

## Conceitos básicos em Eletroforese Capilar

Daniel Alfonso Spudeit, Maressa Danielli Dolzan, Gustavo Amadeu Micke\*

*Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC,  
Campus Universitário Trindade, CP 476, Cep 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil  
e-mail: gustavomicke@qmc.ufsc.br*

### Resumo

Historicamente, o químico sueco Arne Tiselius foi o pioneiro na utilização da Eletroforese como ferramenta de separação, aplicando-a em proteínas presentes no sangue. A Eletroforese Capilar surgiu após décadas de aperfeiçoamento dessa técnica, proporcionando aumento de eficiência e diminuição dos tempos de análise. Sua aplicação é vasta e compreende desde moléculas pequenas e simples, orgânicas e inorgânicas, até moléculas volumosas e complexas, como proteínas e ácidos nucleicos. Essa versatilidade peculiar da Eletroforese Capilar a torna ferramenta promissora para diversas áreas do conhecimento. As metodologias desenvolvidas por essa técnica podem ser auxiliadas e aperfeiçoadas *offline* através de softwares de otimização e simulação, destacando-se o software *Peakmaster*®. O presente artigo irá introduzir ainda aspectos da instrumentação da Eletroforese Capilar, modos de injeção e detecção, bem como fenômenos peculiares da técnica, como o fluxo eletrosmótico.

### Palavras-chave

Eletroforese Capilar; fluxo eletrosmótico; instrumentação; modos de injeção.

## Basic concepts in Capillary Electrophoresis

### Abstract

Historically, the Swedish chemist Arne Tiselius was the first to use Electrophoresis as a separation tool, applying in blood proteins. The Capillary Electrophoresis emerged after decades as an improved technique providing an increase in efficiency and reduced analysis time. Its applications are wide and the range is from small and simple molecules organic and inorganic, to large and complex, as protein molecules and nucleic acids. This peculiar versatility of Capillary Electrophoresis makes it a promising tool for several knowledge areas. The methodologies developed by this technique can be improved offline by optimization and simulation softwares, highlighting the *Peakmaster*® software. This present paper will further introduce Capillary Electrophoresis instrumental aspects, injection modes and detection, as well as peculiar phenomena of technique, as electroosmotic flow.

### Keywords

Capillary Electrophoresis; electroosmotic flow; instrumentation; injection modes.

## 1 Introdução

A palavra eletroforese é originada do grego *electro*, eletricidade; *phóresis*, transporte. Assim, a técnica de eletroforese é definida como uma técnica de separação baseada na diferença de migração de compostos iônicos ou ionizáveis na presença de um campo elétrico. Historicamente, a eletroforese foi apresentada pela primeira vez pelo químico sueco Arne Tiselius<sup>[1]</sup> em sua tese intitulada “*The Moving Boundary Method to Study the Electrophoresis of Proteins*”, publicada em 1930. A ideia surgiu pela necessidade de separar as diversas proteínas que estavam sendo descobertas desde o início do século XX, tornando possíveis estudos aprofundados acerca de cada proteína. O trabalho pioneiro envolveu a separação das proteínas presentes no plasma sanguíneo<sup>[2]</sup>.

Ao longo dos anos, a Eletroforese foi sendo aperfeiçoada de forma a se obter uma maior eficiência e diminuição dos efeitos térmicos provenientes da aplicação de um campo elétrico<sup>[2]</sup>. Com esta finalidade, o avanço instrumental das técnicas de eletroforese permitiu a introdução de colunas capilares no sistema eletroforético, e esta foi denominada Eletroforese Capilar (CE, do inglês *Capillary Electrophoresis*).

A primeira tentativa de realizar separação em tubos com pequenos diâmetros internos surgiu em 1967, quando Hjertén realizou a separação em tubos com diâmetro interno (d.i.) de 300  $\mu\text{m}$ . Porém, foi apenas após a publicação de Jorgenson e Lukacs em 1981<sup>[3]</sup> que a técnica começou a ser reconhecida. Este trabalho, publicado no *Journal of Analytical Chemistry*, demonstrou a capacidade da realização de separações em capilares com diâmetro interno reduzido, combinado com a aplicação de altas voltagens, resultando em um aumento de eficiência e de resolução e diminuição dos tempos de análise.

O uso do capilar oferece muitas vantagens sobre os outros meios utilizados para eletroforese (placas de gel, papel, etc). Devido a fatores geométricos (a relação entre a área superficial interna e o volume é apreciavelmente grande), um capilar possibilita a dissipação eficiente do calor gerada pela passagem da corrente elétrica (efeito Joule). Além disso, a alta resistência elétrica do capilar permite o estabelecimento de campos elétricos elevados (100-1000  $\text{V cm}^{-1}$ ), resultando em separações de alta eficiência (geralmente excede  $10^5$  pratos) e tempos de análise apreciavelmente curtos. Outras vantagens da Eletroforese Capilar são a pequena demanda de amostra, volumes tipicamente da ordem de 1 a 10 nL e a possibilidade de injeção e detecção em fluxo<sup>[1,4]</sup>.

