



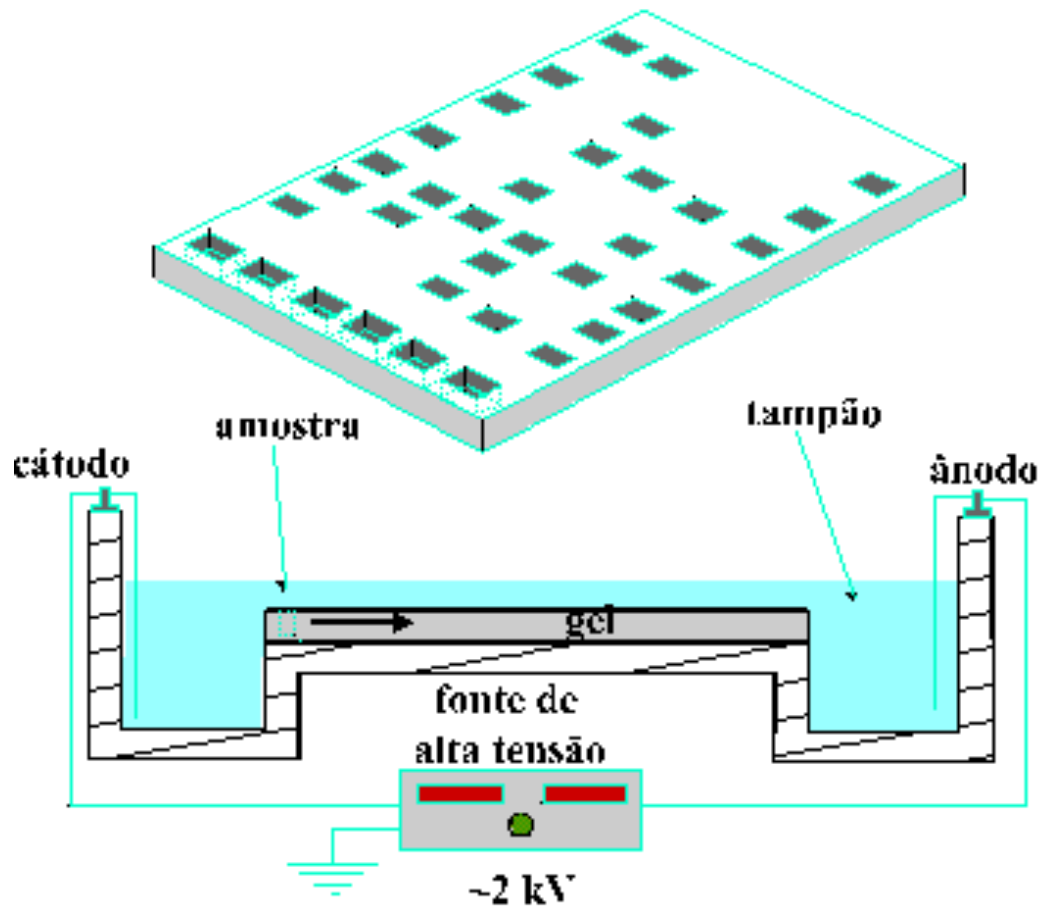
Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos



Eletroforese Capilar

Prof. Dr. Emanuel Carrilho
emanuel@iqsc.usp.br

ELETROFORESE EM GEL



Características da Eletroforese em Gel Clássica



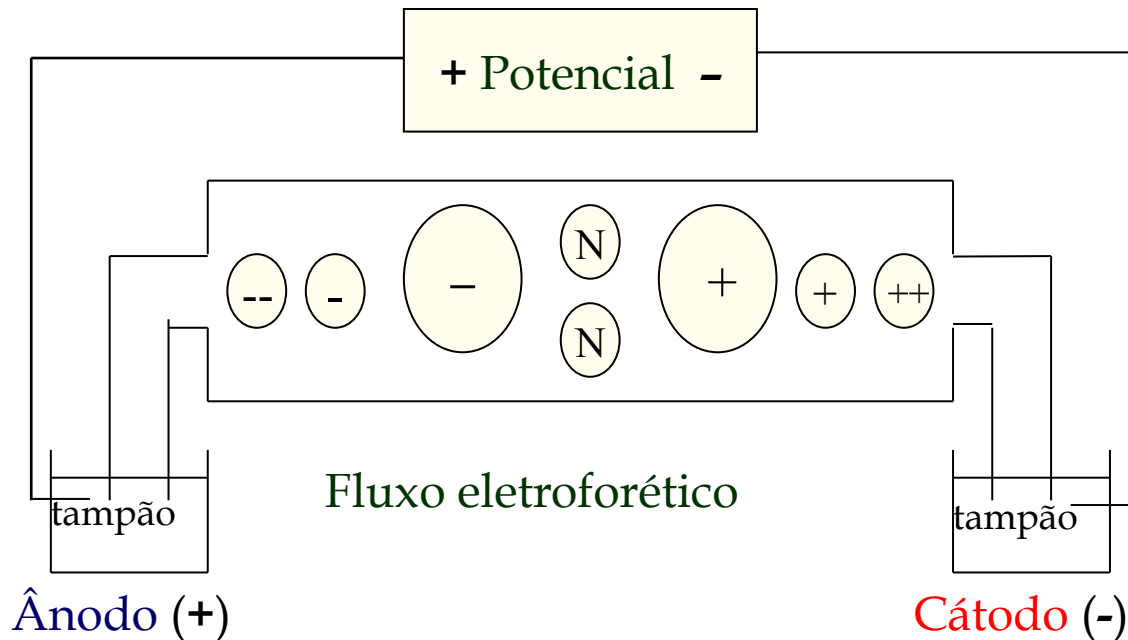
- analisa paralelamente várias amostras
- aparelhagem simples e barata
- alta capacidade de amostra

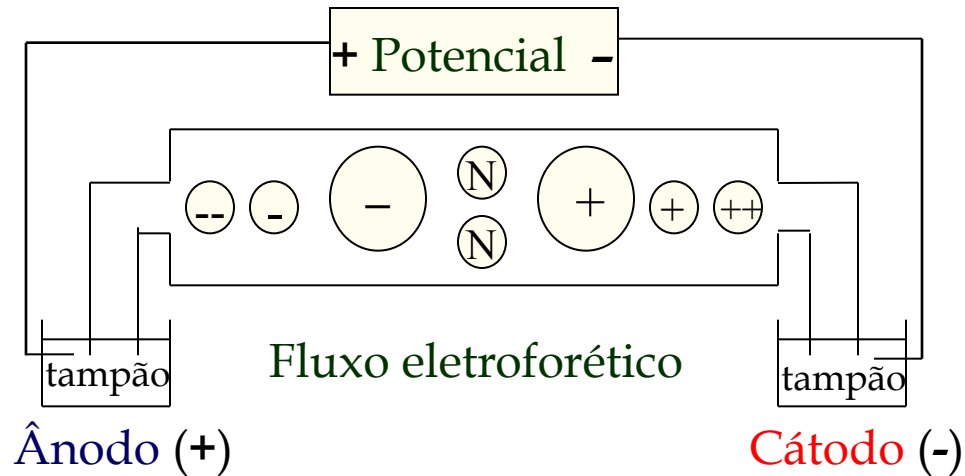


- análises demoradas ($E \cong 20\text{V/cm}$)
- quantificação pobre
- baixa sensibilidade

INTRODUÇÃO

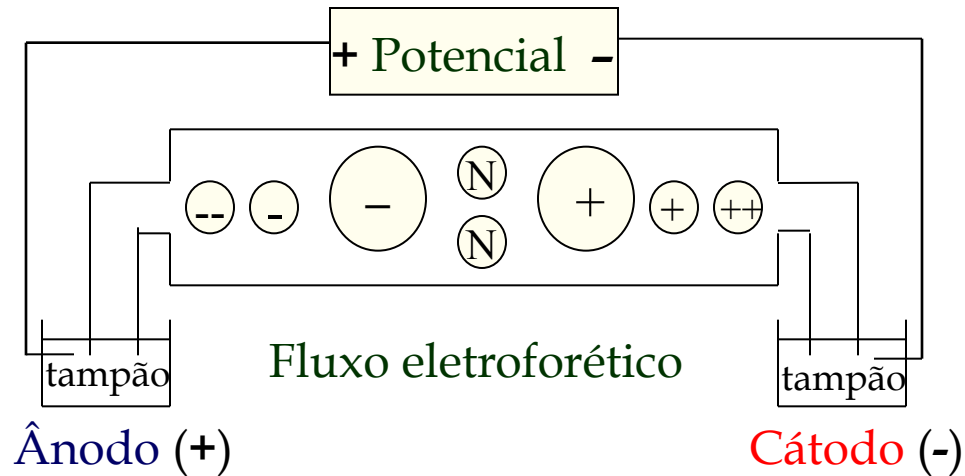
Eletroforese: Define-se como o movimento de partículas carregadas eletricamente em um meio líquido elétrico, sob a influência de um campo elétrico.





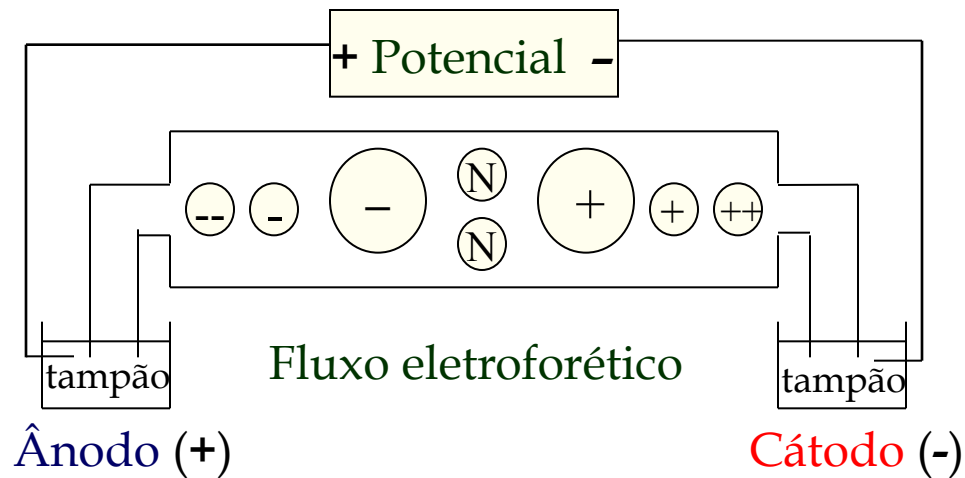
Eletrólitos: solução tampão usada no preenchimento da coluna capilar e meio no qual ocorre a separação;

Eletrodos: instalados dentro dos reservatórios de tampão, fazem a conexão elétrica e aplicação do campo elétrico através da coluna;

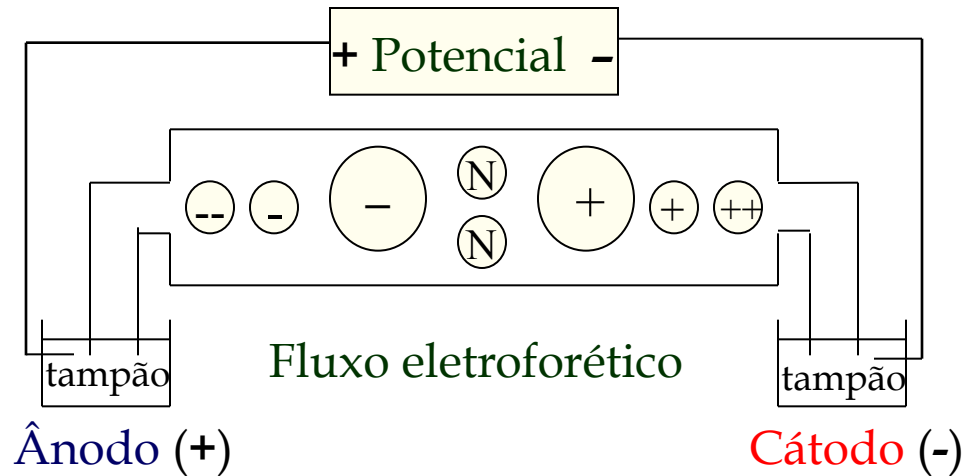


Coluna capilar: tubo aberto de sílica fundida onde ocorre o processo de eletroforese;

Amostra: mistura de analitos neutros e ionizados, com um variado grau de cargas e tamanhos;

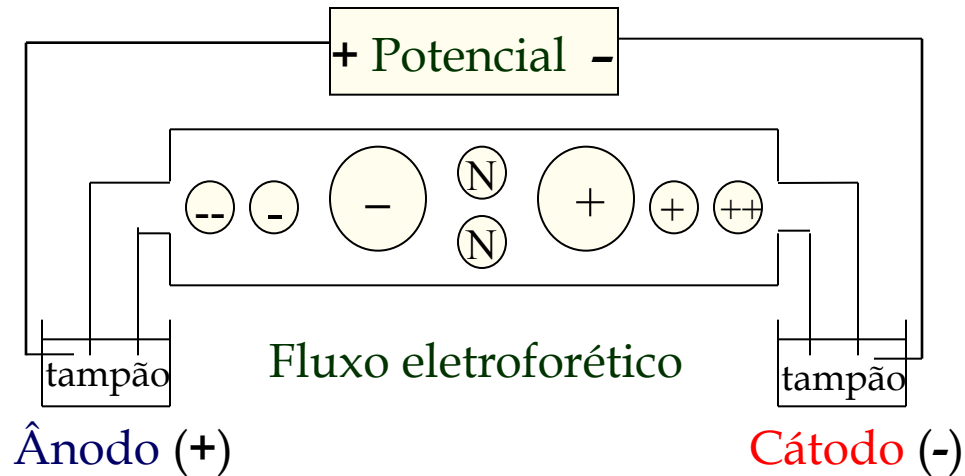


Separação: quando a amostra é introduzida em um lado da coluna, em especial no lado anódico, seus componentes migram com a aplicação do potencial. A direção e a velocidade de migração dependem da carga e do tamanho da molécula;



Fluxo eletrosmótico: fenômeno que acompanha a eletroforese e acarreta a migração do eletrólito e compostos neutros;

Deteção: moléculas separadas são detectadas na extremidade oposta a injeção. O registro do detector é chamado eletroferograma.



