1991)2689.
 32. Christensen P.L. e Yeung E.S., *Anal. Chem.*, 61(1989)1344.
 33. Weinberger R.; *Practical Capillary Electrophoresis*, Academic Press; San Diego, 1993.
 34. Gossman P.D.; in *Capillary Electrophoresis, Theory and Practice*; Grossman P.D.; Colburn J.C; Academic Press; San Diego, 1992; 3.
 35. Terabe, S.; Otsuka K.; Ichikawa, K.; Tsuchiya, A.; Ando T.; *Anal. Chem*; 56(1984)111.
 36. Baker, J.; *Mass Spectrometry*; John Wiley & Sons, New York, 1999; 1.
 37. Skoog, D.A.; Leary, J.J.; *Principles of Instrumental Analysis*; Saunders College Publishing, quarta edição, Orlando, 1992, 420.
 38. Watson, J.T., *Introduction to Mass Spectrometry*; Raven Press, segunda edição, New York, 1985, 1
 39. Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A., *Principles of Instrumental Analysis*, Saunders College Publishing, quinta edição, Orlando, 1998, 498.
 40. Gaskell, S.J., *J. Mass Spec*, 32(1997)677.

CAPÍTULO 1

Implementação de um Sistema de Eletroforese Capilar com Detecção de Fluorescência Induzida por Laser.

1.1 Introdução

A parte inicial desta tese consistiu na implementação de um sistema de eletroforese capilar adaptado à óptica de um espectrômetro Raman. O sistema implementado foi inspirado nos equipamentos disponíveis comercialmente apresentando um perfil como mostra a Figura 3.

A instrumentação é simples e, como qualquer equipamento de eletroforese capilar, consiste basicamente dos seguintes componentes: reservatórios para amostras, dois reservatórios que são preenchidos com uma solução condutora (geralmente uma solução tamponada), o capilar (o canal onde ocorrerá a migração), uma fonte de alta tensão e um detector posicionado em linha. Em cada reservatório são imersas as extremidades do capilar que também é preenchido com a mesma solução condutora para fechar o contato elétrico. Nestes reservatórios também são colocados os eletrodos de platina que estão conectados à fonte de alta tensão. Através de um detector adequado, a separação dos solutos pode ser observada em linha, no meio ou no final da coluna.

Um ventilador se faz necessário para a dissipação do calor gerado pelo efeito Joule (passagem de corrente na solução).

A caixa de alta tensão é feita em acrílico para proteção do operador contra choque elétrico; outra precaução para prevenir o contato com a alta tensão é a presença de uma chave de segurança na porta que ao abri-la há uma interrupção do fornecimento da voltagem fornecida pela fonte de alta tensão.

Figura 3 Esquema do sistema CE implementado no laboratório em conexão ao espectro Raman

1.2 Parte Experimental

A caixa de acrílico, como mostra a Figura 4, é dividida em dois compartimentos: (A) e (B) indicados. Para evitar qualquer tipo de interferência, como arcos voltagem, os cabos conectados à fonte não se cruzam dentro da caixa de acrílico e ficam no compartimento superior (C). Os eletrodos são fixados numa placa de acrílico, apenas por pressão. Os reservatórios são presos por um sistema de O-rings de borracha e o capilar é introduzido no reservatório conectado ao polo da alta tensão apenas por um orifício. O reservatório do compartimento aterrado foi conectado a um sistema de vácuo, através de um canal localizado no interior da placa de acrílico. Neste compartimento também localizam-se o reservatório contendo a solução tampão e a outra extremidade do capilar. O objetivo desta conexão ao sistema de vácuo é proceder ao condicionamento do capilar como será discutido

oportunamente.

Figura 4 Esquema da caixa de acrílico

Toda a caixa de acrílico foi desenhada para ser adaptada à geometria preexistente de um espectrômetro Raman. O sistema também foi dimensionado para obter o menor comprimento possível de capilar para evitar análises desnecessariamente longas.

O equipamento Raman utilizado é um modelo 3000 da Renishaw dotado de uma câmera CCD (Dispositivo de Carga Acoplada) resfriada à $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por um sistema Peltier. A focalização da radiação laser dentro do diâmetro interno do capilar foi feita com o auxílio de um microscópio Olympus (modelo BTH2) equipado com uma objetiva (ampliação 80x). O diâmetro do feixe de laser (em 632,8 nm) no foco é de ca. $1,5\text{ }\mu\text{m}$. A radiação excitante utilizada foi a linha 632,8nm de um laser de He-Ne refrigerado a ar, modelo 120 da Spectra Physics. A potência do laser na amostra era menor que $50\text{ }\mu\text{W}$, ajustada de modo a evitar a fotodecomposição da amostra.

Os capilares utilizados são de sílica fundida da Polymicro Technologies Inc., e possuem as seguintes dimensões: $75\mu\text{m}$ de diâmetro interno, e 83,5 cm de comprimento total sendo 40,5 cm até o detector.

A fonte de alta tensão utilizada neste equipamento é modelo EH50RQ.19XM6, Glassman High Voltage Inc. - Whitehouse Station.

As soluções condicionantes do capilar empregadas foram: hidróxido de sódio ($1,0 \text{ mol.L}^{-1}$), ácido nítrico (50%, v/v) , ambas foram preparadas com água deionizada (a uma condutância de $10^{-18} \Omega^{-1}$). A solução eletrolítica utilizada para as corridas era uma solução tampão 0,100 M de citrato corrigido com HCl para um pH 2,5. O corante utilizado para essa caracterização foi a Ftalcianina de Zinco Tetrassulfonada (ZnPcS_4) de procedência Porphyrin Prodc. sendo utilizada sem purificação prévia. A solução de ZnPcS_4 foi preparada em água deionizada na forma de uma solução estoque de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ e, a partir desta, foram preparadas outras soluções de menor concentração por diluições sucessivas.

1.3 Resultados e Discussão

1.3.1 Efeito Joule

A geração de calor por efeito Joule, devido à existência de campo elétrico, é um dos maiores inimigos da eletroforese pois tem, como principal consequência, o alargamento da banda e, portanto, a perda da resolução. A eletroforese em dimensões capilares destaca-se pela eficiente dissipação do calor, possibilitando a aplicação de voltagens da ordem de 30 a 50 kV, alcançado-se, conseqüentemente, campos elétricos mais intensos. Podem ser atingidos campos elétricos da ordem de 500 V/cm^{-1} , o que reduz o tempo de análise e aumenta a eficiência da separação de forma sensível.

No equipamento ora descrito, a fonte de alta tensão utilizada tem dupla polaridade, ou seja, pode-se aplicar tensões de 0 a 50 kV na direção positiva e negativa de potenciais, enquanto que fontes de equipamentos comerciais, em sua maioria, apresentam limites operacionais de 30 kV (positiva e negativa). O limite de corrente que é alcançado pela fonte chega a $190 \mu\text{A}$.

A eficiência na dissipação do calor gerado pelo efeito Joule pode ser verificada através de um simples experimento que consiste na verificação da lei de Ohm. Sendo a solução tampão utilizada nos experimentos condutora, a aplicação de potenciais crescentes resulta num aumento da corrente o que gera calor. Quando o calor gerado é dissipado eficientemente, o aumento da corrente segue uma dependência linear com o aumento do potencial aplicado ao sistema, ou seja segue a própria lei de Ohm. O desvio dessa lei indica que o calor gerado pelo efeito Joule não está sendo dissipado e a consequência direta deste processo é a imediata perda da resolução dos picos pelo alargamento das bandas dos analitos.

Para esse sistema verificou-se claramente que a lei é seguida até potenciais da ordem de 25 kV, acima deste valor percebe-se, pela perda da linearidade, que a dissipação de calor não é mais eficiente.

1.3.2 O Sistema de Injeção

A injeção de amostra na eletroforese capilar, pode ser feita de três formas: hidrodinâmica, por pressão reduzida ou pressão, sifonagem e eletrocinética. A injeção hidrodinâmica é feita aplicando-se pressão pela introdução de um gás inerte no reservatório contendo a amostra, ou pela aplicação de vácuo no reservatório que contém a solução tampão ambos transferindo um certo volume de amostra para dentro do capilar. A injeção por sifonagem é feita pelo deslocamento de líquido provocado pela diferença de altura dos reservatórios de amostra e tampão. A injeção eletrocinética, por sua vez, é feita pela aplicação de um potencial, geralmente entre 5 e 15 kV, por alguns segundos. Este método de injeção é discriminatório já que a amostra injetada dependerá da relação carga / massa dos solutos presentes, diferentemente do que é observado nas injeções hidrodinâmicas onde ocorre uma simples transferência de volume. No equipamento aqui descrito, o sistema de injeção é unicamente eletrocinético. A injeção eletrocinética, não apresentou, particularmente para o caso da ftalocianina sulfonada de zinco nenhum tipo de problema de amostragem.

Para manter a reprodutibilidade dos eletroferogramas neste sistema, se fez necessário o desenvolvimento de um dispositivo eletrônico para a injeção da amostra. Atuando sobre a fonte de alta tensão, podemos controlar a tensão aplicada e a duração de cada injeção. A Figura 5 ilustra o circuito eletrônico desse dispositivo e as respectivas saídas conectadas à fonte de alta tensão.

O circuito possui três comandos: 1) controlador do tempo de injeção, 2) controlador da tensão de injeção e 3) controlador da fonte de alta tensão. O controlador do tempo de injeção possui 3 posições preestabelecidas, 1s, 5s e 10s que combinados entre si podem aplicar a tensão pelo tempo adequado e desejado pelo operador. O controlador da fonte de alta tensão possui 3 posições: repouso, corrida, e injeção. Na posição repouso, o circuito bloqueia a fonte não permitindo a aplicação de potenciais. Na posição corrida, a fonte é habilitada a aplicar a tensão selecionada no seu painel frontal. A posição injeção por sua vez, o circuito atua sobre a fonte, aplicando através de um gatilho, a tensão selecionada por um período de tempo adequado.

Figura 5 Esquema do circuito eletrônico desenvolvido para injeção eletrocinética.

1.3.3 O sistema de Detecção

Uma das grandes versatilidades da eletroforese capilar é a possibilidade da utilização de uma ampla gama de detectores. Na eletroforese capilar estão disponíveis detectores que são basicamente a adaptação para o formato capilar e tempo de resposta dos detectores utilizados nos equipamentos de HPLC. Tais detectores podem ser: de absorção no UV-vis², fluorescência³, fluorescência induzida por laser⁴, espectrometria de massas⁵, condutividade⁶, amperometria⁷, radioatividade⁸, índice de refração⁹, dicroísmo circular¹⁰ e Raman¹¹.

A escolha do detector depende quase que exclusivamente das

propriedades do soluto em questão e da faixa de concentração contemplada. A Tabela 2, mostra alguns limites de detecção para diversos tipos de detectores¹², assumindo-se 10×10^{-9} L como o volume injetado.

Tabela 2 – Tipos de detectores utilizados em eletroforese capilar e os respectivos limites de detecção típicos encontrados¹.

Tipo de Detector	Limite de Detecção (LOD)
Absorção no UV-vis	$10^{-5} - 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$
Fluorescência Induzida por Laser – LIF	$10^{-14} - 10^{-16} \text{ mol.L}^{-1}$
Fluorescência Direta com Lâmpada	$10^{-7} - 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$
Amperometria	$10^{-8} - 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$
Radiometria	$10^{-9} - 10^{-11} \text{ mol.L}^{-1}$
Raman	$10^{-6} - 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$
Espectrometria de Massa	$10^{-4} - 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$
Condutividade	$10^{-5} - 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$
Índice de Refração	$10^{-5} - 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$

A detecção também pode ser feita em linha ou no final do capilar. A detecção em linha é feita enquanto o soluto ainda migra dentro do capilar, como é o caso da absorção UV-vis, fluorescência, fluorescência induzida por laser e Raman, condutividade, índice de refração para citar alguns exemplos. A detecção no final do capilar, como o próprio nome sugere, o detector é posicionado no final da coluna, este método apresenta a desvantagem do alargamento da banda enquanto os solutos separados são levados ao detector, como é o caso da detecção por espectrometria de massas¹³.

No equipamento implementado, a detecção é feita por fluorescência induzida por laser e o detector empregado é do tipo CCD.

Fisicamente, o CCD é uma matriz de elementos sensíveis à luz. O dispositivo CCD é conhecido por alcançar ruídos de leitura ultra baixos, conferindo grande sensibilidade e definição na geração de uma imagem. Seu conceito de funcionamento concentra-se na transferência de carga de entre um elemento detector da matriz, que é constituído de um semi-condutor, para o

próximo elemento adjacente e assim sucessivamente até a saída do sinal.

Os detectores CCD possuem uma propriedade que os destaca dos demais. Nele é possível fazer um tipo de leitura onde cada elemento detector é combinado, ou seja, é possível somar vários elementos detectores numa junção de saída, na própria matriz do CCD. Este processo é chamado “binning” e a grande vantagem de somar o sinal dentro da própria matriz é que a carga somada está sujeita somente apenas a uma única leitura e ao ruído a ela associado, diferentemente de uma soma digital de dados, onde soma-se também o ruído de leitura de cada elemento à segunda potência.

As Figuras 6 A e B mostram o efeito de “binning” do CCD. Esta figura mostra dois eletroferogramas obtidos com “binning” diferente para a mesma concentração de ZnPcS_4 (10^{-8} M). No eletroferograma da Figura 6A, o CCD opera num “binning” de 5 e não se observa qualquer pico, ao contrário do que é observado no eletroferograma da Figura 6B onde, para um “binning” de 50, foi possível observar o sinal do analito, apesar da baixa relação sinal ruído.

Este comportamento entre o sinal detectado e a concentração do analito remete à discussão sobre o limite de detecção (LOD). Limite de detecção refere-se à mínima massa ou concentração de um analito que pode ser detectado dentro de uma relação sinal-ruído (S/R) aceitável. Neste trabalho o LOD foi adotado como sendo aquele onde observa-se a detecção de um pico com uma S/R igual a 2. O limite de detecção, pode ser encontrado na literatura, de várias formas¹⁴, por exemplo, em termos de massa ou concentração. Neste trabalho verificou-se uma dependência direta em termos práticos, do efeito de “binning” e o limite de detecção. A Figura 7 mostra que pode-se alcançar concentrações mais baixas de analito, como 10^{-11} M, com o aumento da capacidade de “binning” do detector.

O equipamento implementado apresenta boa linearidade numa faixa de 3 ordens de grandeza dentro da mesma condição de “binning”, também apresenta uma boa reprodutibilidade em termos de tempo de migração (1% desvio padrão relativo) e altura de pico (0,2% desvio padrão relativo).

Figura 6 Efeito de “Binning” do CCD sobre o sinal detectado. Condições: ZnPcS_4 10^{-8} M, injeção eletrocinética: 5 kV/ 5s; Tampão: citrato 100 mM, pH 2,5; Voltagem de corrida: -30 kV.
Eletroferograma A : “Binning” = 5
Eletroferograma B: “Binning”= 50

Figura 7 Eletroferograma da ZnPcS_4 10^{-11} M.
Condições: Tampão: Citrato 100 mM, pH 2,5;
Injeção eletrocinética (1s /5kV); Voltagem de corrida: -30 kV;
"Binning"= 100.

1.3.4 Comparação do sistema implementado a um sistema comercial.

O desempenho do sistema implementado no laboratório foi comparado ao equipamento comercial P/ACE série 5510 da Beckman com detecção de fluorescência induzida por laser, tendo um tubo fotomultiplicador como elemento detector.

O tubo fotomultiplicador é um elemento detector bastante sensível, de alto ganho, com baixo nível de ruído, e de custo operacional mais baixo que o CCD; entretanto o CCD, ainda exibe uma sensibilidade melhor, de pelo menos 10 vezes quando comparada ao tubo fotomultiplicador.

Para efeitos de comparação, a Figura 8A mostra um eletroferograma da ZnPcTS 10^{-3} mol. L^{-1} obtido com o sistema implementado no laboratório. Pode-se verificar uma melhor resolução dos picos observados em relação ao eletroferograma obtido no equipamento comercial (Fig. 8B). A esta melhor resolução dos picos, atribuímos à diferença com que a luz do laser é focalizada

no capilar. Enquanto que no sistema implementado, para a radiação laser em 632,8 nm e utilizando uma objetiva de 80 x de aumento, o diâmetro do feixe do laser no foco dentro do diâmetro interno do capilar é de ca. 1,5 μ (dado do fabricante), no sistema comercial o feixe do laser não é focalizado porém concentrado no diâmetro interno do capilar por um sistema de lentes convergentes localizadas no cartucho do capilar. Outro fator que contribui decididamente para uma melhor resolução no caso do aparelho descrito é a capacidade confocal do instrumento, ou seja, qualquer sinal proveniente de emissões de luz fora da região focal, é fortemente rejeitado pela instrumentação. Devemos destacar que embora o campo elétrico para a separação tenha sido o mesmo nos dois instrumentos, a voltagem de injeção no instrumento comercial deveria ter sido igual a 2,81 kV e não 5 kV. Esta diferença leva à introdução de uma quantidade maior de amostra no instrumento comercial podendo também ser responsável pela perda da resolução do eletroferograma.

Figura 8 Eletroferograma obtido de uma solução de ZnPcTS (10^{-3} mol. L^{-1}) no equipamento implementado (A) e no equipamento comercial (B). Condições para equipamento implementado: injeção eletrocínica: -5 kV / 5 s; eletrólito: citrato 0,100 mol. L^{-1} , pH 2,5; voltagem de corrida: -30 kV, "binning" = 100. Capilar: 75 μ m de diâmetro interno, 83,5 cm de comprimento total (40,5 cm ao detector). Condições para o equipamento comercial: injeção eletrocínica -5 kV / 5 s; eletrólito: citrato 0,100 mol. L^{-1} , pH 2,5; voltagem de corrida: -16,8 kV. Capilar: 75 μ m de diâmetro interno, 47cm comprimento total (40 cm ao detector).

1.4 Conclusão

A construção do equipamento de eletroforese capilar é simples e economicamente viável e sua adaptação a outros sistemas de detecção disponíveis é igualmente factível. O equipamento implementado no laboratório apresenta boa resposta linear do detector e reprodutibilidade de sinal. Sua performance quando comparada a um equipamento comercial mostra um limite de detecção considerado bom dentre os padrões aceitos na literatura para este tipo de detecção por fluorescência, i.e..

É claro que o custo da instrumentação espectroscópica usado neste trabalho é muito elevado frente ao custo de um equipamento comercial para eletroforese capilar. No entanto, um sistema compreendendo: i) um monocromador de 20 cm de distância focal com rede de difração de 160 linhas/mm (resolução de ca. 2 nm numa faixa espectral de 350 a 1000 nm); ii) um detector CCD, interface controladora do detector, computador e software; iii) laser de He/Ne de 5 mW; iv) lentes, filtros ópticos para cortar a luz do laser (notch filters) e interferências espectrais de ordem superior (filtros de canto) e v) fonte de alta tensão, capilar e outros pequenos acessórios, pode custar atualmente não mais que US\$ 25,000.00. Além do custo reduzido (ca. de 1/4 do custo do instrumento comercial, este sistema seria ainda mais versátil, pois poderia ser facilmente adaptado para outros tipos de experimentos espectroscópicos, como fotoluminescência (de estado sólido) induzida por laser, ou, com uso de uma lâmpada de tungstênio, ser usado para fazer espectroscopia de absorção e reflectância no visível e infravermelho próximo^{15, 16} (vide refs.[10 e 11], onde um sistema óptico semelhante ao descrito acima foi montado para fazer espectroscopia de reflectância no visível).

Além disso, este trabalho mostra que arranjos experimentais utilizados em espectroscopia Raman laser, já existentes, podem ser adaptados para serem utilizados como sistema de detecção de fluorescência induzida por laser.