Comparando com os demais métodos de separação como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) e Cromatografia Gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*), a CE é considerada uma técnica analítica recente e vem ganhando cada vez mais atenção na comunidade científica, bem como no controle de qualidade de produtos e monitoramento de processos industriais. Uma das razões para a sua crescente utilização é sua gama de aplicações. A princípio, a técnica ficou conhecida apenas pela separação de macromoléculas biológicas. No entanto, o avanço dos equipamentos permitiu aos pesquisadores do mundo todo demonstrar o potencial da Eletroforese Capilar na separação de moléculas pequenas e diversas como aminoácidos<sup>[5]</sup>, fármacos quirais<sup>[6]</sup>, vitaminas<sup>[7]</sup>, pesticidas<sup>[8]</sup>, íons inorgânicos<sup>[9]</sup>, etc. Além da sua utilização na separação e determinação quantitativa de inúmeros analitos, a CE permite estudar cinéticas de reações e interações intermoleculares, no modo *online* e *offline*, auxiliando na elucidação destes mecanismos e obtenção de constantes de

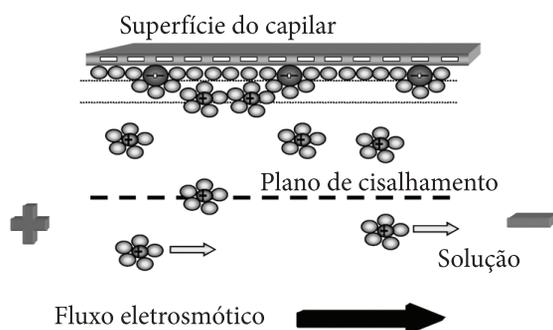
associação<sup>[10,11]</sup>. A técnica apresenta-se útil e promissora para diversos campos da ciência, mas destacam-se as vertentes da Química, Ciências Forenses, e a Biologia Molecular.

Além da vasta aplicação da CE, outras características da técnica a tornam bastante viável, como, por exemplo, o baixo custo analítico (destacando-se o baixo custo das colunas capilares, algo em torno de U\$ 5,00 a U\$ 20,00), a simplicidade na operação e no manuseio, o tempo de execução das metodologias desenvolvidas, além da redução significativa nas quantidades de reagentes e solventes orgânicos utilizados, quando comparada à técnica de HPLC. O solvente mais utilizado em CE é água, e sempre em volumes muito pequenos (poucos mililitros), gerando quantidade mínima de resíduo e toxicidade. Por estas razões, dentre as técnicas de separação, a Eletroforese Capilar é a que mais bem se enquadra nos parâmetros da Química Verde.

## 2 Fundamentos teóricos

### 2.1 Fluxo eletrosmótico

A utilização de capilares de sílica fundida na execução da técnica introduziu uma importante peculiaridade: a geração do chamado fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês *Electroosmotic Flow*), como mostra a Figura 1.



**Figura 1** Ocorrência do fluxo eletrosmótico.

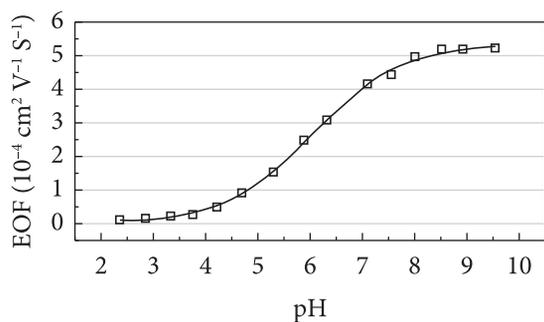
O fluxo eletrosmótico é consequência de uma interação entre a solução e a superfície interna do capilar. Quimicamente, a sílica fundida é caracterizada pela presença de vários tipos de grupos silanóis ( $-\text{SiOH}$ ), os quais apresentam um caráter ácido. Em contato com o meio aquoso, alguns desses grupos são ionizados, e com isso, a superfície do capilar torna-se negativamente carregada. Quando um campo elétrico é imposto tangencialmente à superfície, forças elétricas causam um movimento unilateral de íons em direção ao eletrodo de carga oposta. Durante a migração, os íons transportam moléculas de água, induzindo o fluxo da solução como um todo em direção ao cátodo (pólo negativo). Este modo é conhecido como fluxo eletrosmótico normal<sup>[1]</sup>. A velocidade do EOF pode ser definida pela Equação 1.

$$V_{EOF} = \left( \frac{\epsilon \zeta}{\eta} \right) E \quad (1)$$

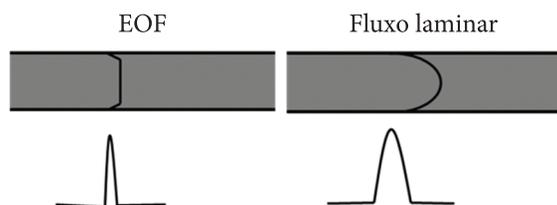
onde  $\epsilon$  é a constante dielétrica;  $\eta$  é a viscosidade do eletrólito;  $E$  é o campo elétrico aplicado e  $\zeta$  é o potencial zeta medido entre plano de cisalhamento e a interface líquido-sólido.

