

2 Objetivos e técnicas utilizadas

2.1 Objetivos

Por ser um fenômeno seletivo, a fosforescência é muito atrativa do ponto de vista espectroanalítico. Esta seletividade pode ser em muito amplificada por meio de um cuidadoso ajuste de condições experimentais, e uso de recursos instrumentais disponíveis nos equipamentos mais modernos.

Sendo assim, dando continuidade à pesquisa desenvolvida no Mestrado, esse trabalho de Doutorado tem como um dos objetivos estudar a aplicação da técnica Fosforimetria em Temperatura Ambiente e Superfície Sólida (SSRTP) fazendo uso de ferramentas que possibilitem a determinação seletiva de derivados da β -carbolina (harmane, harmine, harmol, harmaline, harmalol e norharmane) sem a separação prévia dos mesmos. Devido à sua importância toxicológica e potenciais aplicações clínicas, foi desenvolvido um método analítico baseado em SSRTP para a determinação de harmane em urina e em formulações farmacêuticas simuladas. Este método foi validado usando a técnica de eletroforese eletrocinética capilar micelar (MEKC). Nesse caso, uma adaptação do método desenvolvido por Cheng⁶³ foi feita, trazendo vantagens do ponto de vista operacional na determinação das β -carbolinas por MEKC.

Conforme observado no item 1.1.1, muitos métodos cromatográficos (HPLC) com detecção por fluorescência e preparação complexa de amostras foram publicados para a quantificação de CPT e seus derivados em plasma, urina, bile e fezes.

CPT e seus derivados (CPT11 e TPT) têm uma intensa fluorescência natural⁷⁶, por isso a quantificação destas substâncias por métodos fluorimétricos é uma opção óbvia. Como as fluorescências destas três substâncias são espectralmente similares, uma separação prévia destes componentes, em geral usando cromatografia líquida, é necessária para permitir a detecção seletiva^{77,78,79}, por exemplo, quando desejamos garantir a pureza de formulações anticancerígenas. Sendo assim, neste trabalho, um método espectrofluorimétrico simples e seletivo foi desenvolvido para detectar e quantificar a presença da

camptotecina como um contaminante ou como uma opção usada no lugar de ingredientes ativos mais caros. O método proposto é uma alternativa para aqueles baseados em HPLC, permitindo uma detecção mais rápida e barata de CPT em formulações farmacêuticas contendo irinotecana e topotecana.

Vale ressaltar que vários trabalhos têm sido reportados usando a determinação destas substâncias por HPLC com detecção fluorimétrica e por eletroquímica, no entanto, o uso da fluorimetria tem grandes vantagens com relação ao custo, ao tempo de análise e à simplicidade do método.

Ainda utilizando a camptotecina e derivados, também foi desenvolvido um método por eletroforese eletrocínica capilar micelar (MEKC), no qual as três substâncias foram detectadas e quantificadas em saliva. A validação foi feita utilizando um método por HPLC, que por sua vez foi adaptado no LEEA de modo a simplificar as condições experimentais para a separação cromatográfica.

A crescente necessidade de uma medição exata para os químicos requer o conhecimento de todo o potencial dos métodos analíticos utilizados para a quantificação de espécies químicas. A fim de garantir que a verdadeira informação seja obtida a partir de uma medição química, a estimativa de sua incerteza é crucial para permitir que os resultados sejam reais. Um resultado medido não pode ser caracterizado por um valor único uma vez que todo o processo é dominado pelas fontes de incerteza que devem ser identificadas, quantificadas e, se possível, minimizadas⁸⁰. Na verdade, é do analista a tarefa de realizar esse cálculo e determinar se essa incerteza é tolerável para uma determinada situação. Normalmente, as medições químicas em si têm muitas fontes de incerteza associadas, por exemplo, imperfeições com os aparelhos de medida; imperfeições nos aparatos utilizados para a preparação de amostras; tendências associadas ao analista nos processos de amostragem, de preparação de amostras e das soluções padrão e de medição; utilização de valores inexatos para as constantes; aproximação de valores; etc.⁸⁰ A incerteza é caracterizada por um valor de variância de uma distribuição de probabilidade que é obtida a partir da análise estatística das observações experimentais ou por informações baseadas na experiência e no conhecimento geral dos processos e técnicas que estão sendo empregadas. Neste último caso, em vez de estatísticas em geral associadas a uma série de observações, a fonte de informação vem da experiência ou do conhecimento geral das propriedades e comportamentos, tanto do material testado quanto dos instrumentos. Além disso, as especificações dos materiais comprados, os dados fornecidos pela calibração

e de certificados e/ou incertezas atribuídas aos dados de referência contidos em manuais ou publicações são comumente utilizados.⁸¹

Os métodos analíticos baseados na fotoluminescência são propensos a várias fontes de variações que influenciam a magnitude da medida da luminescência. Por exemplo, as variações na intensidade da fonte de radiação irão afetar direta e proporcionalmente a luminescência do analito. Outros fatores relacionados com o procedimento analítico também serão fontes de variação de sinal. O objetivo desta parte do trabalho é identificar as principais fontes de incerteza e calcular a magnitude da sua contribuição sobre a incerteza associada à medição do sinal de luminescência usando duas diferentes técnicas analíticas: fluorimetria em solução e SSRTP. No caso, o criseno foi escolhido como analito modelo por causa de sua estabilidade em função do pH da solução de trabalho e por possuir propriedades fluorescentes e fosforescentes bem definidas. Os valores de incerteza, calculados para apenas uma massa ou concentração específica, e as fontes são comparadas e sugestões sobre como melhorar os resultados analíticos são feitas levando em consideração as características de cada uma destas técnicas analíticas.

2.2

Informações gerais sobre as técnicas utilizadas

2.2.1

Fluorimetria e Fosforimetria

O fenômeno luminescente é definido como a radiação emitida por espécies químicas (luminóforos) quando elas sofrem uma transição radiativa de um nível de energia excitado para outro nível de menor energia, o que é decorrente da interação entre a matéria com a radiação eletromagnética na região do visível e do ultravioleta (UV). A luminescência estimulada pela absorção de radiação é denominada fotoluminescência, a qual se divide em fluorescência e em fosforescência⁸².

Quando uma molécula absorve um fóton, ela é promovida para um estado de maior energia (estado excitado). Nessa transição eletrônica, elétrons de valência são promovidos para outro orbital, com um aumento concomitante na energia da molécula⁸³. A natureza dos orbitais envolvidos em uma transição eletrônica é um fator importante na determinação das características

luminescentes da molécula. As moléculas orgânicas que são fortemente luminescentes possuem vários elétrons π em sistemas deslocalizados, caso principalmente das moléculas aromáticas. Na ausência de heteroátomos na estrutura do luminóforo, as transições eletrônicas geralmente envolvem a promoção de um elétron de um orbital ligante π para um orbital antiligante π^* . Este processo é conhecido como transição $\pi - \pi^*$ e o estado eletrônico resultante é chamado de estado excitado $\pi\pi^*$. No caso da presença de heteroátomos (N, O ou S) no sistema conjugado de elétrons, um estado eletrônico pode resultar da promoção de um elétron de um orbital ligante n para um orbital antiligante π^* ; este estado eletrônico é chamado de estado excitado $n\pi^*$.^{83,84}

Se o elétron promovido mantém seu sentido relativo de spin original tem-se um estado excitado singlete. Por outro lado, se houver inversão do sentido do spin do elétron promovido, tem-se um estado excitado tripleto. A Figura 7 mostra um esquema eletrônico para o estado fundamental e para as duas configurações citadas para os estados excitados⁸⁴.

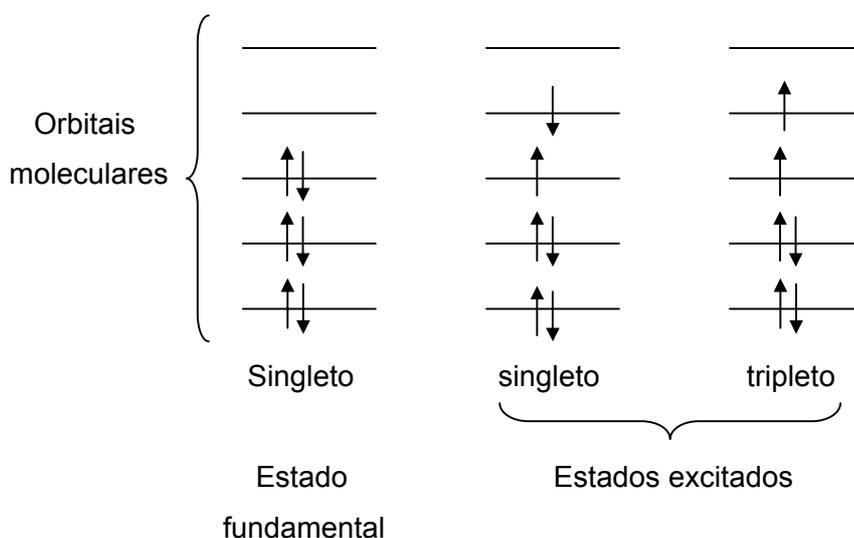


Figura 7: Diagrama esquemático de um arranjo de spins nos orbitais moleculares para os estados fundamental, e singlete e tripleto excitados

O estado fundamental é singlete e denominado S_0 . Já os estados excitados singlete e tripleto de menor energia são chamados de S_1 e T_1 , respectivamente, sendo que, normalmente, o estado T_1 possui menor energia que S_1 .^{82,84}

Em geral, simultaneamente a uma transição eletrônica, ocorrem também mudanças nos estados vibracionais e rotacionais da molécula. Assim, ao se

considerar que uma população de moléculas esteja envolvida no processo, bandas espectrais são relativamente largas ($\Delta\lambda$ na ordem de 100 nm), pois vários níveis rotacionais e vibracionais diferentes estão disponíveis em energias ligeiramente diferentes.^{82,83,84}

O diagrama de Jablonski (Figura 8) pode ser usado para compreender o que ocorre com uma população de moléculas após a absorção de energia radiativa e as consequências diretas desses processos. Considere que a população de moléculas seja promovida pela excitação com radiação de comprimento de onda característico, sendo então distribuída pelos níveis rotacionais e vibracionais de um estado eletrônico excitado singleto qualquer (S_n). O primeiro processo que se observa é o *relaxamento vibracional* (RV), que leva essa população para o nível vibracional mais baixo de S_1 . O RV ocorre na escala de tempo da ordem de 10^{-13} a 10^{-11} s. Essa transição, que não envolve emissão de radiação, pode também ocorrer pela transferência de energia vibracional para outras moléculas (solvente, por exemplo) através de colisões. O efeito final é a conversão de parte da energia do fóton absorvido em calor, que é disseminado por todo o meio.⁸⁴