Ordem de migração: íons positivos migram para o cátodo; íons negativos migram para o ânodo; a razão de migração depende da razão carga/tamanho; ↑ a relação carga/tamanho, ↑ a velocidade;

ELETROFORESE CAPILAR

Mikkers (1979) - Demonstrou que eletroforese em tubos de teflon com 200 μm i.d., apresentava difusão reduzida em comparação ao sistema aberto.

Jorgenson & Lukacs (1981) - Usaram tubos de 75 μm em pyrex, os quais mostraram resultados, melhores do que tubos mais largos. Devido à melhor dissipação de calor, altas voltagens puderam ser implementadas (30 kV)

- **Modos de Operação:**
 - Zona (CZE)
 - Isotacoforese (ITP)
 - Focalização Isoelétrica (IEF)
 - Eletrocínética Micelar(MEKC)
 - Eletroforese em Gel (CGE)
 - Eletrocromatografia (CEC)

• **Aplicações:**

- Íons Inorgânicos
- Compostos Quirais
- Compostos Hidrofóbicos
- Peptídeos
- Macromoléculas
- Carboidratos
- Poluentes Ambientais
- Fármacos

Íons	Moléculas	Peptídeos	Proteínas	Oligonucleotídeos	DNA
------	-----------	-----------	-----------	-------------------	-----

CZE	MEKC	CZE	CZE	CGE	CGE
-----	------	-----	-----	-----	-----

ITP	CZE	ITP	CGE	MEKC	
-----	-----	-----	-----	------	--

		MEKC	CIEF		
--	--	------	------	--	--

		CIEF	ITP		
--	--	------	-----	--	--

		CGE			
--	--	-----	--	--	--

Sistema de Eletroforese Capilar

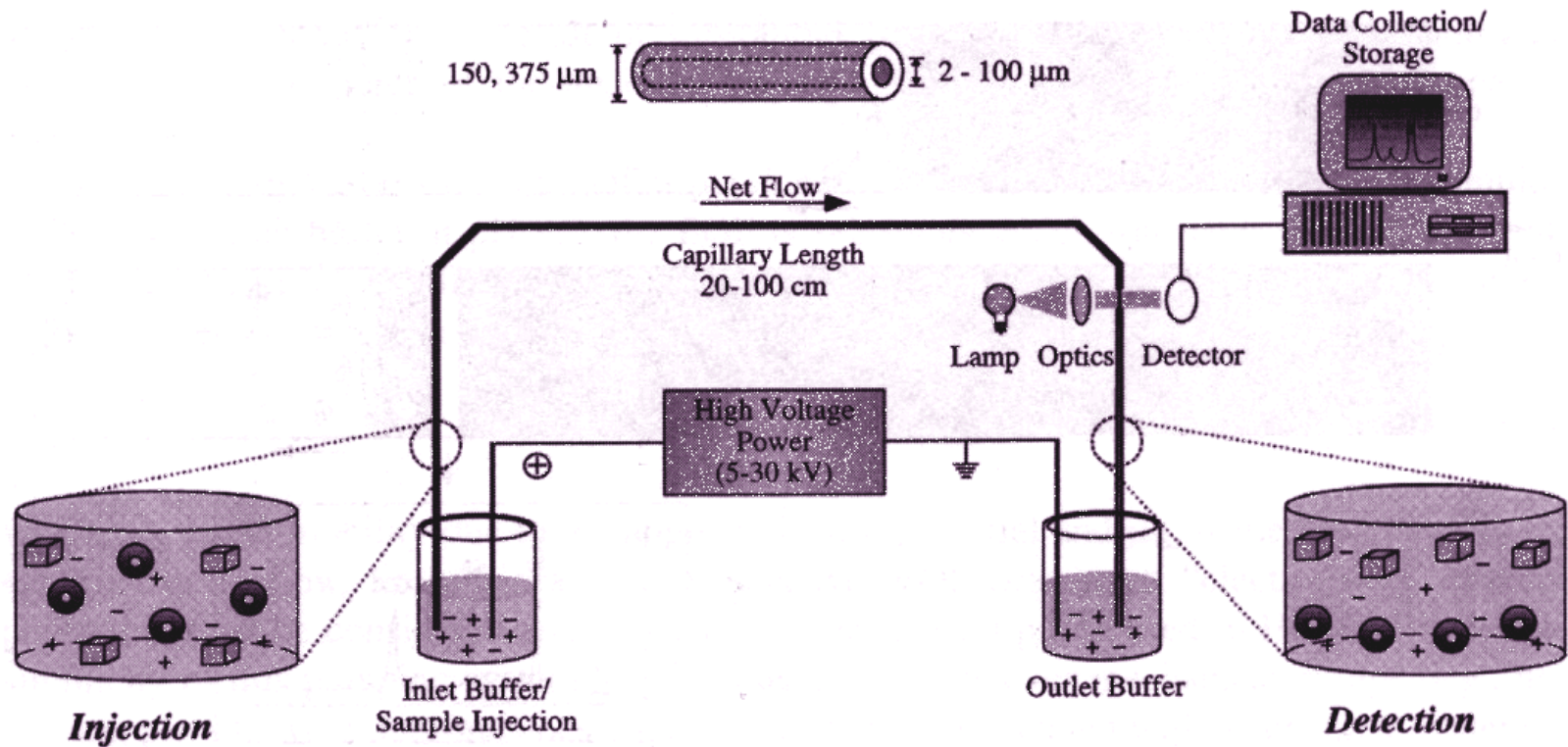


FIGURE 2. General schematic of a CE instrument.

- **Reservatório dos Tampões:**- Cátodo
 - Ânodo
- **Introdução da Amostra:** - Voltagem
 - Diferença de pressão
 - Volumes reduzidos (μL -nL)
- **Colunas Capilares:** - Tubos de sílica fundida
 - Tubos com interior revestido
 - 30 – 100 cm \times 50 – 75 μm

- **Controle de Temperatura:** - Líquido
- Ar Forçado
- **Fonte de Alta Tensão:** - 30 kV - 300 μ A - 6W
- Bi-polaridade
- **Aquisição e Manipulação de Dados:**
 - Análise Qualitativas
 - Análise Quantitativas
 - Impressão de Relatórios
 - Eletroferograma

- **Detectores:**
 - Absorciométricos
 - Eletroquímicos
 - Espectrométricos
 - on- e/ou off-column

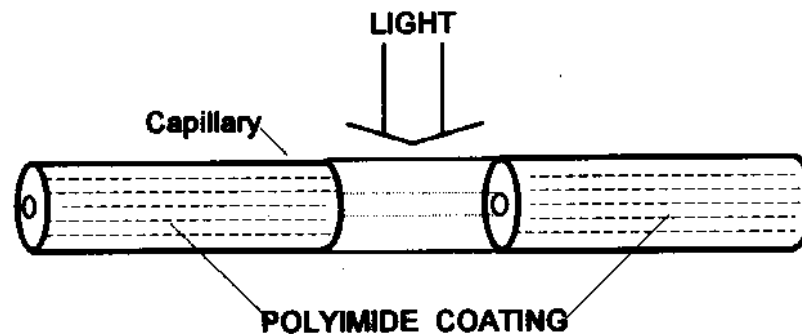


Fig. 1.8. Drawing of a piece of a fused silica capillary with a section of the polyimide coating removed which serves as the cell in a UV/vis or fluorescence detector. This drawing is not to scale.

- **Eletroferograma** - Registro da Resposta do Detector x Tempo

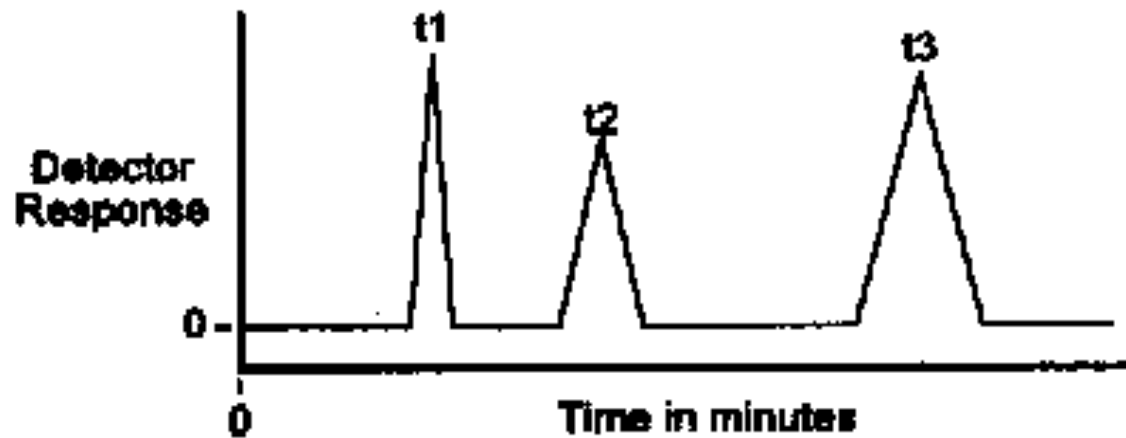
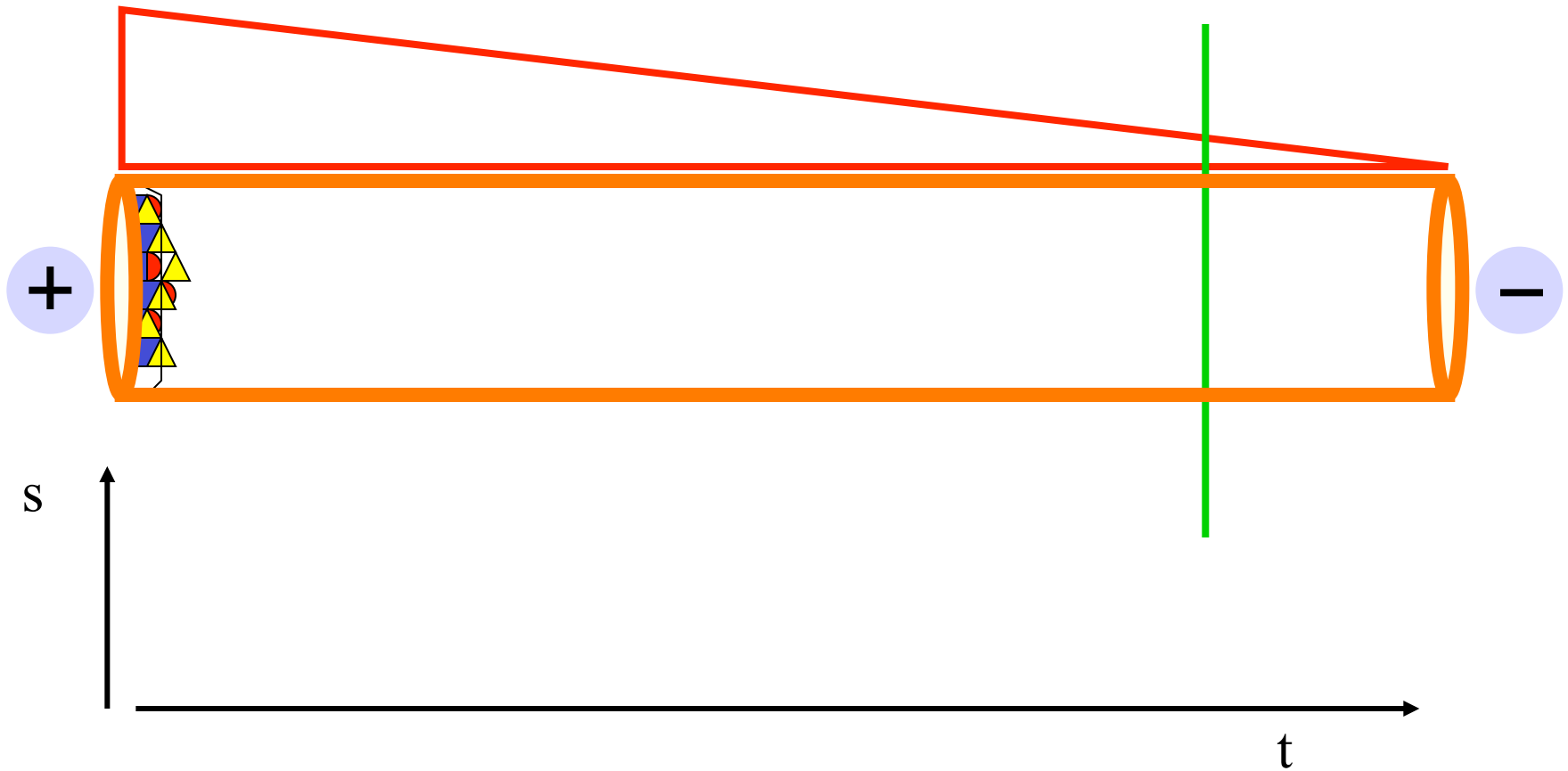