O potencial zeta é essencialmente determinado pela carga na superfície do capilar. Como a ionização dos grupos silanóis são dependentes do pH, temos que a magnitude do EOF varia com o pH. Para valores de pH mais elevados onde os grupos silanóis estão mais desprotonados, a magnitude do EOF é maior que em valores de pH menores, onde os grupos silanóis estão menos ionizados (Figura 2)<sup>[12]</sup>.

Uma característica do EOF é seu perfil radial, o que permite que o componente velocidade seja adicionado a todos os analitos de forma homogênea, independente da posição radial do analito. Essa característica permite separações com maiores eficiências, distinguindo a CE dos métodos cromatográficos em fase líquida em coluna, que apresentam um perfil de velocidade parabólico, característico do fluxo gerado por pressão (Figura 3)<sup>[13]</sup>.



**Figura 2** Variação da mobilidade do fluxo eletrosmótico em função da variação do pH em um capilar de sílica fundida. Legenda: EOF, fluxo eletrosmótico.



**Figura 3** Perfil de velocidade do fluxo radial (eletrosmótico – EOF) e laminar (pressão).

Em condições normais, o fluxo é proveniente do ânodo (eletrodo de carga positiva) para o cátodo (eletrodo de carga negativa). Os ânions são levados em direção ao cátodo nos casos em que a magnitude do EOF é maior que a magnitude da sua mobilidade efetiva. Assim, cátions, ânions e moléculas neutras podem ser analisados em uma única corrida. Porém, não haverá distinção das moléculas neutras quando houver mais de uma destas<sup>[14]</sup>.

O EOF pode ser reduzido ou até mesmo invertido. A redução do EOF ocorre com a alteração dos valores de pH para faixas mais ácidas, onde os grupos silanóis estão menos ionizados. Outra alternativa é utilizar aditivos catiônicos no eletrólito de corrida que interajam com a superfície do capilar, de forma a reduzir a carga negativa dessa superfície. Já a inversão do fluxo pode ocorrer também pela adição de componentes no eletrólito, como surfactantes, ou pela modifica-

ção da superfície interna do capilar, que pode ser dinâmica ou permanente, através da adsorção ou alteração química da sílica, respectivamente<sup>[15]</sup>.

A separação das espécies por eletroforese se dá pela diferença da velocidade do soluto na presença de um campo elétrico. A velocidade eletroforética de um determinado íon pode ser definido pela Equação 2.

$$V_{ep} = \mu_{ep} E \quad (2)$$

onde  $V_{ep}$  é a velocidade do eletroforética,  $\mu_{ep}$  é a mobilidade eletroforética e  $E$  é o campo elétrico aplicado<sup>[13]</sup>.

Todo íon em solução possui uma mobilidade que é característica para cada íon. Essa mobilidade, também conhecida como mobilidade eletroforética ( $\mu_{ep}$ ), é determinada pela força elétrica que as espécies ionizadas, moléculas ou partículas, sofrem, balanceada com as forças de fricção geradas pela passagem das espécies pelo meio. Para um determinado íon, sua mobilidade eletroforética pode ser determinada através da Equação 3<sup>[13-14]</sup>.

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (3)$$

onde  $q$  é a carga do íon,  $\eta$  é a viscosidade da solução e  $r$  é o raio iônico.

Com base na Equação 3, é evidente que espécies menores e mais carregadas possuem mobilidades elevadas. Por outro lado, espécies com maiores raios iônicos e menos carregadas possuem valores baixos de mobilidade. As mobilidades eletroforéticas são determinadas no ponto em que o soluto está completamente ionizado ( $\alpha = 1$ ) e extrapoladas para diluição infinita<sup>[1]</sup>.

Espécies que se comportam como ácidos ou bases fracas apresentam, no equilíbrio, duas espécies: uma neutra, com mobilidade nula, e outra iônica, que possui mobilidade que passa agora a ser chamada de mobilidade efetiva ( $(\mu)_{ef}$ ) e pode ser obtida através da Equação 4.