1.5 Referências Bibliográficas

1. Weinberger R.; Practical Capillary Electrophoresis; Academic Press; 1993, pag. 17; Baker D.R.; Capillary Electrophoresis; John Wiley & Sons Inc.; 1995. , pag.4.
2. Walbroehl Y. e Jorgenson J.W.; J. Chromatogr., 315(1984)135.
3. Albin M.; Weinberger R.; Sapp E. e Moring S.; Anal. Chem., 63(1991)417.
4. Chen D.Y.; Swerdlow H.P.; Harke H.R.; Zhang J. Z. e Dovichi N.J.; J. Chromatogr.y, 559(1991)237.
5. Moseley M.A.; Deterding L.J.; Tomer K.B. e Jorgenson J.W.; J. Chromatogr. 63(1991)109.
6. Ackermans M.T.; Everaerts F.M. e Beckers J.L.; J. Chromatogr., 593(1991)289.
7. Huang X.; Zare R.N.; Loss S. e Ewing A.G.; Anal. Chem., 63(1991)189.
8. Altria K.D.; Simpson C.F.; Bharig A.K. e Theovald A.E.; Electrophoresis, 11(1990)732.
9. Bruno A.E.; Krattiger B.; Maystre F. e Widmer H.M.; Anal. Chem., 63(1991)2689.
10. Christensen P.L. e Yeung E.S., Anal. Chem., 61(1989)1344.
11. Chen C. Y. e Morris M.D., J. Chromatogr., 540(1991)335.
12. Ewing G.W.; Analytical Instrumentation Handbook; Marcel Dekker Inc.; 1997, pag. 1359.
13. Olefirowicz T.M. e Ewing A.G.; Capillary Electroforesis; Academic Press; 1992, pag. 66.
14. Landers J.P., Handbook of Capillary Electrophoresis; CRC, 1996, pag. 381.
15. Rubim J.C.; J. Electrochem. Soc; 140(1993)1601.

16. De Santana, H.; Temperini, M.L.A. e Rubim, J.C.; J. Electroanal. Chem., 356(1993)145.

CAPÍTULO 2

Síntese, Purificação e Análise de cátions, ânions e contaminantes orgânicos da Ftalocianina Sulfonada de Zinco por Eletroforese Capilar

2.1 Introdução

Bonnet ¹, em seu artigo de revisão sobre PDT, sugere que ftalocianinas de zinco e alumínio são bastante promissoras como agentes fotosensibilizadores, entre outros tipos de compostos similares. Baseado no fato de que a hidro e lipofilicidade são a chave para a interação entre a droga e a célula, o grau de sulfonação é um fator importante a ser considerado. Para o caso da ftalocianina de zinco Bonnet atribui a melhor interação à espécie dissulfonada.

Neste capítulo abordaremos sucintamente o método de síntese² adotado bem como os processos de purificação descritos na literatura³, como HPLC de fase reversa, salting-out e salting-out associado à percolação em coluna de Sephadex.

De uma maneira geral, as Pcs metaladas podem ser sintetizadas facilmente por diversos métodos diferentes, sendo que os mais conhecidos são a condensação e sulfonação.

Vários métodos de purificação como salting-out, lavagem ácido/base, percolação em coluna, extração com sohxlet para a purificação das ftalocianinas foram utilizados.

Segundo Ali e col.³, a síntese de um determinado grau de sulfonação pode ser favorecido se utilizadas proporções adequadas de ácidos ftálico e sulfoftálico. No caso da ftalocianina de zinco, o uso de 50 % de ácido ftálico + 50 % de ácido 4'-sulfoftálico na formulação resulta na obtenção de ftalocianinas mono, di, tri e tetrasulfonadas mas com a espécie dissulfonada representando a maior parte do produto final obtido.

Concentramos nossos esforços, portanto, na síntese da ftalocianina de zinco dissulfonada $ZnPcS_2$ e nos métodos encontrados para purificá-la e analisá-la por CE.

Os produtos finais obtidos segundo cada tratamento, foram avaliados em termos dos contaminantes orgânicos como produtos laterais de síntese, cátions e ânions que ainda estão presentes após os processos de purificação. Baseados nestes resultados foi possível desenvolver um estudo sistemático envolvendo métodos combinados de purificação, com o objetivo de alcançar produtos mais puros e de constituição conhecida.

2.2 *Parte Experimental*

Síntese

Neste trabalho adotamos como método de síntese a condensação² por vários motivos. Inicialmente porque é um método mais simples e que oferece menor perigo de manipulação dos reagentes, fácil disponibilidade dos reagentes de partida e principalmente um controle maior dos produtos formados em termos de graus de sulfonação e isômeros de posição. Diferentemente da sulfonação, que demanda inicialmente a utilização de ácido sulfúrico fumegante com 30% de SO₃, cujo acesso foi extremamente difícil. Por sulfonação, a formação aleatória de isômeros de posição dificultam a interpretação de resultados como foi reportado por Ali e col.⁴ e Phillips e col.⁴ na análise da ftalocianina sulfonada de gálio.

A condensação consiste, numa primeira etapa, da mistura de uréia e molibdato de amônia que se funde a uma temperatura de 200 °C. Ao produto fundido, adiciona-se cloreto de amônio, sulfato de zinco e os ácidos ftálico e 4'-sulfoftálico, na forma de seus sais de sódio. A composição do produto final é dependente da proporção relativa dos 2 ácidos em termos de espécies multisulfonadas. Com o objetivo de favorecer a formação da espécie dissulfonada, utilizamos os ácidos ftálico e 4'-sulfoftálico em proporções equimolares.

A formação de espécies multisulfonadas não são as únicas variáveis deste sistema, a formação de isômeros de posição e a possibilidade de formação de agregados serão discutidas no capítulo 3.

Purificação

Salting-out

Este procedimento foi feito segundo Weber e Bush¹, e consiste na lavagem da ftalocianina recém preparada com uma solução aquosa de HCl tipicamente 1mol.L^{-1} saturada com NaCl. O meio fortemente ácido com o excesso de NaCl na solução promove a precipitação da ftalocianina na forma ácida de forte cor verde. Posteriormente, utiliza-se uma solução de NaOH para dissolver o precipitado, fornecendo uma solução de forte coloração azul, contendo o sal sódico da ftalocianina purificada. Como produto final, no entanto obtêm-se uma ftalocianina purificada com grande quantidade de NaCl.

Extrações com Soxhlet

As extrações com Soxhlet foram feitas com acetonitrila (MeCN), metanol (MeOH), etanol (EtOH) e n-hexano. Estes solventes foram escolhidos seguindo o critério de polaridade. O objetivo era extrair a ftalocianina com um determinado grau de sulfonação, explorando sua interação com o solvente, ou seja, esperava-se extrair a maior quantidade de ftalocianina de zinco tetrasulfonada, por exemplo, com o solvente mais polar, acetonitrila.

Lavagens ácido – base

Esta purificação é uma variante do “salting-out”, com a vantagem de não contaminar o produto final com grandes quantidades de NaCl. Ao produto impuro adiciona-se HCl 1mol.L^{-1} , aquecendo-se à 80°C . A seguir, a ftalocianina de cor verde é filtrada. O sólido obtido é dissolvido ao adicionar-se NaOH $0,1\text{mol.L}^{-1}$ dando origem a uma solução azul intenso. A seguir esta solução é aquecida à secura, o sólido obtido é lavado com acetona para retirada do NaCl e NaOH em excesso.

A acetona é evaporada e o sólido obtido é seco sob vácuo e guardado em dessecador, por ser higroscópico.

Cromatografia de coluna

O objetivo desta técnica é separar as ftalocianinas de produtos de partida e outros contaminantes de baixa massa molecular.

Foi utilizado um adsorvente clássico na cromatografia de coluna, a sílica gel G60, que por suas características polares e devidos aos seus sítios básicos, retém preferencialmente compostos ácidos.

Na percolação da ftalocianina impura observa-se o aparecimento de três bandas principais, uma mais rápida e azulada separada, uma banda intermediária amarelada e uma verde-azulada.

Na separação da ftalocianina tratada previamente pela lavagem ácido/base observou-se o aparecimento de duas bandas principais, uma rápida de cor azul intenso e outra mais lenta de cor também azul mas de intensidade mais fraca.

Reagentes

As soluções de amostras, padrões e eletrólitos foram preparadas no momento da execução do experimento, com água deionizada com uma condutância de $10^{-18} \Omega^{-1}$.

Os solventes utilizados para as extrações por sohxlet são todos de grau cromatográfico.

A sílica gel utilizada é G60 sem fluoresceína e de procedência Merck.

Soluções de NaOH (1mol.L^{-1}), HNO_3 (1:1 v/v) e de tampão eletrolítico foram utilizadas como soluções condicionantes de capilar.

As soluções tampão foram preparadas a partir de uma solução de ácido cítrico. O pH foi corrigido com HCl.

Instrumentação

Os eletroferogramas com detecção UV-Vis, foram obtidos num sistema de eletroforese capilar modelo 270A-HT, divisão Applied Biosystems da Perkin Elmer. Este sistema possui como detector uma matriz de fotodiodos.

Os espectros de absorção eletrônica na região do UV-Vis, foram obtidos num equipamento HP 8453 Diode Array Spectrophotometer, em cela de quartzo com 1 mm de caminho óptico.

Capilares

Os capilares utilizados são da Polymicro Technologies Inc, sem nenhum tipo de revestimento interno. As dimensões utilizadas foram 75 μm de diâmetro interno e 365 μm de diâmetro externo, com 72 cm de comprimento total com 50 cm ao detector no instrumento da Perkin Elmer.

O método de condicionamento utilizado antes de cada experimento consiste na lavagem sucessiva de 5 minutos de ácido nítrico 1:1 (v/v), 10 minutos de água, 5 minutos de hidróxido de sódio 1 mol.L⁻¹, 10 minutos de água e 20 minutos de tampão eletrolítico. Detalhes sobre o condicionamento do capilar serão discutidos no capítulo 3.

2.3 Resultados e Discussões

2.3.1 Análise de Impurezas Orgânicas

Para a análise das impurezas orgânicas presentes nos produtos finais de purificação, fez-se necessário um estudo prévio dos espectros eletrônicos de absorção na região do ultravioleta e visível dos compostos obtidos. O objetivo deste estudo era identificar o melhor comprimento de onda em que pode ser monitorada a presença dos contaminantes orgânicos com a menor interferência possível do sinal da Pc e vice-versa.

Neste estudo utilizamos uma amostra padrão comercial de ftalocianina de zinco tetrasulfonada (ZnPcS_4) cujo espectro eletrônico de absorção mostra uma banda em 634 nm atribuída à uma transição $n \rightarrow \pi^*$, também chamada banda "Q". Esta banda também pode ser atribuída à espécie dimérica da Pc em solução, e o ombro em aproximadamente 675 nm, atribuída à espécie monomérica. Em 340 nm observa-se a presença da banda Soret, atribuída à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ ⁵.

As figuras 9 e 10 mostram os espectros de absorção na região de 190 a 800 nm de uma amostra comercial de ZnPcS_4 e da ZnPcS_2 na forma de um produto não purificado.

Os espectros eletrônicos não apresentam mudanças distintas em função do grau de sulfonação da Pc. Entretanto, ao compararmos o espectro da amostra padrão e do produto impuro, verificamos que a região abaixo de 340 nm é sensível à presença de contaminantes, sejam eles produtos laterais ou reagentes não consumidos durante a reação. Selecionamos 260 nm como o comprimento de onda mais adequado para monitorar os contaminantes orgânicos na amostra, pois encontra-se além da absorção da banda Soret. Para a análise da própria ftalocianina sem a interferência de contaminantes orgânicos, adotamos 635 nm como o comprimento de onda mais adequado.

Figura 9 Espectro de absorção UV-vis da ZnPcS₄ padrão comercial.

Figura 10 Espectro de absorção UV-vis da ZnPcS₂ impura.

A Figura 11 mostra os eletroferogramas em 260 nm, obtidos de amostras de ftalocianinas de zinco dissulfonadas purificadas segundo os métodos já descritos na parte experimental deste capítulo.

Com relação à amostra impura (11a), os produtos purificados obtidos por salting-out e lavagem ácido/base apresentaram o melhor resultado final. Os eletroferogramas 11 b e c mostram um menor número de picos com relação a

amostra impura (11 a) mas ainda assim estes tratamentos deixam impurezas no produto final. O eletroferograma da Figura 11 d, por outro lado mostra que a coluna de sílica gel interfere negativamente na purificação da amostra pelo grande aumento no número de picos.

Figura 11 Eletroferogramas obtidos em 260 nm de: (a) ZnPcS_2 impura; (b) ZnPcS_2 purificada por salting-out; (c) ZnPcS_2 purificada por lavagem ácido / base; (d) ZnPcS_2 purificada por cromatografia em coluna de sílicagel. Condições: citrato 20 mM pH 2,5; injeção hidrodinâmica: 2,5s / 5 pol. Hg; Voltagem de corrida: -25 KV.

A seguir, a Figura 12 mostra os eletroferogramas obtidos de amostras submetidas à extração por Soxhlet.

Os solventes considerados para a extração por sohxlet foram escolhidos de acordo com a sua polaridade, visando assim induzir a extração de componentes mais ou menos polares de acordo com o solvente empregado.

Após a extração, as fases líquidas em acetonitrila e etanol apresentam pouca quantidade de impurezas extraídas, deixando a maior parte juntamente com o produto de interesse nas respectivas fases sólidas. A similaridade entre os eletroferogramas indica que a eficiência do etanol, acetonitrila e n-hexano na extração das impurezas é a mesma. Para o tratamento com metanol menos seletivo e mais eficiente, verificamos na fase líquida a maior presença de impurezas extraídas. O n-hexano não mostrou nenhum pico no eletroferograma.

A principal desvantagem da extração por sohxlet é a possibilidade da extração da própria Pc. Solventes como metanol, por ser o mais polar, extraem em grande quantidade a Pc pois experimentalmente pode-se observar a extração do produto fortemente azul. O mesmo efeito não foi observado quando solventes como acetonitrila e etanol foram empregados.

Figura 12 Eletroferogramas obtidos em 260 nm das amostras de ZnPcS_2 obtidas após extração em sohxlet nos solventes indicados. Condições: citrato 20 mM pH 2,5; injeção hidrodinâmica: 2,5s / 5 pol. Hg; Voltagem de corrida: -25KV.

2.3.2 Análise de Íons – Cátions e Ânions

A análise de cátions e ânions foi feita pelo método indireto de detecção. Íons como sódio, cloreto, sulfato e amônio não absorvem na região do UV. O procedimento seguido neste caso, é a utilização de um aditivo dotado de um grupo fortemente cromóforo ao eletrólito de corrida (BGE). No caso da análise de cátions por exemplo, o aditivo cromóforo ao BGE é o imidazol, que absorve fortemente ao redor de 214 nm, enquanto que para a análise de ânions utilizamos o cromato, que absorve fortemente nas proximidades de 254 nm.

A função do grupo cromóforo no BGE é produzir um intenso sinal de absorção de maneira contínua no decorrer da separação. Dessa forma, quando uma banda do analito atravessar a janela de detecção, o sinal do cromóforo é deslocado, dando lugar a picos negativos correspondentes aos analitos que não absorvem.

Inicialmente, as Figuras 13 e 14 mostram os eletroferogramas obtidos de soluções padrões de cátions que nos auxiliaram na atribuição dos picos encontrados nos eletroferogramas. As condições experimentais utilizadas para a obtenção dos eletroferogramas utilizaram além do imidazol como grupo cromóforo o ácido hidroxí-isobutírico (HIBA) cuja função é complexar os cátions e assim discriminá-los durante a separação.

Figura 13 Eletroferograma do padrão de cátions. Condições: Hiba 5 mM + Imidazol 5 mM (pH 4,5); injeção hidrodinâmica: 0,5s / 5 pol. Hg; Voltagem de corrida: 30KV, 30 °C, $\lambda=214$ nm. Concentração dos cátions: 1mmol.L⁻¹.

Para a obtenção do eletroferograma da Figura 14, utilizamos também 8-éter coroa como complexante auxiliar, com a função de complexar potássio e amônia e assim discriminá-los durante a separação. Utilizando-se apenas HIBA como agente complexante, potássio e amônia que co-eluem.

Figura 14 Eletroferograma do padrão de cátions. Condições: éter 8-coroa 5mM + Hiba 5 mM + Imidazol 5 mM (pH 4,5); injeção hidrodinâmica: 0,5s / 5 pol. Hg; Voltagem de corrida: 30 KV, 30 °C, $\lambda = 214$ nm.

A Figura 15 mostra os eletroferogramas obtidos da $ZnPcS_2$ impura e após a purificação por salting-out, tratamento ácido/base e percolação em coluna de sílica gel.

Pode-se verificar claramente pelos eletroferogramas obtidos as presenças de sódio e amônio basicamente, entretanto um pequeno pico atribuído ao zinco pode ser observado.

A presença de amônio é explicada pela utilização de sais como cloreto e molibdato de amônio e uréia na síntese da Pc. Apesar da mistura reacional ter sido submetida a temperaturas da ordem de 200 °C, esperar-se-ia que a sublimação do cloreto de amônio e a decomposição da uréia em amônia e gás carbônico tivessem sido quantitativas em ambos os casos. Entretanto, ainda assim, observa-se a presença de amônia nas amostras. Os eletroferogramas das $ZnPcS_2$ tratadas por salting-out ou lavagem ácido/base aparentemente não mostram picos relativos à presença da amônia, isto porque, como o sódio está

em grande quantidade seu sinal é bastante intenso mascarando o pico do amônio de menor intensidade.

Figura 15 Eletroferogramas obtidos da ZnPcS₂ tratadas segundo os métodos indicados. Condições: Hiba 5 mM + Imidazol 5 mM (pH 4,5); injeção hidrodinâmica: 0,5s / 5 pol. Hg; Voltagem de corrida: 30KV, 30 °C, $\lambda = 214$ nm.
1) Amônio; 2) sódio; 3) zinco.

A presença de sódio é uma constante em todas as amostras, o que é esperado pois o sódio é o contra-íon e cuja concentração no produto final é consistente com o tipo de tratamento utilizado para a purificação, ou seja, a maior concentração de sódio foi observada para as amostras submetidas ao tratamento salting-out, principalmente.

A presença do zinco pode ter duas origens diferentes, como reagente não consumido durante a síntese ou a ftalocianina está sofrendo um processo de desmetalização durante o processo de purificação.

A Figura 16 mostra os eletroferogramas das ZnPcS₂ submetidas à extração por sohxlet. Observa-se que tanto para as fases sólidas como para as fases líquidas, independentemente do solvente utilizado, uma grande quantidade de sódio. Podemos observar a semelhança entre os eletroferogramas da Figura 16 com o eletroferograma da ftalocianina percolada em coluna de sílica gel da Figura 15. A elevada presença de sódio em todas as

amostras é atribuída ao produto de partida que é o sal de sódio do ácido 4'-sulfoftálico, única fonte de sódio neste caso. Observa-se também a presença do zinco.

Figura 16 Eletroferogramas obtidos da ZnPcS_2 tratadas segundo os métodos indicados. Condições: Hiba 5 mM + Imidazol 5 mM (pH 4,5); injeção hidrodinâmica: 0,5s / 5 pol. Hg; Voltagem de corrida: 30KV, 30 °C, $\lambda=214$ nm.
1) amônio; 2) sódio; 3) zinco

As figuras 17, 18 e 19, a seguir, mostram os eletroferogramas obtidos da solução padrão de ânions e das mesmas amostras das figuras anteriores porém utilizando-se as condições experimentais para a análise de ânions.

Os eletroferogramas mostram que para as ftalocianinas submetidas ao tratamento ácido / base e salting-out apresentam a maior quantidade de cloreto. Resultado consistente com aquele observado para a análise de cátions para as mesmas amostras. A presença de sulfato é atribuída à utilização de sulfato de zinco para a síntese, aparentemente não removido com nenhum tratamento.

Figura 17 Eletroferograma da solução padrão de ânions. Condições: Cromato 5 mM + CTAB 0,1 mmol.L⁻¹ (pH 8.6); injeção hidrodinâmica: 0,5s / 5 pol. Hg; Voltagem de corrida: - 30 KV, 30 °C, $\lambda = 254$ nm. Concentração dos ânions: 1mmol.L⁻¹.
1) cloreto; 2) sulfato; 3) carbonato; 4) molibdato

Figura 18 Eletroferograma da ZnPcS₂ tratadas segundo os métodos indicados. Condições: Cromato 5 mM + CTAB 0,1 mmol.L⁻¹ (pH 8.6); injeção hidrodinâmica: 0,5s / 5 pol. Hg; Voltagem de corrida: - 30 KV, 30 °C, $\lambda = 254$ nm.
1) cloreto; 2) sulfato

Os eletroferogramas da Figura 19 mostram que a extração dos ânions é sensivelmente dependente do solvente utilizado no processo. Em acetonitrila,

metanol e etanol, por exemplo, as fases líquidas, que representam as impurezas extraídas, não indicam a presença de sulfato porém observamos a presença de grande quantidade de cloreto. Para as fases sólidas observa-se tanto cloreto como sulfato, no entanto neste caso o sulfato predomina. Em n-hexano por outro lado, a fase sólida não indicou a extração de nenhum destes ânions como era de se esperar neste caso. A fase líquida de n-hexano não forneceu nenhuma extração no eletroferograma.