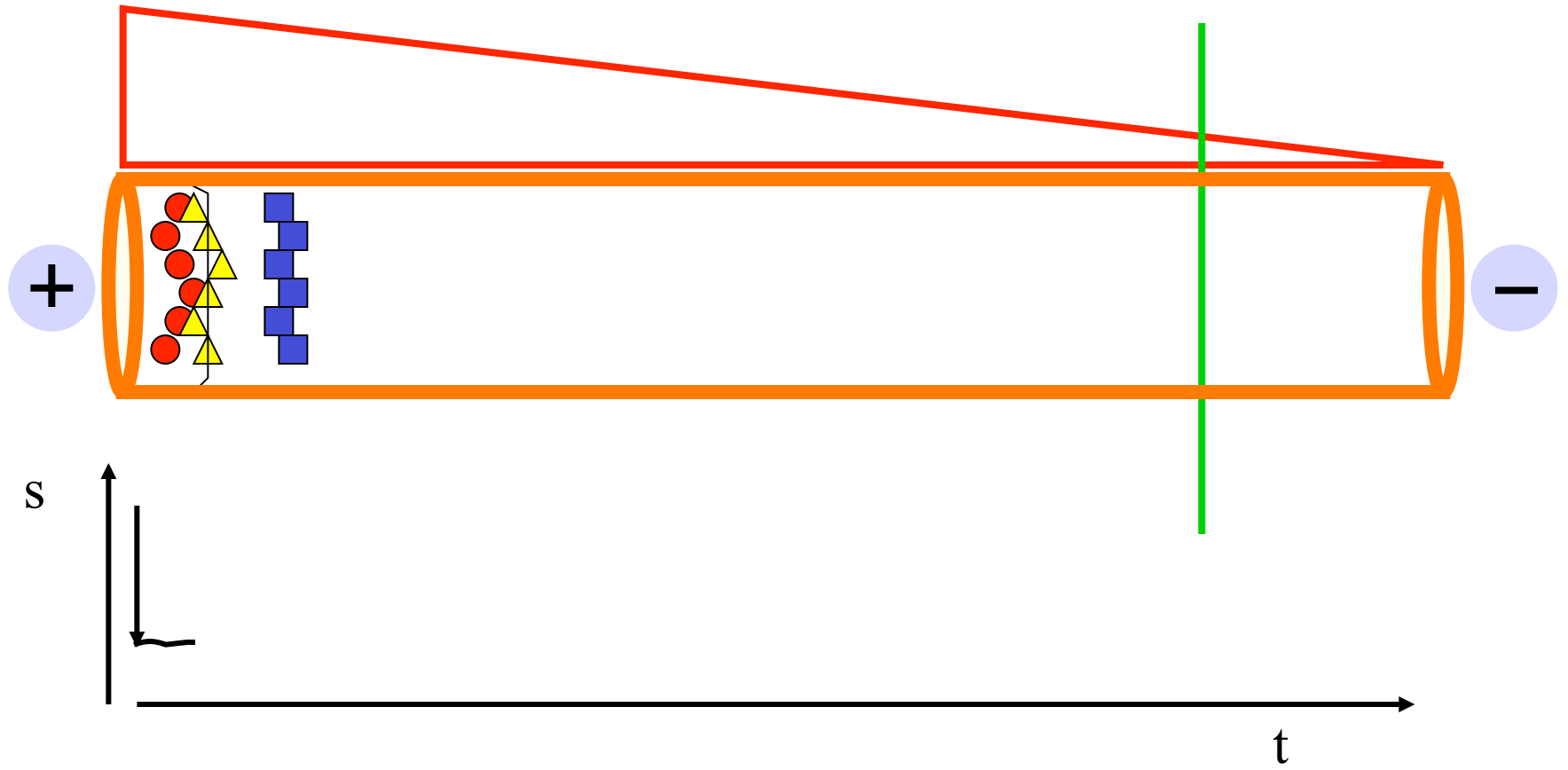
Fig. 1.6. Drawing of a capillary electropherogram. t_1 , t_2 , and t_3 represent the migration times of sample components, measured at the apices of the peaks.

O *eletroferograma* é o registro temporal da separação eletroforética onde os componentes separados são detectados ao passarem pelo detector.

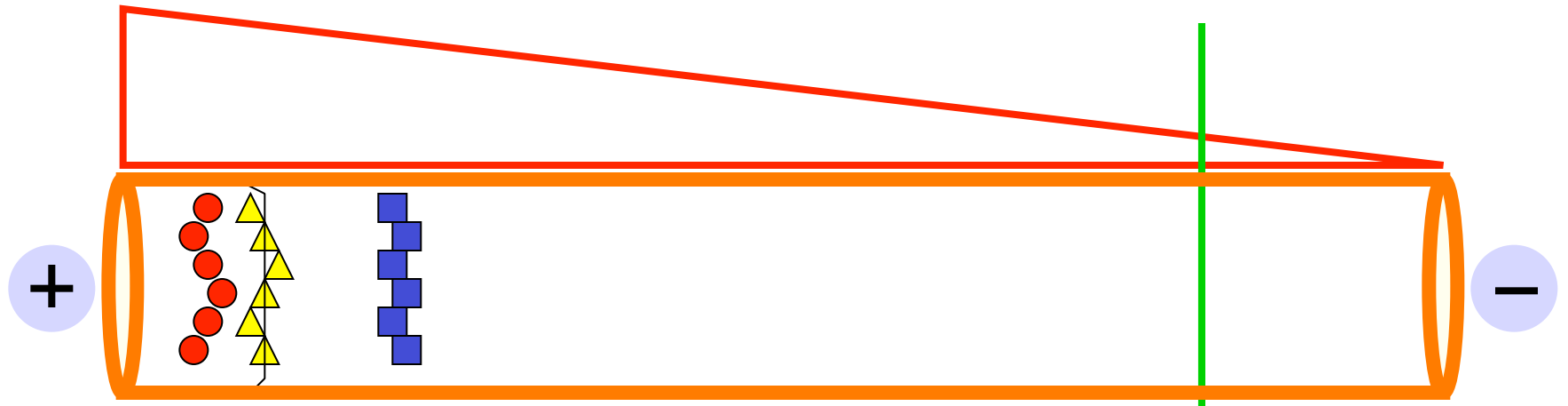
Capillary Zone Electrophoresis



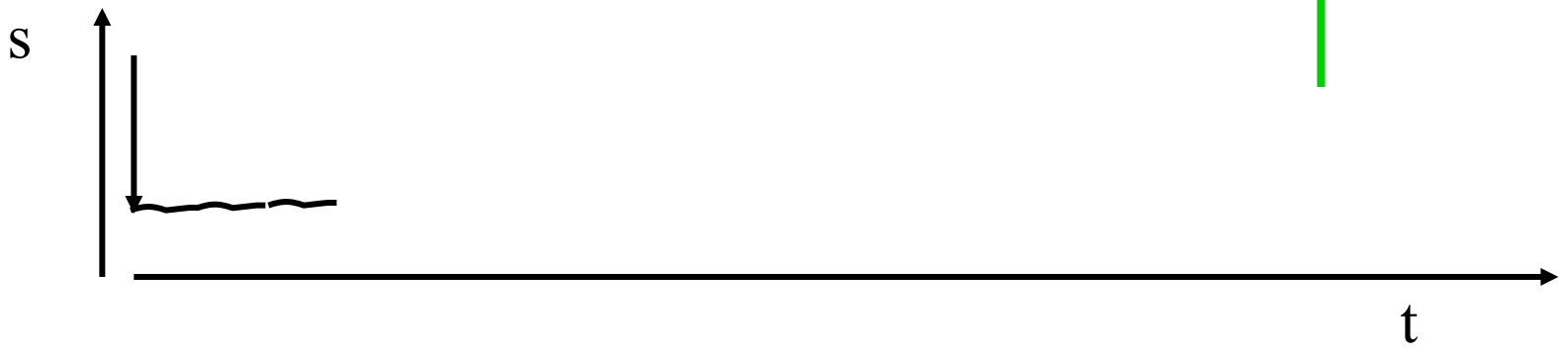
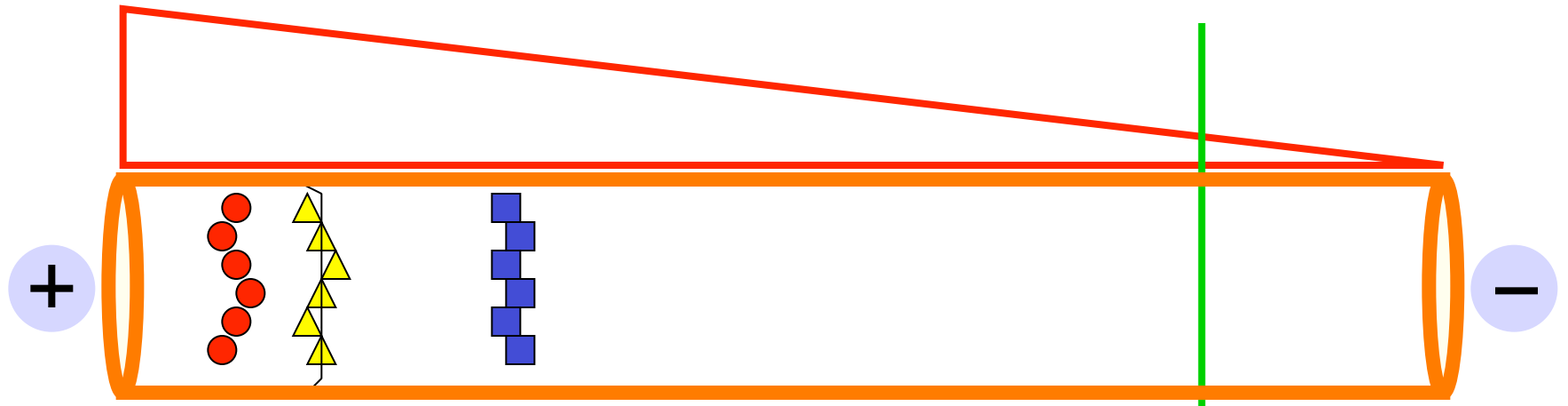
CZE



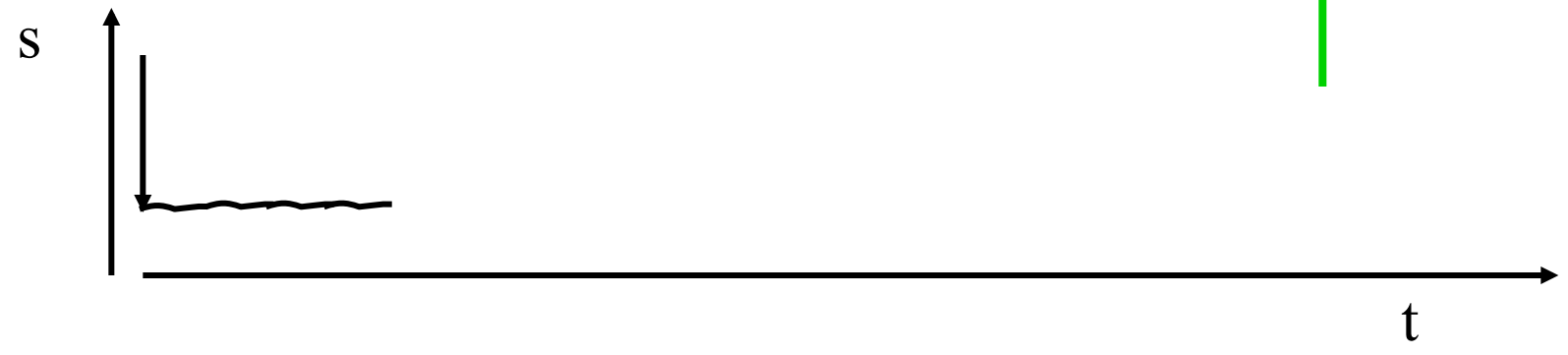
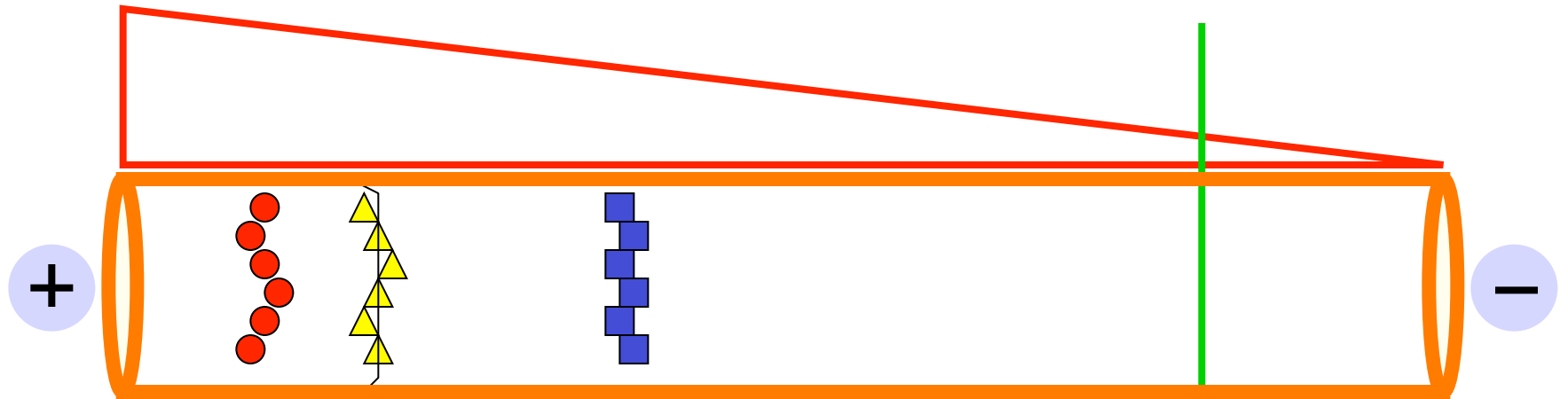
CZE