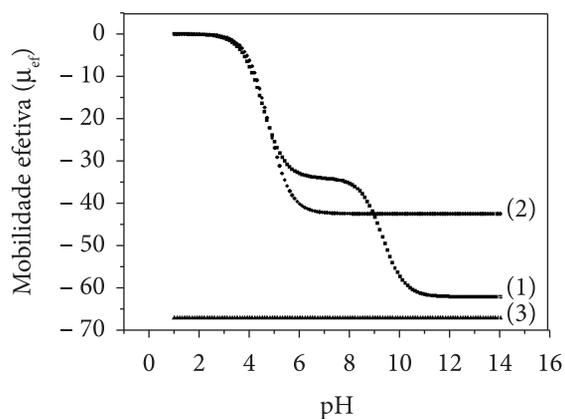
$$\mu_{ef} = \alpha_i \cdot \mu_e \quad (4)$$

onde  $\alpha_i$  é o grau de ionização de uma determinada molécula.

Como o grau de ionização pode ser definido pelo pKa do soluto, a mobilidade efetiva é altamente dependente do pH e da composição do eletrólito de corrida. O efeito da variação do pH na mobilidade efetiva pode ser observado na Figura 4, onde temos um gráfico de mobilidade efetiva *versus* pH para o ácido p-hidroxibenzoico ( $pK_{a1}$  4,53 e  $pK_{a2}$  9,31), ácido acético ( $pK_a$  4,75) e ácido clorídrico.

Observando-se o gráfico de curva de mobilidade podemos perceber que para os ácidos p-hidroxibenzoico e acético, a mobilidade efetiva varia consideravelmente com a variação do pH. Isso ocorre pelo fato destes serem eletrólitos fracos. Por sua vez, o ácido clorídrico em solução é um eletrólito forte, ou seja, sua ionização será completa. Sendo assim, o íon cloreto não sofre variação de mobilidade efetiva com o pH.

A combinação vetorial do fluxo eletrosmótico e a mobilidade do analito resulta na mobilidade aparente do composto.



**Figura 4** Curva de mobilidade para o ácido p-hidroxibenzoico (1), ácido acético (2) e ácido clorídrico (3).

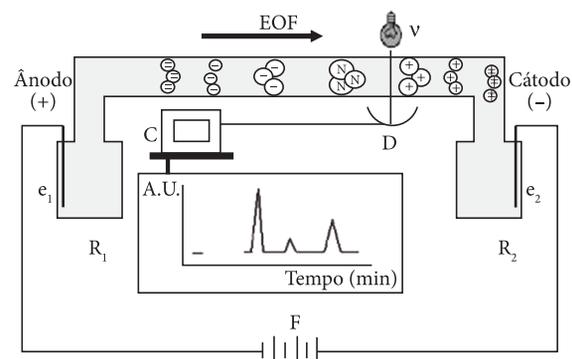
### 3 Instrumentação

Uma característica fundamental da CE é sua simplicidade instrumental. Uma representação esquemática de um equipamento de Eletroforese Capilar é demonstrada na Figura 5.

Basicamente, um equipamento de CE consiste em um sistema de injeção, uma coluna capilar onde ocorre a separação, uma fonte de alta tensão, representada por F na Figura 5 (que opera com voltagens até 30 kV), um par de eletrodos ( $e_1$  e  $e_2$ ), um detector (D) e um computador (C) para obtenção e tratamento dos dados<sup>[13,14]</sup>.

A fonte de alta tensão é conectada, por meio dos eletrodos, aos reservatórios que contém o eletrólito adequado ( $R_1$  e  $R_2$ ). Os capilares preenchidos com eletrólito ajudam a manter o contato elétrico, funcionando como um canal de migração.

Para minimizar os efeitos gerados pelo aquecimento, os capilares devem ser mantidos à temperatura constante, mantida principalmente através da circulação de líquidos ou de ar.



**Figura 5** Esquema ilustrativo de um equipamento de Eletroforese capilar. Onde  $R_1$  e  $R_2$ ,  $e_1$  e  $e_2$  são os reservatórios e eletrodos, respectivamente. F representa a fonte de alta tensão, D é o detector, C é o computador para obtenção dos dados e EOF representa o fluxo eletrosmótico, que é gerado após ser aplicado o potencial<sup>[16]</sup>.

### 3.1 Capilares

Em geral, os capilares utilizados em CE são abertos, constituídos de sílica fundida e revestidos externamente com polímeros que fornecem flexibilidade e resistência, geralmente polii-mida ou poliacrilato. Dependendo do modo de detecção, é necessária uma “janela de detecção” no capilar, que seria um pequeno seguimento ausente destes polímeros, já que estes absorvem luz em comprimentos de onda que podem prejudicar ou tornar impossível a detecção dos analitos. A janela de detecção é feita num comprimento específico do capilar através da remoção do polímero, geralmente realizada por calor. Os capilares utilizados em eletroforese apresentam tamanhos que variam de 10 a 100 cm, mais comumente se utilizam comprimentos de 25-75 cm e diâmetros internos entre 25 e 75  $\mu\text{m}$ , embora possam ser encontrados capilares comerciais de 10 a 200  $\mu\text{m}$  de d.i.<sup>[14]</sup>.

