

Electroforese Capilar

R. J. N. BETTENCOURT DA SILVA, M. FILOMENA G. F. C. CAMÕES*

A Electroforese Capilar (CE) é uma técnica analítica recente cujo rápido crescimento se tem vindo a reflectir nas vendas de instrumentos e no número de publicações científicas. Implementando os princípios da electroforese clássica numa forma automática e simples, de forma a tornar possível a quantificação directa das amostras, esta técnica consegue separar componentes duma amostra pertencendo às mais diferentes categorias de massa molecular ou polaridade. Assim, pode separar amostras de iões inorgânicos, biopolímeros como DNA e proteínas e até moléculas neutras após adição de detergentes ao electrólito suporte. A adição de aditivos quirais como ciclodextrinas, torna possível a separação de enantiómeros.

1. INTRODUÇÃO

Os princípios em que se baseia a Electroforese são conhecidos desde os inícios do século passado e as suas bases teóricas foram formuladas por Kohlrausch em 1897. O termo "Electroforese" (do grego $\Phi\omicron\rho\epsilon\epsilon\sigma\theta - \alpha$ = ser

arrastado) só foi introduzido na primeira metade deste século e desde então tem-se desenvolvido uma técnica de separação baseada neste conceito. As diferentes velocidades de migração de partículas carregadas em solução, sob acção de um campo eléctrico, levou ao desenvolvimento de uma técnica adequada à separação de iões (Figura 1a).

Outras variantes desta técnica foram surgindo, todas elas baseadas nos mesmos fundamentos. Recentemente surgiu uma nova aproximação da electroforese que, por recorrer ao uso de suportes capilares, se designa por Electroforese Capilar. Esta variante nasceu sem qualquer ruptura da bem estabelecida técnica separativa; poder-se-á dizer que representou de certa forma um sopro de ar fresco que catapultou o uso dos princípios electroforéticos para os destaques das recentes publicações científicas.

O uso de capilares apresenta-se como uma vantagem, basicamente pelo facto de possibilitar uma maior dissipação do calor produzido por efeito de Joule, de forma que as separações poderão ser realizadas com altas tensões sem perda da qualidade dos resultados, tanto em termos de largura de banda como em estabilidade

térmica da amostra. Desta forma pode-se obter separações ao mesmo tempo mais resolvidas e mais rápidas quando comparadas com a aproximação clássica. Os resultados obtidos para eficiências, da ordem dos milhões de pratos teóricos por metro, levaram mesmo a reputar esta técnica como uma importante alternativa a outras técnicas separativas.

Como surgiu a Electroforese Capilar?

Na década de 70 houve várias tentativas na redução das correntes de convecção produzidas em tubos abertos preenchidos por electrólitos livres. Uma das soluções mais bem sucedidas para este problema foi o uso de capilares de vidro ou Teflon de reduzido diâmetro (diâmetros internos entre 200 e 500 μm). Nos finais dos anos 70 começaram então a aparecer excelentes trabalhos de Everaerts [1,2] em electroforese de zona de alta eficácia, que no entanto não atraíram muito interesse na comunidade científica. O trabalho que marcou definitivamente a expansão da electroforese capilar, resultou de um estudo realizado por Jorgenson e Lukacs [3] em 1981. As razões para este sucesso foram as seguintes: Jorgenson e Lukacs usaram o equipamento certo; com capilares de vidro de diâmetro igual a 75 μm , bandas de injeção estreitas realizadas por electromigração (por uso de tensão - ver adiante), detecção por fluorescência de amostras apropriadas; com tudo isso conseguiram produzir um aparelho com 400000 pratos teóricos por metro, que originava picos simétricos e estreitos num curto espaço de tempo.

Depois da euforia dos primeiros trabalhos de Jorgenson e Lukacs que resultaram de um grande desenvolvimento, principalmente ao nível da instrumentação, parecia claro que teriam de ser resolvidos ainda alguns problemas associados com a injeção reprodutível e automática de alguns nl de amostra!. Desenvolveram-se assim as técnicas de injeção por pressão, pois eram as únicas capazes de introduzir a amostra no capilar sem discriminação de certos componentes.

Relativamente à detecção fizeram-se muitos trabalhos baseados em estu-

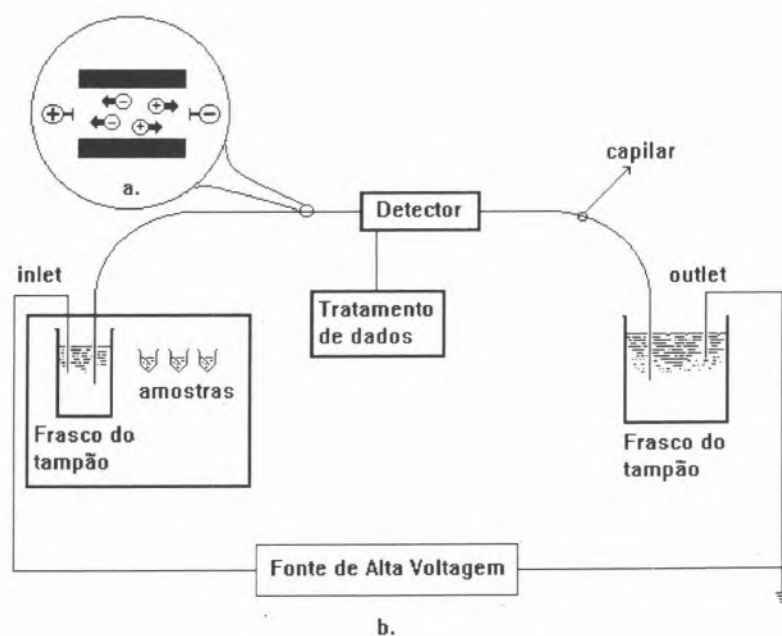


Figura 1: Instrumentação de Electroforese Capilar. a. Migração electroforética; b. Esquema de um instrumento de CE.

dos com vista à miniaturização da cromatografia líquida, que apetrecharam esta técnica com detectores electroquímicos, de espectrometria de massa, condutimétricos, por compostos marcados radioactivamente, detecção por indução de fluorescência LASER e a vulgar espectrofotometria UV/Vis [4].