Figura 19 Eletroferogramas obtidos da ZnPcS_2 tratadas segundo os métodos indicados. Condições: Cromato 5 mM + CTAB 0,1 mM (pH 8.6); injeção hidrodinâmica: 0,5s / 5 pol. Hg; Voltagem de corrida: -30KV, 30 °C, $\lambda=254$ nm.
1) cloreto; 2) sulfato.

Inicialmente pode-se concluir que dos métodos de purificação investigados, aqueles que têm se destacado como os mais adequados são, (nesta ordem de eficiência): 1-salting-out; 2- tratamento ácido/base; 3- cromatografia em coluna de sílica gel e 4- extração por sohxlet.

A tabela 3, resume, as vantagens e desvantagens de cada método utilizado para a purificação das ftalocianinas.

Tabela 3: Vantagens e Desvantagens dos Métodos de Purificação das Pcs

Método	Vantagem	Desvantagem
Salting-out	<ul style="list-style-type: none"> • eliminação dos produtos orgânicos laterais e ácidos não consumidos na síntese 	<ul style="list-style-type: none"> • grande quantidade de sal no produto final • perda de grande quantidade de composto • presença de zinco
Lavagem ácido/base	<ul style="list-style-type: none"> • eliminação dos produtos laterais e reagentes orgânicos da síntese • pouca quantidade de sal no produto final 	<ul style="list-style-type: none"> • pH final alto • perda de grandes quantidades de composto • presença de zinco
Extração por sohxlet	<ul style="list-style-type: none"> • solução neutra 	<ul style="list-style-type: none"> • perda de composto (a extração da impureza leva à extração do próprio composto) • contaminação do produto final pelo solvente utilizado • presença de zinco
Percolação em coluna de sílica gel	<ul style="list-style-type: none"> • solução neutra • eliminação de sais inorgânicos 	<ul style="list-style-type: none"> • compostos orgânicos ainda presentes • diluição • presença de zinco

Com base nos eletroferogramas apresentados, admitimos que cada método isoladamente não é suficiente para se obter um produto final satisfatoriamente puro. No sentido de alcançar um método de purificação mais eficiente do que aqueles descritos na literatura, desenvolvemos um estudo sistemático, combinando os métodos de purificação já descritos.

Considerando que o tratamento por salting-out deixa grande quantidade de cloreto de sódio como resíduo, adotamos como tratamento comum a todos os procedimentos a lavagem ácido / base e submetendo posteriormente o produto obtido desta lavagem à percolação em coluna de sílica gel ou extração por sohxlet.

O eletroferograma da Figura 20 mostra os resíduos encontrados após tratamento combinado de lavagem ácido/base + percolação em coluna de sílica gel. Qualitativamente a combinação destes dois métodos de purificação melhoram a qualidade do produto final obtido, pois observamos um eletroferograma com apenas 3 picos, embora sem uma atribuição conhecida.

Figura 20 Eletroferograma da ZnPcS_2 em 260 nm – análise de resíduos orgânicos. Condições: citrato 20 mM pH 2,5; injeção hidrodinâmica: 2,5s / 5 pol. Hg; Voltagem de corrida: -25 KV.

A análise de cátions por sua vez mostra resultados mais satisfatórios (Figura 21), com picos bem definidos indicando uma concentração mais baixa do que aquela encontrada tanto no tratamento isolado de lavagem ácido / base, como na percolação em coluna de sílica gel. O pico em 4 min pode ser atribuída ao Fe^{3+} como contaminante da água.

Figura 21 Eletroferograma da ZnPcS_2 . Condições: Hiba 5 mM + Imidazol 5 mM (pH 4,5); injeção hidrodinâmica: 0,5s / 5 pol. Hg; Voltagem de corrida: 30 KV, 30 °C, $\lambda = 214$ nm.

A Figura 22 mostra os eletroferogramas da mesma amostra submetida à análise de ânions. Uma vez mais temos cloreto, sulfato e molibdato como resíduos de reagentes de partida. A presença de carbonato, entretanto, pode ser atribuída a duas fontes diferentes, pela decomposição da uréia em gás carbônico e amônia e ou pela utilização de soluções de NaOH que absorvem grande quantidade de gás carbônico do ar.

Figura 22 (a) Eletroferograma do padrão de ânions; (b) Eletroferograma da ZnPcS_2 purificada através do método combinado de lavagem ácido / base e percolação em coluna de sílica gel. Condições: cromato 5 mmol.L^{-1} + CTAB $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ (pH 8,6); injeção hidrodinâmica: $0,5 \text{ s} / 5 \text{ pol. Hg}$; Voltagem de Corrida: -30 kV , 30°C , $\lambda = 254 \text{ nm}$. 1) cloreto; 2) sulfato; 3) carbonato; 4) molibdato; 5) água

O tratamento combinado de lavagem ácido / base e extração por sohxlet, não mostrou resultados satisfatórios. Em 260 nm como pode ser observado nas Figuras 23 e 24, nota-se a presença de grande quantidade de impurezas tanto para as fases líquidas quanto sólidas da extração.

Figura 23 Eletroferogramas da ZnPcS_2 submetidas à lavagem ácido / base seguida de extração por sohxlet. Condições: citrato 20 mmol.L^{-1} (pH 2,5); injeção hidrodinâmica: 2,5s / 5 pol. de Hg; Voltagem de corrida: -25 kV. $\lambda = 260 \text{ nm}$; Os solventes estão indicados nas figuras.

Figura 24 Eletroferogramas da ZnPcS_2 submetidas à lavagem ácido / base seguida de extração por soxhlet. Condições: citrato 20 mmol.L^{-1} (pH 2,5); injeção hidrodinâmica: 2,5s / 5 pol. de Hg; Voltagem de corrida: -25 kV. $\lambda = 260 \text{ nm}$; Os solventes estão indicados nas figuras.

As Figuras 25 e 26 mostram os eletroferogramas obtidos para análise de cátions. Em todos os casos observa-se a presença de amônio e a grande quantidade de sódio, proveniente do tratamento anterior. Observa-se também o pico do zinco, proveniente provavelmente do sal de zinco utilizado na síntese e que não foi consumido na reação.

As Figuras 27 e 28 indicam que, para a análise de ânions ainda se observa a presença de cloreto e sulfato, embora a extração de cloreto nos solventes utilizados seja privilegiada em detrimento do sulfato. A utilização do n-hexano não resultou na extração de nenhum destes ânions.

Dos dois métodos combinados utilizados para a purificação da ZnPcS_2 , fica claro que a lavagem ácido / base seguida de percolação em coluna de sílica gel mostra resultados melhores.

Figura 25 Eletroferogramas da $ZnPcS_2$ submetidas à lavagem ácido / base seguida de extração por Soxhlet. Condições: citrato 20 mM (pH 2,5); injeção hidrodinâmica: 2,5s / 5 pol de Hg; Voltagem de corrida: -25 KV. $\lambda = 260\text{nm}$. Os solventes estão indicados em cada eletroferograma.
1) amônio; 2) sódio; 3) zinco.

Figura 26 Eletroferogramas da $ZnPcS_2$ submetidas à lavagem ácido / base seguida de extração por Soxhlet. Condições: citrato 20 mM (pH 2,5); injeção hidrodinâmica: 2,5s / 5 pol de Hg; Voltagem de corrida: -25 KV. $\lambda = 260\text{nm}$. Os solventes estão indicados em cada eletroferograma.
1) amônio; 2) sódio; 3) zinco.

Figura 27 Eletroferogramas da ZnPcS_2 submetidas à lavagem ácido / base seguida de extração por Soxhlet.
Condições: Cromato 5mM + CTAB 0,1 mM (pH 8,6); injeção hidrodinâmica: 0,5s / 5 pol de Hg; Voltagem de corrida: -30 KV; 30 °C; $\lambda = 254\text{nm}$. Os solventes utilizados estão indicados em cada quadro.
1) cloreto; 2) sulfato

Figura 28 Eletroferogramas da ZnPcS_2 submetidas à lavagem ácido / base seguida de extração por Soxhlet.
Condições: Cromato 5mM + CTAB 0,1 mM (pH 8,6); injeção hidrodinâmica: 0,5s / 5 pol de Hg; Voltagem de corrida: -30 KV; 30 °C; $\lambda = 254\text{nm}$. Os solventes utilizados estão em cada quadro.
1) cloreto; 2) sulfato

A tabela 4, resume a vantagem e a desvantagem dos métodos combinados utilizados na purificação das ftalocianinas.

Tabela 4 Vantagens e Desvantagens do Método de Purificação Combinado

Método Combinado	Vantagem	Desvantagem
<ul style="list-style-type: none"> • lavagem ácido/base seguida de percolação em silicagel 	<ul style="list-style-type: none"> • solução neutra • são excluídos alguns íons inorgânicos e impurezas de síntese 	<ul style="list-style-type: none"> • grandes perdas de composto (etapa de lavagem ácido/base)
<ul style="list-style-type: none"> • lavagem ácido/base seguida de extração por sohxlet 	<ul style="list-style-type: none"> • solução final neutra • são excluídos alguns íons inorgânicos e impurezas de síntese, embora não quantitativamente 	<ul style="list-style-type: none"> • grandes perdas de composto (etapa de lavagem ácido/base) • contaminação final da amostra pela presença do solvente utilizado na extração.

O rendimento de cada processo é variável, dependendo da quantidade de etapas envolvidas. Para o tratamento ácido / base isolado por exemplo, o rendimento é de 10%. Rendimentos muito menores são encontrados quando percolação em coluna de sílica gel é empregada, tanto no tratamento isolado como no tratamento combinado. A grande perda do produto se deve à forte adsorção da Pc na sílica da coluna. Utilizamos também Sephadex, cuja separação é baseada em tamanho, diferentemente da sílica que é baseada em interação eletrostática. Os resultados obtidos em Sephadex foram bastante desencorajadores, com eletroferogramas mostrando um grande número de impurezas, resultando em nenhum efeito sobre a purificação da Pc.

2.4 Conclusões

Embora a síntese da Pc seja simples, a purificação representa a etapa mais demorada e trabalhosa de todo o processo. As perdas durante o purificação são significativas, com rendimento ao redor de 5% considerando a síntese até o final dos processos de purificação. As maiores perdas estão na lavagem ácido – base.

O estudo sistemático realizado por eletroforese capilar com o objetivo de avaliar os processos de purificação foi bastante elucidativo pois fomos capazes de, em diferentes comprimentos de onda e utilizando diferentes condições experimentais, detectar e identificar cátions e ânions. Os contaminantes na forma de íons orgânicos, muito provavelmente produtos laterais e reagentes não consumidos na síntese, foram avaliados de maneira simples e rápida, mostrando com clareza a qualidade da amostra em função da purificação. Desta maneira pudemos traçar um perfil do processo de purificação.

Nossas análises mostraram que o processo de purificação é mais eficiente desde que se use a combinação de pelo menos dois processos. Durante este trabalho verificamos também que um desses processos deve ser uma lavagem ácido/base. A percolação em coluna de sílica gel foi mais eficiente no sentido de extrair cátions e ânions como sódio, entretanto ainda verificamos a presença de vários ânions. Os íons orgânicos por sua vez são extraídos mais eficiente na lavagem ácido – base. Este tratamento combinado, portanto, foi o mais adequado para a purificação das ftalocianinas de zinco sulfonadas, muito embora o produto final ainda apresente impurezas.

2.5 Referências Bibliográficas

1. Bonnet R., Chem. Soc. Rev., (1995)19.
2. M.Ambroz, A. Beeby, A.J. MacRobert, M S.C. Simpson, R.K. Svensen e D. Phillips. J. Photochem. Photobiol., 9b-1(1991)87.
3. Weber J.H.; Bush D.H.; Inorg. Chem. 4(1965)469; C. M. Allen, Weber J. M. e Van Lier J. E., Photochem. Photobiol. 62(1995)184; Skorobogaty A. e Smith T. D., J. Molec. Catal., 16(1982)131.
4. Ali H., Langlois R., Wagner J.R., Brasseur N., Paquette B., van Lier J. E., Photochem. Photobiol., 47(1988)713.
Bishop S.M., Khoo M.J., MacRobert A.J., Simpson M.S.C., Phillips D., Beeby A., J. Chrom., 646(1993)345.
5. Nagao Kobayashi, "Synthesis and Spectroscopic Properties of Phthalocyanine Analogues" em Phthalocyanines, Properties and Applications, Vol. 2, p. 104, VCH Publishers, NY, 1993.

CAPÍTULO 3

Análise de Ftalocianinas Sulfonadas de Zinco, Lutécio e Disprósio por Eletroforese Capilar – Solução Livre

3.1 Introdução

Neste capítulo discutiremos a separação e análise não apenas da ZnPcS mas também das ftalocianinas sulfonadas de disprósio (DyPcS) e lutécio (LuPcS).

Ftalocianinas de terras raras são vistas atualmente como drogas candidatas não somente para PDT mas também como substâncias contrastantes em exames como tomografia computadorizada¹. Desta forma optamos por, além de trabalhar com ftalocianinas de zinco, também incluir neste estudo as ftalocianinas de disprósio e lutécio.

O desenvolvimento de um método de análise para as ftalocianinas mostrou-se um processo bastante complexo. Para tanto, nesta etapa da tese, não mais apresentaremos resultados de amostras sintetizadas no laboratório, mas sim de padrões comerciais.

A intenção da construção do instrumento descrito no capítulo 1, seria a atribuição dos eletroferogramas das ftalocianinas baseada em seus espectros, entretanto, a estreita faixa espectral (400 cm^{-1}) obtida nos eletroferogramas não nos permitiu a atribuição da forma que pretendíamos. Portanto, nesta etapa do trabalho, passaremos a utilizar o instrumento comercial da Beckman e não o instrumento implementado.

Aproveitando a propriedade de emissão de fluorescência que as Pcs apresentam na região do vermelho do espectro eletromagnético, adotamos como detecção do trabalho a fluorescência induzida por laser (LIF).

3.2 Parte Experimental

3.2.1 Reagentes

As soluções de amostras padrões e eletrólitos foram preparadas no momento da execução do experimento com água deionizada com uma condutância de $10^{-18} \Omega^{-1}$.

Os padrões comerciais das ftalocianinas tetra e dissulfonadas de zinco, disprósio e lutécio são de procedência Porphyrin Prodc., e foram utilizados sem prévia purificação.

Soluções de NaOH (1 mol L^{-1}), HNO_3 (1:1 v/v) e de tampão eletrolítico foram utilizadas como soluções condicionantes de capilar.

As soluções tampão foram preparadas a partir de uma solução de ácido cítrico, ácido fórmico e CAPS nas concentrações desejadas. As soluções tamponantes tiveram seu pH corrigido com HCl ou NaOH, conforme o caso.

3.2.2 Instrumentação

Os eletroferogramas com detecção LIF, foram obtidos no sistema de eletroforese capilar modelo P/ACE 5510 da Beckman-Coulter Inc. Neste instrumento, o capilar é acondicionado num cartucho, o qual permite a circulação de um líquido à base de fluorocarbonos para o controle da temperatura durante a corrida. Este equipamento é dotado de dois sistemas de detecção diferentes, um detector tipo “diode array” com 512 fotodiodos (DAD) para detecção por absorção na região do UV-vis, varrendo a região de 190 a 600 nm. Para detecção de fluorescência induzida por laser temos uma fotomultiplicadora que utiliza um conjunto de filtros de excitação e emissão em 635 e 675 nm, respectivamente.

A radiação excitante utilizada foi a linha 635 nm de um laser de semiconductor que é conduzido ao capilar por um cabo de fibra ótica.

Os espectros eletrônicos de absorção na região do UV-Vis, foram obtidos num equipamento HP 8453 Diode Array Spectrophotometer, em cela de quartzo com 1 mm de caminho óptico.

Os espectros de massas foram obtidos num instrumento modelo LCQ 15 da marca Finnigan, do Departamento de Química da Universidade de York – York – Inglaterra.

Em todos os espectros utilizamos, para a fonte ESI as condições abaixo:

Voltagem do spray	- 4.21 kV
Corrente do spray	0.68 μ A
Voltagem no capilar	-22,18 V
Temperatura do capilar	250 °C

Os espectros mostrados foram obtidos de uma média de 100 varreduras.

No apêndice da página 179 encontram-se tabelados os dados de massas e abundância das espécies estudadas neste capítulo bem como o seu espectro teórico.

Estudos envolvendo a fragmentação induzida das ftalocianinas foi feito utilizando-se como recurso a Collision Induced Fragmentation ou CID em porcentagens. O número se refere a uma série de parâmetros dentro da fonte focalizadora dos octopolos A unidade porcentagem não tem um significado físico, apenas indica o grau de dissociação. Quanto maior o número maior a dissociação. O máximo obviamente é 100% e ao redor de 35% tipicamente temos a dissociação de clusters e a quebra de algumas ligações químicas.

3.2.3 Capilares

Os capilares utilizados são da Polymicro Technologies Inc, sem nenhum tipo de revestimento interno. As dimensões utilizadas foram 75 μ m de diâmetro interno e 365 μ m de diâmetro externo, com 47 cm de comprimento total com 40 cm ao detector.

O método de condicionamento utilizado antes de cada experimento consiste na lavagem sucessiva de 5 minutos de ácido nítrico 1:1 (v/v), 10 minutos de água, 5 minutos de hidróxido de sódio 1 mol.L⁻¹, 10 minutos de água e 20 minutos de tampão eletrolítico.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Condicionamento do Capilar

O primeiro aspecto a ser discutido é o condicionamento do capilar. Este procedimento é quase tão importante quanto a escolha da voltagem ou do eletrólito de corrida em muitos casos. Na análise das ftalocianinas não foi diferente.

Devido ao forte poder de adsorção da Pc sobre a sílica, o condicionamento inadequado do capilar resulta na distorção de picos e na irreprodutibilidade dos tempos de migração e área de pico.

Assumimos como modelo que a adsorção da Pc na superfície interna do capilar acontece de maneira aleatória, resultando na alteração da dupla camada elétrica e, conseqüentemente, no potencial zeta, afetando diretamente o fluxo eletroosmótico e finalmente a separação.

A utilização de uma solução de HNO_3 1:1 (v/v) é uma etapa necessária e suficiente para a limpeza do capilar. O HNO_3 como forte agente oxidante, reage quimicamente com a ftalocianina destruindo o macrociclo fornecendo como produtos finais ftalimidas e sulftalimidas. Em seguida, lavagens de água, hidróxido de sódio e eletrólito de corrida são suficientes para tratar e condicionar a superfície da sílica de maneira eficiente.

Não encontramos como sendo necessária a lavagem do capilar com HNO_3 antes de cada corrida, é suficiente apenas como um pré tratamento de capilar.

3.3.2 A análise das ftalocianinas por eletroforese em solução livre

Como já apresentamos na parte introdutória desta tese, o eletrólito de corrida é freqüentemente um tampão, uma vez que a mobilidade e fluxo eletroosmótico são dependentes do pH. A faixa de concentração dos tampões eletrolíticos vão tipicamente de 10 a 200 mmol.L⁻¹. Um tampão diluído promove separações mais rápidas mas a resolução da separação é pobre². Por outro lado, tampões mais concentrados resistem melhor a variações de pH pela adição de pequenas quantidades de ácidos e bases, mas apresentam a desvantagem de serem muito condutores, gerando calor quando submetidos à alta voltagem.

O primeiro aspecto levado em consideração para a análise das Pcs foi essencialmente a carga. Ftalocianinas sulfonadas são moléculas, que dependendo da quantidade de grupos sulfona e do tipo de metal colocado no centro do anel, podem apresentar carga positiva, neutra ou negativa. A ZnPcS₄, por exemplo, tem duas cargas positivas do zinco, duas cargas negativas dos dois átomos de N (parte central do anel) e mais quatro cargas negativas devido aos grupos sulfonas, num total de 4 cargas negativas (Figura 2).

A tabela 5 abaixo resume a carga das ftalocianinas empregadas neste estudo.

Tabela 5 : As ftalocianinas sulfonadas e a carga para cada espécie

Espécie	Carga
ZnPcS ₄	-4
ZnPcS ₂	-2
Lu e DyPcS ₄	-3
Lu e DyPcS ₂	-1

Assim sendo, temos 2 opções principais que podem dar início à escolha de um método de separação.

- 1) polaridade invertida utilizando-se eletrólito ácido;
- 2) polaridade normal utilizando-se eletrólito alcalino;

Por polaridade normal entende-se que o polo positivo ou de alta voltagem está localizado na extremidade da injeção, consequentemente, na polaridade invertida tem-se o polo aterrado na injeção.