### 3.2 Modos de injeção da amostra

Em CE, as amostras podem ser introduzidas por injeção hidrodinâmica ou eletrocinética. A injeção hidrodinâmica é feita aplicando-se uma diferença de pressão que se estabelece entre o reservatório do eletrólito e o capilar. O volume da amostra injetada depende do tamanho do capilar, da viscosidade da amostra e da diferença de pressão usada, e apresenta-se na ordem de nanolitros (1-50 nL). O volume ( $V_i$ ) de injeção pode ser calculado através da Equação 5.

$$V_{inj} = \frac{\Delta P d^4 \pi t_{inj}}{128 \eta L} \quad (5)$$

onde  $\Delta P$  é a pressão aplicada no capilar,  $d$  é o diâmetro interno do capilar,  $t$  é o tempo em que a pressão é aplicada,  $\eta$  é a viscosidade da amostra e  $L$  é o comprimento total do capilar. Por exemplo, em uma injeção de uma solução aquosa a 25 °C

por 3 segundos, aplicando-se uma pressão de 50 mbar em um capilar de 70 cm de comprimento total e diâmetro interno de 50  $\mu\text{m}$ , o volume corresponde a aproximadamente 3,7 nL e o comprimento seria igual a 1,9 mm<sup>[14]</sup>.

A injeção hidrodinâmica em CE permite ser realizada individualmente ou em sequência, sendo denominada de injeção simples e injeções múltiplas, respectivamente. Esta última vem sendo demonstrada em trabalhos publicados principalmente na última década, tanto em metodologias para determinação quantitativa de analitos, quanto para metodologias empregadas em estudos de interação intermoleculares<sup>[17,18]</sup>. A principal vantagem em se utilizar o modo de injeções múltiplas é o aumento da frequência analítica do método, ou seja, a possibilidade de um maior número de análises num dado intervalo de tempo<sup>[18,19]</sup>.

O segundo modo de injeção mais comum em CE é a eletrocinética ou por eletromigração. Neste caso, a amostra é introduzida através da aplicação de uma tensão elétrica. A quantidade injetada pode ser calculada através da Equação 6.

$$Q = \frac{(\mu_{ep} + \mu_{eo}) V \pi r^2 C t_{inj}}{L} \quad (6)$$

onde  $\mu_e$  é a mobilidade eletroforética do analito,  $\mu_{EOF}$  é a mobilidade do fluxo eletrosmótico,  $V$  é a voltagem,  $r$  é o raio interno do capilar,  $C$  é a concentração do analito,  $t_{inj}$  é o tempo de injeção e  $L$  é o comprimento total do capilar.

Assim sendo, a quantidade de amostra injetada no capilar será dependente da mobilidade eletroforética de cada analito, o que pode acarretar discriminação entre espécies iônicas de maior e menor mobilidade. Este fato pode ser limitante deste tipo de injeção, bem como uma forma de injeção seletiva. A injeção eletrocinética é sim-

ples, não requer nenhum equipamento adicional e é vantajosa quando utilizada em amostras com maior viscosidade<sup>[1,2]</sup>.

### 3.3 Detectores

A Tabela 1 apresenta de forma resumida os detectores mais comuns em CE e seus limites de detecção característicos.

Muitos dos detectores utilizados em CE são também empregados em HPLC. Em ambas as técnicas, o detector de absorvância no ultravioleta/visível (UV-Vis) é o mais utilizado<sup>[13]</sup>. No entanto o espectrômetro de massas (MS, do inglês *Mass Spectrometer*) apresenta-se universal e altamente seletivo.

De um modo geral, para a escolha de um detector adequado o analista deve atentar-se primeiramente ao fato dos compostos separados apresentarem características que permitam que sejam detectados pelo método selecionado. Assim como em HPLC, outros fatores devem ser levados em consideração na escolha do modo de detecção, tais como sensibilidade, seletividade, faixa linear e a capacidade de fornecer dados quantitativos<sup>[14]</sup>.

No caso de CE equipada com detector UV-Vis, a técnica tem sua sensibilidade prejudicada com relação ao mesmo modo de detecção em HPLC. Isso se deve ao reduzido caminho óptico, cujo diâmetro do capilar é da ordem de  $\mu\text{m}$ . Para detectores deste tipo, a absorvância

do analito respeita a Lei de Lambert Beer,  $Abs = b.C.\epsilon$ , onde  $Abs$  é a resposta em absorvância,  $b$  é o caminho óptico,  $C$  é a concentração molar e  $\epsilon$  é a absorvância molar do analito. Por este motivo, o feixe óptico deve ser bem focalizado no capilar, de forma a minimizar a dispersão da luz<sup>[13,14]</sup>.