Em que consiste um instrumento de Electroforese Capilar?

De seguida iremos apresentar um esquema dos aparelhos de CE (Figura 1b) que já povoam muitos laboratórios.

O capilar de quartzo (diâmetro interno de 25-100µm) com comprimento de 20 a 100cm, faz de ponte entre dois vasos contendo uma solução tampão de pH (electrólito suporte). Introduce-se uma porção de amostra, da ordem dos nl, no extremo anódico do capilar. Isto é feito pela substituição do vaso de tampão pelo frasco contendo a amostra; por outras palavras o final do capilar é mergulhado na solução amostra (Figura 1b). Iremos descrever estes aspectos mais à frente em detalhe na secção "Instrumentação".

A migração da amostra é induzida pela aplicação de diferença de potencial nos extremos do capilar. Normalmente posiciona-se o detector junto ao cátodo para a análise de aniões.

A migração electroforética é sempre acompanhada por um fluxo electroosmótico (FEO) de determinada amplitude, e que contribui de forma passiva para o transporte das zonas de amostra, não ajudando na sua separação. O FEO é fortemente dependente do pH do tampão e das características da parede interna do capilar.

2. PRINCÍPIOS DA ELECTROFORESE CAPILAR

2.1. Migração Electroforética

Quando se aplica uma diferença de potencial (E) a uma solução de iões, estes vão-se mover com uma velocidade de v_{EF} que lhe é directamente proporcional (1).

$$v_{EF} = \mu_{EF} E \quad (1)$$

em que μ_{EF} é a mobilidade electroforética do ião, que depende fortemente do ambiente que o rodeia. Assim, não existem métodos teóricos simples para prever o seu valor. A velocidade das zonas de amostra é determinada através do

conhecimento do tempo (t) que a amostra necessita para se deslocar da injeção até à janela de detecção; esse comprimento é designado por comprimento efectivo do capilar (L_{ef}).

Antes dos iões atingirem esta velocidade constante v_{EF} são sujeitos a uma aceleração produzida pela força K_B .

$$K_B = zFE \quad (2)$$

em que F é a constante de Faraday (96500 C mol⁻¹) e z é a carga efectiva dos iões. Esta força K_B é então oposta por uma força de fricção K_R que vai aumentando à medida que aumenta v_{EF} , até que a anula. Segundo a lei de Stokes, K_R atinge aproximadamente o valor dado pela equação 3 (3).

$$K_R = 6\pi\eta r \quad (3)$$

onde η é a viscosidade dinâmica [Pa s] e r é o raio de Stokes [cm]. Assim define-se a velocidade electroforética de migração por:

$$v_{EF} = zFE/(6\pi\eta r) \quad (4)$$

A separação electroforética é condicionada pelas diferentes mobilidades electroforéticas dos iões.

A carga efectiva do ião é definida pela diferença entre a sua carga formal e a carga oposta proveniente da dupla camada que rodeia o ião. Quando o ião migra, leva consigo essa dupla camada de forma que migra mais lentamente do que se poderia esperar pelos cálculos a partir da sua carga formal. Este fenómeno é conhecido pelo efeito electroforético e é maior para uma dupla camada difusa estreita. Esta dupla camada pode ser calculada pela teoria de Debye-Hückel, e a sua largura é inversamente proporcional à raiz quadrada da concentração do electrolito. Pode-se demonstrar que a carga iónica efectiva e assim a velocidade de migração, decrescem com o aumento da força iónica.

No caso de moléculas grandes com um raio maior que a largura da dupla camada, a mobilidade é independente do tamanho, desde que tenham composição similar, fazendo com que a separação electroforética seja mais difícil; a velocidade de migração de moléculas de DNA e de proteínas desnaturadas por SDS é idêntica em electrolitos puros; a separação só pode ser realizada quando a migração for influenciada pelo efeito de exclusão (ex: com geis).

Quando as espécies são só parcialmente ionizáveis (ex: ácidos e bases fracas) a mobilidade electroforética é fortemente dependente do grau de dissociação, pois as espécies vão estar ionizadas ou não, em etapas sucessivas (equilíbrio dinâmico).

2.2. Fluxo Electroosmótico

Em CE é muito comum o uso de capilares de sílica sem revestimento interno, sendo importante a interacção do solvente com a parede do capilar. À medida que se usam tampões de pH mais alto vai haver uma maior dissociação de grupos silanol na superfície do capilar, tornando-a mais carregada negativamente. Na ausência de um campo eléctrico exterior, há a formação de uma dupla camada (Figura 2a) em que a zona positiva é constituída por uma parte imóvel fortemente ligada à superfície do capilar e por uma parte móvel. A fronteira entre a fase estacionária e a fase móvel, é chamada plano de cisalhamento ("plane of shear") (Figura 2a) e o potencial do seu plano é chamado de potencial zeta (ζ).