A análise de ânions com polaridade invertida deve ser conduzida utilizando-se um eletrólito ácido, pois as moléculas do analito migram na direção contrária do fluxo eletroosmótico. O eletrólito ácido protona os grupos silanol da superfície do capilar, como consequência, o fluxo-eletroosmótico é residual. A ilustração da Figura 29, a seguir, mostra este tipo de separação.

Figura 29 Esquema da separação com polaridade invertida.

Este método é adequado para a análise das ftalocianinas tetrassulfonadas pois são moléculas aniônicas que, quando sob a influência do campo elétrico, migram no sentido do catodo, vencendo com facilidade a fraca componente do fluxo eletroosmótico. Com a diminuição da carga, como é o caso das ftalocianinas dissulfonadas, migra mais lentamente levando a longos tempos de análise.

O segundo modo de separação, com polaridade normal e eletrólitos alcalinos temos o polo de alta voltagem localizado na injeção. Neste caso a ftalocianina como ânion migra uma vez mais no contra-fluxo do fluxo eletroosmótico.

3.3.2.1 ZnPcS_4

Adotamos como substância referência para esta investigação inicial o padrão comercial ZnPcS_4 e como eletrólito de corrida citrato 20 mmol.L⁻¹ pH 2,5.

A Figura 30 mostra, entre outros, o eletroferograma da ZnPcS_4 10⁻⁴ mol.L⁻¹ (concentração utilizada nos ensaios clínicos¹) em citrato 20 mmol.L⁻¹, pH 2,5. Pode-se observar o aparecimento de 2 picos intensos em 3,99 e 4,29 min, os quais foram tentativamente atribuídos aos isômeros de posição.

Figura 30 Eletroferogramas da ZnPcS_4 10⁻⁴ M em citrato pH 2,5. As concentrações dos eletrólitos estão indicadas na figura. Condições: Voltagem de corrida: -15 kV; Injeção hidrodinâmica: 3s / 5 psi; 25 °C

Sabe-se que esta ftalocianina existe na forma de 4 isômeros de posição³. O formato alargado, e a observação de apenas dois picos no eletroferograma ao invés de 4 como esperávamos, sugere que os outros dois isômeros estão provavelmente co-eluído.

Para melhorar as condições de separação variamos a concentração eletrolítica.

O aumento da concentração do eletrólito de corrida tem a vantagem de diminuir a espessura da dupla camada elétrica e, conseqüentemente, aumentar a resolução da separação⁴. Em contrapartida o aumento da concentração de eletrólito aumenta o calor gerado pelo aumento da corrente, diminuindo a eficiência da separação – o efeito Joule.

Os eletroferogramas obtidos em 3 condições diferentes de concentração de tampão citrato pH 2,5, 20, 50 e 100 mmol.L⁻¹ da Figura 30, mostram que variando a concentração de eletrólito temos um aumento dos tempos de migração e uma pequena melhora na resolução dos picos.

Em 20 mmol.L⁻¹ apenas dois picos são observados, enquanto que em 100 mmol.L⁻¹ são observados três picos embora em nenhum dos casos houve resolução até a linha base.

O aumento da concentração do eletrólito leva a uma diminuição da velocidade do fluxo eletroosmótico, devido à diminuição do potencial zeta na superfície do capilar⁵. Desta forma o aumento do tempo de análise é perfeitamente esperado.

Outros fatores como interação da ftalocianina com as moléculas de eletrólito e a existência de dímeros e outras espécies de ordens superiores de estado de agregação, podem estar sendo observados no eletroferograma e dar origem a tal comportamento.

A interação pode ser feita em termos de complexação, como acontece com o borato.

O borato é um ânion cuja capacidade complexante com o analito a ser separado é bastante conhecido⁶. Segundo Widmer e col.⁶ para a análise de carboidratos que são espécies neutras, a complexação com borato é vantajosa pois lhes confere carga.

Na análise das ftalocianinas no entanto, a possível complexação com citrato pode levar a vários fenômenos como quebra de dímeros, ou espécies de maior grau de agregação, em monômeros, permitindo que sejam observados os diferentes isômeros de posição. Esta interação pode ser investigada através da espectrometria de massas.

A espectrometria de massas pode dar valiosas informações a respeito das espécies presentes na amostra e assim auxiliar na atribuição dos picos. Para

poder correlacionar os resultados no entanto, é necessário manter a condição de separação por CE o mais próximo possível dos espectros de massas. Para mimetizar o meio ácido do tampão citrato pH 2,5, tamponamos uma solução 10^{-4} mmol.L⁻¹ da ZnPcS₄, utilizando ácido fórmico pelo seu carácter volátil. Porém antes de discutirmos o espectro de massas em meio ácido, discutiremos o espectro de massas em meio neutro, sem a presença de nenhum outro ânion que possa induzir desmetalção, complexação ou adicionar outras variáveis ao sistema. Obtivemos também o espectro de massas em meio alcalino para efeito de comparação. Para auxiliar na atribuição dos espectros utilizamos o software ISO.PRO 3.0, que calcula o espectro de massas e a intensidade dos picos considerando a abundância da distribuição isotópica dos átomos constituintes da molécula.

A Figura 31 mostra o espectro de massas da ZnPcS₄ partindo de uma solução aquosa estoque a uma concentração 5×10^{-3} mol.L⁻¹. Para injeção, uma alíquota da amostra foi diluída em MeOH para dar uma concentração final 5×10^{-4} mol.L⁻¹ (concentração utilizada nos eletroferogramas). Neste espectro destacam-se 9 picos mais intensos em 226,2, 277,2, 298,5, 323,5, 448,1 458,1, 469,1, 485,7 e 496,6 m/z.

A Figura 32 mostra o espectro de massas ampliado do pico em 298,5 m/z. Observamos que este pico apresenta um padrão de uma espécie negativa triplamente carregada uma vez que a diferença entre os picos é de 0,3 unidades de massa/carga (m/z). Trata-se de uma espécie carregada negativamente pois a tensão no cone é negativa, condição em que apenas os íons negativos são jogados para dentro do espectrômetro por repulsão. O padrão dos picos é característico da distribuição isotópica do zinco e de uma espécie monomérica. Este pico foi atribuído à $[\text{ZnPcS}_4 + \text{H}^+]^{3-}$.

O pico em 323.4 m/z (Figura 33), também apresenta um padrão de monômero com uma diferença de 0,3 m/z tratando-se, portanto, de uma espécie também triplamente carregada. Para este caso em particular não conseguimos uma perfeita associação dos espectros calculados com os espectros experimentais em termos da abundância relativa dos picos enquanto que a razão m/z é perfeita. Nossa melhor atribuição é a espécie: $[\text{ZnPcS}_4 + \text{Na}^+ + 3\text{H}_2\text{O}]^{3-}$.

Figura 31 Espectro de Massas da ZnPcS₄ em meio neutro. Solução estoque 5×10^{-3} mol.L⁻¹. Diluída 10 vezes em MeOH.

Figura 32 Espectro de Massas expandido do pico em 298,5 m/z da ZnPcS_4 em meio neutro.

Figura 33 Espectro de Massas expandido do pico em 323,4 m/z da ZnPcS_4 em meio neutro.

A Figura 34 mostra o espectro expandido do pico em 448,1 m/z que apresenta uma diferença de 0,5 unidades m/z indicando uma espécie duplamente carregada, com padrão da distribuição isotópica do zinco e na forma monomérica. A este pico atribuímos a espécie $[\text{ZnPcS}_4 + 2\text{H}^+]^{2-}$. O pico em 458,1 m/z é atribuído à espécie ZnPcS_4 na forma de um complexo misto de Na^+ e H^+ .

A Figura 35 mostra o espectro expandido do pico em 485.7 m/z e neste caso mais uma espécie duplamente carregada é observada, com o padrão de distribuição isotópica do zinco e na forma monomérica, cuja atribuição é consistente com um aduto com MeOH da espécie $[\text{ZnPcS}_4 + 2\text{Na}^+]^{2-}$.

O pico em 226 m/z, que aparece em vários espectros tem sua intensidade aumentada, principalmente quando utilizamos a condição de dissociação induzida por colisão (CID). A diferença entre os picos é de 1 unidade de m/z, caracterizando uma espécie monocarregada sem que entretanto apresente a distribuição isotópica do zinco. Provavelmente essa espécie é um fragmento do anel da ftalocianina.

O espectro de massas da Figura 36 foi obtido de uma amostra de ZnPcS_4 1.10^{-4} mol.L⁻¹ em meio de ácido fórmico - pH 2,5. Embora o espectro de massas apresente uma baixa relação sinal-ruído, podemos distinguir os picos em 297,7, 447,1, 458,0, 485,6 m/z como os picos mais intensos. A Figura 37 mostra o espectro expandido do pico em 297,7 m/z e a abundância relativa dos picos mostra a distribuição isotópica do zinco e um padrão característico de uma espécie monomérica. A este espectro atribuímos a espécie $[\text{ZnPcS}_4 + \text{H}^+]^{3-}$. Similarmente as Figuras 38 a 40 mostram os espectros de massas expandidos dos picos em 447,1, 458,0 e 485,6 m/z que foram atribuídos às espécies $[\text{ZnPcS}_4 + 2\text{H}^+]^{2-}$, $[\text{ZnPcS}_4 + \text{H}^+ + \text{Na}^+]^{2-}$ e $[\text{ZnPcS}_4 + 2\text{Na}^+ + \text{MeOH}]^{2-}$, respectivamente. O espectro da Figura 39 mostra um pico em 454,6 m/z que pode ser tentativamente atribuído a $[\text{FePcS}_4 + \text{Na}^+]^{2-}$ na forma de uma possível contaminação, hipótese sustentada pela similaridade entre os espectro experimental e o previsto para essa espécie, incluindo abundância relativa para a distribuição isotópica do ferro.

Com o objetivo de confirmar a atribuição dada, o espectro MS-MS da Figura 41 foi obtido do pico em 485,6 com um índice de CID de 32%. Observa-

se três grupos principais de picos em 445.6, 453.6 e 469.1 m/z os quais foram atribuídos à perda de um grupo SO₃, à perda de um grupo SO₂ e finalmente à perda de uma molécula de MeOH, respectivamente, confirmando a atribuição dada, uma vez que das 4 espécies identificadas, a espécie 485.6 m/z é a única que forma um aduto com metanol.

O espectro de massas da ZnPcS₄ em meio alcalino (pH 10.5) , na Figura 42, mostra um resultado bastante semelhante ao espectro obtido em meio neutro.

A tabela 6 a seguir resume as espécies encontradas em todos os meios e a respectiva atribuição.

TABELA 6 – Atribuição tentativa para MS-ESI ZnPcS₄ (10⁻⁴ mol.L⁻¹) em meio alcalino, ácido e neutro

Meio Neutro	
ESPÉCIE	M/Z
Fragmento do anel	226,2
[ZnPcS ₄ + H ⁺] ³⁻	297,8
[ZnPcS ₄ + Na ⁺ + 3H ₂ O] ³⁻	323,5
[ZnPcS ₄ + 2H ⁺] ²⁻	448,1
[ZnPcS ₄ + Na ⁺ + H ⁺] ²⁻	459,1
[ZnPcS ₄ + 2Na ⁺ + MeOH] ²⁻	485,7
Meio Ácido	
[ZnPcS ₄ + H ⁺] ³⁻	297,7
[ZnPcS ₄ + 2H ⁺] ²⁻	447,1
[ZnPcS ₄ + Na ⁺ + H ⁺] ²⁻	459,1
[ZnPcS ₄ + 2Na ⁺ + MeOH] ²⁻	485,6
Meio Alcalino	
[ZnPcS ₄ + H ⁺] ³⁻	297,8
[ZnPcS ₄ + Na ⁺ + 3H ₂ O] ³⁻	323,5
[ZnPcS ₄ + 2H ⁺] ²⁻	447,1
[ZnPcS ₄ + Na ⁺ + H ⁺] ²⁻	459,1
[ZnPcS ₄ + 2Na ⁺ + MeOH] ²⁻	485,7
[ZnPcS ₄ + 3Na ⁺ + MeOH + OH] ²⁻	498,7

Figura 34 Espectro de Massas expandido do pico em 447,0 m/z da ZnPcS_4 em meio neutro.

Figura 35 Espectro de Massas expandido do pico em 485,5 m/z da ZnPcS_4 em meio neutro.

Figura 36 Espectro de Massas da ZnPcS_4 ($10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) em ácido fórmico, pH 2,5

Figura 37 Espectro de Massas expandido do pico em 297,7 m/z da $ZnPcS_4$ em meio ácido.

Figura 38 Espectro de Massas expandido do pico em 447,0 m/z da $ZnPcS_4$ em meio ácido.

Figura 39 Espectro de Massas expandido do pico em 458,0 m/z da ZnPcS_4 em meio ácido.

Figura 40 Espectro de Massas expandido do pico em 485,5 m/z da $ZnPcS_4$ em meio ácido.

Figura 41 Espectro MS/MS para o pico em 485.6 m/z da ZnPcS₄ em meio ácido, com 32% de CID

Figura 42 Espectro de Massas da ZnPcS_4 ($10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) em meio alcalino (pH 10,5).

Notar que, não verificamos a espécie dimérica da ZnPcS_4 . A amostra foi analisada a uma concentração de 10^{-6}M que segundo Wiederkehr ⁷ e Kobayashi ⁸, ainda pode se observar o dímero. No entanto, a amostra foi diluída em metanol, durante a injeção no instrumento. Na presença de metanol mesmo em pouca quantidade e a baixa concentração da amostra parece a tender a perturbar o equilíbrio no sentido de favorecer a formação do monômero. Para corroborar esta nossa interpretação, temos a repulsão eletrostática dos grupos sulfona entre os anéis, que pode ajudar ainda mais na formação dos monômeros.

Como principais conclusões dos espectros em meio neutro e ácido temos:

- a formação de adutos com metanol;
- não observamos espécies desmetaladas ou diméricas;
- as espécies observadas estão sempre complexadas com Na^+ e H^+ , em diversas extensões;
- fragmento do anel da ftalocianina.;
- contaminação por FePcS_4 ;
- espécies carregadas diferentemente.

É bastante conhecido na literatura a facilidade com que as ftalocianinas formam dímeros e agregados de ordem superiores, mesmo a baixas concentrações⁹. Entretanto este resultado é amplamente discutido para as ftalocianinas neutras, sem o grupo sulfona ligado ao anel. Neste caso devemos considerar a possibilidade da repulsão eletrostática entre os grupos sulfona atuando no sentido de impedir a formação dos dímeros, como observamos nos espectros de massas.

A espectrometria de massas esclareceu, de maneira bastante consistente, que a amostra de ZnPcS_4 se apresenta como uma amostra relativamente pura, apenas com uma provável contaminação por ftalocianina de ferro tetrasulfonada. O eletrospray fundamentalmente revela, que uma única espécie molecular em solução pode ser representada na fase gasosa por uma população iônica de diferentes cargas¹⁰. Desta maneira uma correlação entre as espécies detectadas no espectro de massas em termos de sua relação carga / massa e o eletroferograma diretamente não é segura comprometendo

nossa atribuição. Podemos afirmar, por outro lado que muito provavelmente no eletroferograma da Fig. 30, estamos observando a $ZnPcS_4$, seus isômeros de posição (que não são discriminados nos espectros de massas), e até mesmo dímeros e espécies de ordens superiores de agregação, uma vez que não temos solvente no meio de separação. Devemos destacar que nos eletroferogramas não se espera a discriminação de dímeros e monômeros pelo campo elétrico, pois estes apresentam a mesma relação massa/carga. O mesmo não acontece na espectrometria de massas. Como discutiremos para a $ZnPcS_2$, embora a relação massa/carga seja a mesma para ambas as espécies, o perfil de distribuição é bastante diferente.

Para uma atribuição consistente dos eletroferogramas devemos obter estes eletroferogramas num instrumento CE em linha com um espectrômetro de massas.

3.3.2.2 $LuPcS_4$ e $DyPcS_4$

Embora 100 mmol.L^{-1} de tampão citrato seja uma condição favorável para a separação da $ZnPcS_4$, o mesmo parece não ser verdade para as Lu e $DyPcS_4$.

As Figuras 43 e 44 mostram os eletroferogramas obtidos das $LuPcS_4$ e $DyPcS_4$ utilizando-se 20, 50 e 100 mmol.L^{-1} de tampão citrato pH 2,5. Uma vez mais observa-se o aumento dos tempos de migração com o aumento da concentração do eletrólito como era de se esperar, entretanto ao contrário do que pudemos observar para a $ZnPcS_4$, a grande distorção no formato dos picos indica uma pobre condição experimental de separação.

O formato triangulado dos picos em todos os eletroferogramas são atribuídos ao fenômeno chamado eletrodispersão ^{11,12}. Esta é causada pela diferença de condutividade entre a zona do analito e o tampão eletrolítico.

Em eletroforese capilar mantém-se a concentração do analito mais baixa do que o eletrólito para que a diferença de condutividade entre a zona do analito e a região do eletrólito seja a menor possível. O objetivo de se manter as condutividades entre analito e eletrólito o mais próximo possível é para que o campo elétrico em todo o comprimento do capilar seja constante. Isto garante que a migração dos íons do analito seja função apenas da sua mobilidade

eletroforética. Se os íons do analito contribuem para um aumento da condutividade total da zona da amostra esta é então, uma fonte de alargamento de bandas.

Quando temos uma condutividade maior da zona do analito com relação ao eletrólito, sob a influência da alta voltagem, dois campos elétricos distintos são estabelecidos, um campo elétrico mais baixo, na zona do analito, e um campo elétrico mais alto, na zona do eletrólito. Os íons na zona do analito localizados na parte da frente, pela força do seu próprio campo, migram mais rapidamente, entrando na região do eletrólito onde encontram um campo de força menor diminuindo sua velocidade. Este fenômeno leva à formação de uma cauda frontal na zona do analito. Se a condutividade do eletrólito for maior, os íons na parte de trás da zona do analito migrarão para a região do eletrólito onde serão acelerados e, neste caso, teremos a formação de uma cauda. Entretanto, na interface entre a zona do eletrólito e analito, oposta à cauda frontal ou à cauda, há uma compactação, resultando num formato triangulado dos picos.

Figura 43 Eletroferogramas da LuPcS₄ 10⁻⁴ M em citrato pH 2,5. As concentrações dos eletrólitos estão indicadas na figura. Condições: Voltagem de corrida: -15 kV; Injeção hidrodinâmica: 3s / 0,5 psi; 25°C

Figura 44 Eletroferogramas da DyPcS₄ 10⁻⁴ M em citrato pH 2,5. As concentrações dos eletrólitos estão indicadas na figura. Condições: Voltagem de corrida: -15 kV; Injeção hidrodinâmica: 3s/ 0,5 psi; 25°C.

A princípio esperar-se-ia observar os eletroferogramas das DyPcS₄ e LuPcS₄ com perfis semelhantes ao do eletroferograma da ZnPcS₄. Entretanto, observamos um eletroferograma bastante complexo.

Uma vez mais recorremos à espectrometria de massas para auxiliar na atribuição dos eletroferogramas.

A Figura 45 mostra o espectro de massas da DyPcS₄ em meio de ácido fórmico - pH 2,5. Apesar da pobre relação sinal ruído, podemos destacar 3 grupos de picos principais em 345,4, 519,6, 530,5, 552,8 e 564,3 m/z.

A Figura 46 mostra o espectro de massas expandido do pico em 345,4 m/z. O padrão de abundância relativa dos picos observados mostra o padrão de distribuição isotópica do Dy. Os picos distanciados de 0,3 unidades m/z revela que se trata de uma espécie triplamente carregada. A este espectro atribuímos a espécie [DyPcS₄ + 2H₂O + MeOH]³⁻.

Seguindo a mesma linha de raciocínio, o pico em 519,6 (Figura 47) e 530,5 (Figura 48), tem o perfil de espécies duplamente carregadas com o padrão do Dy. Entretanto, trata-se de uma espécie monomérica. As espécies atribuídas a estes picos são [DyPcS₄ + 2H₂O + MeOH + H⁺]²⁻ e [DyPcS₄ + 2H₂O + MeOH + Na⁺]²⁻, respectivamente. Os picos em 552,8 e 564,3 m/z também apresentam um perfil de espécie duplamente carregada e foram atribuídos às espécies: [DyPcS₄ + 2H₂O + 2MeOH + H⁺]²⁻ e [DyPcS₄ + 2H₂O + MeOH + HCOOH + H⁺]²⁻.

