

2 Teoria Geral sobre Eletroforese Capilar

2.1. Breve resumo sobre a técnica de eletroforese capilar

A eletroforese é definida como o transporte, em solução eletrolítica, de compostos carregados eletricamente sob a influência de um campo elétrico, no qual a separação entre dois solutos ocorre de acordo com diferenças entre suas mobilidades eletroforéticas. (Kuhn & Hoffstetter-Kuhn, 1993). Jorgenson e Lukacs apresentaram um trabalho, no início dos anos 80, mostrando a vantagem do capilar em relação aos outros meios utilizados para eletroforese (placas de gel, papel, etc.). O uso de capilares com diâmetros internos extremamente pequenos (na faixa de 15-100 μm) permite uma melhor dissipação do calor e, assim, é possível obter uma alta eficiência de separação com tempo reduzido de análise. (Kannamkumarath, S *et al.*, 2002; Weinberger, 2000; Tavares, M, 1997).

Na eletroforese capilar é possível empregar diversos modos de separação, cada qual com seu mecanismo e seletividade característicos: eletroforese capilar de zona (CZE), cromatografia eletrocinética micelar (MEKC), isotacoforese capilar (CITP), focalização isoeletrica capilar (CIEF), eletroforese capilar em gel (CGE) e eletrocromatografia capilar (CEC). A seguir são apresentadas, de forma simplificada, as características de cada tipo de separação.

2.1.1. Eletroforese capilar de zona (CZE)

A eletroforese de zona em solução livre é a técnica mais utilizada e tem esta denominação devido ao fato de que o capilar e os reservatórios contendo os eletrodos são cheios com um tampão (denominado eletrólito carreador), o qual conduz a corrente elétrica e fornece a capacidade tamponante. A amostra, contendo uma mistura iônica, é introduzida no capilar como uma banda de pequena espessura. Sob a influência do campo elétrico, as espécies iônicas da amostra e do tampão migram para o eletrodo correspondente, isto é, cátions em

direção ao catodo e ânions em direção ao anodo, como é mostrado na Figura 1. Como apenas esta técnica será utilizada neste trabalho, os seus fundamentos e aplicações serão descritos posteriormente em maiores detalhes, sendo os outros tipos de eletroforese apresentados de forma muito resumida, visando unicamente à apresentação de um quadro completo sobre as diferentes possibilidades e mecanismos de separação.

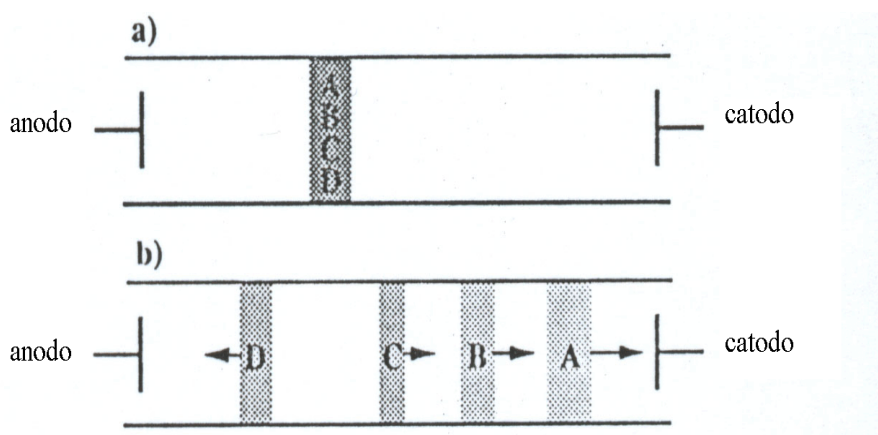


Figura 1: Princípio da eletroforese de zona em solução livre. (a) estado inicial, (b) zonas distintas de amostra, gerando uma migração diferencial. Adaptado de Kuhn & Hoffstetter-Kuhn (1993)

2.1.2. Cromatografia eletrocínética micelar (MEKC)

Na eletroforese de zona em solução livre não é possível a separação de diferentes compostos neutros, pois estes migram na mesma velocidade, já que não estão sob a influência do campo elétrico. Desta forma, para separá-los é necessário utilizar outra técnica de separação, como por exemplo, a cromatografia eletrocínética micelar (Dabde-Zlotorzynska *et al.*, 1998). Neste tipo de eletroforese, a separação do soluto é dependente da distribuição entre as fases aquosa e micelar, como representado na Figura 2.