Quando se aplica um campo eléctrico ao longo do capilar, a fase móvel vai começar a mover-se na direcção do electrodos carregados negativamente (Figura 2a), e os iões serão arrastados pelo solvente. Este fluxo é designado por fluxo electroosmótico (FEO). A velocidade do FEO (v_{FEO}) é também definida pela Mobilidade Electroosmótica (μ_{FEO}) como se vê a seguir (5):

$$v_{FEO} = \mu_{FEO} E \quad (5)$$

Para uma dada combinação de capilar e solvente tamponizante define-se μ_{FEO} como uma constante expressa por [4]:

$$\mu_{FEO} = \epsilon E \zeta / (4\pi\eta) \quad (6)$$

onde ζ é o potencial Zeta; ϵ é a constante dieléctrica do meio e η a viscosidade do meio [5].

Pode-se verificar que a variância radial do FEO é limitada pela largura da dupla camada, fazendo com que este tenha um perfil tanto mais plano quanto menos espessa for a dupla camada em relação ao diâmetro interno do capilar [6]. Assim este tipo de fluxo vai contribuir para uma redução da dispersão das zonas, quando comparadas com os sistemas que usam pressão como meio de

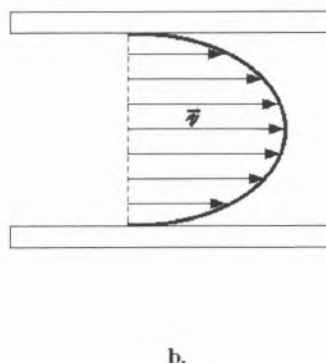
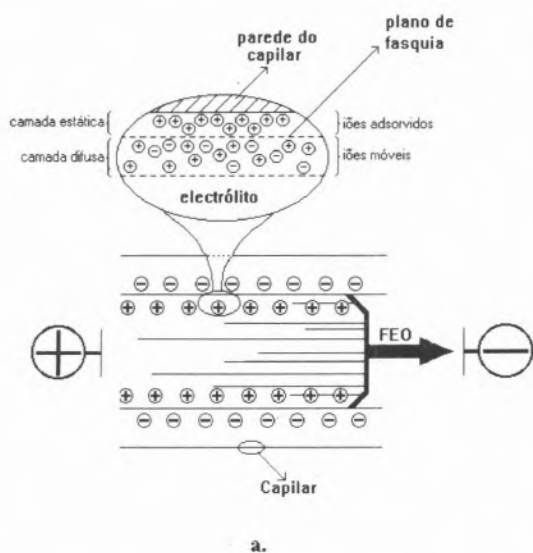


Figura 2: a. Os princípios do fluxo electroosmótico (FEO); b. Perfis de velocidade parabólicos para sistemas que transportam a amostra por pressão (ex: HPLC, LC, FIA, etc.).

transporte das amostras (ex: HPLC, LC, FIA, etc.; perfil de velocidades parabólicas) (Figura 2b), melhorando o limite de detecção da técnica.

Uma outra vantagem deste meio de transporte é o facto de em capilares empacotados com bolas de vidro ou partículas de sílica gel, o FEO ser independente do diâmetro das partículas ou material de empacotamento. Assim, é teoricamente possível usar partículas muito pequenas (diâmetros menores que 1 μm) ou colunas longas, para separações cromatográficas. Este procedimento é conhecido por electrocromatografia (EC) e tem ganhado um interesse crescente, pois combina a selectividade do HPLC com a eficácia de separação da CE.

Como veremos mais à frente, é possível modificar a direcção e/ou a amplitude do FEO num capilar de sílica pela alteração química da sua superfície. Estes processos também tornam os capilares bastante menos sujeitos à adsorção dos componentes da amostra, e assim úteis para a análise de proteínas.

2.3. Alargamento de banda

Como o perfil de velocidades em CE é plano devido ao fluxo electroosmótico, pode-se desprezar o seu efeito no alargamento de banda. Desta forma só é de ter em conta a difusão longitudinal da amostra.

O alargamento de banda (H), pode ser calculado pela equação 7, onde D é o

coeficiente de difusão da amostra no electrolito suporte.

$$H = 2D/v = 2D/\mu E \quad (7)$$

Se usarmos a relação $H=L/N$ podemos calcular o número de pratos teóricos (8), em que L é o comprimento do capilar e U é a diferença de potencial usada.

$$N = \mu U/2D \quad (8)$$

Deve-se mencionar que a mobilidade iónica é a combinação da mobilidade electroforética μ_{EF} e da mobilidade electroosmótica, μ_{FEO} . Giddings [7] mostrou que à temperatura ambiente a equação 8 se pode reduzir à equação 9.

$$N = 20zU \quad (9)$$

Quando se usam diferenças de potencial entre 100 e 500000 V, pode-se implementar separações de íons com cargas efectivas entre 1 e 10, com mais de 10 milhões de pratos teóricos por metro. Neste aspecto a CE não tem rivais. Esta previsão de altos números de pratos teóricos foi confirmada para a análise de moléculas de DNA em capilares cheios de gel (Figura 3b) [10]. No entanto as moléculas de DNA são um caso especial, visto que não interagem com a superfície do capilar porque têm carga negativa. Não se conseguiu este elevado número de pratos teóricos para a separação de proteínas, no entanto obtiveram-se mais de 500000 pratos teóricos quando do uso de capilares revestidos internamente. Uma adsorção na superfície do capilar, mesmo que pequena, leva a alterações locais do FEO e assim a uma distorção do perfil de fluxo. Desta forma aumenta o alargamento de banda. Adicionalmente, qualquer adsorção reduz a transferência de massa.