Figura 45 Espectro de Massas da DyPcS₄ (10^{-4} mol.L⁻¹) em meio de ácido fórmico (pH 2,5).

Figura 46 Espectro de Massas expandido do pico em 345,4 m/z da DyPcS_4 em meio ácido.

Figura 47 Espectro de Massas expandido do pico em 519,6 m/z da DyPcS₄ em meio ácido.

Figura 48 Espectro de Massas expandido do pico em 530,5 m/z da $DyPcS_4$ em meio ácido.

A tabela 7 resume a atribuição dada para o meio ácido:

TABELA 7 – Atribuição tentativa para MS-ESI da DyPcS₄ (10⁻⁴ mol.L⁻¹) em meio de ácido fórmico pH 2,5.

Meio Ácido	
ESPÉCIE	M/Z
[DyPcS ₄ + 2H ₂ O + MeOH] ³⁻	345,7
[DyPcS ₄ + 2H ₂ O + MeOH + H ⁺] ²⁻	519,6
[DyPcS ₄ + 2H ₂ O + MeOH + Na ⁺] ²⁻	530,5
[DyPcS ₄ + 2H ₂ O + 2MeOH + H ⁺] ²⁻	552,8
[DyPcS ₄ + 2H ₂ O + MeOH + HCOOH + H ⁺] ²⁻	564,3

Em resumo, para a DyPcS₄ temos que as espécies encontradas complexam facilmente com duas moléculas de água e com moléculas do solvente. Apresentam-se na forma de um monômero e o resultado mais importante, o pico mais intenso do espectro em 564,3 m/z é atribuído a uma espécie duplamente carregada, complexada com o ácido fórmico. A complexação da ftalocianina com o ácido fórmico abre um precedente bastante importante para admitirmos que, durante a separação, esta espécie possa eventualmente também estar sofrendo interação com o citrato. Outro aspecto importante a ser considerado na atribuição dos eletroferogramas, que deve ser considerado aqui, é que para um mesmo composto encontramos uma espécie triplamente carregada e 4 espécies duplamente carregadas.

A Figura 49 mostra os espectros de massas da LuPcS₄ em ácido fórmico pH 2,5, onde podemos observar 3 grupos principais de picos, em 349,7, 525,1 e 536,0 m/z. A Figura 50 mostra os espectros expandidos dos picos observados. Da mesma forma que analisamos os espectros da DyPcS₄, temos a LuPcS₄ como espécie monomérica e observa-se sua complexação com ácido fórmico nos 3 picos observados. Complexação com Na⁺ e H⁺ também foi observada.

Figura 49 Espectro de Massas da LuPcS₄ (10^{-4} mol.L⁻¹) em ácido fórmico, pH 2,5.

Figura 50 Espectro de Massas expandido da LuPcS_4 em meio ácido, dos picos em 349,7, 525,0 e 536,0 m/z .

A tabela 8 resume a atribuição feita.

TABELA 8 – Atribuição tentativa para MS-ESI da LuPcS₄ (10⁻⁴ mol.L⁻¹) em meio de ácido fórmico pH 2,5.

ESPÉCIE	M/Z
[LuPcS ₄ + HCOOH] ³⁻	349,7
[LuPcS ₄ + HCOOH + H ⁺] ²⁻	525,1
[LuPcS ₄ + HCOOH + Na ⁺] ²⁻	536,0

Tanto para a DyPcS₄ como para a LuPcS₄, não observamos estruturas diméricas nos espectros de massas. Complexação com H⁺ e Na⁺ são comuns assim como a formação de adutos com moléculas de MeOH e com ácido fórmico em diferentes extensões. Importante notar que não observamos ftalocianinas desmetaladas, condição a ser considerada uma vez que o fabricante nos alertou da possibilidade da perda do metal do anel em meio ácido. Para a LuPcS₄ também observamos uma espécie triplamente carregada e duas espécies duplamente carregadas.

A atribuição dos eletroferogramas das DyPcS₄ e LuPcS₄, Figuras 43 e 44, baseada apenas nas espécies observadas nos espectros de massas não é possível pois o número de espécies observadas nos eletroferogramas é muito superior ao número de espécies observadas nos espectros de massas.

As ftalocianinas de terras raras comportam-se diferentemente das ftalocianinas de metais de transição como o zinco, por exemplo, pois formam estruturas diferentes dependendo do solvente utilizado, do pH da solução e do metal empregado.

Kirin e col.¹³ em 1967, sintetizaram a ftalocianina de neodímio e dois compostos foram separados por cromatografia numa coluna de alumina, um composto azul e outro verde, utilizando DMF como eluente. O composto azul apresentou um máximo de absorção em 634 nm, enquanto que o verde apresentou o máximo em 679 nm. Por análise elementar encontraram que o composto azul é uma diftalocianina, entretanto, nenhum dado consistente foi apresentado para atribuir o composto azul à monoftalocianina. Entende-se por diftalocianina uma estrutura tipo sanduíche, onde dois anéis de ftalocianina

estão ligados a um único átomo metálico entre eles. Utilizaram como parâmetro para atribuição do composto azul, a comparação de um espectro de absorção do composto azul e o espectro de uma monoftalocianina.

Em 1974 MacKay e col.¹⁴ sintetizaram a ftalocianina de gadolínio e também observaram a formação de um composto azul e outro verde que absorvem em 630 nm (em piridina) e 672 nm (em clorofórmio), respectivamente. Estes dois complexos podem ser interconvertidos dependendo do solvente. O complexo verde fornece o mesmo espectro que o complexo azul se em piridina ou DMF. O comportamento dos compostos azul e verde foram explicados segundo o equilíbrio:

onde as formas protonada e aniônica são os compostos verde e azul, respectivamente. Este modelo é sustentado por Moskalev e Kirin¹⁵, em seu estudo sobre ftalocianinas tetrassulfonadas de Y, Gd e Lu em meio aquoso em função do pH. Os autores verificaram para a ftalocianina sulfonada de lutécio a forma protonada em pH 5,9 e a forma aniônica em pH 11,6. Sendo que a protonação acontece num dos átomos de N do anel da ftalocianina.

Corroboram com este equilíbrio, os nossos resultados de espectrometria de massas e os espectros UV-Vis das DyPcS₄ e LuPcS₄ apresentados na Figura 51. Os espectros, obtidos de uma solução aquosa neutra (10⁻⁴ mol.L⁻¹) mostram dois picos intensos em 642 e 680 nm, da mesma forma como MacKay¹⁴ e Moskalev¹⁵ observaram. Entretanto, nossos resultados são discordantes no que diz respeito à estrutura da ftalocianina. As espécies que observamos são monoftalocianinas tetrassulfonadas de lutécio e disprósio enquanto MacKay¹⁴ e Moskalev¹⁵ baseados em análise elementar, e Schiffrin e Collins¹⁶ baseados em resultados de espectrometria de massas afirmam tratar-se de uma diftalocianina.

Figura 51 Espectros UV-Vis da DyPcS₄(—) e LuPcS₄ (---). Ambas em meio aquoso a uma concentração de 10⁻⁴ M.

A Figura 52 mostra a estrutura proposta por Moskalev¹⁴ para a diftalocianina tetrassulfonada de lantanídeos. Observe que o metal ocupa a posição central entre os dois anéis e cada anel de ftalocianina tem 2 grupos sulfona. A posição dos anéis e, conseqüentemente dos grupos sulfona, é tal que minimize a repulsão eletrostática entre eles. Embora em ambos os casos se trate de ftalocianinas tetrassulfonadas, a ftalocianina de Kirin¹⁴ é na verdade composta de dois anéis de ftalocianina dissulfonada, enquanto que em nosso estudo, a ftalocianina tem apenas um anel com 4 grupos sulfona ligados.

Figura 52 Estrutura proposta tipo sanduíche, por Kirin e Moskalev, para as diftalocianinas de terras raras

Estabelecidas as devidas diferenças entre as estruturas encontradas no nosso trabalho e aquelas encontradas na literatura, temos que no pH da separação, encontramos essencialmente espécies protonada e sodiada e, muito provavelmente, espécies que interagem com o eletrólito.

Assim como a interação do borato⁶, como eletrólito, com carboidratos lhes confere carga, possibilitando a separação, a interação das ftalocianinas com o ácido fórmico, como observada nos espectros de massas, torna-se razoável admitir que o ácido cítrico pode também estar complexando a ftalocianina, interação que pode acontecer em diferentes extensões. Em resumo, estas são as variáveis que podem responder pelo grande número de picos observados nos eletroferogramas:

1. Presença de isômeros de posição;
2. Interação das ftalocianinas com ácido cítrico;
3. Interação com prótons;
4. Interação com sódio;
5. Interação com moléculas de água;
6. Eletrodispersão.

Neste ínterim, temos espécies com duas e três cargas negativas que formam adutos com o solvente e moléculas de eletrólito, levando a diferenças de massas consideráveis, que sob a influência do campo elétrico serão fatalmente discriminadas, respondendo pelo grande número de picos.

Em resumo, o tampão citrato não é uma escolha adequada para a separação das DyPcS₄ e LuPcS₄, devido à eletrodispersão e a provável interação com o ácido cítrico.

Das 6 variáveis expostas, apenas uma pode ser eliminada, a interação com o ácido cítrico.

Para diminuir problemas como a eletrodispersão, é necessário por exemplo que se escolha um tampão que seja menos condutor que a amostra. Nesse caso, a utilização dos tampões zwitteriônicos como MES (ácido 2-[N-morfolino] etanossulfônico), HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanossulfônico), TRIS (tris(hidroximetil)amino metano) e CAPS (ácido 3-[ciclohexilamino]-1-propanossulfônico) são particularmente interessantes, pois

podem ser utilizados em alta concentração, uma vez que fornecem baixa corrente por serem pouco condutores. A vantagem de se trabalhar em alta concentração de tampão é a diminuição da interação entre o soluto e as paredes do capilar².

Com o objetivo de minimizar a eletrodispersão, utilizamos CAPS como tampão pois, sabe-se que esta molécula não deve, a princípio, interagir com a Pc durante a separação¹⁷.

As Figuras 53 e 54 mostram os eletroferogramas das Lu e DyPcS₄ em CAPS, respectivamente. Enquanto que em citrato, os eletroferogramas eram bastante semelhantes para ambas as ftalocianinas, o perfil obtido em CAPS é completamente diferente daquele observado em citrato e, diferente entre as ftalocianinas. Não temos mais um perfil triangulado característico da eletrodispersão e o número de picos é bem menor.

Figura 53 Eletroferograma da LuPcS₄ (10^{-4} mol.L⁻¹) em CAPS 20 mmol.L⁻¹, pH 10,5. Condições: Injeção hidrodinâmica (3s / 0,5 p.s.i.); Voltagem de Corrida : +15 kV. 25 °C.

Observa-se no eletroferograma da LuPcS₄ (Figura 53), 4 grupos de picos resolvidos até a linha base mas de formato alargado, pouco característico da CE conhecida pela alta resolução, desde que a separação ocorra em condições adequadas.

A Figura 54, mostra o eletroferograma da DyPcS₄, onde observamos 3 grupos de picos resolvidos até a linha base, entretanto o mais intenso deles apresenta 2 grupos de picos não completamente resolvidos.

Figura 54 Eletroferograma da DyPcS₄ (10^{-4} mol.L⁻¹) em CAPS 20 mmol.L⁻¹, pH 10,5. Condições: Injeção hidrodinâmica (3s / 0,5 p.s.i.); Voltagem de Corrida : +15 kV. 25 °C.

Para fazer uma atribuição tentativa dos eletroferogramas das Figuras 53 e 54, obtivemos os espectros de massas em solução alcalina de NaOH pH 10,5. O tampão CAPS não foi utilizado nos experimentos, pois não é um composto adequado, por não ser volátil.

A Figura 55 mostra o espectro de massas da LuPcS₄ obtido de uma solução 10^{-4} mol.L⁻¹ em meio de NaOH (pH 10,5). Para LuPcS₄, observamos 6 picos mais importantes, sendo o mais intenso em 345,1 m/z. O espectro apresenta uma relação sinal-ruído menor do que aquela encontrada em meio ácido ou neutro. Os picos encontrados, em sua maioria, foram atribuídos a adutos formados entre a LuPcS₄ e moléculas de MeOH e H₂O nas formas

Figura 55 Espectro de Massas da LuPcS_4 ($10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) em meio alcalino (pH 10,5).

protonada ou sodiada. Na Figura 56 temos os espectros expandidos dos picos em 345,1 354,4 e 361,8 m/z. Da separação dos 3 picos em 0,3 unidades de m/z concluímos que tratam-se de espécies triplamente carregadas. Segundo o padrão apresentado sabemos que tratam-se de espécies monoméricas nos 3 casos. A Figura 57 mostra os espectros expandidos dos picos em 518,1 e 529,1 m/z. A separação dos picos em 0,5 unidades de m/z indicam espécies duplamente carregadas, com um padrão de monômero e a distribuição isotópica do lutécio. A tabela 9 resume a atribuição feita.

TABELA 9 – Atribuição tentativa para MS-ESI LuPcS₄ (10⁻⁴ mol.L⁻¹) em meio alcalino (pH 10,5).

ESPÉCIE	M/Z
Fragmento	226,1
[LuPcS ₄ + MeOH] ³⁻	345,1
[LuPcS ₄ + 2MeOH] ³⁻	354,4
[LuPcS ₄ + MeOH + H ₂ O] ³⁻	361,8
[LuPcS ₄ + MeOH + H ⁺] ²⁻	518,1
[LuPcS ₄ + MeOH + Na ⁺] ²⁻	529,1

Da mesma forma como observado para a ZnPcS₄ e DyPcS₄, para a LuPcS₄ em meio neutro e ácido, não identificamos a forma dimérica ou uma estrutura tipo sanduíche como discutimos.

Uma vez mais, sustentamos a hipótese de que nestas condições experimentais, a forte repulsão dos grupos sulfona, carregados negativamente, bem como a presença de solvente inibe a formação de dímeros

Entretanto, observamos que a amostra é pura pois somente LuPcS₄ foi encontrada. Cabe destacar aqui que a espectrometria de massas não discrimina isômeros de posição. Obviamente, durante a separação por eletroforese não temos as espécies de ftalocianinas na forma de adutos com metanol, espécie comum nos espectros de massas.

Figura 56 Espectro de Massas expandidos para os picos 345,1, 354,4 e 361,7 m/z da LuPcS₄ em meio alcalino.

Figura 57 Espectro de Massas expandidos dos picos em 518,0 e 529,0 m/z da LuPcS_4 em meio alcalino.

Observando o eletroferograma da fig. 53, observamos uma certa complexidade no número de picos observados. Imaginando que a amostra esteja muito concentrada, obtivemos o eletroferograma da Figura 58, para a LuPcS₄ a uma concentração de 10⁻⁶ mol.L⁻¹.

Figura 58 Eletroferograma da LuPcS₄ (10⁻⁶ mol.L⁻¹) em CAPS 20 mmol.L⁻¹, pH 10,5. Condições : injeção hidrodinâmica (3s / 0,5 psi); Voltagem de corrida: +15 kV. 25 °C.

O espectro de massas em meio alcalino para a DyPcS₄, ilustrado na Figura 59, mostra 4 picos mais intensos, em 341,4, 350,6, 357,3 e 523,5 m/z.

A Figura 60, mostra o espectro de massas expandido do pico em 341,4 m/z onde podemos observar, pela diferença entre os picos de 0,3 unidades de m/z, que se trata de uma espécie triplamente carregada. O padrão de distribuição isotópica do disprósio é claro. Trata-se também de um monômero.

Da mesma forma os picos em 350,7 m/z (Figura 61) e 358,1 (Figura 62), são atribuídos a espécies triplamente carregadas, na forma monomérica com o padrão de distribuição do disprósio. Finalmente, o pico em 523,5 m/z segue os padrões anteriormente descritos para os picos na região de 350 m/z, com a

diferença que se trata de uma espécie duplamente carregada sem atribuição conhecida.

Figura 59 Espectro de Massas da DyPcS₄ (10^{-4} mol.L⁻¹) em meio alcalino (pH 10,5).

Figura 60 Espectro de Massas expandido do pico em 341,4 m/z $^{3-}cS_4$ em meio alcalino.

Figura 61 Espectro de Massas expandido do pico em 350,7 m/z da $DyPcS_4$ em meio alcalino.

Figura 62 Espectro de Massas expandido do pico em 358,1 m/z da DyPcS₄ em meio alcalino.

A tabela 10 mostra a atribuição tentativa dos picos observados para DyPcS₄.

TABELA 10 – Atribuição tentativa para MS-ESI DyPcS₄ (10⁻⁴ mol.L⁻¹) em meio alcalino (pH 10,5)

ESPÉCIE	M/Z
[DyPcS ₄ + 2H ₂ O] ³⁻	341,4
[DyPcS ₄ + H ₂ O + NaOH] ³⁻	350,7
[DyPcS ₄ + MeOH + NaOH] ³⁻	358,1
[DyPcS ₄ + 2H ₂ O + Na ⁺] ²⁻	523,5

Também para a DyPcS₄ não detectamos a espécie do tipo sanduíche, muito provavelmente, assim como observamos para a espécie LuPcS₄, a repulsão dos grupos sulfona e a presença do MeOH, impede a formação de tal espécie.

Concluimos dos espectros de massas que as amostras de Lu e DyPcS₄, são bastante puras, porém, assim como observamos para a ZnPcS₄, nenhuma correlação direta pode ser traçada entre os espectros de massas e os eletroferogramas.

Podemos por outro lado afirmar que embora os eletroferogramas sejam bastante complexos para uma concentração de 10⁻⁴ M, sua simplificação em 10⁻⁶ M, pode ser um forte indicativo de que estamos observando espécies de ordens superiores de estado de agregação. Além dos estados de agregação, isômeros de posição também estão presentes e sempre devem ser considerados na atribuição do eletroferograma.

De fato, o eletroferograma da Figura 63 obtido de uma solução diluída de DyPcS₄, mostra apenas dois picos. A simplificação com relação ao eletroferograma da fig. 44 pode indicar a presença de aglomerados em 10⁻⁴ mol.L⁻¹.

Figura 63 Eletroferograma da DyPcs_4 $10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ em CAPS 20 mmol.L^{-1} , pH 2,5. Condições; injeção hidrodinâmica (3s / 0,5 psi); 25°C ; Voltagem de Corrida: +15 kV.

Uma vez estabelecidas as melhores condições de separação das ftalocianinas tetrassulfonadas. Procuramos agora adaptar a mesma análise para as ftalocianinas dissulfonadas.

3.3.2.3 ZnPcS_2

A Figura 64, mostra o eletroferograma da ZnPcS_2 10^{-4} M , obtido em CAPS pH 10,5, onde observamos 2 picos intensos, em 3,04 e 3,45 min.

As principais diferenças que encontramos entre as espécies tetra e dissulfonada são o maior número de isômeros de posição para a espécie dissulfonada³ e a possibilidade da formação de dímeros, uma vez que a repulsão eletrostática tende a ser menor para estas espécies.

Figura 64 Eletroferograma da ZnPcS_2 ($10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) em CAPS 20 mmol.L^{-1} , pH 10,5. Condições : injeção hidrodinâmica (3s / 0,5 psi); Voltagem de corrida: +15 kV. 25°C .

Para auxiliar na atribuição dos eletroferogramas, uma vez mais utilizamos os recursos da espectrometria de massas.

A conduta utilizada no estudo da ZnPcS_2 foi um pouco diferente do que fizemos com a ZnPcS_4 , pois a espécie dissulfonada demonstrou um comportamento diferente daquele observado para a tetrassulfonada.

Verificamos que os espectros são extremamente dependentes da concentração da amostra e da presença de MeOH. Para um melhor estudo deste sistema e, conseqüentemente, melhor atribuição do eletroferograma, discutiremos com detalhes os resultados obtidos com a espectrometria de massas.

A Figura 65, mostra o espectro de massas da ZnPcS_2 a uma concentração de $5 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, onde podemos observar dois picos principais em 367,2 e 737,1 m/z. O espectro expandido do pico em 367,2 m/z está na Figura 66, e a atribuição é inequívoca. O padrão de monômero e a distribuição isotópica do zinco mostram que se trata da $[\text{ZnPcS}_2]^{-2}$.

Figura 65 Espectro de Massas em meio neutro da ZnPcS_2 ($5 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) diluído 100 vezes em MeOH da solução estoque $5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

Figura 66 Espectro de Massas expandido para o pico em 367,1 m/z da ZnPcS₂ em meio neutro.