A partir de S_1 podem acontecer vários eventos. A população pode transitar para níveis vibracionais de S_0 que possuem energia mais elevada, semelhante ao do nível vibracional de menor energia de S_1 . Esse processo é chamado de *conversão interna* (CI) e é um processo não-radiativo e ocorre em intervalos de tempo similares ao do relaxamento vibracional. Em seguida, a população pode relaxar de volta aos níveis vibracionais de energia mais baixa de S_0 por meio de RV dissipando energia na forma de calor.⁸⁴

Alternativamente, a população de molécula pode se transferir de S_1 para um nível vibracional excitado de T_1 por meio de um evento conhecido como *cruzamento intersistemas* (CIS), ou seja, um processo não-radiativo que envolve a troca de multiplicidade do estado excitado e que tem duração na ordem de 10^{-7} s (cerca de 75% dos elétrons excitados singletos migram para o estado tripleto, que é mais estável por possuir menor energia e conseqüentemente maiores comprimentos de onda). A população então segue por RV para o nível vibracional de menor energia de T_1 . A partir deste nível, a população pode sofrer um segundo cruzamento intersistemas (CIS) para S_0 , se desativando pelo RV de volta para S_0 .⁸⁴ Embora a transição de estados excitados de diferentes multiplicidades seja quântomecanicamente proibida, o CIS pode ocorrer em casos onde existe acoplamento spin-orbital. Este tipo de fenômeno, que consiste no acoplamento entre os campos magnéticos gerados pelo movimento do spin e

pelo movimento angular do orbital do elétron, promove a mistura quantomecânica de estados excitados.^{83,84}

A partir de S_1 ou de T_1 , a população de moléculas pode desativar para S_0 emitindo fótons. A transição radiativa entre estados de mesmo número quântico de spin, $S_1 \rightarrow S_0$, é chamada fluorescência; e a transição radiativa entre estados com números quânticos de spin diferentes, $T_1 \rightarrow S_0$, é chamada fosforescência. A fluorescência e a fosforescência podem terminar em qualquer um dos níveis vibracionais de S_0 . As taxas relativas de conversão interna, relaxamento vibracional, cruzamento intersistemas, fluorescência e fosforescência dependem da estrutura da molécula, do solvente, de presença de espécies químicas concomitantes e de condições como a temperatura e a pressão. Pode-se observar na Figura 8, que a energia da fosforescência é menor do que a energia da fluorescência, de forma que as bandas fosforescentes aparecem em comprimentos de onda maiores do que as bandas fluorescentes.⁸⁴

A fluorescência e principalmente a fosforescência não são fenômenos ordinariamente comuns, pois sofrem forte competição dos processos não-radiativos de desativação do estado excitado. Conseqüentemente, as condições do meio onde o luminóforo se encontra, devem ser bastante favoráveis para permitir a observação da luminescência. O tempo de vida (tempo necessário para que a emissão decaia a $1/e$ de seu valor inicial)⁸³ da fluorescência é relativamente mais curto (da ordem de 10^{-9} a 10^{-4} s), enquanto que o tempo de vida da fosforescência é mais longo (10^{-6} a 10^2), em consequência da complexidade do processo de troca de multiplicidade.^{83,84} Um resumo dos tempos característicos dos processos fotofísicos de moléculas excitadas encontra-se na Tabela 2.

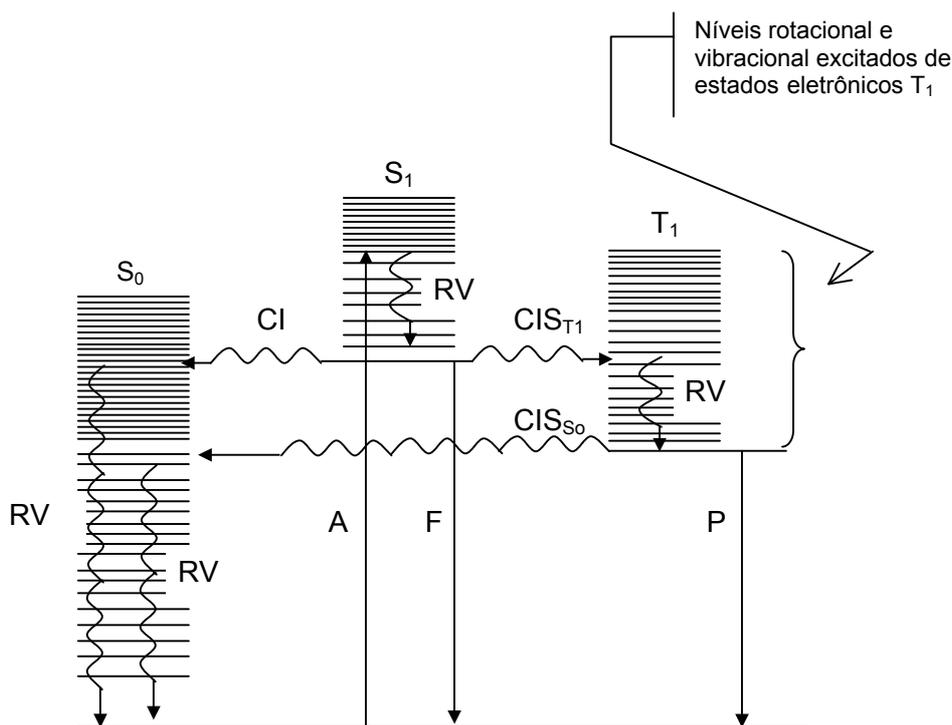


Figura 8: Diagrama de Jablonski modificado, mostrando os processos físicos que podem ocorrer após cada molécula absorver um fóton ultravioleta ou visível

Na figura acima, S_0 é o estado eletrônico fundamental, S_1 e T_1 são os estados excitados mais baixos singleto e tripleto, respectivamente. As setas retas representam os processos envolvendo fótons, e as setas onduladas são as transições não-radiativas. **A**, absorção; **F**, fluorescência; **P**, fosforescência; **CI**, conversão interna; **CIS**, cruzamento intersistemas; **RV**, relaxação vibracional. **F** e **P** são transições que podem terminar em qualquer um dos níveis vibracionais de S_0 e não apenas no nível de menor energia.

Tabela 2: Tempos característicos dos processos fotofísicos em moléculas excitadas

Processo	Tempo
Absorção	10^{-15} s
Relaxamento vibracional (RV)	$10^{-12} - 10^{-10}$ s
Tempo de vida do estado excitado S_1 (fluorescência)	$10^{-9} - 10^{-4}$ s
Cruzamento intersistema (CIS)	$10^{-10} - 10^{-7}$ s
Conversão interna (CI)	$10^{-11} - 10^{-9}$ s
Tempo de vida do estado excitado T_1 (fosforescência)	$10^{-6} - 10^2$ s

Pode-se verificar na Tabela 2 que a emissão de fluorescência ocorre em uma escala temporal de nanossegundos (10^{-9} segundos), enquanto que a emissão de fosforescência é muito mais lenta (de milissegundos a segundos). A explicação para isto é que, enquanto a fluorescência é uma transição permitida por multiplicidade de spins, a emissão de fosforescência é proibida. Isto pode ser generalizado e sempre se obtém que os processos mais rápidos são aqueles permitidos por multiplicidade de spins, mesmo que sejam não-radiativos.

2.2.1.1

Eficiência quântica da fluorescência e da fosforescência

A eficiência da luminescência (ϕ_L) de uma substância é uma característica intrínseca dos compostos e é dada pela razão entre o número de fótons emitidos por luminescência e o número de fótons absorvidos (Equação 1). Uma molécula será significativamente luminescente se sua eficiência quântica tiver magnitude considerável (entre 0,1 e 1).

$$\frac{I_L}{I_A} = \phi_L \quad (1)$$

Onde:

I_L – intensidades da radiação luminescente

I_A – intensidade da radiação absorvida.

A eficiência quântica fluorescente (ϕ_f) pode ser também indicada pela razão entre a constante de velocidade da fluorescência e o somatório das constantes de velocidade de todos os processos que desativam a população do estado excitado singleto (Equação 2):

$$\phi_f = \frac{k_f}{(k_f + k_{CIS} + k_m)} \quad (2)$$

A eficiência da fosforescência (ϕ_P) depende criticamente de certas condições experimentais (temperatura, solvente, rigidez da matriz do analito).⁸³ A Equação 3 descreve a eficiência quântica da fosforescência (ϕ_P) em termos de constantes de velocidades de todos os processos radiativos e não-radiativos de desativação de uma molécula excitada.^{82,83}

$$\phi_P = \left(\frac{k_P}{k_P + k_m} \right) \left(\frac{k_{CIS}}{k_{CIS} + k_f + k_{IC}} \right) \quad (3)$$

Onde:

k_P – Constante de velocidade da fosforescência

k_m – Constante de velocidade dos processos não-radiativos de desativação de T_1

k_{CIS} – Constante de velocidade do cruzamento intersistemas

k_f – Constante de velocidade da fluorescência

k_{IC} – Constante de velocidade dos processos não-radiativos de desativação de S_1

Através da Equação 2 podemos perceber que ϕ_P pode assumir valores entre zero e um. Assim, compostos com ϕ_P próximos da unidade certamente apresentarão alta probabilidade de desativação de T_1 através de emissão fosforescente⁸⁵.

Conforme já foi mencionado, moléculas no estado T_1 possuem grande probabilidade de se desativar para S_0 por processos não-radiativos, por causa da diferença dos tempos de vida dos processos. Por isso, para aumentar a chance de uma molécula fosforescer, se faz necessário minimizar esses processos não-radiativos de desativação de T_1 . Pela Equação 3 podemos ver que a eficiência da fosforescência será favorecida tanto pela redução do valor de k_m quanto pelo aumento de k_{CIS} .

2.2.1.2

Parâmetros que afetam a fluorescência e a fosforescência

Vários fatores, que podem ou não ser manipulados experimentalmente, afetam a fluorescência e a fosforescência. Entre estes, podemos destacar o tipo de estrutura molecular, a natureza do solvente, temperatura, sistema de solventes, o pH do meio onde o analito é dissolvido, a presença de íons de átomos pesados e a presença de modificadores de superfície tais como surfactantes e a presença de espécies desativadoras. A seguir faz-se uma descrição do efeito de cada um desses fatores.