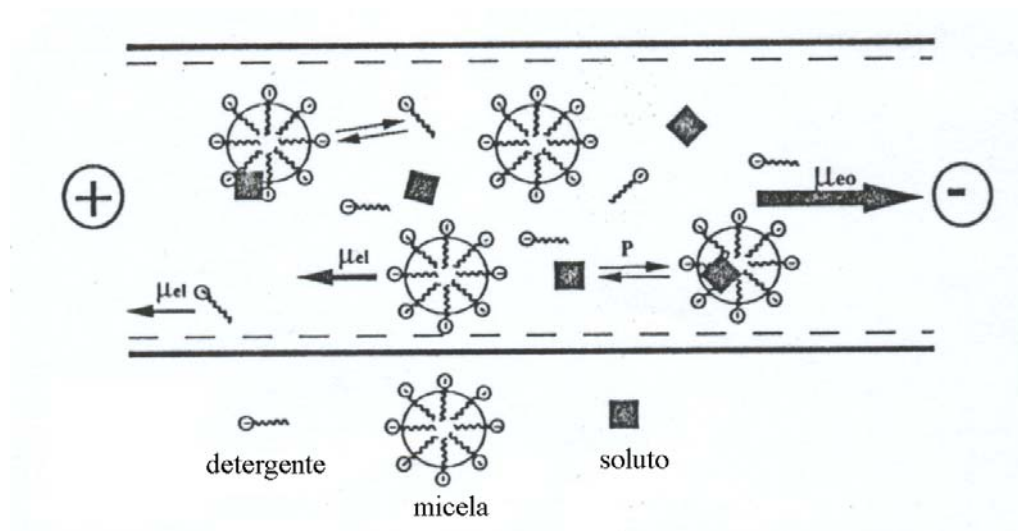


Figura 2: Representação esquemática do princípio da cromatografia eletrocinética micelar. Adaptada de Kuhn & Hoffstetter-Kuhn (1993)

2.1.3. Isotacoforese Capilar (CITP)

Na isotacoforese, cujo fundamento está apresentado na Figura 3, a amostra é introduzida na interface de um sistema tampão, consistindo de um eletrólito líder e um eletrólito terminal. Para efetuar a separação, utilizam-se as diferenças nas mobilidades eletroforéticas de cátions e ânions, em relação aos íons dos eletrólitos líder e terminal. Na separação de uma amostra de cátions, por exemplo, o eletrólito líder deve possuir cátions cuja mobilidade seja maior que a dos íons a serem separados e o eletrólito terminal deve possuir cátions com mobilidades inferiores aos cátions da amostra. Desta forma, estabelecem-se zonas de amostras, entre os dois tipos de eletrólitos, que vão sendo continuamente separadas, até que cada zona contenha um único tipo de íon. Todas as zonas migram, na mesma velocidade do íon do eletrólito líder, em direção ao eletrodo correspondente (Kuhn & Hoffstetter-Kuhn, 1993).

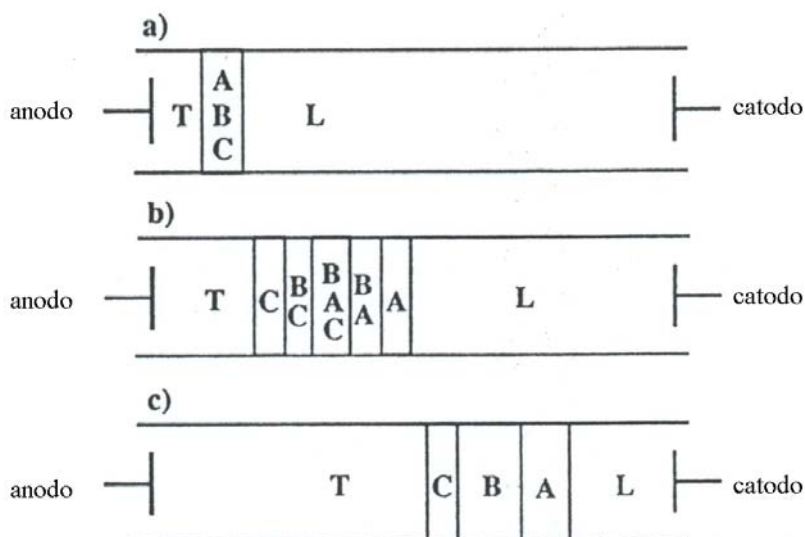


Figura 3: Princípio da isotacoforese (a) Estado inicial, (b) Estado intermediário, (c) Estado em equilíbrio. Adaptado de Kuhn & Hoffstetter-Kuhn (1993)