A Figura 67, mostra o espectro de massas expandido do pico em 737,1 m/z e sua atribuição é um pouco mais complicada. O padrão dos picos revela que muito provavelmente temos uma mistura de espécies, cuja relação m/z é coincidente. As linhas tracejadas mostram a tendência da existência de duas espécies, uma delas com duas cargas negativas e, a outra, com apenas uma carga positiva, pela diferença em m/z entre os picos. Para atribuir este pico temos duas espécies candidatas, $[\text{ZnPcS}_2 + \text{H}^+]^-$ e a $[(\text{ZnPcS}_2)_2 + 2\text{H}^+]^{-2}$. Os espectros calculados de cada espécie, quando superpostos, são semelhantes aos espectros obtidos experimentalmente, tanto em m/z quanto em abundância relativa dos picos. Desta forma, com segurança, podemos atribuir o pico em 737,1 m/z à mistura de duas espécies, um monômero com uma carga negativa e um dímero duplamente carregado, ambos protonados.

A existência de monômeros e dímeros neste sistema denota a existência do equilíbrio dímero-monômero, confirmando nossa hipótese de que, neste caso, a repulsão eletrostática entre os grupos sulfona é minimizada, propiciando o estabelecimento desse equilíbrio, ao contrário do que observamos no caso da espécie tetrassulfonada, onde o maior número de grupos sulfona atua no sentido de inibir a formação de dímeros, pela força de repulsão eletrostática.

A capacidade das ftalocianinas sulfonadas formarem dímeros, até mesmo em soluções diluídas (10^{-5} - 10^{-7} mol.L⁻¹), é um fato bastante conhecido da literatura^{5,18}.

As estruturas diméricas das ftalocianinas correspondem a duas moléculas dispostas paralelamente. Esta associação é mantida por forças de van der Waals, interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas e pela ação da própria água. Para a formação do dímero, a força da interação entre as duas moléculas de ftalocianina deve ser grande, para se sobrepor às forças de solvatação do monômero. Pode-se considerar uma solução 10^{-5} mol.L⁻¹, concentrada o suficiente para formar dímeros e também agregados de ordens superiores. A constante de associação para a ftalocianina de zinco tetrassulfonada é, segundo Bernauer¹⁹ $1,0 \cdot 10^6$ (mol.L⁻¹)⁻¹ em água a 58°C.

Figura 67 Espectro de Massas expandido para o pico em 735,1 m/z da ZnPcS_2 em meio neutro. (----) $[\text{ZnPcS}_2 + \text{H}^+]^-$ / (—) $[(\text{ZnPcS}_2)_2 + 2\text{H}^+]^{-2}$

Neste sentido, realizamos um estudo sobre a dependência deste equilíbrio com a concentração através da espectrometria de massas. A Figura 68, mostra o espectro de massas da ZnPcS_2 obtido após a diluição de 1000 vezes da solução estoque de $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. Neste espectro podemos observar que a intensificação do pico em 367,2 m/z, atribuída ao monômero, é significativa (aumentou em 35% com relação ao espectro da Figura 66, onde a diluição foi de 100 vezes). O espectro expandido do pico em 735,2 m/z está na Figura 69 e mostra claramente a mistura de espécies diméricas e monoméricas. Este resultado mostra que, de fato, a diluição da amostra afeta o equilíbrio. Confirma esta conclusão o espectro de massas expandido do pico em 735,2 m/z (Figura 70) com 35% de CID (collision induced dissociation). Nesta condição experimental, induzimos uma fragmentação branda da amostra e, ao invés de uma mistura de monômeros e dímeros, como nos espectros anteriores, verificamos um padrão de espécie monomérica somente, com uma carga negativa e complexada com um próton, ou seja $[\text{ZnPcS}_2 + \text{H}^+]^-$.

Realizamos outro experimento, com o objetivo de obter o espectro de massas expandido desse pico numa condição intermediária à formação do dímero. Neste sentido obtivemos o espectro de massas de uma solução de ZnPcS_2 submetida à seguinte ordem de diluição: inicialmente diluímos a solução estoque ($5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) em 50 vezes e, em seguida diluímos em 20 vezes em metanol quando da injeção no espectrômetro. A Figura 71 mostra o espectro de massas obtido da ZnPcS_2 segundo estas condições e verificamos a presença de 5 picos, em 367,2, 490,8, 735,1, 748,1, 759,1 m/z.

O pico em 367,2 m/z já foi atribuído à espécie $[\text{ZnPcS}_2 + \text{H}^+]^-$. O pico em 490,8 m/z foi identificado como uma espécie triplamente carregada, com a distribuição de um dímero. Nossa atribuição para esse pico, confirmada pelo espectro teórico, é a espécie $[(\text{ZnPcS}_2)_2 + \text{H}^+]^{-3}$.

A Figura 72, mostra o espectro expandido do pico em 735,1 m/z. É interessante notar que os picos marcados com (*), atribuídos ao dímero, estão em baixa intensidade (comparar com os espectros das Figuras 67 e 69) e, aparentemente, não representam o perfil de distribuição isotópica de um dímero. Este resultado, no entanto, mostra que a diluição em etapas é uma condição experimental onde o equilíbrio dímero - monômero não responde

Figura 68 Espectro de Massas da $ZnPcS_2$ em meio neutro, diluído $1000\times$ em MeOH (5×10^{-6} mol.L $^{-1}$).

Figura 69 Espectro de Massas expandido do pico em 735,1 m/z da ZnPcS_2 em meio neutro.

Figura 70 Espectro MS/MS expandido para o pico em 735,1 m/z da $ZnPcS_2$ em meio neutro, com 35% CID.

Figura 71 Espectro de massas da ZnPcS₂ em meio neutro com diluições sucessivas de 20x e 50x em MeOH, concentração final 5×10^{-6} mol.L⁻¹.

Figura 72 Espectro de massas expandido do pico em 735,1 m/z da ZnPcS_2 em meio neutro. * = $[(\text{ZnPcS}_2)_2 + 2\text{H}^+]^{2-}$

prontamente no sentido da formação do dímero, como pudemos observar nos espectros das Figuras 67 e 69, para a diluição única em 100 e 1000 vezes.

A Figura 73 mostra o espectro de massas expandido do pico em 759,1 m/z e, mais uma vez, verificamos uma mistura de espécies. Este pico é atribuído às espécies semelhantes às aquelas observadas em 735,1 m/z, com a diferença de que apresentam Na^+ ao invés de H^+ em sua estrutura.

O espectro expandido do pico em 748,1 m/z, por sua vez, (Figura 74), mostra um padrão de uma espécie dimérica duplamente carregada, na forma de um complexo misto de H^+ e Na^+ . Interessante notar que neste pico não detectamos a presença do monômero, pois não podemos ter $\frac{1}{2}$ de Na^+ e $\frac{1}{2}$ de H^+ .

A Figura 75 mostra o espectro de massas da ZnPcS_2 obtido em meio de ácido fórmico, pH 2,5. O espectro mostra claramente a existência de 3 picos, o mais intenso em 737,2, o pico em 226,1 o segundo mais intenso, atribuído a um fragmento do anel da ftalocianina (espécie comum que já foi encontrada nos espectros das amostras tetrassulfonadas) e um pico menor em 367,3 m/z. Este espectro foi obtido de uma solução $10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ que foi diluída em 30 vezes em metanol.

Os espectros expandidos dos picos em 367,3 e 737,2 estão nas Figuras 76 e 77, respectivamente. Como já discutimos anteriormente, o pico em 367,3 m/z foi atribuído à $[\text{ZnPcS}_2]^{-2}$ e o pico em 737,2 à mistura de $[\text{ZnPcS}_2 + \text{H}^+]^-$ e $[(\text{ZnPcS}_2)_2 + 2\text{H}^+]^{-2}$. Entretanto, observa-se que os picos do dímero são bem menores do que aqueles observados na Figura 65. Neste caso também podemos confirmar a existência do equilíbrio dímero-monômero e sua dependência, não apenas da concentração, mas também da presença de solventes orgânicos.

Obtivemos também para esta amostra o espectro de massas com 20% de CID (Figura 78). Nesta condição observamos que o pico mais intenso é aquele em 226,1 m/z, atribuído à fragmentação do anel. O espectro expandido do pico em 735,1 m/z na condição de 20% de CID (Figura 79) mostra a presença de pequenos picos, os quais foram anteriormente atribuídos ao dímero. No entanto, semelhantemente ao espectro da Figura 66, a

Figura 73 Espectro de massas expandido do pico em 759,1 m/z da ZnPcS_2 .

Figura 74 Espectro de massas da $ZnPcS_2$ (10^{-4} mol.L $^{-1}$) em meio de ácido fórmico (pH 2,5).

Figura 75 Espectro de massas da ZnPcS_2 ($10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) meio de ácido fórmico (pH 2,5).

Figura 76 Espectro de massas expandido da $ZnPcS_2$ em meio ácido, para o pico em 367,1 m/z .

Figura 77 Espectro de massas expandido da ZnPcS_2 em meio ácido, para o pico em 735,1 m/z.

Figura 78 Espectro de massas da ZnPcS_2 $10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ com 20% de CID.

Figura 79 Espectro de massas expandido da $ZnPcS_2$ em meio ácido, para o pico em 735,1 m/z com 20% de CID.

fragmentação induzida quebrou a estrutura dimérica em sua maior parte, como se pode observar no espectro expandido da Figura 79.

O espectro de massas obtido em meio alcalino de NaOH, pH 10,5 (Figura 80), mostra os 3 picos característicos em 367,1, 735,1 e 759,2 m/z. O pico mais intenso, observado em 367,2 m/z, é atribuído à espécie monocarregada $[\text{ZnPcS}_2]^{-2}$. Os demais picos, já discutidos anteriormente, o pico em 735,1 m/z foi atribuído às espécies $[\text{ZnPcS}_2 + \text{H}^+]^{-2}$ e $[(\text{ZnPcS}_2)_2 + 2\text{H}^+]$ e o pico em 759,2 m/z às correspondentes espécies sodiadas.

A tabela 11, a seguir, resume a atribuição tentativa para os espectros de massas da ZnPcS_2 .

TABELA 11 – Atribuição tentativa para MS-ESI ZnPcS_2 ($10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) em meio alcalino, ácido, neutro

Meio Neutro	
ESPÉCIE	M/Z
Fragmento do anel	226,2
$[\text{ZnPcS}_2]^{-}$	367,2
$[(\text{ZnPcS}_2)_2 + \text{H}^+]^{-3}$	490,8
$[\text{ZnPcS}_2 + \text{H}^+]^{-} + [(\text{ZnPcS}_2)_2 + 2\text{H}^+]^{-2}$	735,1
$[(\text{ZnPcS}_2)_2 + \text{Na}^+ + \text{H}^+]^{-2}$	748,1
$[(\text{ZnPcS}_2)_2 + 2\text{Na}^+]^{-2} + [\text{ZnPcS}_2 + \text{Na}^+]^{-}$	759,1
Meio Ácido	
Fragmento do anel	226,1
$[\text{ZnPcS}_2 + \text{H}^+]^{-} + [(\text{ZnPcS}_2)_2 + 2\text{H}^+]^{-2}$	485,6
Meio Alcalino	
$[\text{ZnPcS}_2]^{-2}$	367,2
$[\text{ZnPcS}_2 + \text{H}^+]^{-} + [(\text{ZnPcS}_2)_2 + 2\text{H}^+]^{-2}$	735,1
$[\text{ZnPcS}_2 + \text{Na}^+]^{-} + [(\text{ZnPcS}_2)_2 + 2\text{Na}^+]^{-2}$	759,1

Figura 80 Espectro de massas da ZnPcS_2 ($10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) em meio alcalino, pH 10,5.

Resumidamente 3 espécies são encontradas em meio alcalino :

1. monômero duplamente carregado: $[\text{ZnPcS}_2]^{-2}$;
2. dímero duplamente carregado: $[(\text{ZnPcS}_2)_2 + 2\text{H}^+]^{-2}$, $[(\text{ZnPcS}_2)_2 + 2\text{Na}^+]^{-2}$;
3. monômero monocarregado: $[\text{ZnPcS}_2 + \text{H}^+]$.

Com o objetivo de verificar a influência da diluição sobre o equilíbrio dímero-monômero, como observado nos espectros de massas, obtivemos o eletroferograma da ZnPcS_2 10^{-6} mol.L⁻¹ (Figura 81).

Figura 81 Eletroferograma da ZnPcS_2 10^{-6} mol.L⁻¹ em CAPS 20 mmol.L⁻¹, pH 10,5. Condições : injeção hidrodinâmica (3s / 0,5 psi); Voltagem de corrida: +15 kV, 25 °C.

Este eletroferograma mostra também dois picos. Entretanto, as intensidades relativas dos picos são bastante diferentes. O primeiro pico (2,80min) continua bastante intenso, enquanto o segundo pico (3,35min) diminui sua intensidade relativa em aproximadamente 50%. Este resultado sugere que o equilíbrio dímero – monômero se deslocou no sentido de favorecer a formação do monômero, como seria esperado.

Sabemos ainda que a intensidade da fotoemissão observada (fosforescência) é uma transição proibida, de um estado triplete excitado ao estado singlete fundamental. Se a espécie fotoluminescente apresenta-se na forma de agregados, como dímeros e / ou oligômeros, a sobreposição de níveis vibracionais excitados do estado fundamental com o estado triplete de um nível eletrônico excitado, leva a um tipo de decaimento chamado decaimento por "intersystem crossing", que por ser um decaimento não radiativo, leva a uma diminuição do rendimento quântico da fotoemissão, ou seja, de sua intensidade. Uma vez que estes estados de agregação não existam mais, este tipo de decaimento não radiativo desaparece e a intensidade de fotoemissão aumenta²⁰.

Poderíamos, tentativamente atribuir o pico em 2,80 ao monômero da ZnPcS_2 e o pico em 3,35 min ao dímero, considerando a diminuição da intensidade deste pico em função da diluição da amostra. Entretanto, para afirmar tal suposição, se faz necessário a obtenção dos espectros de fluorescência destas amostras, nas mesmas condições que foram obtidos os espectros de massas.

Neste ínterim uma vez mais, temos que apesar dos espectros de massas terem elucidado a amostra de ZnPcS_2 , revelando uma amostra bastante pura, nenhuma correlação segura pode ser traçada com os eletroferogramas diretamente.

3.3.2.4 DyPcS_2 e LuPcS_2

As Figuras 82 e 83 mostram os eletroferogramas obtidos das Lu e DyPcS_2 ($10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) em CAPS 20 mmol.L^{-1} , pH 2,5. Uma vez mais podemos observar a complexidade dos picos. Como já discutimos anteriormente, a existência de

estruturas tipo sanduíche para as ftalocianinas de terras raras é bastante comum^{12,13,14}.

Figura 82 Eletroferograma da LuPcS₂ (10⁻⁴ mol.L⁻¹) em CAPS 20 mmol.L⁻¹, pH 10,5. Condições : injeção hidrodinâmica (3s / 0,5 psi); Voltagem de corrida: +15 kV. 25 °C.

Figura 83 Eletroferograma da DyPcS₂ (10⁻⁴ mol.L⁻¹) em CAPS 20 mmol.L⁻¹, pH 10,5. Condições : injeção hidrodinâmica (3s / 0,5 psi); Voltagem de corrida: +15 kV. 25 °C.

Para auxiliar na atribuição dos eletroferogramas obtivemos os espectros de massas das Lu PcS₂ e DyPcS₂ também em meio neutro, alcalino e ácido, os quais passaremos a discutir.

A Figura 84 mostra o espectro de massas da LuPcS₂ obtido em meio neutro. Embora aparentemente tenhamos uma boa relação sinal ruído, na verdade, o pico mais intenso em 459.4 m/z, atribuído a um fragmento da molécula, mascara a baixa intensidade dos picos atribuídos às espécies em solução. A presença do fragmento indica a instabilidade da ftalocianina em solução.

Diferentemente das espécies encontradas na amostra de ftalocianina de zinco dissulfonada, a ftalocianina de lutécio apresenta-se de duas formas como LuPcS₂ e Lu(PcS₂)₂, assim como previsto na literatura^{9,10,11}. É bastante comum encontrar estas espécies na forma de adutos com metanol, complexadas com H⁺ e Na⁺. Interessante notar a formação de um aduto entre duas moléculas de LuPcS₂ e ácido fórmico.

Em meio de ácido fórmico (Figura 85), o espectro de massas obtido é completamente diferente daquele obtido em meio neutro. Os picos detectados referem-se a fragmentos do anel e adutos entre a ftalocianina e ácido fórmico. O pico mais intenso do espectro é o 459.3 m/z, apresentando um perfil de uma espécie monocarregada. O espectro MS obtido com 35% de CID (collision induced dissociation) mostrou a intensificação dos mesmos picos observados na Figura 85, confirmando que, em condições de meio ácido, a molécula é bastante instável, sofrendo fragmentação com facilidade, senão, formando adutos com ácido fórmico. O fragmento atribuído ao pico 459.3 m/z é, muito provavelmente, ¾ do anel da ftalocianina.

Em meio alcalino (pH 10,5) o espectro apresenta uma relação sinal-ruído bastante pobre, como pode ser visto pela Figura 86. Os picos observados estão localizados na região abaixo de 450 m/z, ou seja, se devem a fragmentos. Mais uma vez o pico mais intenso (459.3) foi atribuído ao anel fragmentado. Alguns poucos picos de intensidade fraca, próxima à intensidade do próprio ruído, podem ser observados, por exemplo, em 759.3 e 770.3, atribuídos a [Lu(PcS₂)₂ + 3H⁺]²⁻ e [Lu(PcS₂)₂ + 2H⁺ + Na⁺]²⁻, respectivamente.

Figura 84 Espectro de massas da LuPcS_2 ($10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$), em meio neutro.

Figura 85 Espectro de massas da LuPcS₂ (10^{-4} mol.L⁻¹) em meio de ácido fórmico (pH 2.5).

Figura 86 Espectro de massas da LuPcS_2 ($10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) em meio alcalino (pH 10,5).

A tabela 12 mostra a atribuição tentativa para a LuPcS₂ em meio neutro, alcalino e ácido.

TABELA 12 – Atribuição tentativa para MS-ESI LuPcS₂ (10⁻³ mol.L⁻¹)

Meio Neutro	
ESPÉCIE	M/Z
aduto entre 2 moléculas de LuPcS ₂ e 2MeO ⁻	438,1
[Lu(PcS ₂) ₂ + 2H ⁺] ⁻³	504,5
[Lu(PcS ₂) ₂ + 3H ⁺] ⁻²	759,3
[Lu(PcS ₂) ₂ + 2H ⁺ + Na ⁺] ⁻²	770,2
[Lu(PcS ₂) ₂ + H ⁺ + 2Na ⁺] ⁻²	781,2
[LuPcS ₂] ⁻³	845,0
[LuPcS ₂ + MeOH] ⁻³	901,0
Meio Ácido	
ESPÉCIE	M/Z
Fragmento do anel	459,3
Meio Alcalino	
ESPÉCIE	M/Z
Fragmento do anel	459,3
[Lu(PcS ₂) ₂ + 3H ⁺] ⁻²	759,3
[Lu(PcS ₂) ₂ + 2H ⁺ + Na ⁺] ⁻²	770,3

A Figura 87 mostra o espectro de massas da DyPcS₂ 5.10⁻³ mol.L⁻¹ em meio neutro. Utilizamos uma concentração superior neste caso pois o espectro da solução 10⁻⁴ mol.L⁻¹ apresentou um sinal muito baixo. Entretanto, o espectro não apresentou nenhuma alteração em função da concentração com relação ao aumento do número de picos. O espectro de massas da DyPcS₂ (Figura 87) mostra vários aspectos interessantes, os quais passaremos a discutir a seguir.

Figura 87 Espectro de massas da DyPcS₂ ($5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) em meio neutro.

Na Figura 88 podemos observar, em 336,1 m/z, o padrão do anel desmetalado da ftalocianina sulfonada. A separação dos picos em 0,5 unidades de m/z indica tratar-se de uma espécie dissulfonada, porém sem padrão de distribuição isotópica de metal. Este pico foi atribuído à ftalocianina dissulfonada desmetalada. A Figura 88 mostra também o espectro expandido do pico em 367,1 m/z, indicando que se trata de uma espécie com duas cargas negativas, com um padrão de distribuição isotópica do zinco. Este espectro é semelhante ao espectro da figura 76 o qual foi atribuído à [ZnPcS₂].