2.2.1.2.1 Estrutura molecular

A estrutura molecular tem forte influência sobre a luminescência, mas é difícil prever de antemão se uma molécula exibirá luminescência sem o prévio conhecimento da diferença de energia relativa entre o estado excitado singlete e o fundamental, pois muitos destes fatores agem de forma complexa impossibilitando, muitas vezes, que generalizações sejam feitas. A estrutura molecular tem ação tanto direta como indireta sobre a emissão de fluorescência. Como exemplo de ação indireta, a inserção de longos substituintes alifáticos em moléculas cromofóricas, impede que a molécula excitada aproxime-se de outra e transfira-lhe energia via processo não radiativo, o que se deve ao efeito estérico. Além disso, moléculas relativamente rígidas e ricas em elétrons π (como no caso das moléculas aromáticas), contendo ou não heteroátomos em sua cadeia principal, são potencialmente fluorescentes. De forma geral, um aumento na extensão da conjugação desloca o espectro de absorção e de emissão para comprimentos de onda maiores (deslocamento batocrômico), além de aumentar o rendimento quântico de fluorescência.

A conjugação também tem sua extensão aumentada devido à presença de heteroátomos diretamente envolvidos com o sistema π conjugado. Em hidrocarbonetos aromáticos, as transições de menor energia são do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, que são caracterizadas por altos coeficientes de absorção molar e altos rendimentos quânticos relativos de fluorescência. Quando um heteroátomo está envolvido em um sistema π conjugado, a transição $n \rightarrow \pi^*$ em geral é a transição de menor energia. Essas transições caracterizam-se por possuir coeficientes de absorção molar que são aproximadamente 100 vezes menores do que aqueles das transições $\pi \rightarrow \pi^*$. O tempo de vida radiativo é 100 vezes mais longo do que o da transição $\pi \rightarrow \pi^*$, por volta de 10^{-6} s. Isto explica o baixo rendimento quântico de fluorescência de muitas moléculas onde a transição eletrônica $n \rightarrow \pi^*$ é a de menor energia. Isto acontece com a maioria dos compostos azo e com alguns compostos que possuem grupamentos carbonila ou nitrogênio heterocíclico (nitrogênios tipo piridina).

Estruturas moleculares rígidas (com restrições de liberdade vibracional) têm o processo de desativação não-radiativo por CI significativamente minimizado com conseqüente aumento da ϕ_f . Já uma estrutura molecular planar favorece a

fluorescência, pois aumenta a interação e a conjugação entre o sistema de elétrons π .

O efeito de substituintes sobre as características de fluorescência dos hidrocarbonetos aromáticos é complexo e as generalizações devem ser feitas com cuidado. Ambos, natureza e posição de um substituinte, podem afetar estas características. A presença de grupos substituintes na molécula também é fator importante, pois afeta a intensidade e o tipo de luminescência. No caso dos substituintes que doam elétrons para o sistema (OH, -OR, -NH₂, -NHR, -NR₂), geralmente estes induzem um aumento do coeficiente de absorção molar e um deslocamento nos espectros de absorção e fluorescência para regiões de menor energia, os espectros tendem a ficar mais largos e menos estruturados, porém a fluorescência é amplificada. Por outro lado, grupos cetônicos (-C=O) e carboxílicos (-COOH) fazem com que as substâncias tenham baixas energias associadas às transições $n \rightarrow \pi^*$ (transições preferenciais) e por isso exibem um baixo rendimento quântico de fluorescência - o decaimento desses elétrons é mais lento e acaba ocorrendo cruzamentos intersistema, trajetória dominante de decaimento nesses sistemas, alterando a multiplicidade da população excitada ($S_1 \rightarrow T_n$) e por consequência diminuindo a fluorescência.⁸⁵

Em geral, a presença de átomos pesados como substituintes de moléculas aromáticas (ex. Br, I) resulta em uma extinção da fluorescência devido ao aumento na probabilidade do cruzamento intersistema. Todavia, átomos pesados podem afetar menos algumas substâncias aromáticas se: (i) o rendimento quântico de fluorescência é alto de forma que o decaimento por fluorescência domine todos os outros tipos de decaimento; (ii) o rendimento quântico de fluorescência é muito baixo e, neste caso, o aumento na eficiência de cruzamentos intersistemas será relativamente baixo e (iii) não há estado tripleto energeticamente próximo ao estado singleto.⁸⁶

Em geral, a fluorescência de aromáticos contendo substituintes nitro (-NO₂) não é detectável, o que se deve, provavelmente, à existência de transições $n \rightarrow \pi^*$ que provocam um eficiente processo de cruzamento intersistema e também a grande velocidade dos processos de conversão interna $S_0 \rightarrow S_1$. É interessante mencionar que muitos nitroaromáticos são fotodegradáveis.

Quando o nitrogênio encontra-se ligado ao anel como ocorre com o carbazol e os indóis, as transições envolvendo os elétrons não ligantes têm propriedades similares as transições $\pi \rightarrow \pi^*$. De fato, os orbitais não ligantes são perpendiculares ao plano do anel o que lhes permite interagir com os orbitais π

dos carbonos adjacentes. O alto rendimento quântico relativo do carbazol e dos indóis pode ser explicado por este fenômeno. As propriedades de heterocíclicos relacionados contendo oxigênio e enxofre podem ser interpretadas do mesmo modo.

2.2.1.2.2 Temperatura

Em geral o aumento da temperatura tem como consequência um aumento na eficiência dos processos de relaxamento vibracional (CI) na desativação do estado excitado. No entanto, por ser um fenômeno de tempo de vida relativamente curto, esse fator é menos crítico no caso da fluorescência, o que permite fácil observação do fenômeno na temperatura ambiente. No caso da fosforescência, em solução e na temperatura ambiente, decaimentos não radiativos a partir do estado tripleto T_1 são predominantes em relação ao decaimento radiativo denominado fosforescência. Como este é um processo relativamente lento, as numerosas colisões com as moléculas de solvente favorecem o cruzamento intersistema e a relaxação vibracional até S_0 ⁸⁶.

Em baixas temperaturas e/ou em um meio rígido, a fosforescência pode ser observada. O tempo de vida do estado tripleto pode, nestas condições, ser longo o suficiente para se observar a fosforescência em uma escala de tempo superior a 1 segundo ou mais⁸⁶. A minimização das colisões moleculares entre o luminóforo e as moléculas do solvente e a restrição das vibrações moleculares foram primeiramente realizados pelo congelamento da amostra a 77 K. O uso de substratos sólidos ou de meio organizado em solução aquosa (micelas, por exemplo) vem permitindo a observação de fosforescência na temperatura ambiente (RTP)⁷³.

2.2.1.2.3 Sistema de solventes

A natureza do sistema de solventes também é fator relevante sendo que a sua viscosidade, polaridade e caráter prótico podem afetar significativamente a luminescência. A viscosidade pode diminuir a taxa de colisões bimoleculares desativadoras (quenching) pela diminuição da difusão de espécies desativadoras e do oxigênio (comentado no próximo item) no meio. Já a polaridade e o caráter prótico do solvente são importantes, pois afetam a energia do estado excitado.

Em solventes próticos, surgem ligações de hidrogênio que afetam as energias das ligações atômicas podendo ocorrer uma inversão nas energias associadas aos orbitais moleculares. Nesses solventes as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ têm menor energia sendo, por isso, preferenciais e os rendimentos quânticos de fluorescência são muito superiores em relação aos solventes derivados de hidrocarbonetos.

O efeito da composição do sistema de solventes no sinal luminescente medido em solução é diferente do efeito na luminescência em substrato de celulose. Em solução, de acordo com Jablonski⁸⁷, substâncias aromáticas, tais como a maioria dos luminóforos, são mais polares quando estão no estado excitado, devido às mudanças na distribuição de elétrons π da molécula que acontecem na transição. As interações entre as moléculas do(s) solvente(s) com as moléculas do soluto têm caráter fortemente eletrostático⁸⁵ e, como normalmente são as diferenças entre as energias de estabilização do estado fundamental e do estado excitado que definem que processos (radiativos ou não-radiativos) são dominantes na desativação do estado excitado, conclui-se que o favorecimento dos processos de desativação radiativa é consequência da estabilização do soluto com o estado excitado mais polar, na presença de solventes mais polares.⁸⁵

Então, a escolha do solvente para depositar o analito no substrato sólido é de muita importância para a obtenção de um bom sinal fosforescente. A solubilidade do analito é logicamente um aspecto fundamental que também deve ser considerado.⁸²

2.2.1.2.4 Influência do oxigênio e da umidade

No caso da fluorescência, a presença do oxigênio não é crítica, pois este é apenas desativador do estado excitado tripleto, o que se torna um fator importante no caso da fosforescência. Portanto, de modo geral, pode-se assumir que os processos proibidos por multiplicidades de spins são mais lentos e, portanto, as moléculas nestes estados eletrônicos excitados são mais susceptíveis de serem desativadas através de processos não radiativos como, por exemplo, colisões com impurezas como o oxigênio molecular. Isto explica, em parte, o fato de que a emissão do tipo fosforescência em moléculas orgânicas aromáticas só pode, em geral, ser observada em ausência de oxigênio molecular, ou em temperaturas baixas que diminuem a possibilidade de

desativação colisional por formação de complexos de contato com outros supressores. A eficiência muito alta da desativação por oxigênio molecular das moléculas orgânicas excitadas eletronicamente no estado tripleto se deve, também, ao fato de que o estado eletrônico fundamental do oxigênio molecular é um estado tripleto, e, portanto, a transferência de energia é permitida por multiplicidade de spins⁸⁶.

Além do oxigênio, a umidade atua por si só como um forte desativador do luminóforo no estado excitado, via colisão. Porém, pelo fato da umidade facilitar o transporte de oxigênio dentro da matriz sólida, o potencial desativador é grandemente amplificado.⁸⁸ Para se ter uma ideia, um aumento de 8,5 para 40% de umidade relativa causa entre 40 a 90% de redução na intensidade fosforescente.⁸³

2.2.1.2.5 Efeito do pH

O efeito do pH nos sistemas de solventes práticos é relevante na fluorescência em moléculas aromáticas contendo grupos funcionais básicos ou ácidos, sendo muito comum observar significativa diferença entre as propriedades luminescentes de moléculas protonadas e não-protonadas.

Um dos aspectos mais relevantes das reações ácido-base de moléculas potencialmente luminescentes é a produção de derivados com maior ϕ_P devido a protonação ou hidrólise ácida ou básica. Além disso, espécies com cargas têm maior probabilidade de mostrar sinais mais intensos, o que se deve ao fato de que espécies ionizadas têm maior rigidez molecular depois de adsorvidas no papel, produzindo uma ótima condição para RTP.⁸⁹ Assim, o efeito do pH na intensidade fosforescente é largamente dependente da molécula analisada, sendo a escolha do pH muito importante para melhorar a sensibilidade da SSRTP.