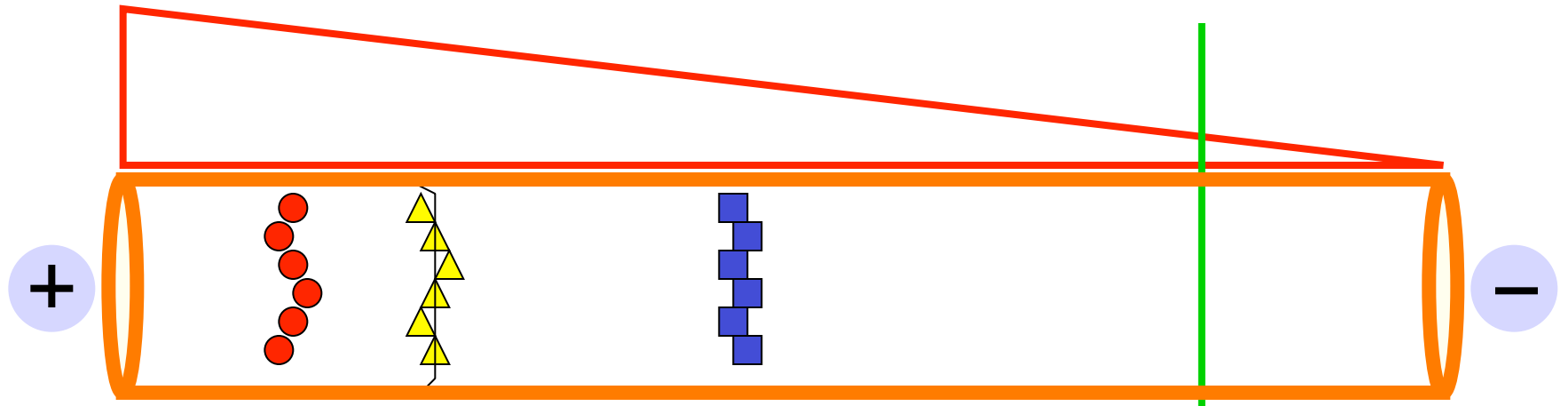
CZE



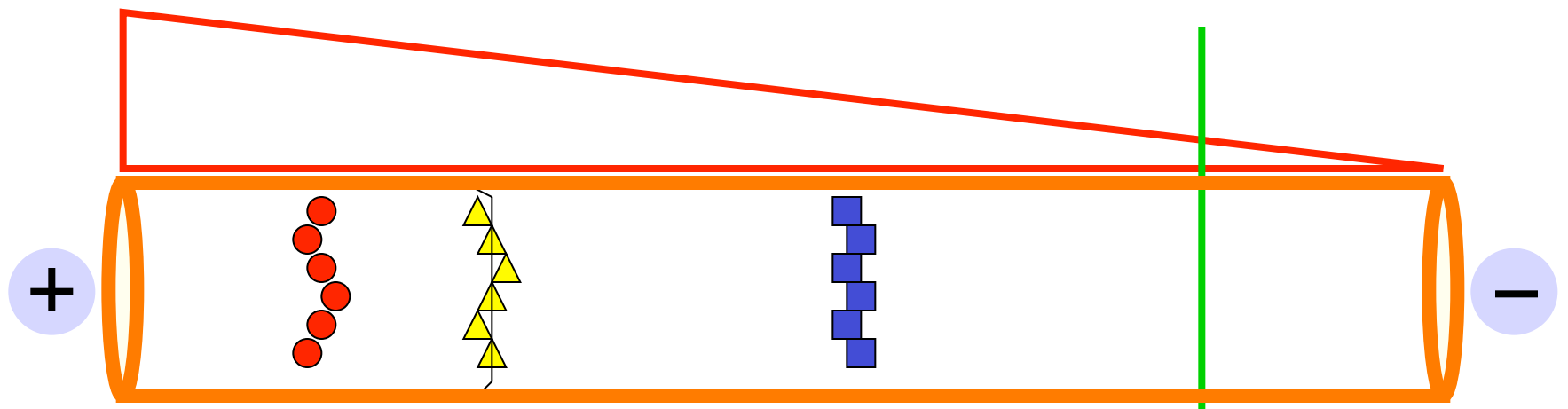
CZE



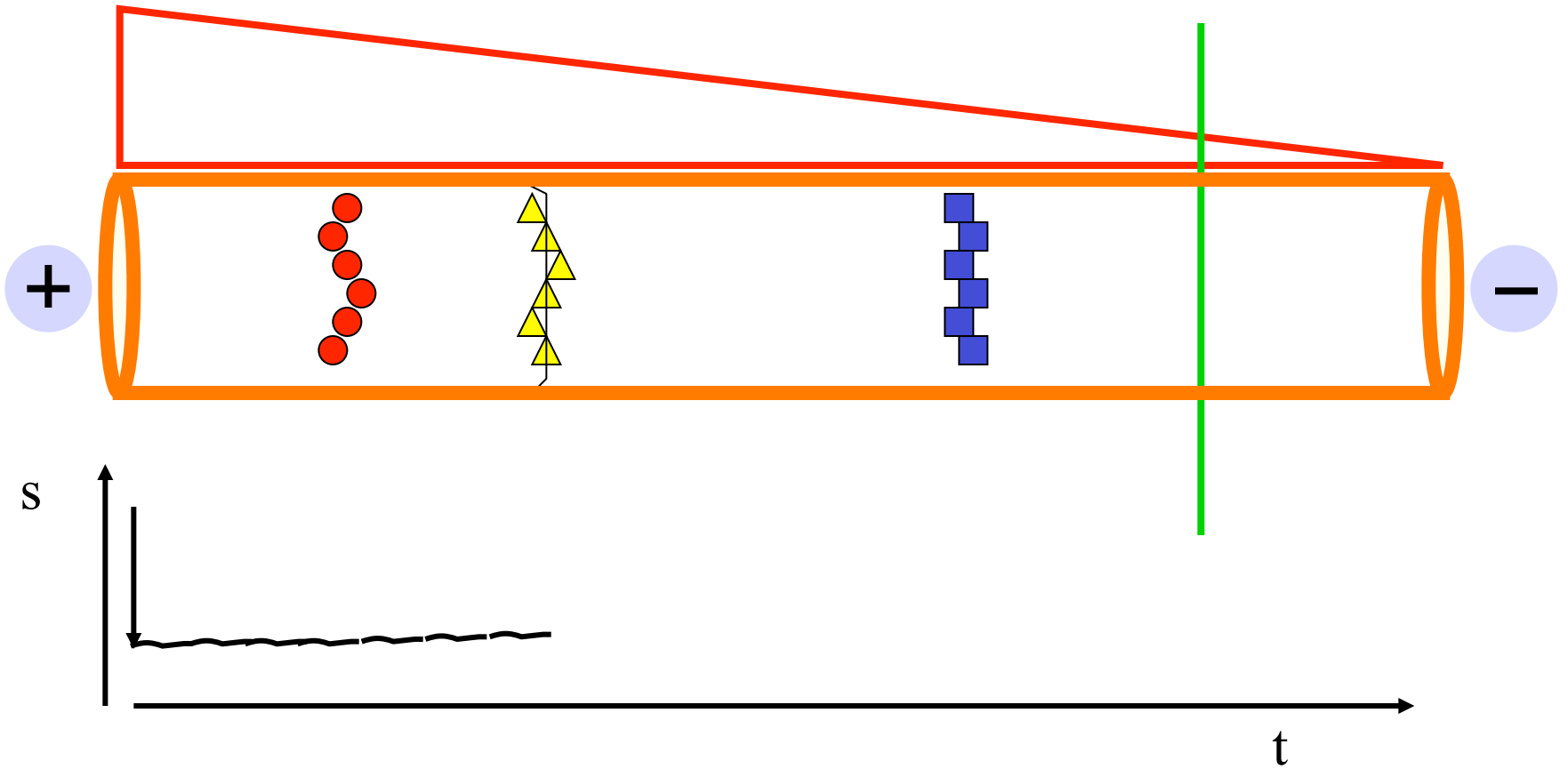
CZE



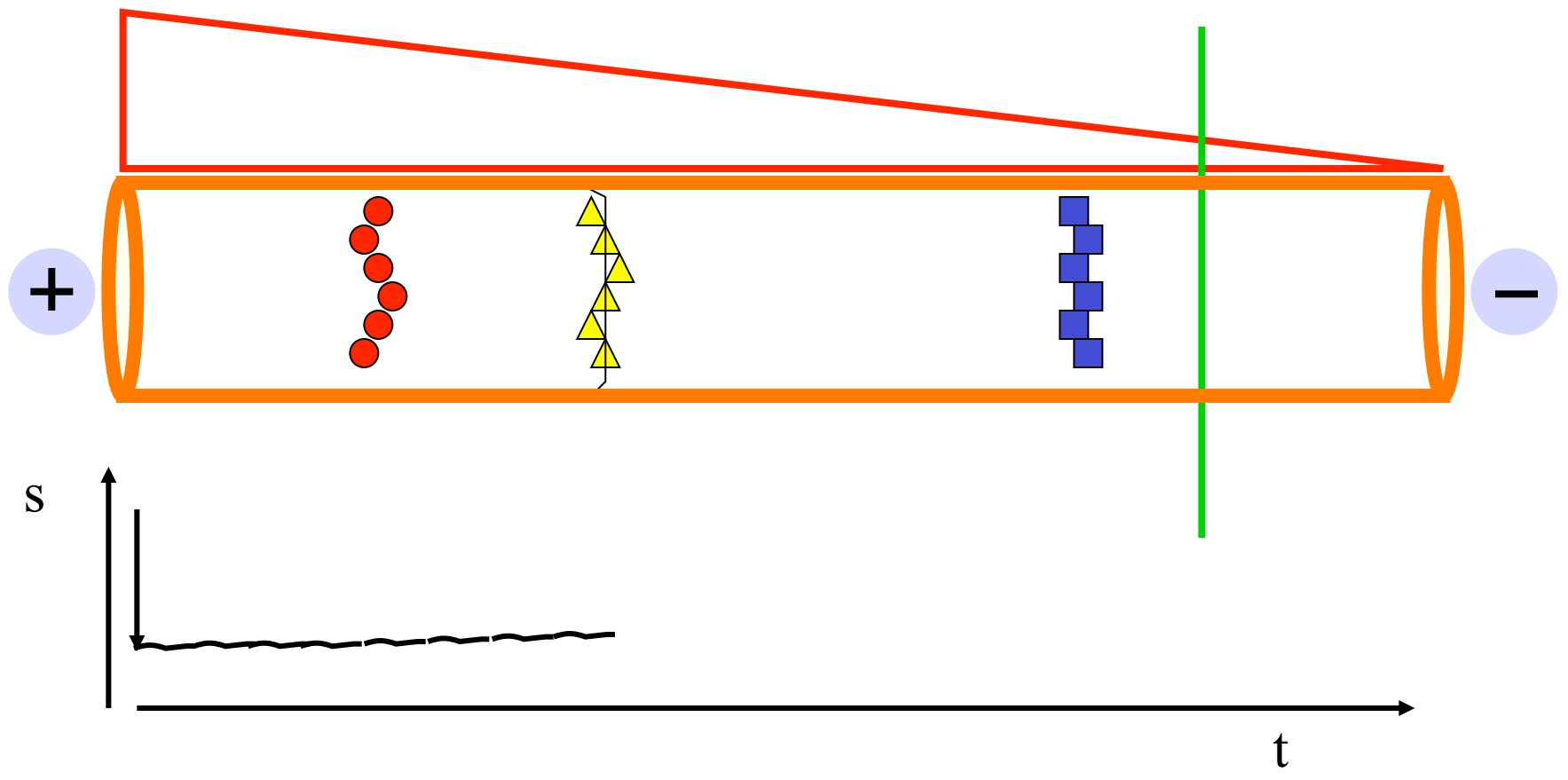
CZE



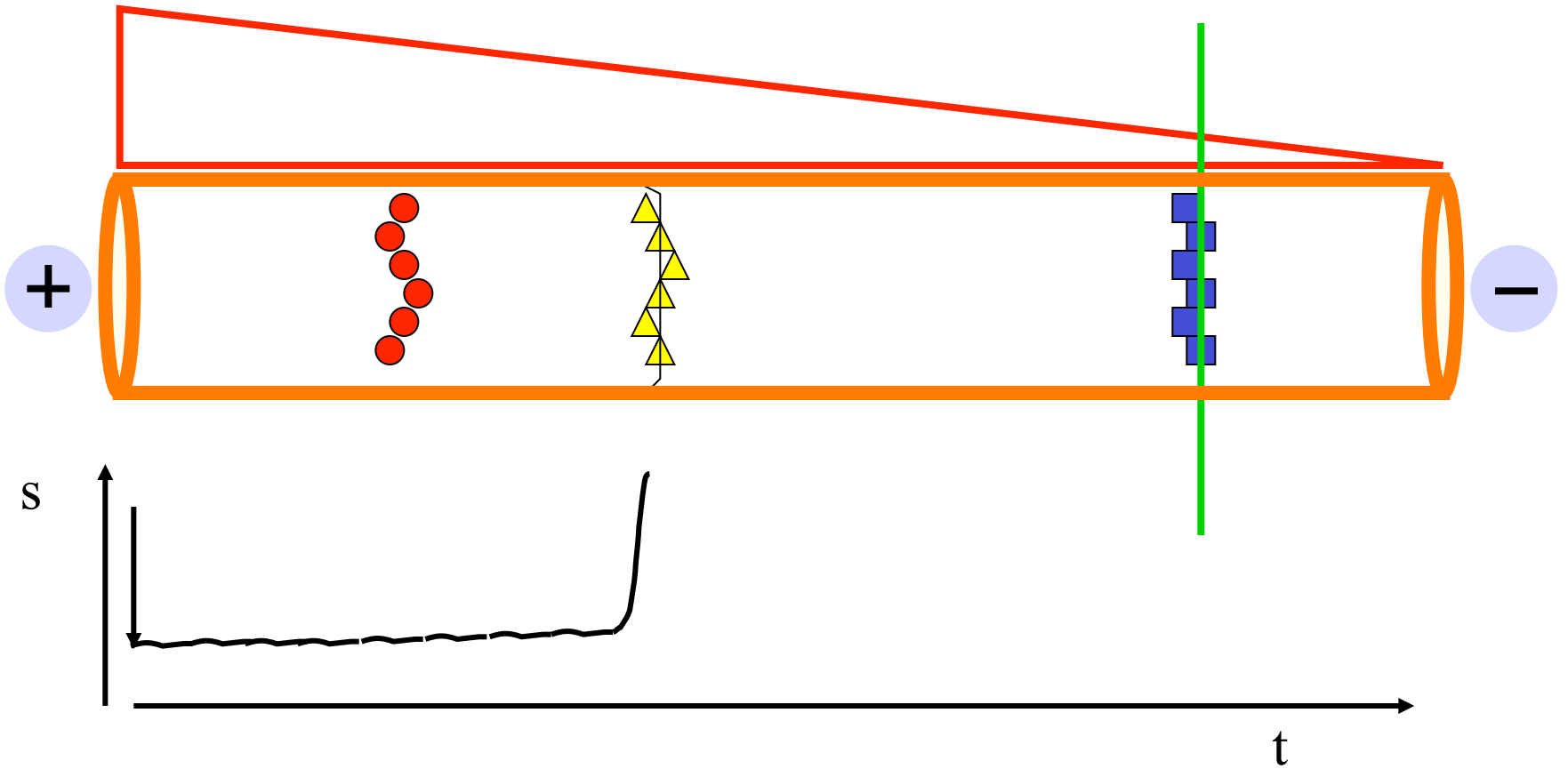
CZE



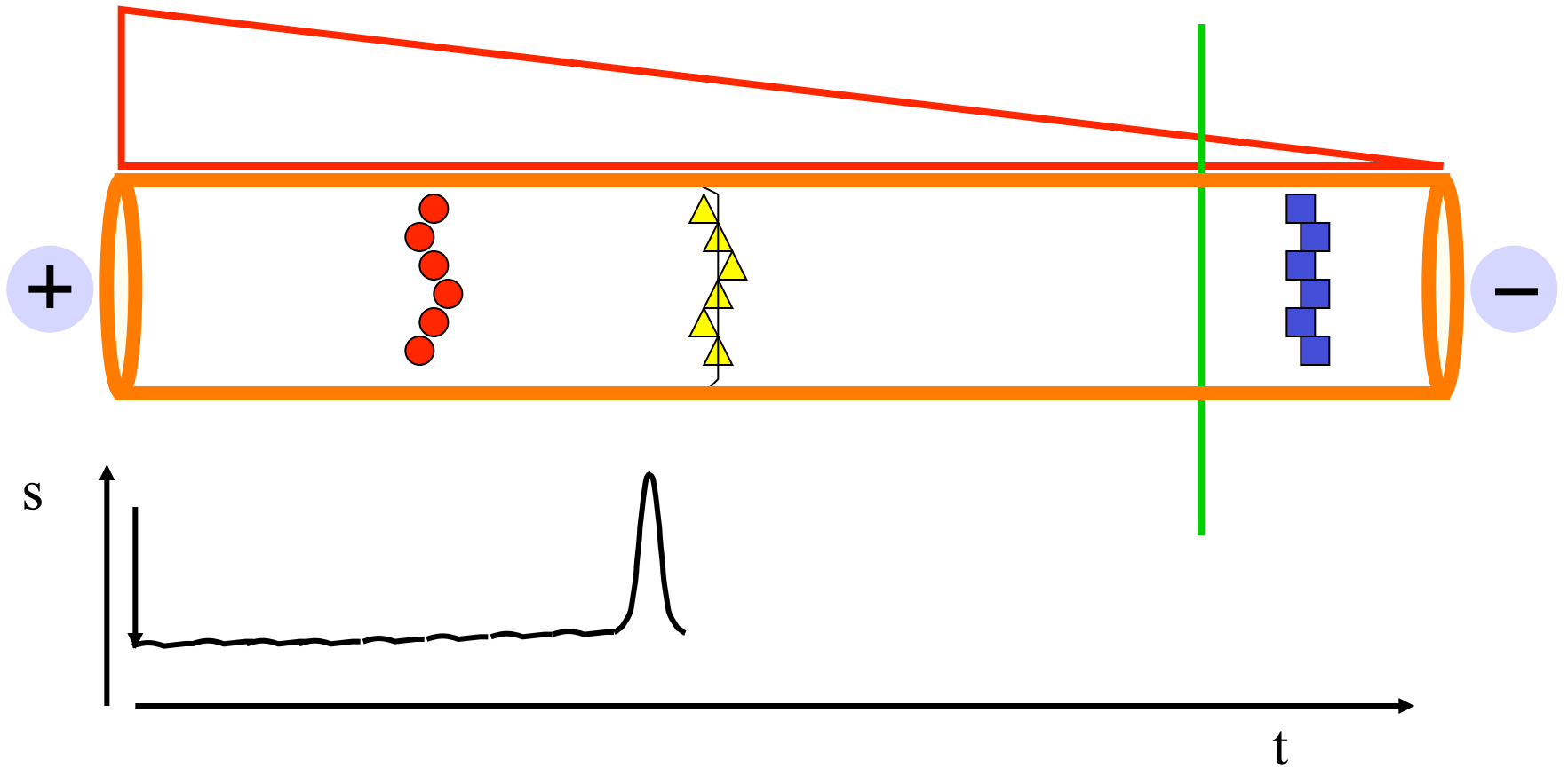
CZE



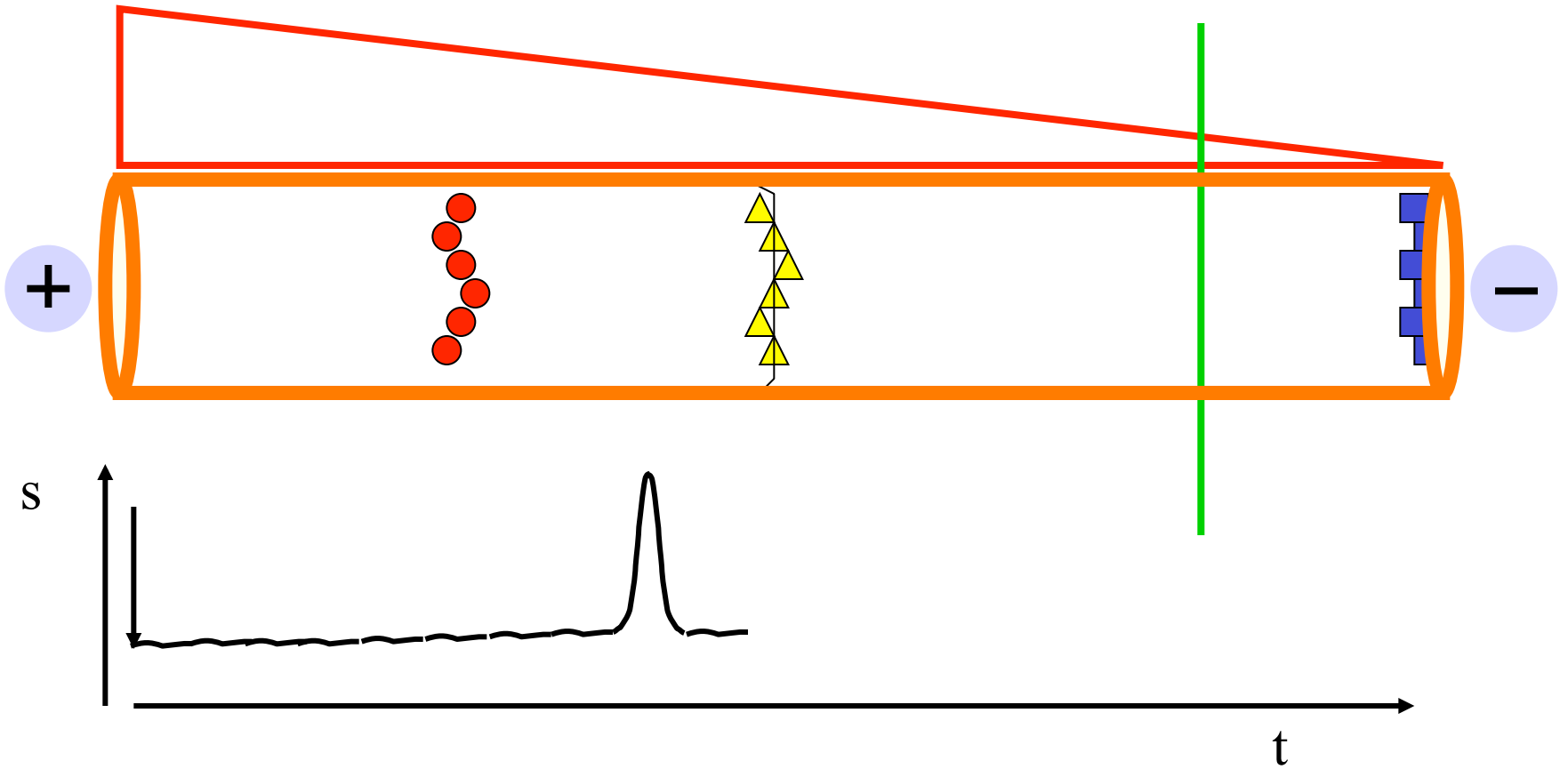
CZE



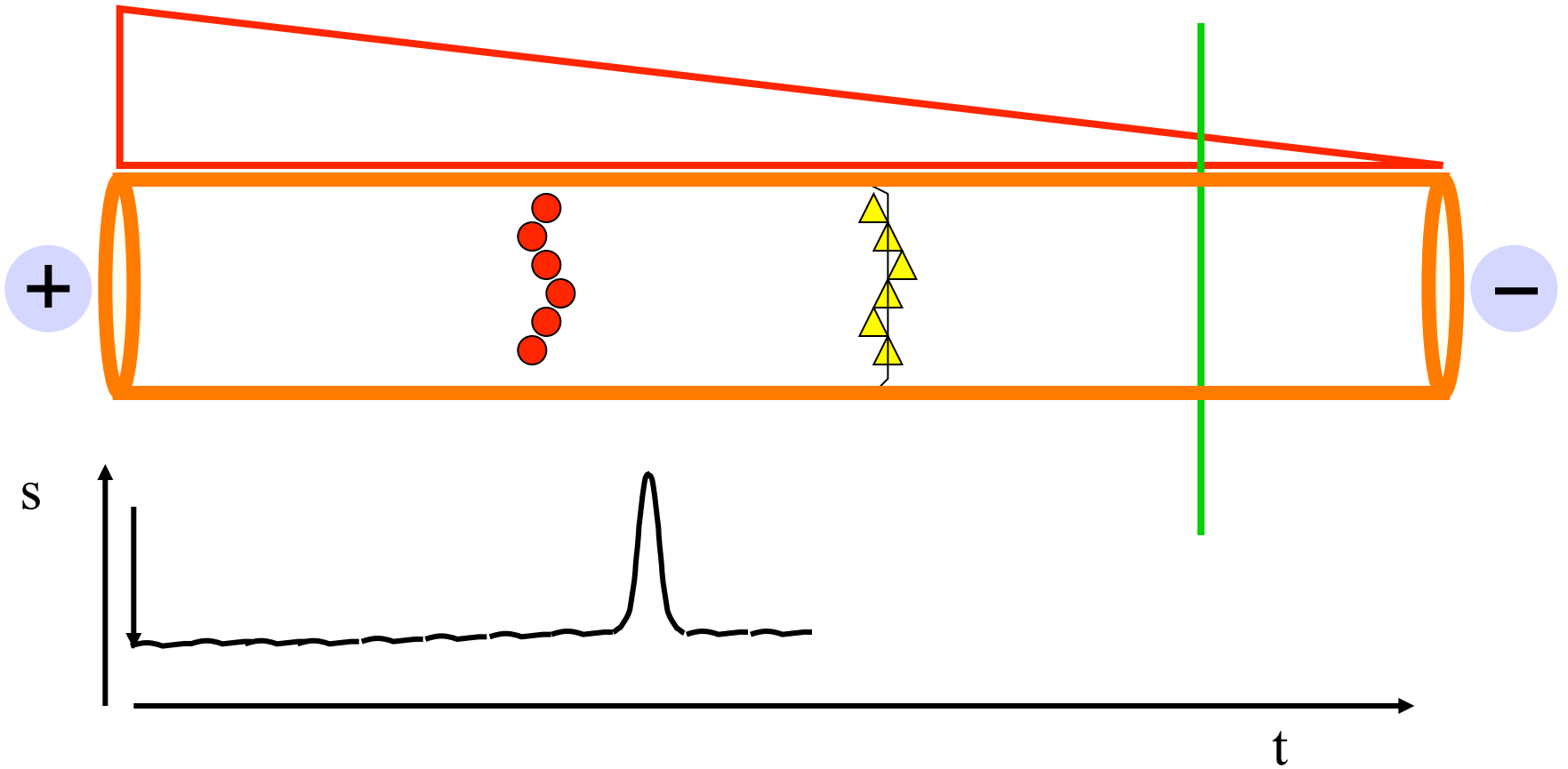
CZE



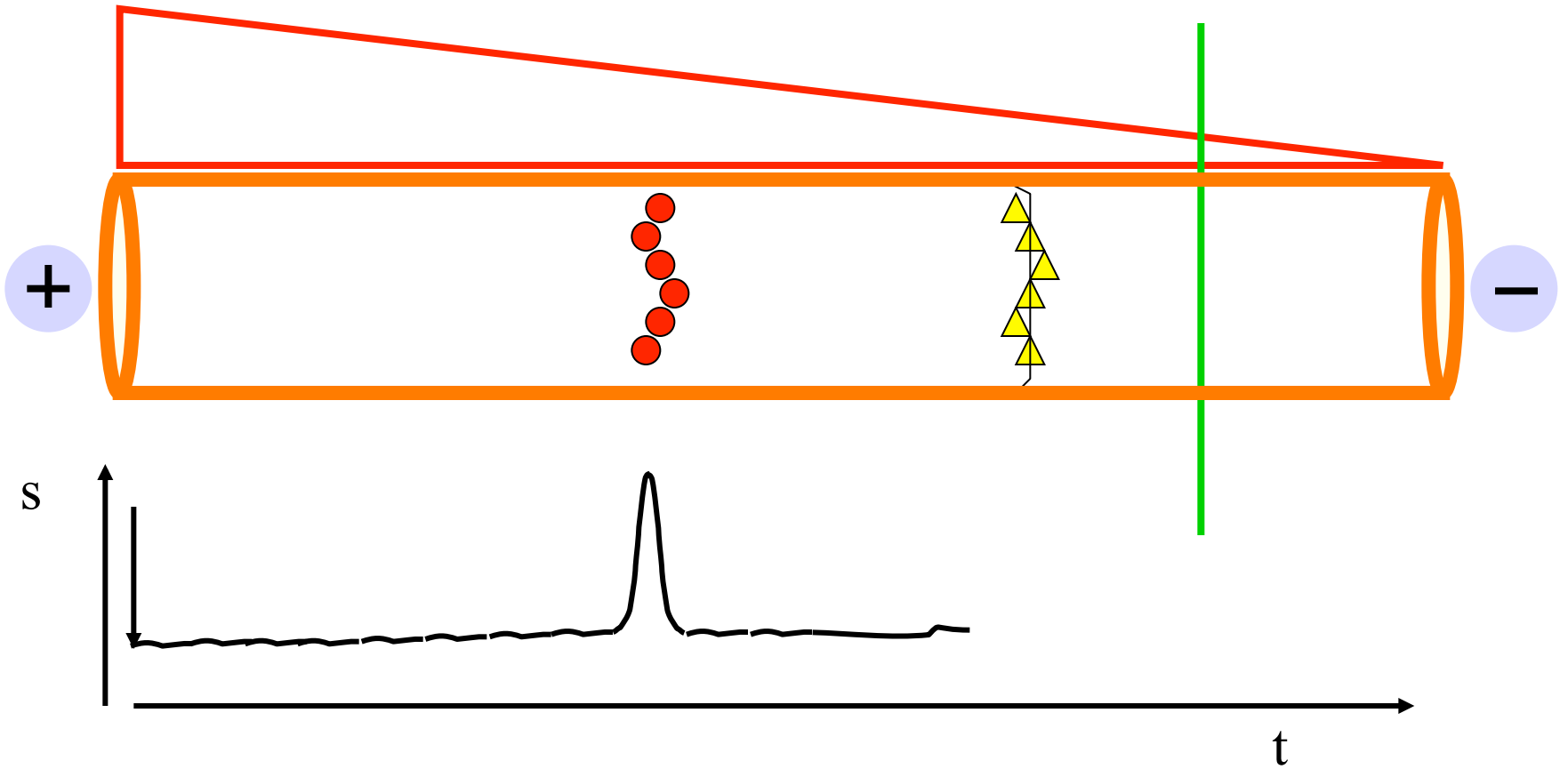
CZE



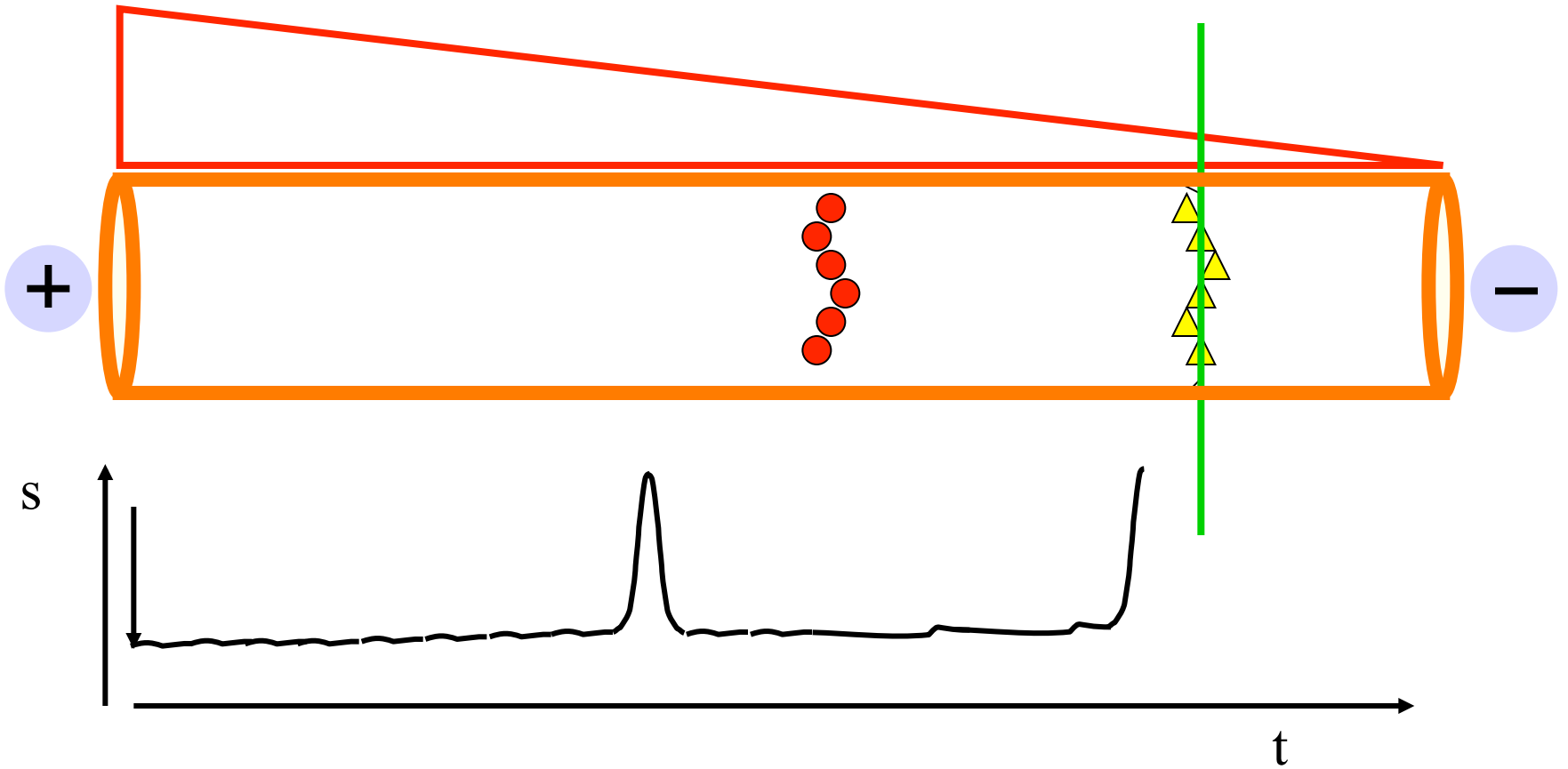
CZE



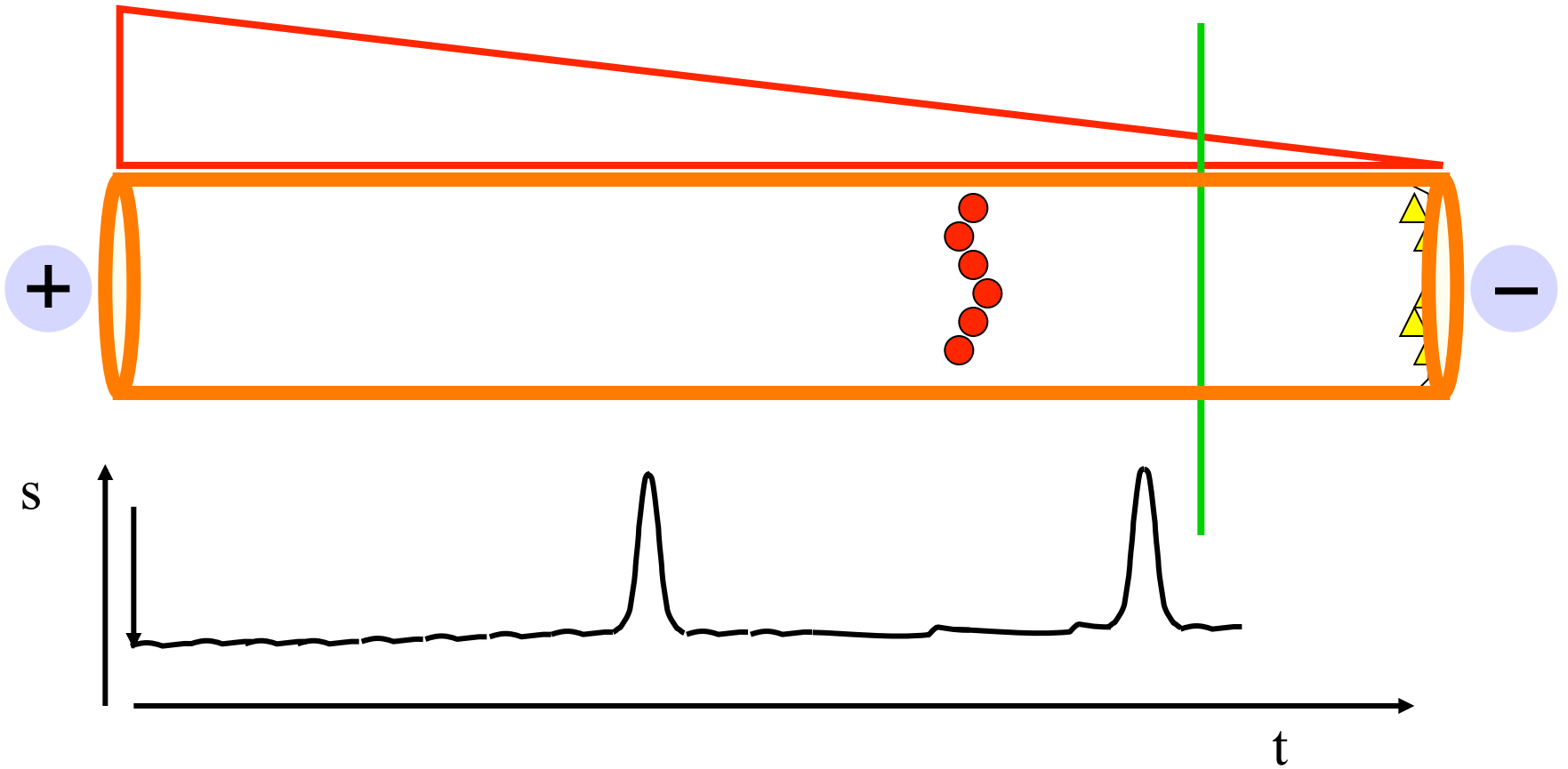
CZE



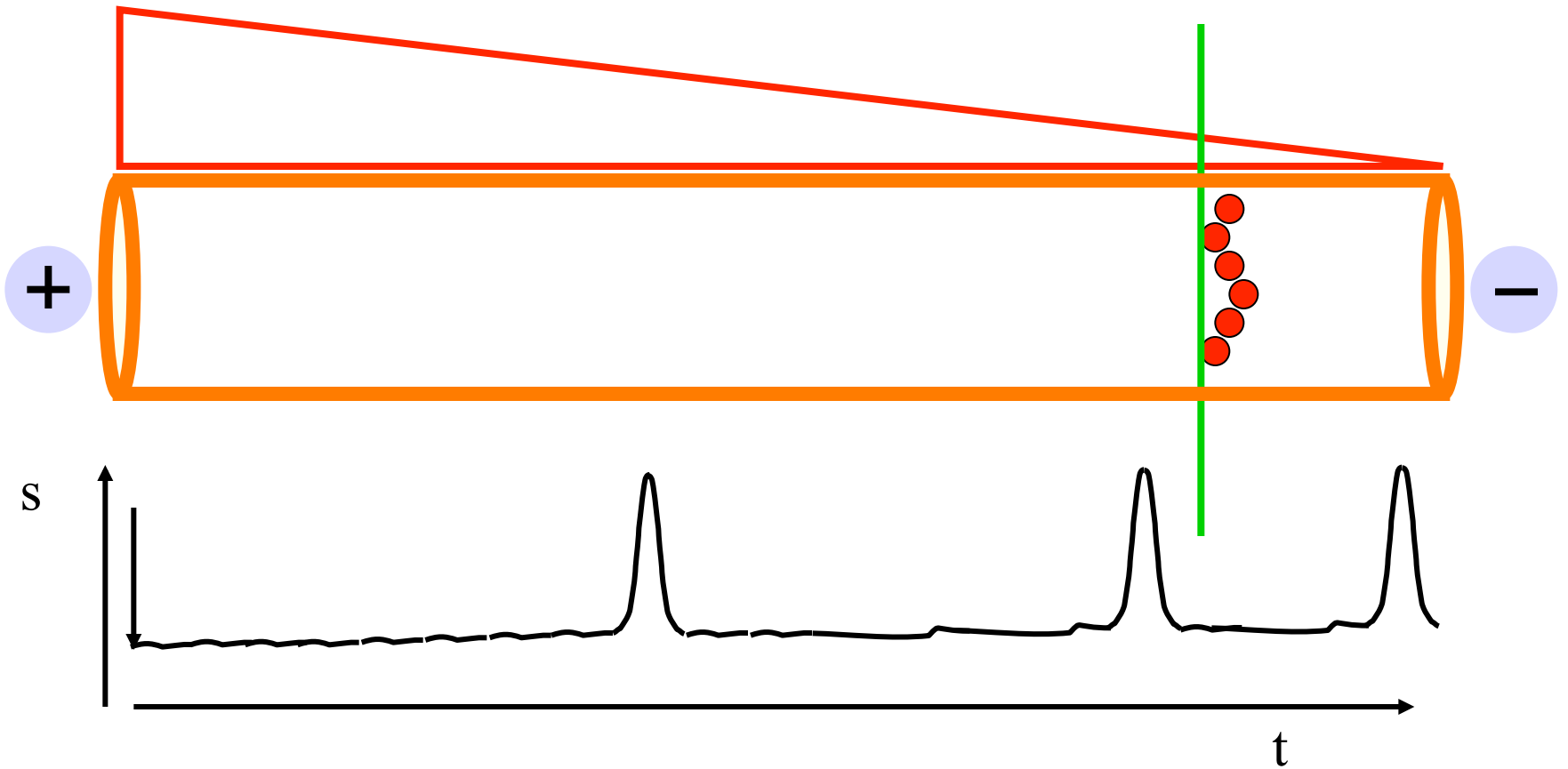
CZE



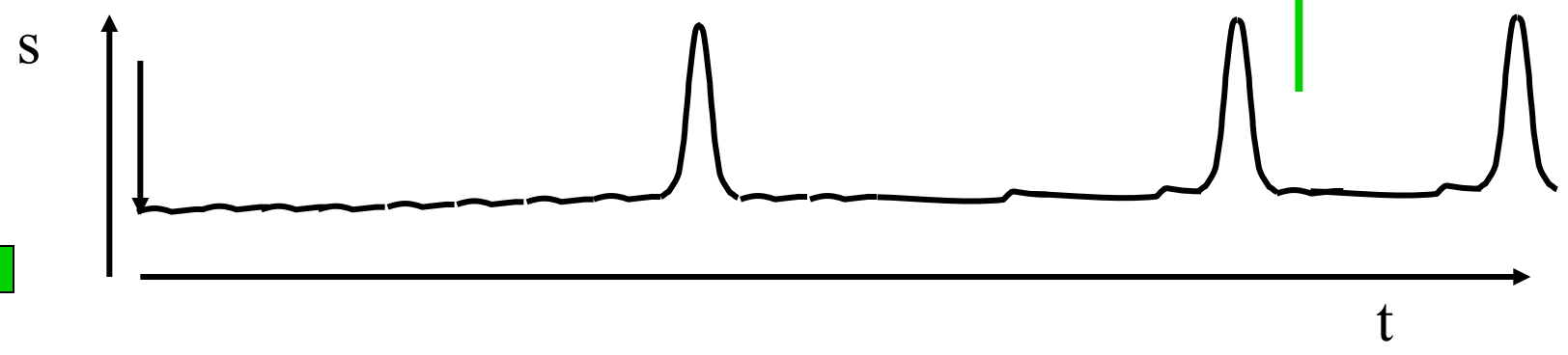
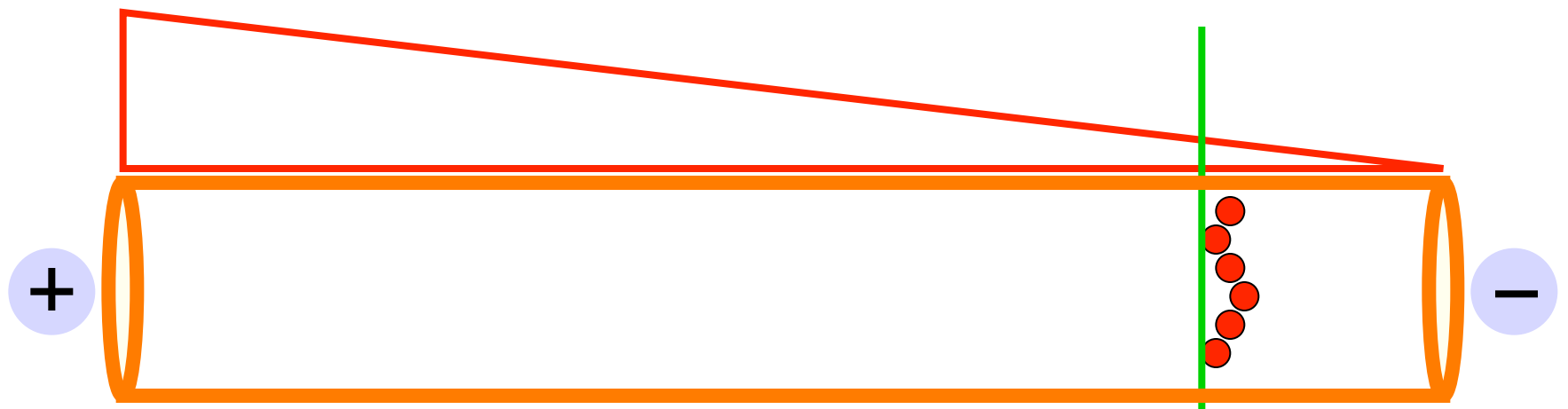
CZE



CZE

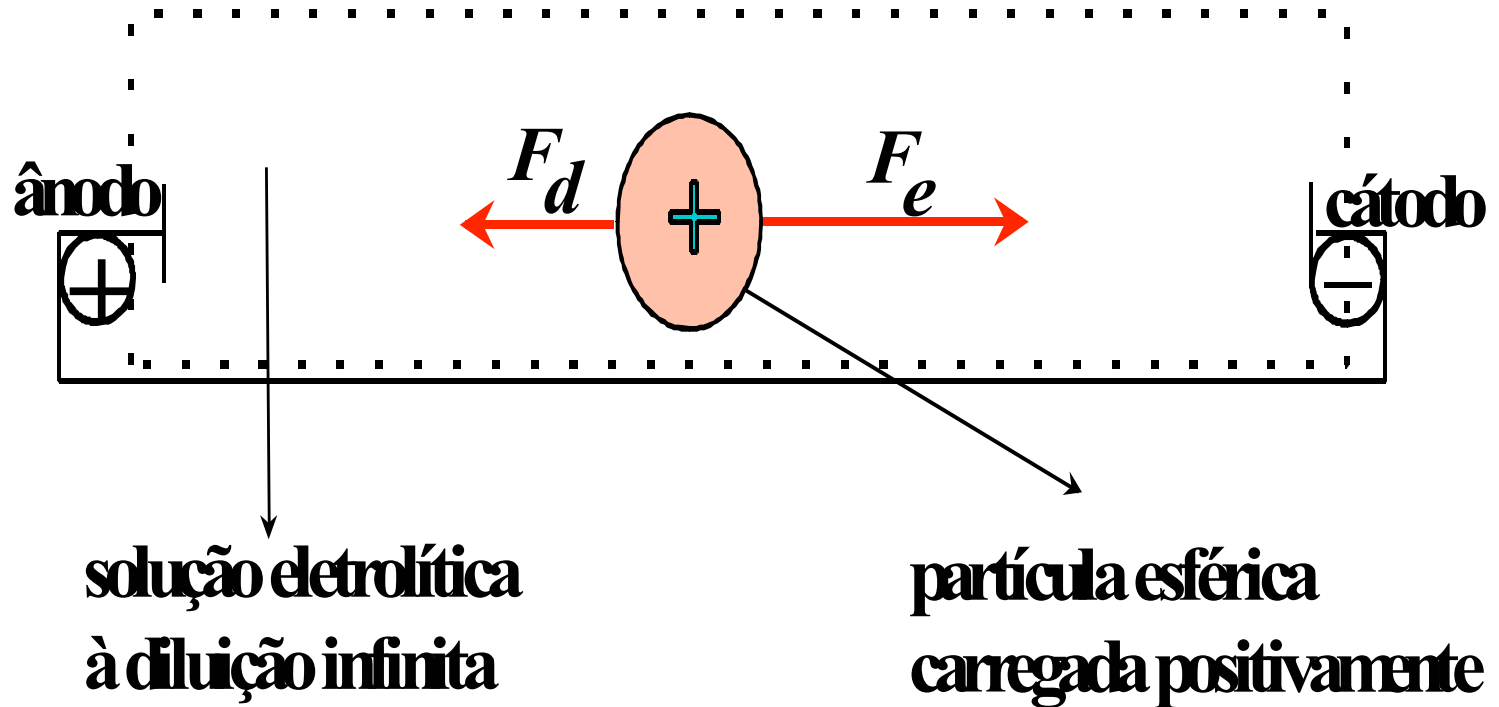


CZE



I - MOBILIDADE ELETROFORÉTICA DE UMA PARTÍCULA ELETRICAMENTE CARREGADA EM SOLUÇÃO