A mobilidade e o FEO aumentam com a diferença de potencial, tornando as análises mais rápidas. Como a amostra passa menos tempo na coluna, o alargamento de banda decresce e o número de pratos teóricos aumenta. No entanto quando se usam grandes diferenças de potencial, aumenta o aquecimento da solução por efeito de Joule. Dá-se assim um transporte de calor ao longo da parede do capilar, e formam-se gradientes radiais de temperatura e viscosidade. O arrefecimento do capilar

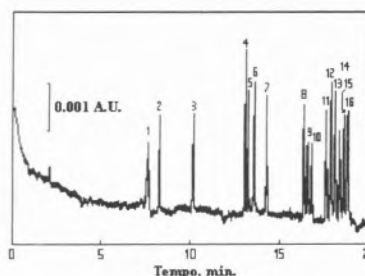
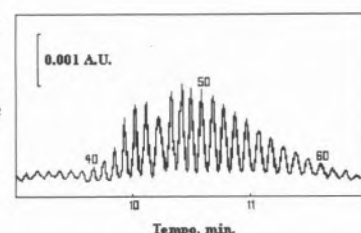


Figura 3a: Separação Electrocinética de fenóis com uma solução de SDS: (1) água, (2) acetilacetona, (3) fenol, (4) o-cresol, (5) m-cresol, (6) p-cresol, (7) o-clorofenol, (8) m-clorofenol, (9) p-clorofenol, (10) 2,6-xilenol, (11) 2,3-xilenol, (12) 2,5-xilenol, (13) 3,4-xilenol, (14) 3,5-xilenol, (15) 2,4-xilenol, (16) p-etilfenol; solução micelar de 1 mmol de SDS em 20 ml de um tampão de borato-fosfato, pH=7.0; intensidade de corrente, 28 μA ; comprimento de onda de detecção, 270nm; temperatura, 25°C.

Figura 3b: Separação de uma mistura de ácidos polideoxiligonucleotidos p-[dA]₄₀₋₆₀ por CGE. Solução tampão: 0,1M Tris / 0,25M Borato / 7M Ureia, pH=7,6; gel poliácridamida, 6% T e 5% C; Intensidade de corrente 10,8 μA ; comprimento de onda de detecção 260nm.



aumenta esse gradiente de temperatura, mas é necessário para evitar o sobreaquecimento. As diferenças de viscosidade entre o centro do capilar e a sua parede levam assim a diferentes migrações da amostra, e portanto a um alargamento de bandas e perda de resolução.

A única solução para esta formação de gradiente de temperatura é o uso de capilares de menor diâmetro. Num tubo cilíndrico as diferenças de temperatura entre o centro e as paredes do capilar aumentam com o quadrado do diâmetro do capilar. Por essa razão usam-se capilares extremamente estreitos (diâmetros internos de 25-100 μm) em CE. Esta redução de diâmetro leva no entanto à existência de percursos ópticos reduzidos quando da detecção espectrofotométrica. Uma outra alternativa a este método é o uso de tampões de baixa concentração e/ou baixa condutividade. Deve-se no entanto evitar que o tampão tenha uma condutividade muito diferente da da amostra (neste caso inferior), sob pena da distorção das zonas da amostra e redução da eficácia da separação.

A mobilidade dos iões do tampão deve também ser menor que a dos componentes da amostra, para se obterem picos estreitos e simétricos em vez de picos triangulares com grandes caudas que levariam a baixas resoluções.

Desta forma a optimização da eficiência de separação em CE tem que ter em conta a influência do efeito de Joule, diferenças da condutividade das zonas de amostra e electrólito, e a sensibilidade na detecção de forma à obtenção de altas resoluções e reduzidos tempos de análise.

3. AS DIFERENTES MODALIDADES DA ELECTROFORESE CAPILAR

O desenvolvimento da electroforese levou ao aparecimento de um sem número de variantes, todas elas baseadas nos mesmos princípios. Mais tarde, com o surgimento da CE todas estas ideias foram implementadas em suportes capilares. Podemos dividir estes modos em quatro grupos diferentes consoante o electrólito usado:

- Electroforese Capilar de Zona (CZE);
- Electroforese Capilar de Fronteira Móvel (CMBE);
- Isotacoforese Capilar (CITP);
- Focagem Isoeléctrica Capilar (CIEF);

Podemos encontrar outras técnicas híbridas destas que combinam o princípio electroforético com outros conceitos:

- Electroforese Capilar em Gel (CGE) que combina CZE com os princípios da exclusão molecular;
- Cromatografia Capilar Electrocinética Micelar (MECC) que combina a CZE com a partição de fases com recurso a detergentes em concentrações superiores à concentração micelar crítica;
- Electrocromatografia (EC) que combina a CZE com a cromatografia líquida pelo uso das fases estacionárias da última.

Estas técnicas são designadas de modos diferentes, o que não impede que os seus princípios sejam usados em outros meios separativos (e.g. Electroforese de Zona e Focagem Isotacoforética em Gel). Iremos de seguida descrever cada um destes modos (Figura 4).

3.1. Electroforese Capilar de Zona (CZE)

A Electroforese Capilar de Zona é a variante mais simples e amadurecida da Electroforese Capilar. O capilar é preenchido com um tampão conhecido, designado por electrólito suporte. De seguida, introduz-se uma pequena zona de amostra nessa solução e aplica-se um campo eléctrico exterior no sistema. Este procedimento leva ao movimento dos iões que se encontram no tampão, também em movimento (pode-se reduzir drasticamente o movimento do tampão por uso de condições experimentais específicas). Cada um desses iões vai-se mover a diferentes velocidades (iões com diferentes mobilidades) de

forma que podem ser separados pela extensão temporal suficiente da aplicação desse campo eléctrico exterior. Os diferentes iões dão diferentes zonas (razão da designação deste modo), e algumas delas vão passar pelo detector "on-line". Os aniões migram na direcção oposta dos cатиões, e se o FEO não for suficientemente grande (vêr atrás) só iremos detectar o tipo de iões que migram para o eléctrodo que se encontra na direcção do detector.