2.1.4. Focalização Isoelétrica Capilar (CIEF)

Na focalização isoelétrica, os analitos são separados de acordo com seus pontos isoelétricos (pI) isto é, o valor do pH no qual o anfólito tem carga residual nula. No pI não ocorre migração sob a ação de um campo elétrico. A amostra é misturada com uma série de reagentes, denominados anfólitos carreadores, que possuem boa capacidade tamponante em seus valores individuais de pI. Um gradiente de pH é obtido quando se aplica o campo elétrico, fazendo com que ocorra uma movimentação do soluto, de acordo com o valor do pH. Desta forma, em valores de pH mais baixos que o pI dos analitos, estes migram para o catodo, pois estão positivamente carregados. Em pH mais alto, eles migram para o anodo, pois estão carregados negativamente, como representa a Figura 4. Este tipo de eletroforese é utilizado, quase exclusivamente, para a separação de espécies anfóteras, como proteínas e polipeptídios. (Kuhn & Hoffstetter-Kuhn, 1993; Schaumloffel, 2002).

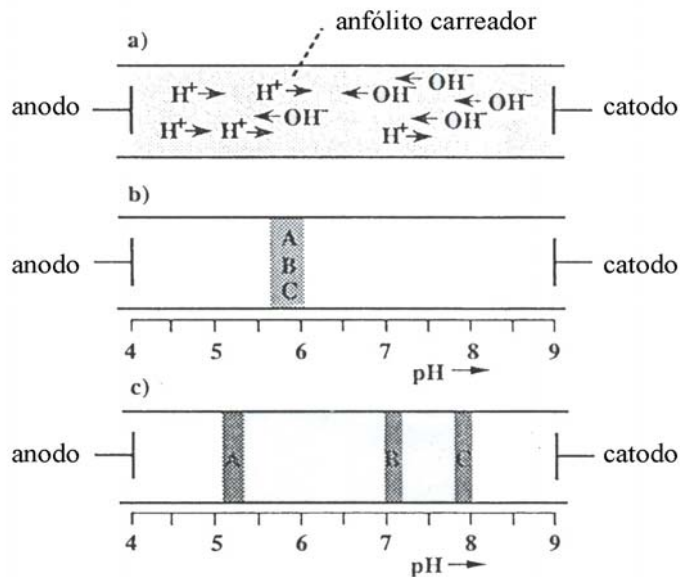


Figura 4: Princípio da focalização isoeletrica. a) geração do gradiente de pH, b) introdução da amostra, c) estado estacionário. Adaptado da referência: Kuhn & Hoffstetter-Kuhn, 1993

2.1.5. Eletroforese Capilar em Gel (CGE)

Este tipo de eletroforese é utilizado quando a razão carga/raio dos analitos é tão próxima, que não é possível separá-los com o uso da eletroforese de zona tradicional. A separação é realizada com base na diferença entre o tamanho das moléculas dos analitos; sendo assim, a maior ou menor facilidade com que os analitos de diversos tamanhos migram através da matriz de gel é que produz a separação, como mostra a Figura 5. (Kuhn & Hoffstetter-Kuhn, 1993)

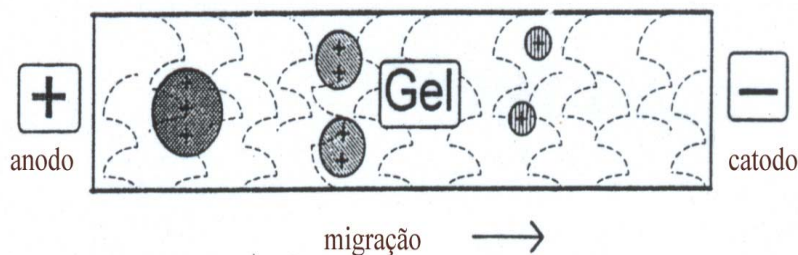


Figura 5: Princípio da Eletroforese Capilar em Gel. Adaptado da referência: Baker, 1995