#### 3.3.1 Modos de detecção no UV-Vis: direto e indireto

O modo de detecção direto é comumente utilizado e é adequado quando as espécies a serem determinadas apresentam absorção na região do ultravioleta e/ou visível. Nesse caso, normalmente são utilizados como eletrólito de corrida compostos que não apresentam absorção nessa região. Assim sendo, o tamanho do pico referente é dependente da Lei de Lambert Beer, como descrito anteriormente<sup>[4,14,20]</sup>.

Já a detecção indireta é aplicada com sucesso em Eletroforese Capilar para analitos que não apresentam absorção no UV-Vis, ou apresentam absorção pouco intensa. Neste modo, faz-se uso de um cromóforo no eletrólito de corrida, ou seja, um dos componentes do eletrólito deve apresentar absorção na região UV-Vis. Os compostos que são normalmente analisados utilizando-se esse tipo de detecção são cátions e ânions inorgânicos, ácidos carboxílicos, aminoácidos e aminas de cadeia curta<sup>[4]</sup>.

**Tabela 1** Detectores mais comuns usados em Eletroforese Capilar.

Modo de detecção	Limite de detecção <sup>1</sup>
UV-Vis	$10^{-5}$ - $10^{-7}$
Fluorescência (LIF)	$10^{-13}$ - $10^{-16}$
Espectrometria de Massas (MS)	$10^{-8}$ - $10^{-10}$
Amperométrico	$10^{-7}$ - $10^{-10}$
Conducométrico	$10^{-7}$ - $10^{-9}$

<sup>1</sup>Concentração em mol L<sup>-1</sup>.

## 4 Modos de operação em Eletroforese Capilar

Durante as décadas passadas, a Eletroforese Capilar e suas muitas variantes, tal como a Cromatografia Eletrocínética Micelar (MEKC, do inglês *Micellar Electrokinetic Chromatography*), Eletroforese Capilar em Gel (CGE, do inglês *Capillary Gel Electrophoresis*), Cromatografia Eletrocínética (EKC, do inglês *Electrokinetic Chromatography*), Isotacoforese Capilar (CITP, do inglês *Capillary Isotachopheresis*) e Eletroforese Capilar em Solução Livre (FSCE, do inglês *Free Solution Capillary Electrophoresis*), têm se demonstrado como técnicas de grande poder de separação<sup>[14,21,22]</sup>.

### 4.1 Cromatografia Eletrocínética Micelar (MEKC)

A cromatografia eletrocínética micelar se aplica principalmente à análise de compostos neutros. Neste mecanismo de separação é baseada na partição diferenciada dos solutos entre a fase móvel e uma “pseudo-fase” composta por micelas, cuja mobilidade efetiva é uma resultante da mobilidade do fluxo eletrosmótico e da mobilidade da própria micela.

### 4.2 Eletroforese Capilar em Gel (CGE)

Essa técnica é usada para a separação de compostos, principalmente proteínas e ácidos nucleicos, por diferenças de tamanho relativo. A separação é obtida preenchendo-se um capilar com uma matriz polimérica. A maior vantagem sobre a clássica eletroforese em placas é a obtenção de resultados quantitativos mais exatos, tempo de análise mais curtos e a possibilidade de automação do processo.

### 4.3 Cromatografia Eletrocínética Capilar (CEC)

A CEC é uma técnica recente de separação que combina as vantagens da cromatografia líquida de alta eficiência com a Eletroforese Capilar. Nesta técnica, o transporte de solvente (fase móvel) é feito através do fluxo eletrosmótico ao longo da coluna. Os capilares utilizados para esse tipo de separação são recheados com uma fase estacionária, como C18 (octadecilsílica).

### 4.4 Isotacoforese Capilar (CITP)

A Isotacoforese Capilar é uma técnica em que são empregados dois tipos de eletrólito e os solutos ficam confinados entre duas regiões compostas por estes eletrólitos. O primeiro eletrólito, que apresenta mobilidade eletroforética maior que todos os componentes da amostra, é chamado de eletrólito líder. O segundo, que apresenta mobilidade eletroforética menor que todos os componentes da amostra, é conhecido como eletrólito terminador. Quando o potencial é aplicado, cria-se um estado estacionário no qual as zonas dos analitos migram em ordem decrescente de mobilidade, mas com velocidade constante e única. Outro aspecto importante é que todas as zonas adotam a concentração do eletrólito líder. Desse modo, esse fenômeno pode ser utilizado para concentração de amostras no interior do capilar.

### 4.5 Eletroforese Capilar em solução livre (FSCE)

Também denominado Eletroforese Capilar de Zona (do inglês *Capillary Zone Electrophoresis*), é o modo de operação em CE mais utilizado pelos analistas. Neste modo, a amostra é injetada dentro da coluna capilar previamente preenchida com o eletrólito de corrida,

e o potencial é aplicado gerando um campo elétrico, fazendo com que os solutos migrem dentro do capilar em zonas distintas. Dessa forma, os solutos são separados de acordo com as diferentes mobilidades efetivas resultantes da composição entre as mobilidades eletroforéticas e a mobilidade eletrosmótica.