A electroforese capilar de zona com capilares sem revestimento é uma técnica particularmente adequada à separação de moléculas pequenas com carga permanente. Assim, é possível separar, sem grandes problemas, ácidos carboxílicos aromáticos e alifáticos, ácidos sulfónicos, aminoácidos, fenóis, nucleótidos, aminas, açúcares e ácidos de açúcares. A separação de moléculas carregadas com resíduos hidrofóbicos relativamente grandes é melhorada pela adição de SDS, o que foi provado para alguns ácidos sulfónicos aromáticos [5].

3.2. Electroforese Capilar de Fronteira Móvel (CMBE)

A Electroforese Capilar de Fronteira Móvel (CMBE) é uma técnica analítica de valor limitado, talvez devido ao facto de ainda se tratar de uma técnica relativamente recente. Nesta variante a amostra é continuamente introduzida num capilar cheio de electrólito frontal. Este electrólito frontal contém um ião com carga de sinal igual ao componente a separar e uma mobilidade efectiva maior. Quando se aplica o campo eléctrico, os componentes começam a migrar e depois de



Figura 4: Revisão esquemática dos modos de Electroforese Capilar. ES- electrólito suporte; EF- electrólito frontal; ET- electrólito terminal; A e B são os componentes da amostra.

um certo período o componente de mobilidade superior (B), vai formar uma zona pura na frente da amostra, seguida por uma zona mista contendo A e B (Figura 4).

3.3. Isotacoforese Capilar (CITP)

Na Isotacoforese Capilar (CITP) faz-se a introdução duma porção discreta de amostra entre dois electrólitos diferentes; o electrólito frontal e terminal. Ambos estes electrólitos contêm uma espécie iónica com carga do mesmo sinal que os componentes a separar. Os iões frontais e terminais têm respectivamente mobilidades efectivas superiores e inferiores às dos iões da amostra a separar. Assim teremos de separar aniões e catiões em duas análises diferentes.

Quando o sistema atinge o estado estacionário, todos os iões migram com a mesma velocidade e encontram-se separados num número discreto de zonas que estão em contacto directo entre si e organizam-se de acordo com a sua mobilidade efectiva. Como todas as zonas se deslocam com uma velocidade idêntica e constante, estabelece-se um gradiente de potencial em degraus ao longo das zonas consecutivas. Poder-se-á usar este gradiente de potencial (E) como forma de detecção (Figura 4).

De acordo com Kohlraush [6], a concentração de cada zona é directamente relacionada com a concentração dos iões frontais. Um outro aspecto importante deste modo, é que as zonas de amostra têm propriedades auto-correctoras em relação ao alargamento de zona por dispersão. Cada zona tem uma concentração constante, de forma que o comprimento destas bandas fornece-nos informação quantitativa. A altura dos degraus de potencial, que é função da mobilidade efectiva do componente e do ião frontal, pode fornecer-nos tanta informação quantitativa como qualitativa. Esta técnica foi usada principalmente para a separação de iões inorgânicos e ácidos carboxílicos. O método não é usado com frequência devido aos problemas envolvidos na detecção e à dificuldade da escolha dos electrólitos adequados a uma amostra desconhecida.

Como a CITP produz uma concentração das amostras, pode ser usada como pré-concentrador antes de uma separação por outras CE/s ou HPLC.

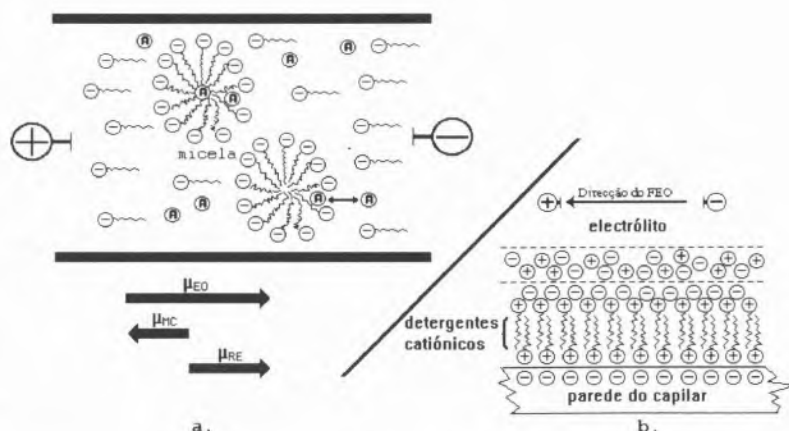


Figura 5: a. Representação esquemática da Cromatografia Capilar Electrocinética Micelar (MECC). A=componentes da amostra; μ_{EO} =mobilidade electroosmótica; μ_{MC} =mobilidade micelar; μ_{RE} =mobilidade resultante. b. Representação esquemática do FEO revertido pela acção de detergentes catiónicos.