2.1.6. Eletrocromatografia Capilar (CEC)

A eletrocromatografia capilar é uma técnica de separação que mistura características da eletroforese capilar e de HPLC. Este tipo de eletroforese emprega como fase estacionária micro partículas de sílica fundida, usualmente contendo um ligante hidrofóbico que retém os solutos. Da mesma forma que em HPLC, na CEC existe uma fase móvel que é, normalmente, uma mistura de tampões aquosos. A superfície de sílica possui uma alta densidade de grupos silanóis ionizados, gerando, desta forma, um elevado fluxo eletroosmótico quando a voltagem é aplicada. O mecanismo de separação é dependente da natureza da amostra. (FRAZIER *et al.*,2000; WEHR *et al.*,1999)

2.2. Aspectos teóricos sobre a eletroforese capilar de zona

A eletroforese de zona em solução livre é o modo mais utilizado devido à simplicidade do equipamento e maior facilidade na otimização das condições experimentais. A Figura 6 apresenta um esquema do equipamento de eletroforese capilar, composto de reservatórios para o tampão e amostra, sistema de alta tensão, detector e processador.

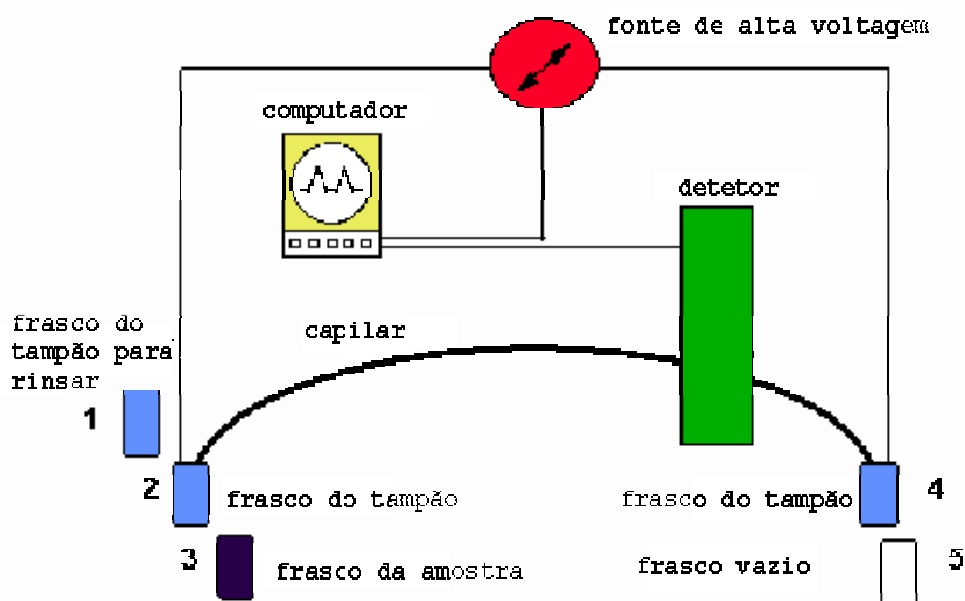


Figura 6: Esquema de um sistema de eletroforese capilar. (<http://www.ceandcec.com>)

Na eletroforese de zona, a migração das espécies ocorre pela combinação dos efeitos dos fluxos eletrosmótico e eletroforético que são gerados quando o campo elétrico é aplicado (Dabek-Zlotorzynska *et al.*, 1998). Quando o capilar é feito de sílica fundida, o fluxo eletrosmótico é devido à ionização dos grupos silanóis na parede do capilar. Ao se passar uma solução alcalina através do capilar, a superfície adquire uma carga negativa e, então, uma camada de contra-íons é formada próxima à parede a fim de manter a eletroneutralidade, dando origem a uma dupla camada elétrica que possui uma camada compacta (fixa) e outra difusa (móvel), como é representada na Figura 7. Desta forma, cria-se uma diferença de potencial muito próxima da parede do capilar que é conhecida como potencial zeta (ξ), sendo este potencial dependente da carga da superfície na parede do capilar (Kuhn & Hoffstetter-Kuhn, 1993; Tavares, 1996).