2.2.1.2.6 Efeito do átomo pesado

Em fluorescência, certos cátions e ânions de elementos de elevada massa atômica causam a desativação do estado excitado singleto, seja pela mudança da multiplicidade do mesmo ($S_1 \rightarrow T_n$) ou pelo aumento da velocidade dos processos de desativação não-radiativos. Por exemplo, no caso dos halogenetos, esse efeito é mais comum para o iodeto, seguido do brometo e em

muito menor intensidade para o cloreto e fluoreto. Esse maior efeito desativador do estado excitado singleto causado por íons mais pesados se deve ao melhor acoplamento spin-orbital obtido entre esses íons e moléculas no estado excitado. Esse efeito, denominado de efeito externo do átomo pesado, é também observado para outros íons tais como Cd^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} e Tl^+ . Outras substâncias podem desativar o estado excitado singleto por meio do *quenching* dinâmico. *Quenching* pode ser definido como transferência de energia, por processo não-radiativo, da substância de interesse no estado excitado (fluoróforo) para outras moléculas, que serão denominadas aqui como agentes desativadores (Q), que por sua vez passam para o estado excitado enquanto o fluoróforo retorna para o estado fundamental. O quenching dinâmico é um processo colisional e por isso requer o contato entre as espécies envolvidas. Em consequência, a magnitude dessa desativação é proporcional à concentração do agente desativador e da sua capacidade de difusão no meio.⁸⁵

Vale ressaltar que o substrato sólido é compatível com o uso de diferentes sais de átomos pesados, quando comparado com a outra maneira de se obter RTP: o meio micelar. O uso do meio micelar, na prática, tolera o uso de apenas dois (I^- e de Tl^+) dos seis íons de átomos pesados tradicionalmente aplicados em fosforimetria. Esses fatos aumentam a versatilidade e a seletividade da aplicação analítica desse fenômeno com substrato sólido.^{73,85,90}

Em resumo, a presença de átomos pesados no substrato sólido pode diminuir a intensidade fluorescente e o tempo de vida da fosforescência, aumentando conseqüentemente a intensidade fosforescente.⁹¹ No entanto é difícil prever qual íon de átomo pesado irá favorecer a fosforescência de um determinado analito. Por isso, é necessário um estudo sistemático para verificar o efeito dos seis íons de átomos pesados tradicionalmente mais empregados (I^- , Tl^+ , Ag^+ , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+}).

2.2.1.3 **Técnicas para aumento de seletividade**

Com o intuito de facilitar o entendimento dos resultados nos Capítulos 4 e 5, será feita abaixo uma breve discussão sobre as ferramentas instrumentais empregadas para o aumento da seletividade das β -carbolinas e da camptotecina e derivados.

2.2.1.3.1 Varredura sincronizada

A técnica da varredura sincronizada foi desenvolvida para melhorar a seletividade da espectrometria de luminescência. Na espectrometria luminescente convencional, o espectro de emissão pode ser produzido varrendo faixas de comprimentos de onda de emissão (λ_{em}), enquanto um composto luminescente é excitado em um comprimento de onda de excitação (λ_{ex}) fixo. Por outro lado, um espectro de excitação pode ser obtido varrendo uma faixa de λ_{ex} e fixando um λ_{em} . Uma terceira possibilidade, denominada de varredura sincronizada, consiste em variar, simultaneamente (ou sincronizadamente), ambos os monocromadores de excitação e emissão, mantendo uma diferença constante de comprimento de onda ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$), coincidente com a diferença entre os máximos de excitação e de emissão do analito de interesse.⁹² Esse processo tem o efeito de minimizar o sinal de quaisquer substâncias concomitantes que não possuam o mesmo $\Delta\lambda$ do analito.

A metodologia explora a especificidade das diferenças de energia entre as bandas de emissão e as bandas de absorção.⁹³

A equação que expressa o sinal luminescente sincronizado (I_S) é dado pela Equação 4:⁹³

$$I_S(\lambda_{em}, \lambda_{ex}) = k.c.E_{ex}(\lambda_{ex}).E_{em}(\lambda_{em}) \quad (4)$$

Onde:

k = fator experimental

c = concentração do analito

I_{SP} = sinal fosforescente sincronizado

E_{ex} = espectro de excitação

E_{em} = espectro de emissão

λ_{em} = comprimento de onda de emissão

λ_{ex} = comprimento de onda de excitação

Se considerarmos $\lambda_{ex} = \lambda_{em} - \Delta\lambda$, a Equação 4 pode ser expressa da seguinte forma:

$$I_S(\lambda_{em}) = k.c.E_{ex}(\lambda_{em} - \Delta\lambda).E_{em}(\lambda_{em}) \quad (5)$$

Assim, podemos perceber através da Equação 5, que o sinal sincronizado depende diretamente da sobreposição das bandas do $E_{ex}(\lambda_{em} - \Delta\lambda)$ e $E_{em}(\lambda_{em})$ ⁹³.

Vo-Dinh⁹² mostrou a aplicabilidade deste método através da análise de uma mistura de naftaleno, fenantreno, antraceno, perileno e tetraceno, obtendo um espectro com vários picos muito bem resolvidos, no qual cada banda corresponde, inequivocamente, a um componente da mistura. A simplificação da banda do sinal sincronizado obtido minimizou as interferências causadas por sobreposição espectral, facilitando a identificação dos diversos componentes da mistura complexa, sem a necessidade de uma separação prévia.

2.2.1.3.2 Fosforescência derivada superior (d^n)

A técnica da 2ª derivada ou de derivada de ordem superior pode ser usada para aumentar a seletividade das análises de RTP e de fluorimetria, de modo a separar espacialmente os sinais luminescentes de analitos cujas bandas não são coincidentes, mas se sobrepõem significativamente. Por exemplo, no modo d^2 , é produzido um sinal proporcional à 2ª derivada relativa ao comprimento de onda. Em geral, sinais d^2 podem ser obtidos por diferentes métodos, incluindo diferenciação eletrônica.⁸³

Espectrofluorímetros modernos podem transformar diretamente o sinal para sua segunda derivada usando um diferenciador eletrônico. A derivada de

um sinal I relacionado a um comprimento de onda pode ser escrita da seguinte forma:

$$\frac{dI}{d\lambda} = \left(\frac{dI}{dt}\right) \cdot \left(\frac{dt}{d\lambda}\right) \quad (6)$$

Considerando a velocidade de varredura do comprimento de onda como $r = d\lambda/dt$, teremos:

$$\frac{dI}{d\lambda} = (1/r) \cdot \left(\frac{dI}{dt}\right) \quad (7)$$

Logo, se o monocromador é varrido em uma velocidade constante, o sinal obtido pela derivação do tempo é proporcional ao espectro derivativo relativo ao comprimento de onda.⁸³

Uma vez medida a velocidade de mudança da curvatura do pico no modo d^2 , não somente a intensidade do sinal é amplificada, mas também a largura das bandas é reduzida e os pequenos detalhes espectrais são amplificados pela transformação das bandas em pulsos diferenciais. Nesse caso, o pico de emissão máxima da banda original passa a ser correspondente ao ponto que cruza o eixo da ordenada da varredura. Este efeito traz vantagens do ponto de vista da resolução dos espectros, amplificando a capacidade seletiva da espectrometria de luminescência.⁸³

2.2.2 Eletroforese capilar

O fenômeno denominado eletroforese é definido como sendo a migração de espécies carregadas eletricamente, que ocorre quando as mesmas são dissolvidas ou suspensas em um eletrólito, através do qual uma corrente elétrica é aplicada.⁹⁴

A eletroforese capilar (CE) é uma técnica relativamente nova, que foi idealizada primeiramente por Hjertén em 1967. Os primeiros trabalhos publicados datam da década de 70, entretanto a primeira metodologia desenvolvida com sucesso foi publicada por Everaerts e seus colaboradores em 1979, seguida de Jorgenson e Lukacs em 1981. A partir de então, vem sendo utilizada por um número cada vez maior de pesquisadores na área da química, bioquímica, ciência forense, laboratórios clínicos, indústrias farmacêuticas, por

exemplo, confirmando a importância e a aceitação desta potente ferramenta de separação.⁹⁵

Geralmente o funcionamento de um equipamento de eletroforese capilar (CE) envolve a aplicação de um potencial elevado, tipicamente 5 a 30 kV, em um capilar de diâmetro reduzido gerando correntes na faixa de 10 a 100 mA. O uso do capilar apresenta várias vantagens, particularmente com respeito ao aquecimento Joule.⁹⁶ A alta resistência elétrica do capilar permite a aplicação de campos elétricos elevados, pois gera um aquecimento mínimo. Além disso, o formato do capilar propicia uma dissipação eficiente do calor gerado. O uso de campos elétricos elevados resulta em tempos de análise curtos, alta eficiência e resolução.⁹⁶

Na eletroforese capilar, o capilar é preenchido com uma solução tampão e suas extremidades são mergulhadas em recipientes, que contêm a solução tampão, e onde é aplicado um campo elétrico, que gera uma corrente no interior do capilar. Os eletrodos são feitos de um material inerte, tal como a platina, e são também mergulhados na solução para fechar o circuito. O capilar passa através de um detector, usualmente um detector espectrofotométrico de absorção no UV/Vis (vide esquema simplificado na Figura 9). Para minimizar os efeitos térmicos, o capilar é mantido à temperatura constante (o sistema deve, portanto ser termostatizado) para esse propósito.