3.4. Focagem Isoelétrica Capilar (CIEF)

A Focagem Isoelétrica Capilar (CIEF) é um modo usado para separar analitos anfotéricos, como proteínas, baseando-se nos seus diferentes pontos isoelétricos (pI). Nesta técnica dá-se a migração dos componentes do analito num gradiente de pH até que atingem, imóveis, um pH que iguala o seu pI. Consiste portanto, no encher do capilar com a solução amostra em mistura de anfólitos; introduz-se uma solução tampão ácida no lado do ânodo e uma solução tampão básica do lado do cátodo. Quando se aplica uma diferença de potencial neste sistema há a formação de um gradiente de pH estável e a consequente focagem do analito [12]; ou seja, ao contrário da IEF clássica, dá-se a formação do gradiente de pH e focagem ao mesmo tempo. De início observam-se correntes altas que decrescem ao longo do processo até se atingir um patamar indicador do final da focagem. Depois procede-se à extração das zonas focadas e imóveis do capilar por intermédio de pressão ou por alteração do pH no capilar, de forma a transportá-las até à janela do detector.

Nesta técnica são usados capilares revestidos, com vista a evitar a destruição do gradiente de pH pelo FEO. Uma outra alternativa é o uso de tampões em polímeros altamente viscosos, mais adequada para sistemas de pH elevado.

3.5. Cromatografia Capilar Electrocinética Micelar (MECC)

A Cromatografia Capilar Electrocinética Micelar (MECC) baseia-se na adição de um detergente (ex: Dodecilsulfato de Sódio - SDS) ao electrólito suporte, a uma concentração superior à concentração micelar crítica (CMC). Como as micelas formadas apresentam uma carga negativa, migram a velocidades reduzidas na direcção do ânodo. Quando a velocidade do FEO excede a velocidade absoluta das micelas, estas deslocar-se-ão em direcção ao cátodo. De facto, estamos em presença de duas fases móveis: uma fase hidrofílica aquosa de velocidade superior e uma fase hidrofóbica representada pelas micelas, que se move a velocidade inferior (Figura 5a). Esta variante permite uma separação de solutos neutros (ex: fenóis - Figura 3a [8]) baseada nas diferentes afinidades destes em relação à fase hidrofóbica do interior da micela. A Presença de SDS pode também beneficiar a separação de analitos carregados, devido à adição de um outro conceito de separação baseado nos princípios da cromatografia. No entanto, a sua ligação com as micelas reduz-lhes a velocidade de migração. Deve-se também referir que o alargamento de banda é mínimo devido às altas velocidades de associação e dissociação. ... também possível a separação de compostos neutros por uso de detergentes em concentrações submicelares. Foi implementada a separação de compos-

tos quirais pela adição de componentes quirais a um tampão contendo SDS [9]. Também se usam altas concentrações de ureia e ciclodextrinas para melhorar a solubilidade de compostos aromáticos nos tampões aquosos. Esta técnica portanto apresenta-se com bastantes recursos o que a torna muito versátil e com bastantes aplicações.

3.6. Electroforese Capilar de Gel (CGE)

Na Electroforese Capilar de Gel (CGE) a separação é melhorada pelo enchimento do capilar com um gel polimérico peneirador. A electroforese de gel clássica usava geis como material anti-convectivo de forma a reduzir os alargamentos de banda de origem térmica. Na CGE usa-se esta matriz também como peneira molecular devido aos microporos do gel. Quando se usam geis poliacrilamidas, é possível controlar o tamanho do poro pelo controlo da razão monómero/agente de cruzamento, de forma que o gel pode ser gerado tendo em conta o tamanho das moléculas a analisar.

A CGE tem definitivamente vantagens em relação à electroforese de gel convencional visto que pode produzir separações rápidas se usarmos altas tensões e suportes de reduzido diâmetro, como são os capilares. Assim o efeito térmico não é tão problemático. Apesar das propriedades anti-convectivas do gel, o aquecimento pode sempre produzir a degradação da amostra.

Por outro lado, como o gel possui uma carga intrínseca, este tenderá a mover-se ao longo do capilar durante o processo electroforético, reduzindo a eficiência do processo. Pode-se evitar este último fenómeno ligando covalentemente o gel às paredes do capilar. Deve-se também ter em conta que os geis usados têm de ser transparentes ao comprimento de onda desejado. Um dos exemplos mais flagrantes do seu sucesso foi a separação de fragmentos de DNA com alta resolução [10] (Figura 3b).

3.7. Electrocromatografia (EC)

A Electrocromatografia é talvez a variante menos focada da electroforese capilar, e baseia-se no uso de fases estacionárias de cromatografia líquida (LC) em que o transporte das amostras é feito pelo FEO. Assim o transporte por pressão, usual em LC e que desenvolve um perfil de velocidades parabólico (Figura 2b), é substituído pelo uso dum campo eléctrico que não produz esses alargamentos das bandas da amostra. O perfil de velocidades desenvolvido por este sistema de transporte é plano, independentemente do tipo de empacotamento usado, não havendo os problemas de quedas de pressão em LC e HPLC quando se usam empacotamentos muito densos ou capilares longos. Esta técnica combina assim a alta selectividade do HPLC com a alta eficiência da CE, em que são acoplados no mesmo sistema dois princípios de

separação: por partição entre uma fase estacionária e uma fase móvel, e por electromigração. Ainda não se provaram experimentalmente as vantagens teóricas desta variante; não existe uma redução substancial da altura dos pratos teóricos em relação à HPLC e a detecção já não pode ser feita no capilar de separação como em CE devido ao empacotamento da coluna. Portanto estes sistemas passam a sofrer dos mesmos problemas da micro-HPLC resultantes do acoplamento do detector ao capilar de separação.

4. ELECTROFORESE EM CAPILARES DE SUPERFÍCIE MODIFICADA

O FEO pode ser controlado pela modificação química ou revestimento dinâmico da superfície do capilar. Reduz-se a adsorção dos componentes da amostra e melhora-se a reprodutibilidade da análise.