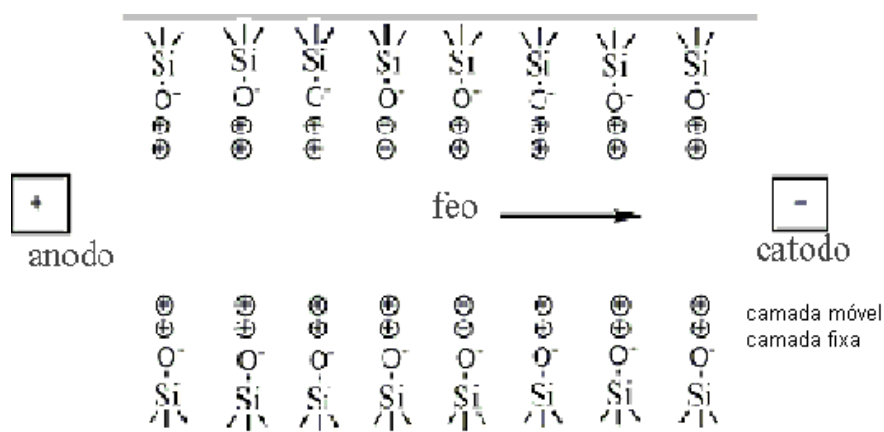


Figura 7: Representação esquemática da parede do capilar.

feo = fluxo eletrosmótico

(<http://www.ceandcec.com>)

Quando o campo elétrico é aplicado, forças elétricas atuam nas cargas da camada difusa. Com isto, os íons arrastam moléculas de água, formando um fluxo que é direcionado para o catodo, enquanto a parede do capilar permanecer negativa. A magnitude do fluxo eletrosmótico pode ser expressa em termos de velocidade ou mobilidade, segundo as equações (Dabek-Zlotorzynska *et al.*, 1998; Tavares, 1996).

$$V_{\text{FEO}} = (\varepsilon \xi / \eta) E$$

$$\mu_{\text{FEO}} = \varepsilon \xi / \eta$$

[V_{FEO} = velocidade do fluxo eletrosmótico; ε = constante dielétrica; ξ = potencial zeta; η = viscosidade; E = potencial elétrico aplicado; μ_{FEO} = mobilidade do fluxo eletrosmótico].

O fluxo eletroforético é direcionado ao eletrodo de carga contrária ao analito. Porém, se este é composto de espécies iônicas de diferentes cargas, cada espécie migrará para o eletrodo correspondente, sendo o fluxo eletroforético resultante dependente da velocidade de cada íon e do fluxo eletrosmótico. Neste caso, como os cátions migram no mesmo sentido do fluxo eletrosmótico, isto é, em direção ao catodo, estes chegarão mais rapidamente ao detector, enquanto que os ânions migram mais lentamente, pois são atraídos pelo anodo. No entanto, todas as espécies presentes do analito serão direcionadas para o sistema de

detecção pelo fluxo eletrosmótico, pois este possui uma velocidade maior que a dos íons, como esquematizado na Figura 8.

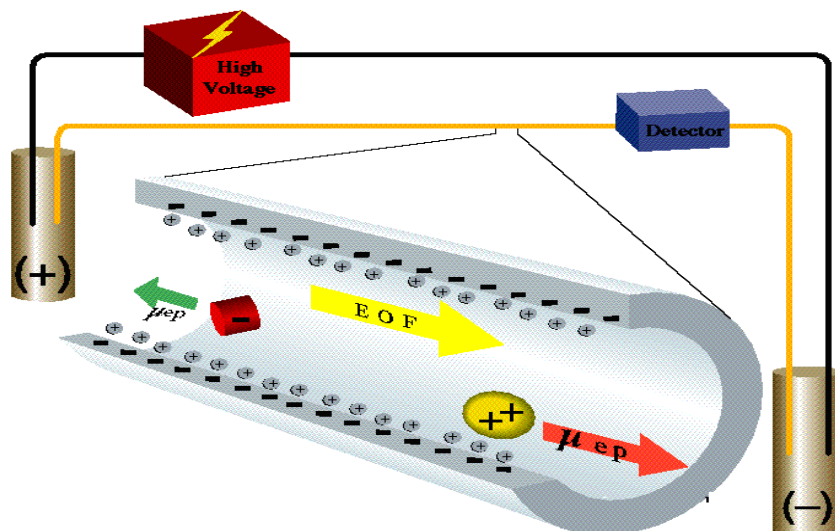


Figura 8: Representação esquemática da migração de cátions e ânions na presença do fluxo eletrosmótico. μ_{ep} é a mobilidade eletroforética, EOF = fluxo eletrosmótico. (<http://www.ceandcec.com>)