A - Soluções Diluídas - Leis de Stokes



1) Em campo elétrico homogêneo a partícula será acelerada pela força elétrica F_e

$$F_e = Z_i \cdot e_o \cdot E$$

Z_i = número de cargas do componente i

e_o = carga elementar [$1,602 \times 10^{-19} \text{ A.S} = \text{C}$]

E = força do campo elétrico [V.cm^{-1}]

2) Em um meio hidrodinâmico viscoso existirá uma força de arraste (ou friccional) F_d exercida sobre as espécies i na proporção de suas velocidades v_i^0 .

$$F_d = \kappa \cdot \eta \cdot v_i^0$$

κ = constante [cm]

η = viscosidade newtoniana da solução [$P_a \cdot s$]

v_i^0 = velocidade de migração do componente i [cm.s⁻¹]

3) De acordo com a lei de Stokes, $\kappa = 6\pi r$ para uma partícula esférica. Para partículas não esféricas o valor numérico é < 6 .

4) No momento da aplicação do campo elétrico e a força de aceleração F_e será contrabalanceada pela força de arraste F_d e as partículas i migrarão com velocidade v_i^0 constante.

$$F_d = F_e$$

$$6\pi r_i \cdot \eta \cdot v_i^o = Z_i \cdot e_o \cdot E$$

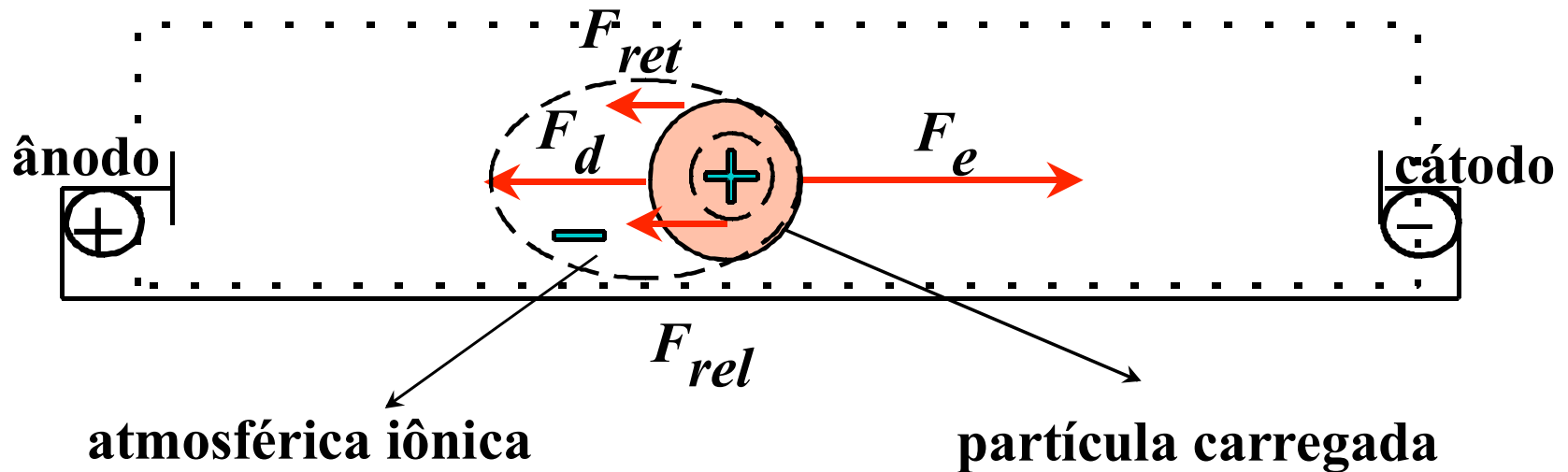
$$v_i^o = \frac{Z_i \cdot e_o}{6\pi\eta r_i} \cdot E$$

5) Visto que a velocidade de migração v_i^o é proporcional ao campo elétrico E , o fator de proporcionalidade é chamado mobilidade eletroforética absoluta μ_i^o .

$$\mu_i^o = \frac{v_i^o}{E} = \frac{Z_i \cdot e^o}{6\pi\eta r_i}$$

$$[\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$$

B - Soluções Reais - Lei de Debye, Hückel e Onsager (DHO)



F_e = Força Elétrica

F_{rel} = Força Relaxamento

F_d = Força Arraste

F_{ret} = Força de Retardo

- 1) De acordo com D.H.O., um íon em solução estará sempre rodeado por íon de carga oposta.
- 2) A presença da atmosfera iônica de carga oposta acarreta a ação de duas forças adicionais, F_{ret} e F_{rel} , que diminuirão a velocidade do íon.
- 3) A força de retardo (F_{ret}) é causada pelo movimento, em direção oposta, dos contra-íons. Como resultado a força friccional é maior e há um decréscimo na modalidade do íon central.

4) A movimentação do íon central deformam a atmosfera iônica, alterando a densidade relativa de cargas. Isto é, a densidade da atmosfera iônica será levemente menor na parte anterior do íon central do que na parte posterior (à direção do movimento).

5) Atrações coulômbicas entre as duas partes do íon desaceleram o mesmo na proporção da força de relaxamento F_{rel} .