Na CE, uma pequena quantidade de amostra é introduzida em uma das extremidades do capilar. A aplicação do campo elétrico provoca o movimento dos analitos em direção aos eletrodos. As separações nesta técnica são baseadas na presença de um fluxo eletricamente induzido, denominado fluxo eletro-osmótico (EOF), um fenômeno eletroforético que gera um fluxo da solução dentro do capilar, que faz com que os solutos se movimentem em direção ao detector.⁹⁶

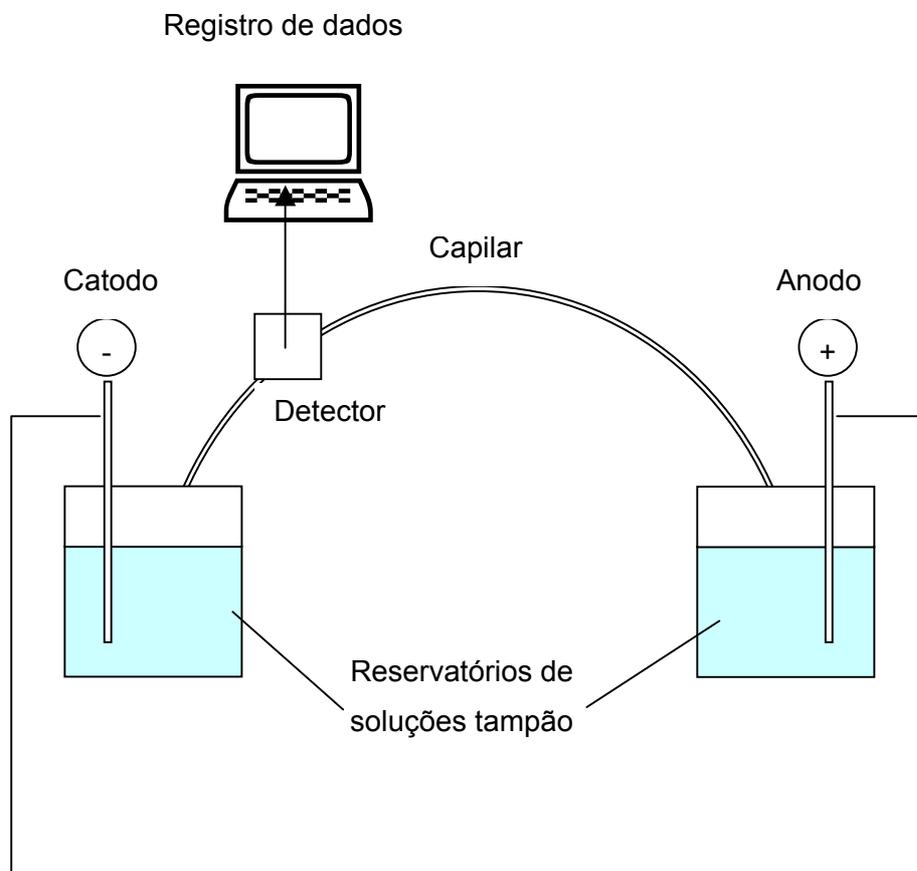


Figura 9: Representação esquemática do arranjo dos principais componentes de um instrumento típico de Eletroforese Capilar.

Como em HPLC, a detecção espectrofotométrica de absorção na região do UV-vis é a mais utilizada em CE. Com capilares de sílica fundida, transparência é alcançada entre 190 e 900 nm. A alta eficiência observada em CE é decorrente, em parte, da detecção direta no capilar, onde a janela óptica é feita diretamente no capilar. Desse modo, a detecção ocorre em um momento onde a separação de espécies ainda está ocorrendo, ao contrário da cromatografia líquida, onde o processo de separação termina quando as espécies deixam a coluna cromatográfica. Como todos os detectores ópticos, a largura da região de detecção deve ser relativamente pequena em relação à zona da amostra para manter a alta resolução. Isto é compatível com as dimensões do capilar. Os picos em CE normalmente são de 2 a 5 mm de largura, e o tamanho da região de detecção deve ser no máximo um terço desse valor. O alinhamento do detector é crítico devido ao curto caminho óptico. O feixe óptico deve ser firmemente focado no capilar para obter máximo sinal e minimizar a luz dispersa que alcança o detector. Estes aspectos são importantes tanto para a sensibilidade quanto para a faixa linear de detecção.¹⁰⁰

No caso da sensibilidade, a dimensão do capilar impõe um fator limitante na lei de Beer-Lambert ($A = \epsilon bc$, onde “A” é absorvância, “ ϵ ” é a absorvidade molar da espécie absorvente, “b” é comprimento do caminho óptico que a luz percorre na amostra e “c” é a concentração de analito). No caso da CE, o parâmetro “b” é um valor muito pequeno, impondo limites à detectabilidade. Adicionalmente, o pH, a composição do eletrólito de corrida e o grau de ionização do analito são também fatores importantes, pois podem ocasionar mudanças nos valores da absorvidade molar e deslocamento no comprimento de onda máximo. Valores típicos para limites de detecção com CE com detecção fotométrica na região do UV-Vis ficam na faixa de $10^{-5} - 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

A detecção também pode ser feita de duas formas: em linha e 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. Na 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. Este é o caso da espectrometria de massas onde o soluto é carregado ao espectrômetro de massas através de uma agulha.⁹⁷

O gráfico do tempo em função de resposta do detector é denominado eletroferograma.

Os capilares mais comumente usados são de sílica fundida recoberta externamente com uma camada de proteção de poliimida, que produz uma melhora na resistência mecânica do material, uma vez que é extremamente frágil e se quebra com facilidade. Uma pequena porção deste recobrimento é removida a fim de formar uma janela para a detecção. A janela é então alinhada ao centro óptico do detector.⁹⁶ Os capilares têm, tipicamente, de 25 a 100 cm de comprimento com 15 a 100 μm de diâmetro interno. Existem duas classificações para o tamanho do capilar: o comprimento efetivo, que vai do ponto de introdução da amostra ao de detecção; e o comprimento total, que vai do ponto de introdução da amostra até o extremo final da coluna capilar. O conhecimento de ambos é importante já que o tempo de migração e a mobilidade são definidos pelo tamanho efetivo, enquanto que o campo elétrico é dado pelo comprimento total.

A parede do capilar de sílica contém grupos silanóis (SiOH), os quais se ionizam ($\text{SiO}^- + \text{H}^+$) quando em contato com soluções tampão com valores de pH elevados. Esta ionização produz uma superfície carregada negativamente. Uma camada de contra-íons (cátions) é então formada próxima à parede do capilar a fim de manter a eletroneutralidade. Obtém-se então uma dupla camada, ou seja, uma região mais compacta (camada de Stern) formada por íons firmemente ligados à superfície do capilar e que são atraídos por forças eletrostáticas e/ou de coesão, e outra região que contém íons que se difundem para o seio da solução afastando-se da superfície e formando a uma dupla camada elétrica difusa, criando, portanto, uma diferença de potencial muito próxima à parede.⁹⁸ A este fenômeno dá-se o nome de potencial zeta (Figura 10).

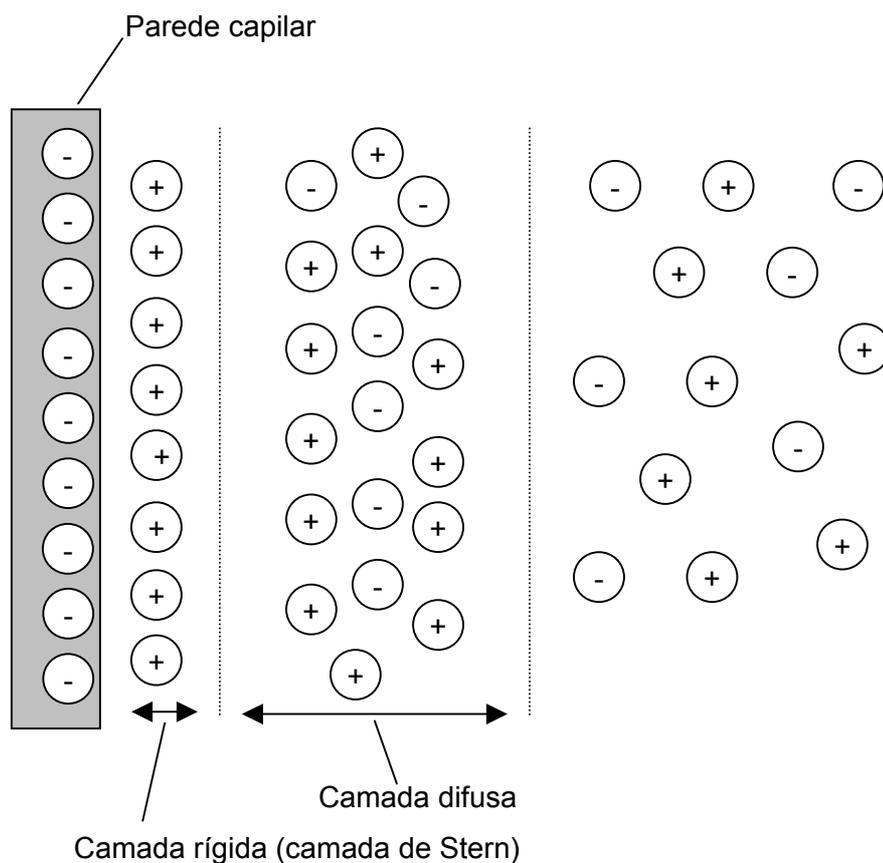


Figura 10: Modelo da distribuição de uma dupla camada de carga em um capilar carregado negativamente, o qual gera potencial zeta.

O potencial zeta é essencialmente determinado pela carga da superfície na parede do capilar (a carga é dependente do pH). Quando uma diferença de potencial (ddp) é aplicada, os íons solvatados com água migram em direção ao cátodo. Este movimento de íons resulta no movimento das espécies em direção ao detector e pode ser considerado como um fluxo eletricamente dirigido. O nível desse fluxo eletro-osmótico (EOF) é altamente dependente do pH do eletrólito, uma vez que o potencial zeta é governado pela ionização dos grupos silanóis (ácidos) da parede do capilar. Abaixo de pH 4, a ionização dos grupos silanóis é pequena e o EOF não é significativo, enquanto que acima de pH 9 os silanóis ficam completamente ionizados e, portanto, o EOF é alto. A magnitude do fluxo eletro-osmótico pode ser expressa em termos de velocidade ou mobilidade segundo as equações 8 e 9:

$$V_{\text{EOF}} = (\varepsilon/4\pi\eta)E\xi$$

(8)

$$\mu_{\text{EOF}} = \varepsilon \xi / 4\pi\eta \quad (9)$$

Onde: V_{EOF} = velocidade do EOF; ε = constante dielétrica; ξ = potencial zeta; η = viscosidade; E = potencial aplicado; μ_{EOF} = mobilidade do EOF.

O potencial zeta é também dependente da força iônica da solução tampão. Um aumento da força iônica resulta na compressão da dupla camada e conseqüentemente uma redução do EOF.

Quando um íon com carga q (em coulombs) é colocado em um campo elétrico E (V/m), a força sobre o íon é qE (em newtons). Em solução, a *força de atrito* é fu_{ef} , onde u_{ef} é a *velocidade do íon* e f é o *coeficiente de atrito*. O índice $_{\text{ef}}$ refere-se à eletroforese. O íon alcança quase que instantaneamente uma velocidade constante quando a força de aceleração se iguala à força de atrito⁸⁴:

$$\begin{array}{c}
 + \\
 + \\
 +
 \end{array}
 \left| \begin{array}{c}
 fu_{\text{ef}} \quad qE \\
 \leftarrow \oplus \rightarrow \\
 \text{Íon}
 \end{array} \right|
 \begin{array}{c}
 - \\
 - \\
 -
 \end{array}
 \quad
 \begin{array}{c}
 qE \\
 \text{Força} \\
 \text{de aceleração}
 \end{array}
 =
 \begin{array}{c}
 fu_{\text{ef}} \\
 \text{Força} \\
 \text{de atrito}
 \end{array}$$

$$\text{Mobilidade eletroforética} = u_{\text{ef}} = (q/f) E \equiv \mu_{\text{ef}} E \quad (10)$$

Mobilidade eletroforética

A *mobilidade eletroforética* (Equação 10) é a constante de proporcionalidade entre a velocidade do íon e a força do campo elétrico. A mobilidade é proporcional à carga do íon e inversamente proporcional ao coeficiente de atrito. Para moléculas de tamanho semelhante, a magnitude da mobilidade aumenta com a carga.