As Figuras 89 (359,0 m/z) e 90 (502,1 m/z) mostram os padrões para as espécies tipo sanduíche para a DyPcS₂ onde temos espécies tripla e duplamente carregadas. Como descrito na literatura^{9,10,11} e ao contrário do que observamos para a espécie tetrassulfonada da ftalocianina de disprósio, a espécie dissulfonada apresenta-se na forma de sanduíche. Não encontramos também evidências da estrutura dimérica como observamos para a ZnPcS₂.

A Figura 91 mostra o espectro expandido para o pico em 764,6 m/z. Observamos também para este pico, um padrão de espécies duplamente carregada e na forma sanduíche a qual atribuímos a espécie: [Dy(PcS₂)₂ + 2H⁺ + 2Na⁺]²⁻

Segundo nossa atribuição, as espécies detectadas apresentam-se com 3 ou 2 cargas negativas, complexadas em diversas extensões com H⁺ e Na⁺. Neste caso, não observamos a formação de adutos com metanol.

A Figura 92, mostra o espectro de massas da DyPcS₂ em meio alcalino (pH 10.5), onde encontramos um espectro bastante semelhante ao espectro obtido em meio neutro, porém, com as intensidades relativas dos picos significativamente alteradas. Neste espectro, o pico do anel desmetalado da ftalocianina não é o pico mais intenso, mas sim o pico em 346,1 m/z, atribuído a uma espécie monocarregada, que provavelmente não apresenta Dy em sua constituição, uma vez que o perfil do pico não mostra a distribuição isotópica do metal. Observa-se também outras espécies monocarregadas com picos em 328.3 e 578.2 m/z, cuja atribuição é desconhecida.

Em meio de ácido fórmico, pH 2.5 (Figura 93), o espectro de massas apresenta uma relação sinal ruído muito pobre. Um único pico é observado em 346.2 m/z, sendo tentativamente atribuído a um fragmento do anel da ftalocianina.

Figura 88 Espectros de massas expandidos dos picos em 336,1 e 367,1 m/z da $DyPcS_2$ ($5 \cdot 10^{-3}$ mol.L $^{-1}$) em meio neutro.

Figura 89 Espectro de massas expandido da DyPcS₂ em meio neutro para o pico em 359,0 m/z.

Figura 90 Espectro de massas expandido da DyPcS_2 em meio neutro, para o pico em 502,1 m/z .

Figura 91 Espectro de massas expandido da DyPcS_2 para o pico em 764,6 m/z .

Figura 92 Espectro de massas da DyPcS₂ (10^{-4} mol.L⁻¹) em meio alcalino (pH 10,5).

Figura 93 Espectro de massas da DyPcS₂ (10^{-4} mol.L⁻¹) em meio de ácido fórmico (pH 2,5).

A tabela 13 a seguir mostra a atribuição tentativa para a DyPcS₂.

TABELA 13 – Atribuição tentativa para MS-ESI DyPcS₂ (10⁻³ mol.L⁻¹)

ESPÉCIE	M/Z
[H ₂ PcS ₂] ²⁻	336.3
[ZnPcS ₂] ²⁻	368.2
[Dy(PcS ₂) ₂ +2H ⁺] ³⁻	501.9
[Dy(PcS ₂) ₂ +3H ⁺] ²⁻	753.7
[Dy(PcS ₂) ₂ + 2H ⁺ + Na ⁺] ²⁻	764.6
[Dy(PcS ₂) ₂ + H ⁺ + 2Na ⁺] ²⁻	774.7

De uma maneira geral observa-se, pelos espectros de massas obtidos para a DyPcS₂, que se trata de uma amostra contaminada por ZnPcS₂. A presença da ftalocianina dissulfonada desmetalada é um outro resultado interessante pois revela a instabilidade da amostra em solução. Esta conclusão se tornou evidente com os espectros de massa obtidos em meio ácido, mostrando um pico intenso atribuído apenas a fragmentos do anel.

A presença da ZnPcS₂, pode ter duas origens prováveis, ser de fato uma contaminação da DyPcS₂, ou ser uma contaminação deixada dentro do instrumento.

Tanto para a LuPcS₂ como para a DyPcS₂, os espectros mostraram basicamente a mesma espécie, uma estrutura tipo sanduíche das ftalocianinas dissulfonadas na forma protonada ou “sodiada” em diferentes extensões.

Para a ftalocianina de lutécio observamos também a forma [LuPcS₂]³⁻ estrutura que contém apenas um anel de ftalocianina. Notar que este tipo de ftalocianina não foi detectada na amostra de disprósio.

A atribuição eletroferograma em CAPS 20mM pH 10,5, na Figura 82 da LuPcS₂ é bastante complexa uma vez que o número de picos observados no eletroferograma é muito superior ao número de espécies observadas no espectro de massas.

O efeito da diluição também para a LuPcS₂, mostrou-se bastante importante pois simplificou significativamente o eletroferograma. A Figura 94,

mostra o eletroferograma de uma solução 10^{-6} mol.L $^{-1}$ de LuPcS $_2$ em CAPS 20 mM, pH 10,5, onde observamos apenas um pico de baixa intensidade em 2,8 min. Neste mesmo pH o espectro de massas também revela apenas a presença de Lu(PcS $_2$) $_2$. Desta forma podemos admitir de uma maneira coerente que no eletroferograma estamos observando uma espécie tipo sanduíche e não uma ftalocianina de anel simples, pois não é uma espécie presente nos espectros de massas neste pH. Entretanto, em se tratando do eletroferograma da LuPcS $_2$ a uma concentração 10^{-4} mol.L $^{-1}$, o elevado número de picos denota a complexidade do sistema com a concentração. Neste caso é fundamental lembrar que os isômeros de posição das ftalocianinas sulfonadas são em número de 16 em se tratando da espécie de um anel apenas. Para a espécie sanduíche é razoável admitir que sejam fruto da combinação das 16 espécies isoméricas duas a duas, elevando para 120 o número de espécies esperadas.

Figura 94 Eletroferograma da LuPcS $_2$ (10^{-6} mol.L $^{-1}$) em CAPS 20 mmol.L $^{-1}$, pH 10,5. Condições : injeção hidrodinâmica (3s / 0,5 psi); Voltagem de corrida: +15 kV. 25 °C.

O eletroferograma da DyPcS_2 é relativamente mais simples. O eletroferograma da Figura 83 para a DyPcS_2 a $10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, mostra um pico intenso em 3,08 min e outro mais fraco em 3,47 min. Segundo as espécies observadas nos espectros de massas, sabemos que neste caso temos uma mistura de ZnPcS_2 e H_2PcS_2 e da própria $\text{Dy(PcS}_2)_2$. Como as espécies ZnPcS_2 e H_2PcS_2 são contaminações, a diluição da amostra deve eliminar o sinal da contaminação, auxiliando em nossa atribuição.

A Figura 95 mostra o eletroferograma da DyPcS_2 obtido a uma concentração $10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, onde podemos observar apenas um pico mais intenso em 3,00 min. Neste caso a atribuição parece bastante simples, uma única espécie observada no espectro de massas e um único pico no eletroferograma., ou seja, trata-se de uma espécie tipo sanduíche da ftalocianina de disprósio.

Figura 95 Eletroferograma da DyPcS_2 ($10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) em CAPS 20 mmol.L^{-1} , pH 10,5. Condições : injeção hidrodinâmica (3s / 0,5 psi); Voltagem de corrida: +15 kV. 25 °C.

3.4 Conclusões

Como principais conclusões deste capítulo temos que o método de separação das ftalocianinas não é trivial. O sistema eletrolítico a ser escolhido deve levar em consideração inúmeras variáveis como a carga da ftalocianina, possíveis interações entre o eletrólito e a ftalocianina, eletrodispersão, possíveis contaminações e, sem dúvida alguma, o mais importante, a espectrometria de massas.

A espectrometria de massas mostrou-se a etapa mais importante para a atribuição tentativa dos eletroferogramas. Mostrou, por exemplo, o equilíbrio dímero – monômero para a ZnPcS_2 como função da diluição, comportamento que não foi detectado para a amostra de ZnPcS_4 . Mostrou contaminações por FePcS_2 na ZnPcS_4 e por $\text{H}_2\text{PcS}_2 + \text{ZnPcS}_2$ na DyPcS_2 , situações que, apenas por eletroforese capilar, não seriam elucidadas. Por espectroscopia de massas pudemos detectar também a existência de espécies tipo sanduíche para as ftalocianinas dissulfonadas de disprósio e lutécio. Espécies que por outro lado não foram encontradas nas amostras tetrassulfonadas destes mesmos metais. Aqui sustentamos a hipótese de que a repulsão eletrostática entre os 8 grupos sulfona e a presença do metanol, inibe a formação de tal espécie.

Embora os espectros de massas tenham se mostrado absolutamente essenciais para auxiliar na atribuição tentativa do eletroferograma, infelizmente a sua correlação direta com os eletroferogramas não é válida, comprometendo nosso objetivo maior que é a atribuição dos eletroferogramas.

Os sistemas discutidos neste trabalho são um exemplo bastante claro de que para se fazer uma atribuição consistente dos eletroferogramas os experimentos devem ser feitos num instrumento de eletroforese capilar acoplado em linha a um espectrômetro de massas.

Verificamos também, que o melhor meio eletrolítico para a análise das ftalocianinas é um tampão que interage o menos possível com o analito como o ácido ciclo hexil amino propanosulfônico ou CAPS. Observamos também que, embora pretendêssemos desenvolver um método que pudesse ser utilizado à uma concentração de $10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, concentração utilizada nos ensaios clínicos, a deformidade dos picos, mesmo em CAPS, prejudica a atribuição. A concentração mais adequada a ser utilizada é $10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.

3.5 Referências Bibliográficas

1. R. Bonnet, Chem. Soc. Rev., (1995)19.
2. Weinberger R., in Practical Capillary Electrophoresis, Academic Press, 1993, San Diego, p. 39.
3. Barbosa C. A.S., Constantino V. R.L. e Tavares M. F.M., J. Cap. Elec , 4(1997) 157.
4. Fujiwaran S. e Honda S.; Anal. Chem. 58(1986)1811.
5. Grossman P.D. e Colburn J.C.; in Capillary Electrophoresis – Theory and Practice, Academic Press, 1992, San Diego, p.14.
6. Hoffstetter-Kuhn S., Paulus A., Gassmann E., Widmer H. M., Anal. Chem. 63(1991)1541.
7. Wiederkehr N.A.; J. Braz. Chem. Soc., 7(1996)7.
8. Nagao Kobayashi, "Synthesis and Spectroscopic Properties of Phthalocyanine Analogues" em Phthalocyanines, Properties and Applications, Vol. 2, p. 104, VCH Publishers, NY, 1993.
9. Nagao Kobayashi, "Synthesis and Spectroscopic Properties of Phthalocyanine Analogues" em Phthalocyanines, Properties and Applications, Vol. 2, p. 104, VCH Publishers, NY, 1993.
10. Gaskell, S.J., Journal of Mass Spectrometry, 32(1997)677.
11. Grossman P.D. e Colburn J.C.; in Capillary Electrophoresis – Theory and Practice, Academic Press, 1992, San Diego, p.36.
12. Lurle I.S., Klein R.F.X., Anal. Chem., 66(1994)4019.
13. Kirin I.S., Moskalev P.N. e Yu. A. Makashev, Russ. J. Inorg. Chem., 12(1967)369.
14. MacKay A.G., Boas J.F. e Troup G.J., Aust. J. Chem., 27(1974)955.
15. Moskalev P.N. e Kirin I.S.; Russ. J. Inorg. Chem., 16(1971)57
16. Collins G.C.S. e Schiffrin D.J., J. Electroanal. chem, 139(1982)335.
17. Goodall D. e Bergstrom E., manuscrito em preparação
18. Yang Y. C., Ward J.R. Seiders R.P., Inorg. Chem. 24(1985)1765.
Monahan A.R., Brado J.A., DeLuca A.F., J. Phys. Chem., 76(1972)447.
Howe L. e Zhang J.Z, J. Phys. Chem. A, 101(1997)3207
19. Bernauer K., Fllab S., Helv. Chim. Acta, 44(1961)1287.

20. Sharma A. e Shulman S. G., in Introduction to Fluorescence Spectroscopy, Wiley Interscience, 1999, New York, p. 1.

CAPÍTULO 4

Análise de Ftalocianinas Disulfonadas de Lutécio e Disprósio por Cromatografia Eletrocinética Micelar (MEKC)

4.1 Introdução

Discutimos no capítulo 3, para os espectros de massas das ftalocianinas de terras raras, que a presença de fragmentos e ftalocianinas desmetaladas denotam a instabilidade do composto em solução aquosa.

Procurando estabilizar a ftalocianina em solução e também discriminar os isômeros de posição pela sua provável interação seletiva com micelas, utilizamos um outro mecanismo de separação em eletroforese capilar, a cromatografia eletrocinética micelar ou MEKC.

Em se tratando da análise de moléculas aniônicas, como é o caso das ftalocianinas, a utilização de um surfactante catiônico não é desejável uma vez que a atração coulombica forte induz a formação de pares iônicos onde a carga líquida neutra não sofre discriminação pelo campo elétrico.

Por outro lado, a utilização de surfactantes aniônicos, como p. ex. dodecil sulfato de sódio (SDS), demonstrou ter dois efeitos distintos.

4.2 Parte Experimental

4.2.1 Reagentes

As soluções de amostras padrões e eletrólitos foram preparadas no momento da execução do experimento com água deionizada com uma condutância de $10^{-18} \Omega^{-1}$.

Os padrões comerciais das ftalocianinas tetra e dissulfonadas de disprósio e lutécio são de procedência Porphyrin Prodc., e foram utilizados sem prévia purificação.

Soluções de NaOH (1 mol L^{-1}), HNO₃ (1:1 v/v) e de tampão eletrolítico foram utilizadas como soluções condicionantes de capilar.

As soluções tampão foram preparadas a partir de uma solução de ácido cítrico 100 mmol.L^{-1} (o pH foi corrigido com NaOH). Em seguida, o surfactante foi adicionado na concentração desejada.

4.2.2 Instrumentação

Os eletroferogramas com detecção LIF, foram obtidos no sistema de eletroforese capilar modelo P/ACE 5510 da Beckman-Coulter Inc. Neste instrumento, o capilar é acondicionado num cartucho, o qual permite a circulação de um líquido à base de fluorocarbonos para o controle da temperatura durante a corrida. Este equipamento é dotado de dois sistemas de detecção diferentes, um detector tipo “diode array” com 512 fotodiodos (DAD) para detecção por absorção na região do UV-vis, varrendo a região de 190 a 600 nm. Para detecção de fluorescência induzida por laser temos uma fotomultiplicadora que utiliza um conjunto de filtros de excitação e emissão em 635 e 675 nm, respectivamente.

A radiação excitante utilizada foi a linha 635 nm de um laser de semiconductor que é conduzido ao capilar por um cabo de fibra ótica.

4.2.3 Capilares

Os capilares utilizados são da Polymicro Technologies Inc, sem nenhum tipo de revestimento interno. As dimensões utilizadas foram 75 μm de diâmetro interno e 365 μm de diâmetro externo, com 47 cm de comprimento total com 40 cm ao detector.

O método de condicionamento utilizado antes de cada experimento consiste na lavagem sucessiva de 5 minutos de ácido nítrico 1:1 (v/v), 10 minutos de água, 5 minutos de hidróxido de sódio 1mol.L⁻¹, 10 minutos de água e 20 minutos de tampão eletrolítico.

4.3 Resultados e Discussões

Consideramos o seguinte modelo para interpretação dos eletroferogramas que passaremos a discutir. A repulsão eletrostática entre os grupos sulfona da ftalocianina e os grupos sulfato do SDS e a partição da porção hidrofóbica (sem os grupos sulfona) das ftalocianinas dissulfonadas e cavidade da micela, fazem com que a intensidade da interação seja dependente do isômero de posição das ftalocianinas.

As Figuras de 96 a 99 mostram os eletroferogramas obtidos para LuPcS₂ e DyPcS₂ em citrato 100 mM pH 2,5 e em várias concentrações de SDS. Escolhemos citrato pois é um tampão que mesmo a altas concentrações como 100 m mol.L⁻¹ apresenta corrente baixa, condição desejável para que possamos adicionar e variar a concentração de SDS no sistema sem que a corrente aumente demasiadamente.

Figura 96 Eletroferogramas da LuPcS₂. Condições: 100 mM ácido cítrico, pH ajustado para 2.5 com HCl; SDS como aditivo, faixa de concentração: 3 - 7 mmol.L⁻¹. Injeção: Hidrodinâmica (1 s/ 0.5 psi); Voltagem: -15 kV; 25°C.

Figura 97 Eletroferogramas da LuPcS₂. Condições: 100 mM ácido cítrico, pH ajustado para 2.5 com HCl; SDS como aditivo, faixa de concentração: 10 – 50 mmol.L⁻¹. Injeção: Hidrodinâmica (1 s/ 0.5 psi); Voltagem: -15 kV; 25°C. Os picos identificados por letras são aqueles para os quais calculamos os valores de k' e P.

Figura 98 Eletroferogramas da DyPcS₂. Condições: 100 mM ácido cítrico, pH ajustado para 2.5 com HCl; SDS como aditivo, faixa de concentração

Fig. 99 Eletroferogramas da DyPcS₂. Condições: 100 mM ácido cítrico, pH ajustado para 2.5 com HCl; SDS como aditivo, faixa de concentração: 10 – 50 mmol.L⁻¹. Injeção: Hidrodinâmica (1 s/ 0.5 psi); Voltagem: -15 kV; 30°C. Os picos identificados por letras são aqueles para os quais calculamos os valores de k' e P .

O eletroferograma obtido em citrato 100 m mol.L⁻¹ é a condição extrema onde não há micela. Neste caso, o mecanismo de separação, como já discutimos anteriormente, é do tipo eletroforese de zona ou solução livre (CZE). Neste eletroferograma pudemos observar apenas 2 picos em 20,6 e 21,8 min, sendo este último mais intenso. Para concentrações crescentes de SDS no tampão de corrida observamos o aumento no número de picos observados.

Como verificamos, a partir da equação do coeficiente de partição discutida anteriormente, à medida que aumentamos a concentração de SDS, a quantidade de micelas aumenta e, portanto, a partição também aumenta. De fato, os eletroferogramas mostram o aumento do número de picos de 2 para 5 quando variamos a concentração de 0 a 7 m mol.L⁻¹ de SDS. Para concentrações de 7 a 75 m mol.L⁻¹ não temos o aumento do número de picos, entretanto, observamos que a mobilidade dos picos aumenta significativamente.

Destes eletroferogramas pudemos construir uma tabela onde correlacionamos os picos observados através da razão área / tempo de migração e a diferença de concentração de SDS e a CMC ($[SDS - CMC]$). A razão área / tempo de migração foi utilizada para corrigir efeitos de distorção do pico em função do tempo com o aumento da concentração do eletrólito que eventualmente possa estar ocorrendo em nossos experimentos.

O objetivo desta tabela é nos auxiliar na construção de uma curva de mobilidade aparente em função da diferença de concentração $[SDS] - CMC$.

No nosso caso em particular onde a amostra contém um grande número de espécies passíveis de serem discriminadas pelo campo elétrico e cuja atribuição ainda é obscura, é necessário que saibamos associar ao mesmo pico sua evolução em termos de mobilidade em função da concentração de SDS na série de eletroferogramas.

É intuitivo admitir que, em se tratando de uma mesma espécie, a razão área / tempo de migração deve permanecer constante pelo menos na sua ordem de grandeza. Por exemplo, para se correlacionar o pico A, observado no eletroferograma utilizando 7 m mol.L^{-1} de SDS no tampão de corrida, cujo tempo de migração é de 9,01 min, ao pico em 5,61 min do eletroferograma obtido com 50 m mol.L^{-1} de SDS, devemos observar uma invariância em ordem de grandeza da sua razão área / tempo de migração em função da diferença $[SDS] - CMC$.

Adotamos como CMC do SDS em citrato a concentração de 3 mmol.L^{-1} , pois como podemos observar nas Figuras 96 e 98, esta é uma condição intermediária entre eletroforese de zona (CZE), onde não temos nenhuma micela no tampão, e 5 m mol.L^{-1} de SDS onde observamos que, pelo aumento do número de picos no eletroferograma, já está ocorrendo uma partição das espécies da amostra com a micela, portanto, saímos da condição de CZE para MEKC.

Da série de eletroferogramas apresentada nas Figuras 96 e 98, observamos também que, variando a concentração de SDS de 0 até 7 mmol.L^{-1} , temos uma região de transição, pois em 0 mM de SDS observamos apenas 2 picos no eletroferograma e à medida em que a concentração de SDS cresce até 7 mM o número de picos vai aumentando até que finalmente observamos os 5 picos

principais (A, B, C, D, E), que se mantêm até uma concentração de 75 mM de SDS, variando apenas sua mobilidade.