4.1. Capilares Dinamicamente Modificados

O método mais simples de modificar a superfície de capilares de quartzo é pela adição ao tampão de um componente que se adsorva preferencialmente aos grupos silanol. A camada resultante influencia o FEO e também reduz a adsorção devido à repulsão electrostática ou hidrofóbica. Como se mostra na Figura 5b, o uso de detergentes catiónicos leva à formação de uma dupla camada em que as cargas positivas estão viradas para o interior do capilar, o que resulta na inversão do FEO. Esta técnica permite a separação de aniões de migração rápida quando o campo é também invertido [11].

Quando se inverte o FEO, é possível detectar e determinar simultaneamente os aniões rápidos e lentos numa única análise (Figura 6). É possível a análise de aniões inorgânicos e orgânicos na ordem dos ppm, com detecção UV indirecta. Usa-se o cromato como absorvedor UV e o capilar é revestido com brometo de cetiltrimetilamónio. Deve-se evitar que o detergente se encontre a uma concentração superior à sua concentração micelar crítica.

Também se usam cargas superficiais positivas para a separação de proteínas. A adsorção de proteínas catiónicas é assim evitada pela repulsão electrostática

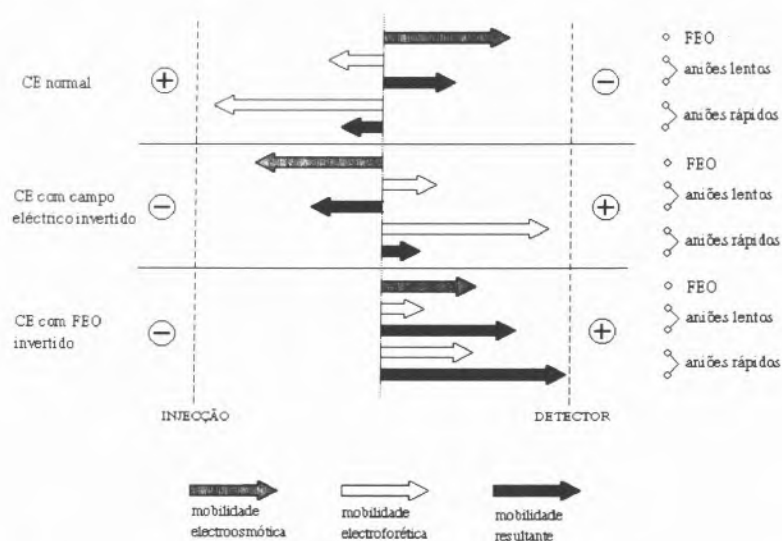


Figura 6: Migração de aniões com FEO normal e invertido.

das paredes revestidas tanto por estes detergentes como por revestimentos com etilenoimina, que pode também formar ligações cruzadas com a superfície.

4.2. Capilares Quimicamente Modificados

Foram usadas as técnicas desenvolvidas para cromatografia gasosa (revestimento polimérico) e métodos usados na modificação das superfícies de gel de sílica (reações de sililação, polimerização superficial) para a modificação química dos capilares de sílica para CE. A Tabela I contém uma lista dos métodos de revestimento mais importantes e as suas áreas principais de aplicação bem como as zonas de estabilidade desses revestimentos.

TABELA I

Apanhado de alguns revestimentos de capilares.

Revestimentos	Zona de pH	Aplicações
<i>Convencionais:</i>		
trimetilsilil	7	moléculas pequenas
trimetilsilil	9	MECC
RP-C8 (n-octilsilil)	9	proteínas
polietilenoglicol	3-5	proteínas
polietileno maltose	3-7	proteínas
<i>Poliméricas:</i>		
poliacrilamida linear até 10	2-8 IEF	proteínas
polietilenimina	3-11	proteínas
1-vinil-2-pirrolidina	2-6	proteínas
polimetilsiloxano (OVI)	7	MECC
polisiloxano / β -ciclodextrina	7	separações quirais

A maior limitação dos revestimentos preparados por silanização é a sua limitada estabilidade a elevados valores de pH.

Uma vantagem do uso de capilares revestidos é a maior constância e reprodutibilidade do seu FEO. A maior área de aplicação de capilares revestidos é, para além da separação de proteínas, o seu uso em Cromatografia Electrocínética Micelar (MECC), onde o FEO tem de ser reduzido para a obtenção de tempos de residência maiores.

5. INSTRUMENTAÇÃO

Os primeiros instrumentos comer-

ciais de electroforese capilar apareceram em 1988, e tem vindo a crescer o número de empresas que fornecem esse tipo de equipamento. A maioria dos instrumentos são bastante similares residindo as maiores diferenças nas formas de introdução da amostra e no número de detectores disponíveis.

Injecção

A injecção da amostra é uma etapa fulcral para o desenvolvimento de análises em CE, principalmente na implementação de ensaios quantitativos. Os volumes de injecção em CE são muito pequenos, entre 10 e 50 nl (comparável aos 10 nl de uma gota de água dispersa no nevoeiro). Assim, teve de se investir bastante no desenvolvimento desses sistemas. Os mais comuns são:

- A. Injecção Hidrodinâmica:
 - i) Pressão;
 - ii) Vácuo;
- B. Injecção Hidrostática (Gravidade),
- C. Injecção Electrocínética;

A. INJECCÃO HIDRODINÂMICA: A injecção hidrodinâmica é uma ferramenta muito versátil e frequentemente usada em CZE, o volume injectado é definido pela lei de Hagen-Poiseuille:

$$V = \Delta P d^4 \pi t / (128 \eta L) \quad (10)$$

onde V é o volume injectado; ΔP é a pressão aplicada, d é o diâmetro do capilar; t é o tempo de injecção, η é a viscosidade do tampão e L é o comprimento total do capilar. O parâmetro mais difícil de obter é ΔP , devido às variações da pressão atmosférica. Comparando com os sistemas de injecção de "loop" fixo comuns em HPLC, esta técnica é potencialmente mais sujeita a variações em diferentes análises e especialmente em dias consecutivos.