Eletroforese capilar, na verdade, não é uma única técnica isolada, ela deve ser encarada como uma família de técnicas fundamentadas no mesmo princípio de migração sob ação de um campo elétrico, mas com mecanismos de separação diferentes.⁹⁵

Na Eletroforese Capilar em Solução Livre (ECSL), a separação está baseada nas diferenças nas mobilidades eletroforéticas resultantes das

diferentes velocidades de migrações de espécies iônicas no tampão, contido dentro do capilar. Na ECSL espécies neutras não são separadas, porém é possível a separação de cátions e ânions na mesma corrida.

De acordo com as recomendações da IUPAC, a cromatografia eletrocínética (EKC) é uma técnica baseada na combinação de eletroforese e interações dos analitos com certos aditivos (surfactantes, por exemplo), os quais formam uma fase dispersa que se move em uma velocidade diferente dos analitos. Para que haja a separação, tanto os analitos quanto a fase secundária devem estar carregados. EKC Micelar (MEKC) é um caso especial de EKC, no qual a fase secundária é uma fase micelar dispersa no interior do capilar.⁹⁹

A Cromatografia eletrocínética micelar (MEKC) foi inicialmente desenvolvida para a resolução de compostos neutros, os quais não podem ser separados usando simplesmente a ECSL. Esta técnica separa as moléculas neutras e os íons. Na ausência de micelas, todas as moléculas neutras devem alcançar o detector no tempo t_0 . As micelas injetadas com a amostra alcançam o detector no tempo t_{mc} , que é maior do que o t_0 porque elas migram contra a corrente. Se uma molécula está em equilíbrio entre a solução pura e o interior das micelas, seu tempo de migração aumenta, porque ela migra na taxa mais lenta da micela em parte do tempo. Neste caso, as moléculas neutras alcançam o detector num tempo entre t_0 e t_{mc} . Quanto mais tempo a molécula leva no interior da micela, maior será o seu tempo de migração. Os tempos de migração dos cátions e ânions também são afetados pelas micelas, porque os íons se distribuem entre a solução e as micelas e interagem eletrostaticamente com as micelas.⁸⁴

A MEKC é uma forma de cromatografia porque as micelas se comportam como uma fase pseudo-estacionária. A separação de moléculas neutras está baseada na distribuição entre a solução e a fase “estacionária”. Neste tipo de técnica podemos usar surfactantes aniônicos, catiônicos e neutros para modificar os coeficientes de partição dos constituintes em análise. Adiciona-se solventes como a acetonitrila e a N-metil-formamida para aumentar a solubilidade de substâncias orgânicas e modificar o coeficiente de partição entre a solução e as micelas. O uso de ciclodextrinas, com uma cavidade opticamente ativa dentro das quais podem se encaixar pequenas moléculas, também é uma opção para separar os isômeros ópticos (enantiômeros) que dependem diferentes quantidades de tempo associadas com as ciclodextrinas.⁸⁴ Maiores detalhes sobre MEKC serão discutidos no item 2.2.2.3.

Na eletroforese capilar a análise qualitativa é feita através da comparação dos tempos de migração dos padrões com os tempos de migração das substâncias presentes na amostra e/ou através de espectros na região do UV/Vis ou do espectro de massas. A quantificação das substâncias, com concentrações desconhecidas presentes na amostra é feita através do procedimento usual de Curvas analíticas.

2.2.2.1

Modos de introdução da amostra

Em eletroforese, pequenos volumes de amostra são introduzidos no capilar para manter a alta eficiência na separação. O comprimento do volume de amostra dentro do capilar é um parâmetro crítico em relação ao volume introduzido. Como regra geral, esse comprimento deve ser inferior a 1 ou 2% do comprimento total do capilar, o que corresponde a alguns milímetros de amostra injetada ou entre 1 e 50 nL de volume de amostra, dependendo do comprimento e do diâmetro interno do capilar. Isso se torna uma vantagem quando se dispõe de pequenos volumes de amostra cuja diluição não é possível.¹⁰⁰ Sobrecarga de amostra dentro do capilar pode ter efeitos prejudiciais para a resolução. Injeção de grandes quantidades de amostra causa difusão descontrolada da zona de amostra, ampliando a largura dos picos e causando também a heterogeneidade do campo elétrico ao longo do capilar, além de distorcer o formato dos picos devido à diferença de condutividade entre o tampão de corrida (eletrólito de corrida) e a zona de amostra.

O modo de introdução da amostra no capilar tem implicação direta na análise quantitativa. A reprodutibilidade da área ou altura do pico reflete a precisão da técnica de injeção. As amostras podem ser introduzidas no capilar por métodos hidrodinâmicos ou eletrocinéticos. Na injeção eletrocinética, um gradiente de potencial é estabelecido ao longo do compartimento do capilar por um período de tempo conhecido, enquanto que na injeção hidrodinâmica utiliza-se um gradiente de pressão. Este gradiente de pressão pode ser estabelecido por diferentes mecanismos: pressurização ou vácuo em um dos reservatórios de solução, ou por gravidade, onde um dos reservatórios é elevado em relação ao outro e a amostra é introduzida por sifonação.⁹⁸

A injeção hidrodinâmica (usada nesse trabalho) introduz no capilar uma alíquota representativa da composição do soluto na amostra. O volume de injeção (da ordem de nL) depende do tempo de injeção, dimensões do capilar,

viscosidade da solução tampão (eletrólito de corrida) e da diferença de pressão estabelecida. A injeção hidrodinâmica é usualmente mais precisa que a eletrocinética porque é baseada estritamente na transferência de volume. Entretanto, pode ocorrer um alargamento significativo da zona, como resultado do perfil de velocidade parabólico, característico do fluxo induzido por pressão. Injeções hidrodinâmicas são preferidas em aplicações de eletroforese de zona em solução livre e micelar, particularmente quando a concentração da amostra está dentro dos limites de sensibilidade do detector.

2.2.2.2 Concentração da amostra no capilar

Uma das principais desvantagens da eletroforese capilar é em relação a sua baixa sensibilidade, resultante das pequenas dimensões da coluna de separação (capilar) e de amostra. Existem duas formas de se obter melhores sensibilidades: uma é melhorar o sistema de detecção com o uso de técnicas de alta sensibilidade através da instalação de cela de detecção em formato-Z ou do uso de capilares com caminho óptico estendido; a outra forma de aumentar a sensibilidade é através do uso de processos de pré-concentração no capilar denominada “empilhamento”.

Empilhamento (*stacking*) é o nome dado ao método que realiza a concentração da amostra dentro do capilar durante ou imediatamente após a injeção da amostra. Esse método é baseado na diferença da intensidade do campo elétrico entre a zona de amostra e o tampão de corrida. O fenômeno de empilhamento de amostras em eletroforese capilar foi provavelmente sugerido pela primeira vez por Tiselius e colaboradores em 1965 com o uso da eletroforese em gel de poli(acrilamida)^{101, 102}.

Na literatura diferentes técnicas para realizar o “empilhamento” têm sido discutidas. Geralmente estas técnicas podem ser divididas em dois grupos, de acordo com o movimento da zona de amostra no tampão de corrida: (i) empilhamento por fronteira móvel, onde toda a zona de amostra migra com mesma velocidade e (ii) empilhamento por fronteira estacionária, onde a fronteira entre uma amostra preparada em tampão de baixa concentração (baixa condutividade) e o tampão de corrida de maior concentração (alta condutividade) permanece estável durante o processo de eletroforese.

O Empilhamento da Amostra Amplificada por Campo (FASS-Field Amplified Sample Stacking) é um exemplo do segundo tipo de empilhamento que

pode ser aplicado em eletroforese capilar (CE). Esta abordagem foi introduzida por Chien and Burgi em 1991^{103,104}, após Mikkers *et al.*¹⁰⁵ terem estabelecido seus princípios teóricos em 1979. Esta técnica permite injetar no capilar grande volume de amostra quando comparada com o modo convencional de CE.¹⁰³ No modo FASS um grande plug de amostra contendo íons preparados em solução de baixa condutividade é injetado hidrodinamicamente para dentro do capilar cheio com tampão de corrida de alta condutividade. A diferença de potencial é então aplicada para que ocorra a eletroforese. Devido à diferença de condutividade entre os meios (tampão corrida e amostra) dentro do capilar, a força do campo elétrico será maior na região da amostra do que no resto do capilar. Os íons inseridos na região de baixa condutividade irão sofrer uma intensa força de campo elétrico e irão mover-se com maior velocidade do que os íons inseridos na região de alta condutividade (Figura 11a). Quando os íons atingem a região de baixo campo elétrico (região do tampão de corrida) sua velocidade diminui, ocorrendo assim o empilhamento dos íons no tampão de corrida (Figura 11b). O modo de concentração no capilar descrito acima é também denominado modo de empilhamento normal (NSM) sendo o mais simples dos métodos de empilhamento por campo amplificado. Uma limitação desse modo está no tamanho do *plug* de amostra que pode ser injetado no capilar sem perder a eficiência ou resolução da separação. A concentração do limite de detecção com o uso do modo NSM pode ser reduzida em pelo menos uma ordem de grandeza.¹⁰¹ A Figura 11 mostra um esquema geral de empilhamento de amostra aniônica.

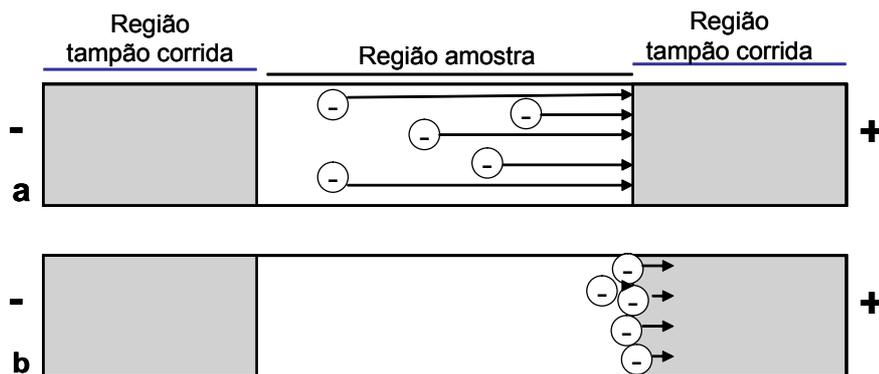


Figura 11: Esquema geral do modo de empilhamento de uma amostra aniônica.