De fato, pelas tabelas 14 e 15, podemos verificar que de 0 a 7 mM de SDS há uma flutuação na relação área / tempo de migração dos 5 picos, indicando a dinâmica do sistema ou seja o aumento do número de micelas, aumentando a partição analito – micela.

Tabela 14 – Correlação Área/ Tempo de Migração para a DyPcS₂ e ([SDS] – CMC)

Area / Tempo de Migração para DyPcS₂					
([SDS] – CMC) / m mol.L⁻¹	Pico A	Pico B	Pico C	Pico D	Pico E
72	3,5E-03	5,2E-03	5,5E-02	2,3E-03	1,1E-03
47	3,1E-03	4,7E-03	4,5E-02	1,1E-03	9,3E-04
22	3,4E-03	5,3E-03	9,1E-02	2,1E-03	1,9E-03
7	2,6E-03	4,0E-03	7,6E-02	1,8E-03	1,4E-03
4	1,2E-03	6,7E-03	1,3E-01	2,5E-03	2,4E-03
2	1,9E-03	4,8E-03	1,2E-01	2,0E-03	1,4E-03
0		6,4E-03	1,5E-01	2,1E-03	

Tabela 15 – Correlação Área/ Tempo de Migração para a LuPcS₂ e ([SDS] – CMC)

Area / Tempo de migração para LuPcS₂					
([SDS] – cmc) / mM	Pico a	Pico b	Pico c	Pico d	Pico e
72	6,0E-03	2,6E-03	2,6E-03	5,1E-04	3,8E-04
47	3,5E-03	1,7E-03	2,4E-03	4,9E-04	3,6E-04
22	3,6E-03	1,6E-03	4,0E-03	5,9E-04	5,4E-04
7	4,7E-03	1,0E-03	4,1E-03	8,9E-04	5,2E-04
4	2,4E-03	1,7E-03	6,3E-03	1,1E-03	7,1E-04
2	2,6E-03	1,1E-03	6,7E-03	8,3E-04	6,2E-04
0	1,0E-03	1,5E-03			

Estabelecidas as correlações entre os dois picos nos eletroferogramas, foi possível traçar as curvas de mobilidade aparente em função da diferença [SDS] – CMC, como mostram as Figuras 100 e 101. Das curvas podemos observar que temos pelo menos uma espécie relacionada ao pico A, tanto para a LuPcS₂ como para a DyPcS₂, que interagem fortemente com a micela desde a mais baixa concentração de micelas em solução.

Figura 100 Curva da mobilidade aparente da DyPcS₂ em função da concentração de SDS.

Figura 101 Curva da mobilidade aparente da DyPcS₂ em função da concentração de SDS.

Resumidamente, lembrando que, dos espectros de massas para DyPcS₂ em meios neutro, alcalino e ácido, aparte da grande formação de fragmentos, observamos que basicamente temos apenas um tipo de estrutura, a Dy(PcS₂)₂. No caso da LuPcS₂ observamos duas espécies, a própria LuPcS₂ e a espécie tipo sanduíche, Lu(PcS₂)₂.

Como discutimos anteriormente, e segundo a literatura¹, sabemos que estas ftalocianinas possuem vários isômeros de posição. Observamos também dos nossos resultados que em eletroforese de zona estes isômeros muito provavelmente migram juntos. No entanto, em se tratando de fase micelar, a diferença na estrutura da molécula pode interferir na partição com a micela, resultando em diferenças significativas dos tempos de migração.

A Figura 102 mostra esquematicamente 5 estruturas prováveis para os isômeros de posição das ftalocianinas tipo sanduíche. As linhas tracejadas representam o anel da ftalocianina na porção inferior da estrutura e a linha contínua representa o anel na porção superior. Verificamos que para o isômero de posição trans-trans temos apenas uma única espécie esperada, para a espécie cis-cis temos 2 espécies e finalmente para o isômero cis-trans esperamos outras 2 espécies, num total de 5 isômeros de posição para a estrutura tipo sanduíche.

Dos 5 isômeros, espera-se que a espécie cis-cis seja a espécie que resida mais tempo no interior da micela ou seja interaja mais fortemente com a micela. Isto porque os grupos sulfona desta espécie, representados pelos círculos, encontram-se todos de um mesmo lado da molécula, deixando a outra metade hidrofóbica livre para interação com a micela.

Os demais isômeros portanto, interagem em diferentes extensões com a micela. Qualitativamente, propomos que as espécies da Figura 102 interajam com a micela na seguinte ordem:

cis - cis 1 > cis - trans 1 > cis - trans 2 ~ trans - trans > cis - cis 2

A partir deste modelo é razoável admitir que no gráfico de mobilidade aparente, a curva do pico A, cuja interação com a micela é forte, condição caracterizada pela tendência quase linear da curva de mobilidade em função da concentração de SDS, é tentativamente atribuída ao isômero cis-cis 1 e o outro

extremo, onde o tempo de residência da ftalocianina na a micela é o menor possível, foi tentativamente atribuída à espécie cis-cis 2.

Figura 102 Esquema dos isômeros de posição. As espécies da esquerda supostamente interagem mais com a micela do que as espécies da direita.

Avaliamos a intensidade da interação para 3 séries de picos em termos do coeficiente de partição micela – água ($P_{m,w}$). A série principal refere-se ao pico mais intenso identificado como (C) / (c) no eletroferogramas da DyPcS₂ e LuPcS₂, respectivamente e duas séries menores referindo-se aos picos identificados como (B) / (b) e (E) / (e) nos eletroferogramas da DyPcS₂ e LuPcS₂, respectivamente.

Para o cálculo do coeficiente de partição utilizamos a fórmula:

$$P_{m,w} = \frac{k'}{\beta} \quad [9]$$

onde K é o fator capacidade e β a razão da fase.

Como vimos anteriormente β pode ser calculado apartir da seguinte expressão:

$$\beta = \frac{V_p ([surf] - cmc)}{1 - V_p ([surf] - cmc)} \quad [10]$$

assumindo para V_p ou volume parcial do surfactante como $0,25 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ e CMC = 3 mM, 25 °C.

O fator capacidade pode ser calculado como:

$$k' = \frac{t_r - t_o}{t_o (1 - t_r / t_{mc})} \quad [11]$$

onde t_r é o tempo de migração do pico do analito de interesse

t_{mc} é o tempo de migração da micela

t_o é o tempo de migração do fluxo eletroosmótico

Para nossos cálculos utilizamos para o tempo de migração da micela o tempo de migração médio do primeiro pico observado nos eletroferogramas em diversas concentrações de SDS, identificado como pico A, que como discutimos anteriormente através da curva de mobilidade, é a espécie que mais fortemente interage com a micela.

Admitimos como o marcador de fluxo eletroosmótico o tempo de migração observado para o pico mais lento em condição de CZE ou seja 0 mM de SDS em tampão citrato pH 2,5 ($t_0 = 21,77$ min).

As tabelas de 16 a 18 mostram os valores de K, β e P para os picos das séries principal e menores identificados como (B)/(b), (C)/(c), e (E)/(e) nos eletroferogramas da LuPcS₂ e DyPcS₂, respectivamente em meio de citrato 100 m mol.L⁻¹ em diferentes concentrações de SDS.

Tabela 16 – Valores de K, β e P para a Série Principal – Pico (C) / (c)

[SDS] (mmol.L⁻¹)	t_{mc} - Dy	t_{mc} - Lu	t_{mc} médio	t_{obs} - Dy (C)	t_{obs} - Lu (c)	t_{obs} médio	K
0,00				21,80	21,74	21,77	
10,00	5,78	5,79	5,79	9,48	9,41	9,45	0,89
25,00	5,75	5,70	5,73	7,31	7,23	7,27	2,47
50,00	5,63	5,60	5,62	6,32	6,31	6,32	5,69
75,00	5,45	5,45	5,45	5,91	5,90	5,91	8,73

[SDS] – CMC (mmol.L⁻¹)	β	K	P
7,00x10 ⁻³	1,75 x 10 ⁻³	0,89	511,34
22,00x10 ⁻³	5,53 x 10 ⁻³	2,47	446,30
47,00x10 ⁻³	11,89 x 10 ⁻³	5,69	478,94
72,00x10 ⁻³	18,33 x 10 ⁻³	8,73	476,22

Tabela 17 – Valores de K , β e $P_{m,w}$ para a Série Menor – Pico (B) / (b)

[SDS] (mmol.L⁻¹)	t_{mc} - Dy	t_{mc} - Lu	t_{mc} médio	t_{obs} - Dy (B)	t_{obs} - Lu (b)	t_{obs} médio	K
0,00				21,80	21,74	21,77	
10,00	5,78	5,79	5,79	7,84	7,77	7,81	1,84
25,00	5,75	5,70	5,73	6,41	6,36	6,39	6,13
50,00	5,63	5,60	5,62	5,87	5,84	5,86	17,10
75,00	5,45	5,45	5,45	5,61	5,60	5,61	26,11
[SDS] – CMC (mmol.L⁻¹)		β		K		$P_{w,m}$	
7,00x10 ⁻³		0,00175		1,84		1049,78	
22,00x10 ⁻³		0,00553		6,13		1108,53	
47,00x10 ⁻³		0,01189		17,10		1438,48	
72,00x10 ⁻³		0,01833		26,11		1424,36	

Tabela 18 – Valores de K , β e P para a Série Menor – Pico (E) / (e)

[SDS] (mmol.L⁻¹)	t_{mc} - Dy	t_{mc} - Lu	t_{mc} médio	t_{obs} - Dy (E)	t_{obs} - Lu (e)	t_{obs} médio	K
0,00				21,8	21,74	21,77	
10,00	5,78	5,79	5,79	11,5	11,4	11,45	0,48
25,00	5,75	5,7	5,73	8,54	8,43	8,49	1,27
50,00	5,63	5,6	5,62	6,93	6,92	6,93	2,92
75,00	5,45	5,45	5,45	6,31	6,31	6,31	4,50
[SDS] – CMC (mmol.L⁻¹)		β		K		P	
7,00x10 ⁻³		0,00175		0,48		276,62	
22,00x10 ⁻³		0,00553		1,27		228,90	
47,00x10 ⁻³		0,01189		2,92		245,82	
72,00x10 ⁻³		0,01833		4,50		245,52	

Resumidamente, obtivemos os seguintes valores médios de coeficiente de partição para as duas séries:

$$P_{\text{médio}} (C)/(c) = 478,20 \pm 26,58 \text{ (RDS = 5,5 \%)}$$

$$P_{\text{médio}} (B)/(b) = 1255,29 \pm 204,87 \text{ (RSD = 16,3 \%)}$$

$$P_{\text{médio}} (E)/(e) = 249,22 \pm 19,82 \text{ (RSD = 7,8 \%)}$$

Dos valores de P obtidos, fica claro que, de fato, os analitos possuem diferentes graus de hidrofobicidade e estão interagindo diferentemente com a micela. Partindo deste princípio, atribuímos, tentativamente, o pico (A) / (a) à espécie que mais fortemente interage com a micela, a qual, inclusive, utilizamos como nosso marcador de mobilidade micelar. Esta aproximação mostrou-se ser válida uma vez que os valores de coeficiente de partição obtidos são coerentes com a interpretação dos resultados. Tentativamente podemos atribuir este pico ao isômero cis-cis 1 (Figura 98), pois é a estrutura isomérica que mais fortemente interagiria com a micela segundo nosso modelo.

O pico (C) / (c), que possui um coeficiente de partição intermediário e que é o mais intenso do eletroferograma, atribuímos às espécies de Lu(PcS₂)₂ e Dy(PcS₂)₂ do tipo sanduíche baseados nos resultados de espectrometria de massas. Considerando o modelo proposto no início desta discussão este pico poderia ser tentativamente atribuído à espécie cis-trans + trans-trans dos isômeros de posição da Figura 98.

O pico (B) / (b), que dos valores de P calculados é o mais intenso, poderia ser tentativamente atribuído, seguindo o nosso modelo, à espécie cis-trans 1 e o pico (E) / (e) à espécie cis-cis 2.

Devemos destacar aqui que esta é uma atribuição tentativa. É claro que há vários picos de menor intensidade que, com o aumento da concentração de SDS, co-eluem, embutindo neste caso uma fonte de erro, como podemos observar nos eletroferogramas para a LuPcS₂.

Consideramos também apenas as espécies de lutécio e disprósio em nossa atribuição, não consideramos por exemplo a contaminação de ZnPcS₂ e H₂PcS₂

que claramente foi observada nos espectros de massas da amostra de disprósio apenas. Estas espécies, por serem menores, muito provavelmente tem um tempo de residência significativo na micela. No entanto, por serem contaminantes admitimos que a intensidade destes picos é baixa.

Espécies diméricas e monoméricas por sua vez, que foram observadas apenas no espectro de massas da LuPcS₂, também podem apresentar uma interação mais intensa com a micela, mas devem dar origem a picos pouco intensos uma vez que foram observados apenas no espectro em meio neutro.

4.3 Conclusões

A separação em meio micelar, mostrou os diferentes graus de interação entre os analitos que compõem a amostra com a micela. Essa diferença de interação se deve, muito provavelmente, aos isômeros de posição, uma vez que essencialmente temos apenas Dy(PcS₂)₂ e Lu(PcS₂)₂ nas amostras.

4.4 Referências Bibliográficas

1. Barbosa C. A.S., Constantino V. R.L. e Tavares M. F.M., J. Cap. Elec , 4(1997) 157.

Trabalhos Futuros

Como discutimos neste trabalho, toda a atribuição feita para os eletroferogramas das ftalocianinas tetra e dissulfonadas de zinco, lutécio e disprósio foram baseadas nas espécies observadas nos espectros de massas em diferentes meios. Todas as atribuições encontradas são tentativas feitas através da melhor correlação encontrada para os sistemas, uma vez que várias espécies observadas nos espectros de massas não são esperadas nos eletroferogramas, como os adutos com metanol e fragmentos por exemplo.

Obviamente, para uma atribuição mais adequada, os eletroferogramas deveriam ser sido obtidos utilizando-se um espectrômetro de massas em linha ao instrumento de eletroforese capilar. Neste caso se faz necessário o desenvolvimento de um método que utilize tampões mais voláteis como acetato/ácido acético e formiato/ácido fórmico.

CURRICULUM VITAE

Marcia Rodrigues dos Santos

Nascida em São Paulo aos 28 de novembro de 1966.

Educação:

Segundo grau realizado no Colégio Objetivo em São Paulo em 1985.

Bacharel em Química pela Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

Mestre em Química pela Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

Doutor em Química pela Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

Ocupação:

Bolsista Fapesp, processo nº: 96/01093-5

Publicações:

- M. R. Santos, M. F. M. Tavares, T. Dransfield e D. M. Goodall (2000), *ESI-MS study in neutral, acidic and basic media of some sulfonated metallo phthalocyanines*, manuscrito em preparação.
- M. R. Santos, M. F. M. Tavares e J. C. Rubim e D. M. Goodall (2000), *Micelar Electrokinetic Chromatography of Lutetium and Dysprosium Disulfonated Phthalocyanines. Partitioning Studies*, manuscrito em preparação.
- M. R. Santos, M.F.M.Tavares e J. C. Rubim (2000), *Surface Enhanced Ressonance Raman Scatering of Sulfonated Zinc, Lutecium and Dysprosium Phthalocyanines on Ag and Cu Electrodes*, manuscrito em preparação.
- M. R. Santos, M. F. M. Tavares e J. C. Rubim (2000), *Implementação de um sistema de eletroforese capilar com detecção de fluorescência induzida por laser.*, Química Nova, no prelo.

- M. L. A. Temperini, M. R. Santos e V. R. P. Monteiro, *Spectroscopic Study of the Isomerization of Z- to E- Pyridine-2-formylthiosemicarbazone*, *Spectrochimica Acta*, 51A (1995)1517.

APÊNDICE

Tabelas de Massa e Abundância para as ftalocianinas sulfonadas de Zn, Lu e Dy e seus espectros de massas

1. ZnPcS_2

Massa	Abundância	Multiplicidade
733.98	0.2942125	1
734.98	0.1192517	5
735.97	0.2219993	13
736.98	0.1080606	25
737.97	0.1577899	36
738.98	0.0597187	45
739.97	0.0274765	50
740.97	0.0078301	44
741.97	0.0020714	31
742.97	0.000417	17
743.97	0.0000664	9
744.97	0.0000026	1

2. $(\text{ZnPcS}_2)_2$

Massa	Abundância	Multiplicidade
1469.96	0.086535	1
1470.97	0.0701756	5
1471.96	0.1448695	15
1472.96	0.116563	27
1473.96	0.1680156	53
1474.96	0.1208471	79
1475.96	0.1122573	112
1476.96	0.0718576	138
1477.96	0.0531494	159
1478.96	0.029025	167
1479.964	0.0149591	158
1480.964	0.0063689	131
1481.964	0.0023984	92
1482.964	0.0007645	52
1483.964	0.0002035	29
1484.963	0.0000398	9
1485.964	0.0000054	3

3. ZnPcs_4

Massa	Abundância	Multiplicidade
891.87	0.261726	1
892.87	0.110901	5
893.87	0.225783	14
894.87	0.110717	25
895.87	0.163104	42
896.87	0.065936	54
897.87	0.040251	61
898.87	0.013188	60
899.86	0.004908	47
900.86	0.001263	34
901.86	0.000279	18
902.87	4.38E-05	6

4. LuPcS_2

Massa	Abundância	Multiplicidade
983.87	0.000323	1
984.87	0.000136	4
985.87	0.000631	6
986.87	0.000254	8
987.87	0.012766	8
988.87	0.107198	11
989.87	0.184127	19
990.87	0.222869	32
991.87	0.258475	52
992.87	0.119769	66
993.87	0.062323	77
994.87	0.02056	73
995.87	0.006759	60
996.87	0.001619	38
997.87	0.000298	18
998.87	3.76E-05	5
999.87	2.7E-06	1

5. $\text{Lu}(\text{PcS}_2)_2$

Massa	Abundância	Multiplicidade
1515.03	0.3572020	1
1516.03	0.2988491	6
1517.03	0.1953101	19
1518.03	0.0931117	30
1519.03	0.0371423	47
1520.03	0.0124592	47
1521.03	0.0033833	36
1522.04	0.0007428	20
1523.04	0.0001069	6
1516.24	0.0000113	2

6. LuPcS_4

Massa	Abundância	Multiplicidade
1005.73	0.5247405	1
1004.90	0.2361435	6
1005.90	0.1572733	17
1006.90	0.0540405	27
1007.90	0.0196279	33
1008.90	0.0051332	28
1009.90	0.0010117	16
1010.90	0.0001321	5
1011.90	0.0000092	1

7. $Dy(PcS_2)_2$

Massa	Abundância	Multiplicidade
1492.99	0.00022	1
1493.98	0.000176	3
1494.99	0.000479	6
1495.98	0.000349	11
1496.99	0.008775	10
1497.99	0.076267	15
1498.99	0.154091	23
1499.99	0.205516	39
1500.99	0.244371	61
1501.99	0.161919	91
1502.99	0.088349	110
1503.99	0.038104	115
1504.99	0.013994	103
1505.99	0.004341	78
1506.99	0.001096	44
1507.99	0.000226	23
1509.00	3.05E-05	6
1517.06	3.3E-06	2

8. *DyPcS₄*

Massa	Abundância	Multiplicidade
993.26	0.000323	1
985.88	0.000136	4
986.88	0.000631	6
987.88	0.000254	8
988.88	0.012766	8
989.88	0.107198	11
990.88	0.184127	19
991.88	0.222869	32
992.88	0.258475	52
993.89	0.119769	66
994.89	0.062323	77
995.88	0.02056	73
996.89	0.006759	60
997.88	0.001619	38
998.88	0.000298	18
999.89	3.76E-05	5
1000.89	2.7E-06	1

9. FePcS_4

Massa	Abundância	Multiplicidade
883.90	0.031352	1
884.90	0.013275	5
885.89	0.503556	10
886.89	0.223687	19
887.89	0.150027	31
888.89	0.051297	39
889.89	0.018794	41
890.89	0.004909	33
891.89	0.000981	19
892.89	0.00013	6
893.89	8.6E-06	1

10. H_2PcS_2

m/z	Abundance	Multiplicity
672.65	0.622909	1
672.06	0.234663	4
673.06	0.105715	8
674.06	0.028273	13
675.06	0.006483	13
676.06	0.001165	10
677.06	0.000162	4
678.06	1.82E-05	3