A separação das espécies é possível graças à diferença nas mobilidades iônicas dos analitos, que estão relacionadas com suas densidades de carga, isto é, as razões carga/raio. Desta forma, formam-se zonas de amostras distintas de acordo com a mobilidade. O tempo necessário para um composto percorrer o capilar até o ponto de detecção é chamado de tempo de migração. A mobilidade aparente do soluto é a medida da mobilidade na presença do fluxo eletrosmótico, e pode ser calculada pela seguinte equação (CHEMKEYS, 2001; Dabek-Zlotorzynska *et al.*, 1998):

$$\mu = l / t E = l L / t V$$

[V = voltagem aplicada; E = campo elétrico; L = comprimento total do capilar; l = comprimento efetivo (distância até o detector); t = tempo de migração].

Com este valor pode-se calcular a mobilidade efetiva do soluto, pela

expressão:

$$\mu_a = \mu_e + \mu_{\text{FEO}}$$

[μ_a = mobilidade aparente; μ_e = mobilidade efetiva; μ_{FEO} = mobilidade do fluxo eletroosmótico].

A introdução da amostra no capilar pode ser feita através de duas técnicas diferentes. Na injeção hidrodinâmica, utiliza-se a aplicação de pressão ou vácuo no sistema, por um determinado período de tempo, fazendo com que uma pequena quantidade de amostra entre no capilar. Na injeção eletrocinética, um campo elétrico é aplicado no frasco da amostra, causando a migração dos componentes da amostra para o interior do capilar. (Baker, 1995).

A injeção hidrodinâmica é a mais comum nos equipamentos comerciais, sendo o volume de amostra introduzido no capilar dependente da magnitude da pressão aplicada, do tempo e das características do capilar. O volume e o comprimento do segmento da amostra podem ser calculados com auxílio das seguintes expressões:

$$V_i = \Delta P r^4 \pi t / 8 \eta \quad \text{e} \quad L_p = V_i / \pi r^2 = \Delta P r^2 t / 8 \eta L$$

[ΔP = pressão aplicada no capilar; r = raio interno do capilar; t = tempo em que a pressão é aplicada; η = viscosidade da amostra; L = comprimento total do capilar].

Na separação por eletroforese capilar é possível obter picos com alta definição (resolução), pois os efeitos de alargamento dos picos são mínimos. Diferentemente da cromatografia, a não existência de fase estacionária diminui o efeito de alargamento, causado pela transferência de massa entre as fases estacionária e móvel. Outro motivo da alta eficiência de separação por eletroforese capilar é que a aplicação de voltagem ao sistema, e não de pressão, evita gradientes de velocidade ao longo da parede do capilar. Desta forma, o fluxo eletroosmótico é gerado uniformemente ao longo de todo o capilar e migra de forma segmentada, diminuindo o alargamento dos picos. A resolução do capilar depende como em outras técnicas cromatográficas, do número de pratos teóricos

(N) e pode ser calculada pela expressão:

$$N = \mu V / 2 D$$

[μ = mobilidade eletroforética; V = voltagem aplicada ao sistema; D = coeficiente de difusão do soluto]

A resolução entre dois solutos é definida como (Kuhn,1993):

$$R = 2 (t_2 - t_1) / (w_1 + w_2)$$

[t_1 = tempo de migração do componente 1, em segundos; t_2 = tempo de migração do componente 2, em segundos; w_1 = largura do pico do componente 1, em segundos; w_2 = largura do pico do componente 2 em segundos].

O sistema de detecção mais utilizado na eletroforese capilar é o UV-VIS, devido à sua natureza quase universal; porém, devido ao pequeno caminho óptico do capilar, a principal desvantagem deste tipo de detecção é a sua baixa sensibilidade. Como os equipamentos são em geral equipados com este detector, dependendo do tipo de amostra, é necessário o uso de detectores mais sensíveis, como por exemplo, amperométricos, de condutividade, fluorescência e de espectrometria de massas.