Para que o limite de detecção alcance valores de concentração menores é necessário à aplicação de outros modos de empilhamento, como por exemplo, o modo de empilhamento onde se aplica inversão da polaridade do eletrodo (REPSM – Reverse electrode polarity stacking mode). Pelo modo REPSM fatores de concentração maiores que 100 são obtidos.¹⁰¹ No modo REPSM, um grande *plug* de amostra é injetado no capilar a fim de manter a eficiência da separação e minimizar a dispersão da zona de amostra. A matriz de baixa condutividade deve ser retirada de dentro do capilar logo após o processo de empilhamento através da aplicação de um potencial de polaridade inversa ao potencial de separação. A remoção da matriz é necessária para que a força do campo elétrico e a V_{EOF} sejam uniformes durante o processo de eletroforese. O processo de remoção da matriz do capilar envolve, então, as seguintes etapas: (i) preenchimento do capilar com o eletrólito de corrida e injeção hidrodinâmica dos analitos dissolvidos em matriz de baixa condutividade; (ii) injeção da amostra seguida da inversão da polaridade dos eletrodos (como a parede de sílica está carregada negativamente, íons da amostra carregados negativamente irão parar (empilhamento) na parte de trás da zona do tampão (eletrólito de corrida) e irão migrar em direção ao lado da injeção (eletrodo negativo) sob orientação do campo elétrico invertido); (iii) a polaridade dos eletrodos é retomada quando a matriz do tampão é quase que completamente retirada do capilar, a qual pode ser monitorada pelo valor da corrente elétrica, e a matriz é retirada nesse processo pelo EOF; (iv) separação e detecção dos analitos negativos que foram concentrados.

Os fenômenos descritos acima são válidos para os analitos que possuem cargas, pois os analitos neutros não possuem mobilidade eletroforética. Para resolver este problema, o empilhamento tem que ser realizado com a presença

de micelas aniônicas, que interagem com as moléculas neutras que podem assim sofrer o processo de concentração no capilar.¹⁰³

Em um capilar de sílica fundida o EOF migra em direção ao catodo (pólo negativo) e as micelas migram para o anodo (pólo positivo), geralmente, um forte EOF carrega as micelas carregadas negativamente em direção ao catodo (em pH maior que 5). Como a v_{EOF} dominante da solução tampão é oposta à mobilidade das micelas, promove-se uma situação ideal para o empilhamento de moléculas neutras. Na literatura podemos encontrar muitos trabalhos que fazem aplicações de empilhamento com o uso de micelas para pré-concentrar analitos neutros a fim de se obter valores cada vez melhores de sensibilidade para aplicação de metodologias analíticas baseadas na técnica eletroforese capilar para uma série de novos analitos^{103,106,107}.

Neste trabalho foi utilizado MEKC como modo de separação das moléculas neutras da camptotecina e seus derivados (irinotecana e topotecana), e NSM (método de empilhamento normal) em conjunto com a pré-concentração *on line*.

2.2.2.3 Cromatografia eletrocínética micelar (MEKC)

Em MEKC, agentes tensoativos iônicos, em condições apropriadas à formação de micelas, são adicionados ao eletrólito de corrida, proporcionando assim um sistema cromatográfico de duas fases. O eletrólito representa a fase primária, a qual é transportada eletro-osmoticamente sob ação do campo elétrico, enquanto que as micelas representam a fase pseudoestacionária, a qual é transportada por uma combinação de eletroforese e eletro-osmose. Solutos neutros com diferentes coeficientes de partição (P_{mw}) entre a fase aquosa (eletrólito) e a fase micelar podem ser separados (Figura 12). Em MEKC existe um limite de eluição, chamado janela de eluição, que é definido pelo tempo de eluição do EOF (t_{EO}) e o tempo de migração das micelas (t_{mc}). MEKC pode ser visto como híbrido da cromatografia líquida de fase reversa e CZE, com um processo de separação tendo interações hidrofóbicas e polares, mecanismo de partição e eletromigração. MEKC oferece uma combinação de fatores de CZE (eletroforese capilar em zona) e cromatografia líquida como a alta eficiência, os curtos tempos de análise, o pequeno volume de amostra e o consumo de solvente muito reduzido.

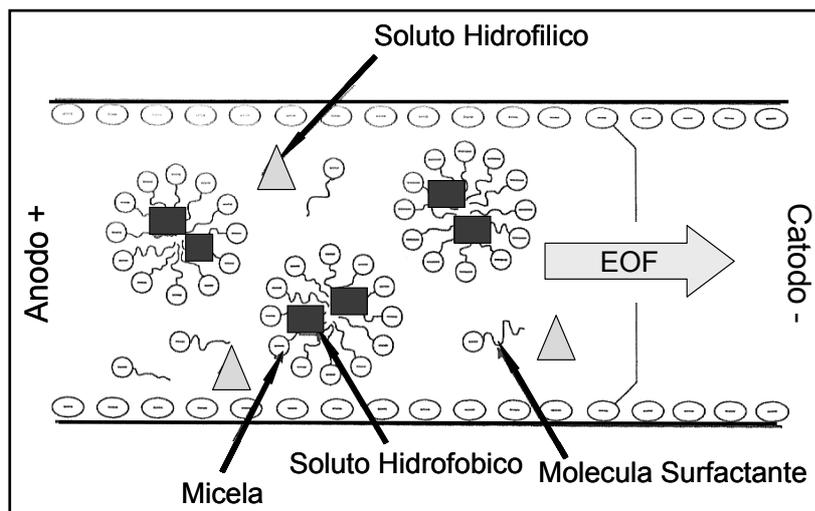


Figura 12: Esquema representativo da separação por MEKC usando micelas aniônicas¹⁰⁸.

2.2.2.3.1 Micelas

Surfactantes são moléculas que contêm grupamentos com caráter hidrofóbico (cauda apolar) e hidrofílico (“cabeça” polar ou iônica). Eles podem ser reconhecidos pela parte hidrofílica, como surfactantes aniônico, catiônico, neutro ou anfótero; ou pelas características da parte orgânica (hidrofóbica). Os surfactantes têm, em geral, a propriedade de formar micelas quando estão em concentração superior a um valor crítico, denominado concentração crítica micelar (CMC). As micelas estão sempre em equilíbrio com os monômeros (moléculas de surfactantes) presentes em solução. A quantidade de monômeros e o tamanho das micelas variam entre os tipos de surfactantes. O processo de formação de micelas por surfactantes em meio aquoso ocorre do fato de a redução da interação hidrocarboneto-água ser energeticamente favorável. A CMC na qual a agregação ocorre reflete o fato de que interações hidrofóbicas entre as partes apolares das moléculas do surfactante são balanceadas pela hidratação e pela repulsão eletrostática do grupo hidrofílico.

Os surfactantes que apresentam altos valores de CMC são inadequados para MEKC, pois as micelas formadas coexistem com grandes quantidades de monômeros livres, o que representa uma sobrecarga térmica (aumento de calor a ser dissipado pelo capilar).

O surfactante utilizado para formação de micelas nesse trabalho foi o dodecil sulfato de sódio (SDS), um surfactante aniônico. As micelas aniônicas têm mobilidade eletroforética em sentido contrário ao do EOF, com isso sua

velocidade de migração é diferente da solução eletrolítica, o que favorece a interação analito-micela. Para o sucesso da separação é necessário que essa interação seja diferente para os diversos solutos.

2.2.2.3.2 Migração em MEKC

Como citado, micelas aniônicas migram em direção oposta ao EOF em um capilar de sílica. Tipicamente em capilares de sílica fundida e em pH maior que 6, a v_{EOF} é maior que a velocidade eletroforética das micelas aniônicas. Como resultado, as micelas são carregadas para o catodo. Quando micelas catiônicas são usadas, a parede do capilar é recoberta com surfactante positivamente carregado para inverter o EOF, e conseqüentemente a polaridade dos eletrodos também deve ser invertida para permitir a eluição das micelas dentro da janela de eluição. Existem dois extremos que definem uma janela de eluição em MEKC. O extremo t_{EO} é marcado por analitos que não interagem com as micelas ($P_{mw} \sim 0$) e que passam todo o tempo de migração na fase aquosa, migrando com mobilidade eletro-osmótica. O outro extremo t_{mc} é definido pela eluição de analitos que interagem fortemente com as micelas e ($P_{mw} \sim \infty$); esses compostos são muito hidrofóbicos e seus tempos de migração coincidem com o tempo de migração das micelas (t_{mc}). A existência da janela de eluição limita a capacidade de pico em MEKC já que todos os analitos neutros devem ser separados entre os tempos t_{EO} e t_{mc} . O tamanho da janela de eluição pode ser alterado pela adição de modificadores orgânicos ou misturas de micelas ou pela modificação da parede do capilar.

O fator de retenção em MEKC (k') é definido como a razão do número de mols de soluto na fase pseudo-estacionária (micela), n_{mc} , e o número de moles na fase aquosa, n_{aq} :

$$k' = \frac{n_{mc}}{n_{aq}} \quad (11)$$

O fator de retenção em MEKC para analitos neutros pode ser determinado pelo tempo de migração usando:

$$k' = \frac{t_r - t_{eo}}{t_{eo} \left[1 - \left(\frac{t_r}{t_{mc}} \right) \right]} \quad (12)$$

onde t_r é o tempo de migração do analito.

Esta expressão é muito similar à equação para fator de retenção em cromatografia convencional, com a exceção do termo adicional $[1 - (t_r / t_{mc})]$ no denominador. Este termo indica a existência de uma janela de eluição, porque a fase “estacionária” em MEKC é também móvel. Se t_{mc} tende ao infinito (micela estacionária), o termo extra no denominador tende a zero e pode ser omitido. Como consequência, o fator de retenção é o mesmo da cromatografia convencional.