#### 4.5.1 Simulação de Eletroforese Capilar em solução livre

A ferramenta que se destaca para otimização e simulação de FSCE é o software *Peakmaster*<sup>[27]</sup>. Vale reconhecer que a Eletroforese Capilar no modo FSCE é o único, dentre todos os métodos de separação, que pode apresentar simulação completa da separação.

Para utilização do software é necessário que sejam conhecidos os valores de mobilidade iônica e  $pK_a$  dos componentes da análise. Estes dois parâmetros físico-químicos são, na verdade, as informações preliminares mais úteis quando se deseja desenvolver um método por CE. Quando se pretende utilizar softwares de otimização e/ou simulação, são fundamentais.

Conhecidos esses parâmetros, é possível construir curvas de mobilidade efetiva versus pH. A partir dela são obtidas informações como pH ótimo e componentes do eletrólito de corrida adequados para a análise.

O software *Peakmaster*<sup>®</sup> foi desenvolvido por Bob Bohuslav Gaš<sup>[27-29]</sup> e fornece características relevantes, como pH, força iônica, condutividade e capacidade tamponante do eletrólito de corrida já estabelecido, bem como eletrodispensão dos analitos (EMD, do inglês *Electromigration Dispersion*) que acarreta alargamento dos picos e mobilidades efetivas dos componentes da análise nas condições determinadas. Detecção indireta e detecção por condutividade também podem ser simulados pelo software<sup>[23,25]</sup>.

## 5 Conclusões

Dentre as técnicas analíticas de separação, a Eletroforese Capilar é considerada a mais recente e, de fato, ainda não está inserida nas comunidades acadêmicas, bem como em indústrias, tanto quanto as técnicas cromatográficas. No entanto, vem crescendo exponencialmente o interesse pela técnica. Isto se deve principalmente a características como baixo custo operacional, abrangência das análises (versatilidade), simplicidade instrumental, tempo e quantidades e toxicidade de reagentes e resíduos extremamente reduzidos se comparados às técnicas de HPLC e CG. Por outro lado, a CE necessita de investigações e aperfeiçoamento para melhoria de sensibilidade e reprodutibilidade das análises. De fato, a técnica é extremamente versátil, porém apresenta-se como complemento às técnicas de separação, assim como as demais. Quando se deseja fazer uma análise específica, é necessário uma escolha criteriosa da técnica adequada, e para isto deve-se considerar seletividade, sensibilidade, robustez, tempo, quantidade de reagentes e amostras disponíveis, concentração de analito, custo, quantidade de resíduo, e outros. A relevância de cada um destes fatores irá depender do objetivo da análise que se deseja e das condições as quais se encontram. A CE apresenta diversos modos de operação e cada um é adequado para sistemas determinados. No modo CZE é possível otimizar metodologias com auxílio de softwares de otimização e simulação, destacando o simulador *Peakmaster*<sup>®</sup>, desenvolvido por Gaš et al.<sup>[23]</sup>. No mais, todos utilizam a mesma instrumentação, exceto a eletrocromatografia capilar, em que a coluna capilar se difere pelo empacotamento.

Análises de moléculas pequenas, como fármacos, vitaminas, aminoácidos, íons inorgânicos, etc, são possíveis de ser realizadas por CE, bem como moléculas maiores, como polímeros, proteínas e ácidos nucleicos. Além disso, estudos

cinéticos e de interação para cálculos de constantes de ligação também vêm sendo realizados exaustivamente por pesquisadores de todo o mundo, demonstrando-se uma ferramenta útil para diversas áreas do conhecimento.

O sistema da CE permite modificação de diversos parâmetros, como os exemplos citados ao longo do texto, modificação interna do capilar e múltiplas injeções.