B. INJECCÃO HIDROSTÁTICA: A injecção hidrostática é um caso particular das injecções por pressão. Neste caso, a diferença de pressão entre os dois extremos do capilar é produzida pela diferença em altura Δh dos níveis dos líquidos dos dois frascos (inlet e outlet). Se o capilar estiver preenchido com líquido, vai haver um fluxo do nível mais alto (inlet) para o mais baixo (outlet); este fenómeno é denominado de efeito sifão. O volume injectado (V) depende da densidade do electrolito (ρ)

através da equação:

$$V = \rho g \Delta h d^4 \pi t / (128 \eta L) \quad (11)$$

onde g é a constante gravitacional. Esta equação é semelhante à equação (10), em que $\Delta P = \rho g \Delta h$.

C. INJECCÃO ELECTROCÍNÉTICA:

Na injecção electrocinética os analitos são transportados para o capilar pela aplicação de um campo eléctrico. Estes podem entrar no capilar de duas formas:

- Passivamente pelo FEO (moléculas neutras);
- Activamente pela mobilidade electroforética dos iões;

Pode-se definir aproximadamente o volume de injecção (VC) como:

$$VC = (m_{FEF} + m_{FEO}) \pi r^2 Et \quad (12)$$

O volume é diferente para cada analito e leva a uma disposição diferencial dos componentes da amostra na porção injectada; um grande valor de m_{FEO} pode reduzir estas diferenças. No entanto, na prática, o cálculo destes volumes de injecção é muito difícil, porque o seu valor depende da concentração e mobilidade de todos os outros iões do sistema.

* CECUL - Departamento de Química - FCU Lisboa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. F. E. P. Mikkers, F. M. Everaerts, T. P. E. M. Verheggen, *J. Chromatogr.* **169** (1979) 1.
2. F. E. P. Mikkers, F. M. Everaerts, T. P. E. M. Verheggen, *J. Chromatogr.* **169** (1979) 11.
3. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, *Anal. Chem.* **53** (1981) 1298.
4. H. H. Lauer, J. B. Ooms, *Anal. Chem. Acta*, **250** (1991) 45.
5. H. Engelhardt, W. Beck, J. Kohr, T. Schmitt, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **32** (1993) 629.
6. R. J. N. B. da Silva, *Capillary Electrophoresis I*, Lauerlabs B.V., 1993.
7. J. C. Giddings, *Unified Separation Science*, Wiley, New York, 1991.
8. S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, *Anal. Chem.*, **56** (1984) 113.
9. A. Dobashi, T. Ono, S. Hard, J. Yamaguchi, *Anal. Chem.*, **61** (1989) 1984.
10. A. Guttman, A. S. Cohen, D. N. Heiger, B. L. Karger, *Anal. Chem.*, **62** (1990) 137.
11. R. J. N. B. da Silva, M. F. G. F. C. Camões, *Efeito tampão para a separação de aniões em Electroforese Capilar*, XIV Encontro Nacional da S. P. Q., 1994.
12. J. R. Mazzeo, I. S. Krull, *Anal. Chem.*, **63** (1991) 2852.



LABORATÓRIO ACREDITADO

NP 45001

Ensaiois Acreditados:

- Ensaio de Amortecimento do Pêndulo (Köning) - NP 2400
- Determinação do pigmento para blocos de 100µm - NP 684
- Determinação do tempo de escoamento, através de copos de escoamento - EN 535
- Ensaio de dobragem com mandril cónico - pr NP 3353
- Determinação das matérias voláteis e não voláteis - NP 3026
- Determinação da dureza barcol - NP 2121
- Determinação do rendimento de aplicação normal (natural). Aplicação à trincha - pr NP 3632
- Apreciação de aderência. Método da quadricula - NP 1903
- Medição da viscosidade com o viscosímetro de Stormer - NP 234
- Determinação da resistência ao nevoeiro salino neutro - pr NP 3629
- Medição do brilho especular de revestimentos por pintura não metálicos a 20° e 60° - pr NP 3631
- Ensaio de comparação de cor, utilizando o espectrofotómetro no visível - ISO 7727-1/2/3
- Determinação da massa volúmica e do poder de cobertura de uma tinta - NP 256
- Determinação de ensaios mecânicos: tracção, compressão e flexão - NP 1198, 2123, 2217
- Determinação da espessura da película - NP 1884
- Determinação dos tempos de secagem superficial e de endurecimento - Método Interno nº 3
- Determinação do teor em veículo fixo - NP 185
- Ensaio de envelhecimento acelerado, utilizando o aparelho de Q.U.V. - ASTM G 53
- Análise qualitativa por cromatografia em fase gasosa em coluna capilar. Método comparativo. - Método Interno nº 6
- Análise qualitativa por espectroscopia do infravermelho. Método comparativo. Método Interno nº 7
- Análise qualitativa de elementos, com número atómico superior a 11, por espectrofotometria de fluorescência de raios X. - Método Interno nº 8



**LABORATÓRIO
ACREDITADO**

CERTIFICADO N. 94 / L. 113
EMITIDO PELO
INSTITUTO PORTUGUÊS
DA QUALIDADE