2.2.2.3.3 Resolução, capacidade e eficiência

A resolução R_s em MEKC é dada por:

$$R_s = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_2}{1 + k'_2} \right) \left[\frac{1 - (t_{eo} / t_{mc})}{1 + (t_{eo} / t_{mc})k'_1} \right] \quad (13)$$

Onde N é o número de pratos teóricos, k_1 e k_2 são os fatores de retenção dos analitos denominados 1 e 2, respectivamente e α é o fator de seletividade dado por k'_1/k'_2 . A equação 13 difere da equação de resolução para cromatografia convencional apenas pela inclusão do último termo, o qual refere-se à existência da janela de detecção. A migração da micela inserida no capilar causa redução do tamanho efetivo da coluna (capilar). Se t_{mc} tender ao infinito, o último termo da equação será igual à unidade e a expressão da resolução é simplificada para aquela definida para cromatografia convencional.⁹⁹

Em cromatografia, a resolução aumenta com o aumento do fator de retenção. Em MEKC, entretanto, a relação entre R_s e k' não é intuitiva, devido ao último termo da equação, que de fato diminui com o aumento de k' . A resolução passa por um máximo, para valores de k' entre 1 e 5. O valor ótimo depende do intervalo de eluição. Quando a velocidade de migração da micela e a velocidade eletro-osmótica têm magnitudes aproximadas, mas direções opostas, o intervalo de eluição pode ser estendido e o valor ótimo de k' aumentado. No entanto, sob estas condições, a reprodutibilidade dos tempos de eluição pode ser comprometida. Em geral, a redução dos valores de k' dos últimos componentes da mistura é necessária para melhorar a resolução. Um aumento de t_{mc} relativo à t_r é suficiente para diminuir k' . O tempo de eluição da fase micelar é determinado pela velocidade aparente da micela, v_M , que por sua vez, é a soma vetorial das velocidades eletro-osmótica (v_{osm}) e eletroforética da micela (v_{eM}). Em condições

de rotina (micela aniônica, $\text{pH} > 5$), a v_{osm} é maior que v_{eM} . Dessa forma, uma diminuição do potencial zeta do capilar irá reduzir tanto v_{osm} quanto v_{eM} . Isto produz o efeito desejado de aumento de t_{mc} relativo à t_r . Além disso, desde que o fator $t_{\text{eo}}/t_{\text{mc}}$ diminui, o valor de resolução ótima aumenta, deslocando-se para valores maiores de k' .⁹⁸

O fator de retenção de um soluto é o produto do coeficiente de partição, K , e a razão entre as fases, β (razão entre os volumes da fase estacionária e fase móvel):

$$k' = \beta K \quad (14)$$

Em cromatografia líquida de fase reversa, a incorporação de solventes na fase móvel afeta os valores de k' , pois afeta o coeficiente de partição. Em MEKC, a situação é diferente, o solvente orgânico afeta não só K , mas também β . Solventes orgânicos alteram a CMC e, portanto, o volume micelar. Além disso, a adição de solventes orgânicos altera a viscosidade e a constante dielétrica da fase móvel e, conseqüentemente, o potencial zeta do capilar, resultando na variação da velocidade eletro-osmótica. Metanol, 2-propanol e acetonitrila são alguns dos solventes (aditivos) utilizados para a amplificação dos intervalos de tempos de eluição. Em geral, a redução do fator de capacidade dos solutos que eluem por último é conseguida à custa de longos tempos de análise.

Em MEKC, a capacidade de picos (n) é dada pela seguinte expressão:

$$n = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \ln \frac{t_{\text{mc}}}{t_{\text{eo}}} \quad (15)$$

Em geral, se nenhum procedimento é usado para estender o intervalo de eluição, um número de aproximadamente 100 solutos, assumindo $t_{\text{eo}}/t_{\text{mc}} = 0,3$ e $N = 10^5$, poderia ser separado por MEKC; esse número é pequeno em relação ao número de pratos considerado. Com outras técnicas que não tem a limitação da janela de eluição esse número de solutos separados seria maior.⁹⁸

Eficiência é a média de alargamento de banda que ocorre durante a separação. Os termos definidos para cromatografia foram transferidos para métodos de separação em eletromigração capilar. A altura equivalente de um prato teórico (altura do prato) H corresponde à variância do pico (em unidades de comprimento) dividida pela distância de migração. O número de pratos N é a distância que foi migrada dividida pela altura do prato. Em EKC com parâmetros

experimentais padrão, um número de pratos de 200.000 a 300.000 pode ser obtido.⁹⁹

Em MEKC, a variância da zona do soluto resultante de difusão longitudinal é proporcional ao coeficiente de difusão do soluto e ao tempo de migração. O soluto tem a difusão na fase móvel e a difusão na fase micelar. Os solutos que apresentam altos valores de k ficam muito tempo no interior da micela, que por sua vez migra lentamente. Esses solutos levam mais tempo para eluir do capilar e as bandas são mais vulneráveis ao alargamento gerado por difusão. Outro fator que pode produzir bandas largas é a variação de tamanho das micelas com o tempo, em decorrência do equilíbrio de troca entre o monômero e a micela. A mobilidade eletroforética da micela é determinada por fatores como tamanho e forma, os quais dependem do número de agregação. Surfactantes que geram micelas em um amplo intervalo de tamanhos e formas podem não ser adequados para MEKC. Solutos interagindo com micelas de diferentes tamanhos exibem um amplo intervalo de velocidades de migração e podem produzir bandas largas. Um aumento da concentração do surfactante, assim como um aumento da temperatura pode contribuir para acelerar o processo de troca entre micela e monômero, melhorando a eficiência da separação. Outro efeito relacionado com a resistência à transferência de massa entre as fases pseudoestacionária e móvel também podem ocorrer em MEKC. Em geral, baixas voltagens e altos coeficientes de difusão do soluto minimizam estes efeitos. No entanto, devido à natureza das forças envolvidas, o processo de partição entre solutos polares ou iônicos e a micela pode apresentar uma cinética lenta, e causar o alargamento de bandas. Resistência da transferência de massa na fase móvel envolve dois processos distintos: difusão intermicelar e intracoluna. O efeito intermicelar ocorre porque a difusão do soluto entre as micelas é um processo lento. Mesmo em concentrações moderadas de surfactantes, a distância entre as micelas é extremamente pequena, dificultando a passagem do soluto. As micelas constituem uma fase secundária mais uniforme e homogênea dispersa (devido à repulsão de cargas entre as micelas) e têm dimensões menores que as partículas usadas nas colunas empacotadas. Devido à quase perfeita distribuição de micelas e sua natureza fluida, diferenças de percurso na migração dos solutos são praticamente eliminadas, explicando-se assim a maior eficiência obtida nas separações por MEKC. A transferência de massa intracoluna é lenta e contribui para o alargamento das bandas somente se existir um gradiente de velocidade radial no capilar. Tais gradientes podem ser originados apenas por efeitos térmicos, já que a natureza do fluxo eletro-

-osmótico, constância do perfil radial da velocidade, minimiza esta fonte de dispersão.⁹⁸

2.2.2.3.4

Parâmetros experimentais relacionados com a otimização da resolução

A escolha dos vários constituintes químicos que devem estar presentes na análise por MEKC influencia na resolução da separação dos analitos. Além da temperatura, as escolhas do surfactante e do modificador adicionado ao eletrólito de corrida são os mais importantes parâmetros para aumentar a resolução.⁹⁹ Alguns parâmetros experimentais estudados neste trabalho serão discutidos mostrando a importância de cada um na resolução.

2.2.2.3.5

Escolha da micela – surfactante aniônico

Para a separação de analitos neutros, a micela usada em MEKC deve ser iônica. O que mais se utiliza são surfactantes iônicos ou mistura de surfactantes iônicos e não iônicos. Os grupos hidrofóbicos e hidrofílicos presentes na molécula dos surfactantes têm influência direta na seletividade em MEKC. O surfactante mais utilizado em MEKC é o SDS (utilizado também neste trabalho), cuja micela tem formato esférico, com os grupos polares ficando na parte externa da micela e os grupos apolares constituindo o núcleo hidrofóbico. Quando um analito é incorporado na micela, três tipos de interações são possíveis: (i) o analito é adsorvido na superfície da micela por interação eletrostática ou de dipolo; (ii) o analito comporta-se como um co-surfactante por partição na formação da micela; ou (iii) o analito é incorporado dentro do núcleo da micela. O efeito da estrutura molecular do surfactante na seletividade da separação pode diferir de acordo com o tipo de interação envolvida. O grupo hidrofílico, ou iônico, é geralmente mais importante na determinação da seletividade que o grupo hidrofóbico, pois mais analitos interagem com a superfície da micela. A diferença de seletividade em MEKC entre vários surfactantes aniônicos é devido a interações de hidrogênio e um pouco de interações dipolar.⁹⁹

2.2.2.3.6 Concentração e pH da solução tampão

Em geral, a concentração do tampão, na qual a fase pseudoestacionária é dissolvida não tem influência significativa na resolução, no entanto, o pH do tampão é um importante fator na manipulação da resolução de analitos ionizáveis. Um analito ionizado com a mesma carga da micela poderá ser incorporado dentro da micela de forma menos intensa do que um analito não ionizado. O fator de retenção de um ácido é a média dada pelo fator de retenção de sua forma não dissociada com o fator de retenção de sua forma dissociada. Assim, o coeficiente de distribuição, o tempo de migração e a resolução podem ser alterados por mudanças no pH para analitos ionizáveis. Se a amostra é composta somente por analitos neutros, o pH do tampão terá pouco efeito na seletividade. A consideração que deve ser feita é selecionar um pH onde as moléculas de surfactantes estejam ionizadas (as micelas irão migrar em uma taxa diferente da do EOF) e que o EOF seja suficiente. O pH irá influenciar no tempo de migração das micelas e precisa ser otimizado para verificar a influência no tamanho da janela de migração.^{99,108}

2.2.2.3.7 Temperatura

O coeficiente de distribuição é dependente da temperatura, cujo aumento causa a redução do tempo de migração, pois o coeficiente de distribuição é diminuído. O aumento da temperatura também resulta em aumento da velocidade do EOF e das micelas na mesma proporção devido à redução da viscosidade do eletrólito de separação. Existe também a dependência do coeficiente de distribuição (partição) dos solutos em função da temperatura. Conseqüentemente, a temperatura pode afetar a resolução. Sabendo-se que a temperatura tem forte efeito não só na resolução, mas também no tempo de migração, é importante mantê-la sempre constante para a boa reprodutibilidade dos resultados.⁹⁹

2.2.2.3.8 Uso de aditivos na fase aquosa

Assim como na cromatografia líquida, vários modificadores de fase móvel são aplicados a MEKC. Entre os aditivos mais utilizados temos os solventes

orgânicos, as ciclodextrinas (CDs) e a uréia.⁹⁹ Nesse trabalho foi adicionado ao eletrólito de trabalho apenas solvente orgânico (acetonitrila).

Solventes orgânicos miscíveis em água como metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) podem ser utilizados em MEKC. Estes solventes orgânicos reduzem o fator de retenção e alteram a seletividade da separação. Quando esses solventes são adicionados na solução do eletrólito de trabalho alteram a polaridade da fase aquosa do eletrólito causando um aumento na atração do analito para essa fase. A alta concentração de solvente orgânico pode dividir a estrutura da micela, assim, é recomendado que a fração de volume não exceda 20% da composição. A adição de solvente orgânico na solução micelar reduz a v_{EOF} e, desse modo, estende a janela de migração e aumenta a resolução. Um estudo para escolher a porcentagem de solvente deve ser realizado.^{99,108}