## Referências

- 1 Tavares MFM. Eletroforese Capilar: conceitos básicos. *Química Nova* 1996; 19(2):173.
- 2 Tagliaro F, Manetto G, Crivellente F, Smith FP. A brief introduction to capillary electrophoresis. *Forensic Science International* 1998; 92(2-3):75-88. [http://dx.doi.org/10.1016/S0379-0738\(98\)00010-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0379-0738(98)00010-3)
- 3 Jorgenson JW, Lukacs KD. Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass-Capillaries. *Analytical Chemistry* 1981; 53(8): 1298-1302. <http://dx.doi.org/10.1021/ac00231a037>
- 4 Micke GA. *Otimização e simulação em eletroforese capilar* [tese]. São Paulo: Instituto de Química, Universidade de São Paulo; 2004. 311 p.
- 5 Manaenkov OV, Sidorov AI, Sul'man EM. Rapid determination of amino acids by capillary electrophoresis without preliminary derivatization. *Journal of Analytical Chemistry* 2003; 58(10):979-82. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1026140003197>
- 6 Prokhorova AF, Shapovalova EN, Shpigun OA. Chiral analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis using antibiotics as chiral selectors. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2010; 53(5):1170-9. PMID:20675089. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2010.07.005>
- 7 Franco M, Jasionowska R, Salvatore E. Application of CZE Method in Routine Analysis for Determination of B-Complex Vitamins in Pharmaceutical and Veterinary Preparations. *International journal of analytical chemistry* 2012; 2012:592. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/592650>
- 8 Chen GH, Sun J, Dai YJ, Dong M. Determination of nicotinyl pesticide residues in vegetables by micellar electrokinetic capillary chromatography with quantum dot indirect laser-induced fluorescence. *Electrophoresis* 2012. 33(14):2192. PMID:22821497. <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201200043>
- 9 Piovezan M, Costa ACO, Jager AV, Oliveira MAL, Micke GA. Development of a fast capillary electrophoresis method to determine inorganic cations in biodiesel samples. *Analytica Chimica Acta* 2010; 673(2):200-5. PMID:20599036. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaca.2010.05.031>
- 10 Jiang CX, Armstrong DW. Use of CE for the determination of binding constants. *Electrophoresis* 2010; 31(1):17-27. PMID:20039286. <http://dx.doi.org/10.1002/elps.200900528>
- 11 El-Hady D, Kühne S, El-Maali N, Wätzig H. Precision in affinity capillary electrophoresis for drug-protein binding studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2010; 52(2): 232-41. PMID:20080373. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2009.12.022>
- 12 Gervasio APG, Lavorante AF, Moraes MCB, Giné MF, Miranda CES, Carrilho E. *Eletroforese capilar acoplada à espectrometria com plasma: uma ferramenta eficiente para a especificação*. *Química Nova* 2003; 26(1):65-74. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422003000100013>
- 13 Landers JP. *Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press; 2008. vol. 21, 1567 p., 6 p. of plates.
- 14 Gaš B. *High Performance Capillary Electrophoresis - A primer*. Agilent Technologies; 2009. 182 p.
- 15 Zhang Y, Gomez FA. Multiple-step ligand injection affinity capillary electrophoresis for determining binding constants of ligands to receptors. *Journal of Chromatography A* 2000; 897(1-2):339.
- 16 Vitali L, Horst BL, Heller M, Fávere VT, Micke GA. Using multiple short-end injections to develop fast electrophoretic separations-Applications in iodide analysis. *Journal of Chromatography A* 2011; 1218(28):4586-91. PMID:21621785. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.04.084>
- 17 Geiser L, Rudaz S, Veuthey JL. Decreasing analysis time in capillary electrophoresis: Validation and comparison of quantitative performances in several approaches. *Electrophoresis* 2005; 26(12):2293-2302. PMID:15895467. <http://dx.doi.org/10.1002/elps.200410242>
- 18 Simpson SL, Quirino JP, Terabe S. On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis Fundamentals and applications. *Journal of Chromatography A* 2008; 1184(1-2):504-41. PMID:18035364. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.11.001>

- 19 Vitali L, Favere VT, Micke GA. A new method to determine biological sample volume by short end multiple injection capillary electrophoresis: Application in determination of nitrate and thiocyanate in human saliva. *Journal of Chromatography A* 2011; 1218(16):2327-33. PMID:21397240. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.035>
- 20 Lucy CA, MacDonald AM, Gulcev MD. Non-covalent capillary coatings for protein separations in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 2008. 1184(1-2):81-105. PMID:18164023. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.114>
- 21 Kuhr WG, Monnig CA. Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry* 1992; 64(12): R389-R407. <http://dx.doi.org/10.1021/ac00036a021>
- 22 Monnig CA, Kennedy RT. Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry* 1994; 66(12):R280-R314. <http://dx.doi.org/10.1021/ac00084a013>
- 23 Gaš B, Coufal P, Jaroš M, Muzikář J, Jelínek I. Optimization of background electrolytes for capillary electrophoresis I. Mathematical and computational model. *Journal of Chromatography A* 2001; 905(1-2):269-79. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00983-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00983-3)
- 24 Štědrý M, Jaroš M, Gaš B. Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis - I. System eigenpeaks and resonance in systems with strong electrolytes. *Journal of Chromatography A* 2002; 960(1-2):187-98. PMID:12150556. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00239-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00239-X)
- 25 Štědrý M, Jaroš M, Včeláková K, Gaš B. Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: II. Eigenpeaks in univalent weak electrolytes. *Electrophoresis* 2003; 24(3):536-47. PMID:12569543. <http://dx.doi.org/10.1002/elps.200390061>

---

Recebido: 10/09/2012

Aceito: 31/10/2012