6) O ajuste pode ser feito substituindo-se a carga absoluta do íon pelo seu valor efetivo (D.H.O.), o qual leva em consideração os contra-íons e o raio da atmosfera iônica.

$$\mu_i = \frac{Q_{ef}}{6\pi\eta R}$$

μ_i = mobilidade eletroforética efetiva [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$]

Q_{ref} = carga efetiva do íon [C]

R = raio total do íon [cm]

∴ A mobilidade efetiva será sempre menor que a mobilidade absoluta devido às interações iônicas

II - Mobilidade Eletroforética

- Raio
- Forma
- Carga
- Grau de dissociação

Íon

- Solvatação
- Viscosidade
- Constante dielétrica
- Força iônica
- Temperatura
- pH

Meio

$$\bar{\mu}_\alpha = \frac{\textit{carga}}{\textit{volume (tamanho)}}$$

A. Determinação da Mobilidade Eletroforética Efetiva

- O cálculo da mobilidade eletroforética pelas equações descritas é muito difícil.
- Em termos práticos, pode-se calcular diretamente pelo registro da separação eletroforética

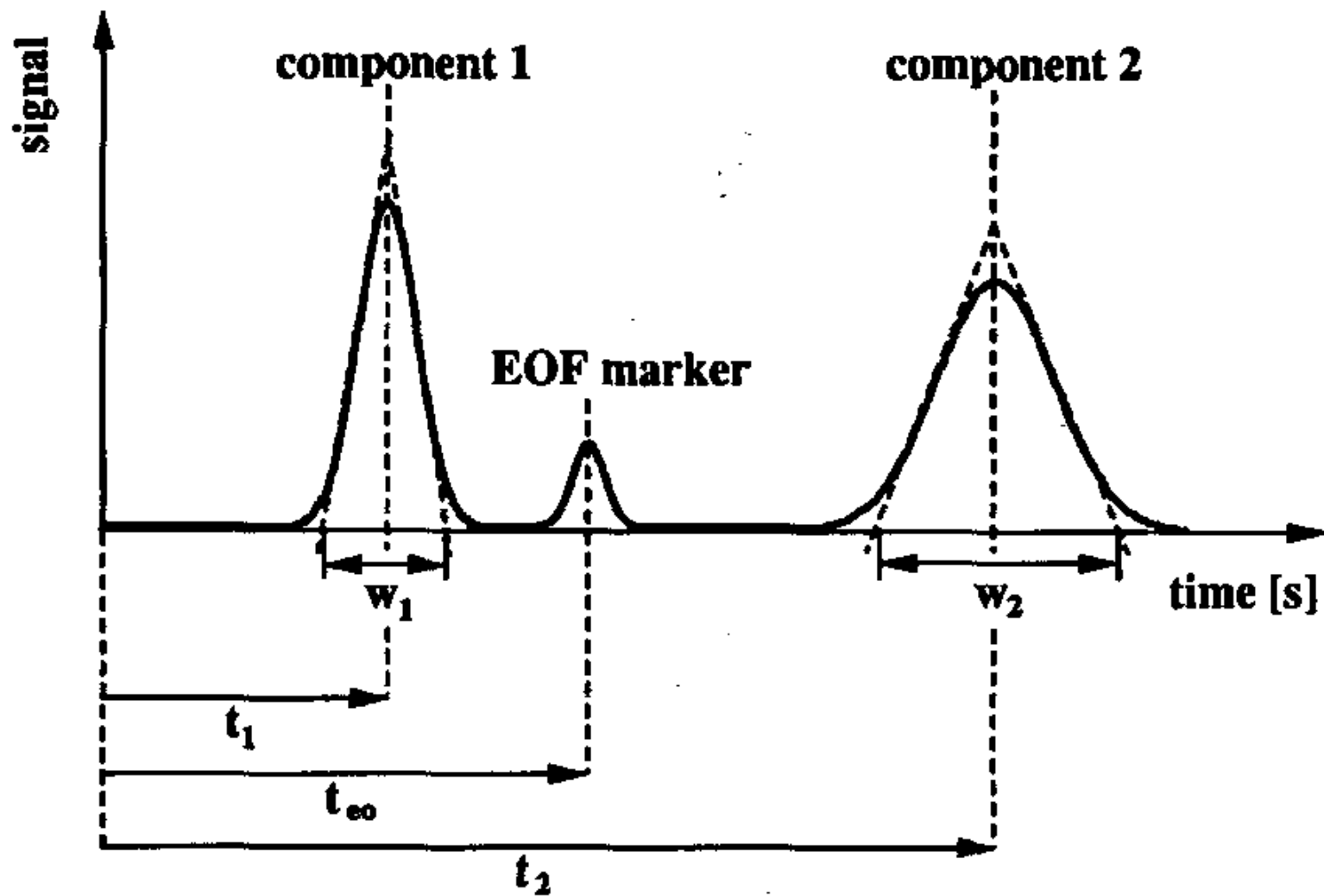
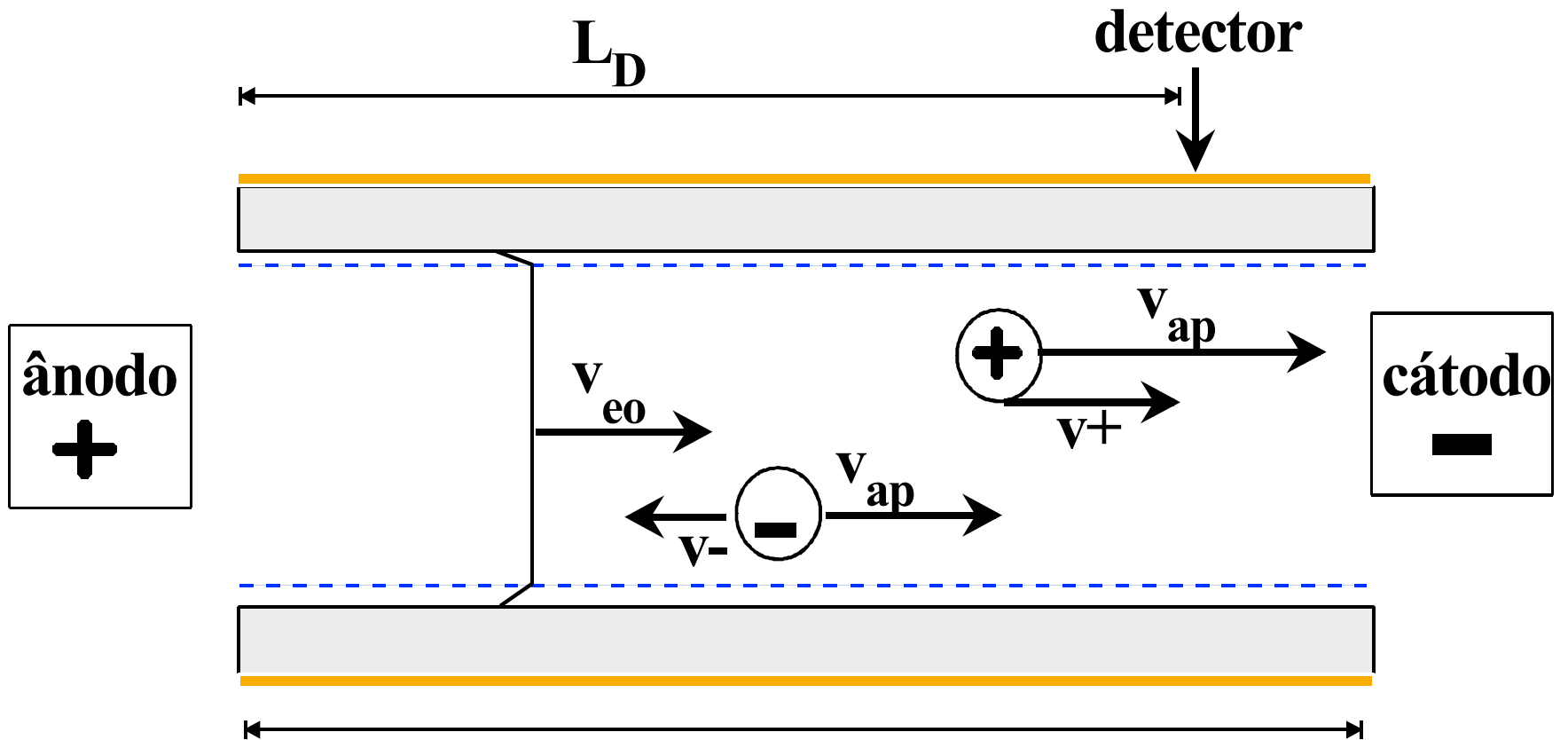


Fig. 2.6. Schematic diagram of a capillary electrophoretic separation. t_1 migration time of component 1, t_2 migration time of component 2, t_{eo} migration time of EOF marker, w_1 temporal peak width of component 1 and w_2 temporal peak width of component 2

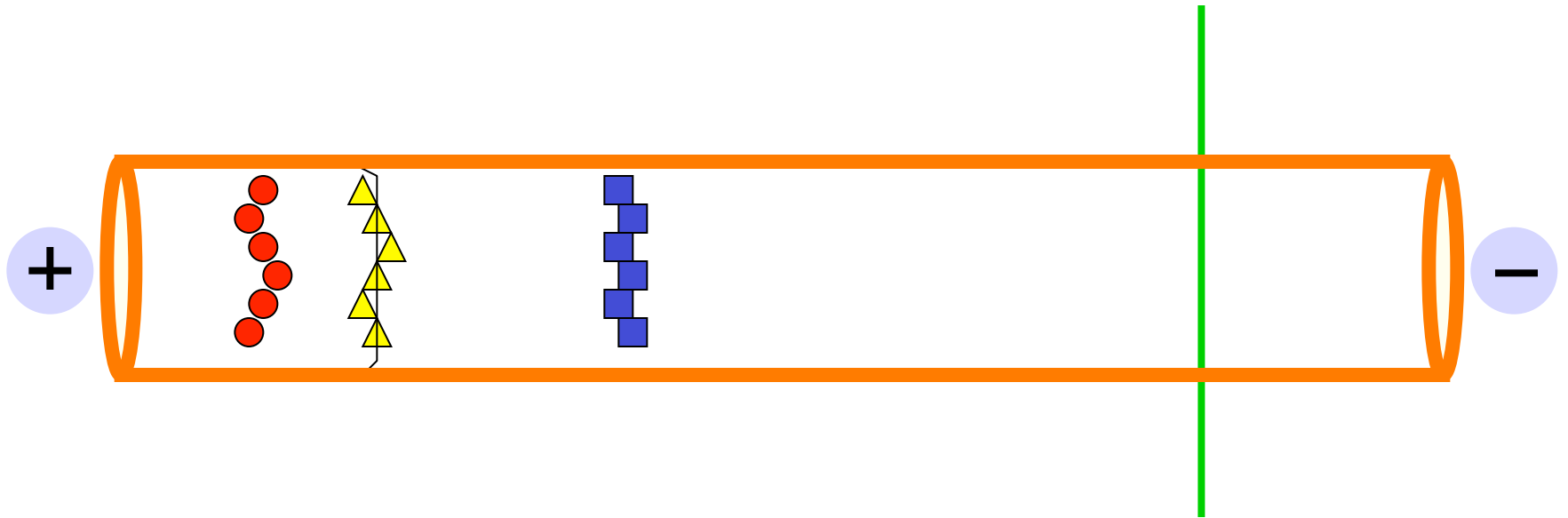


$$\mu_i = \frac{v_i}{E} = \frac{v_i \cdot L_T}{V} \quad L_T \quad [\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$$

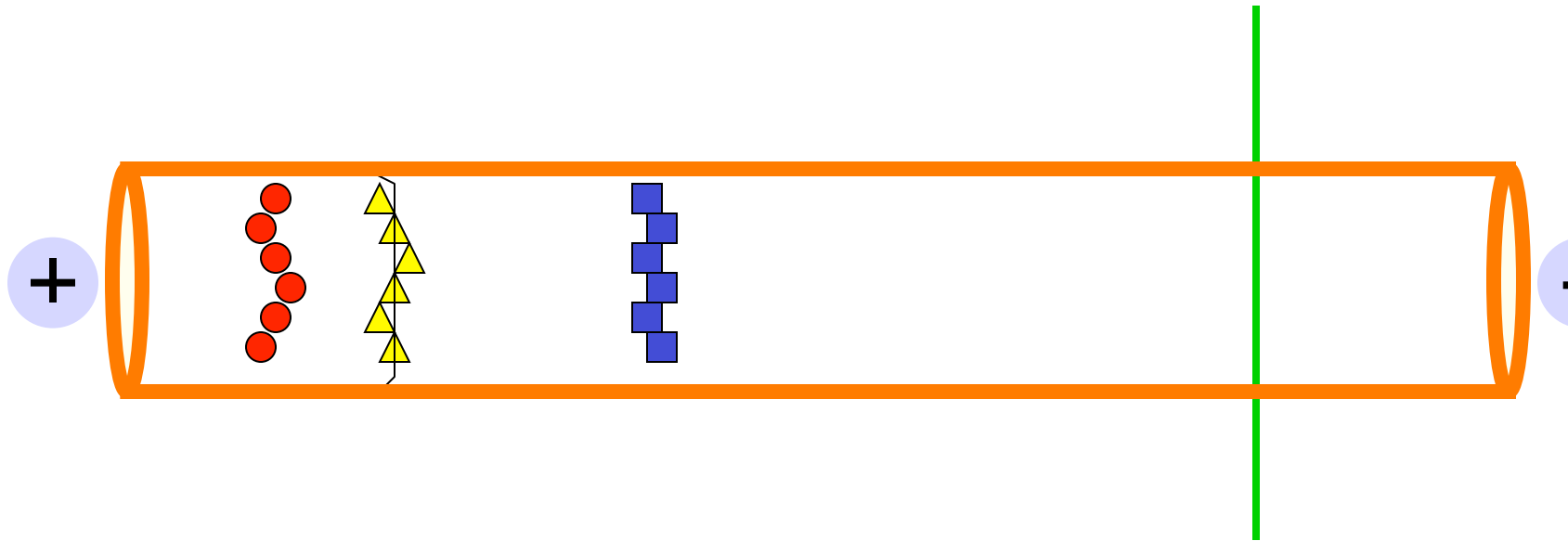
L_T = distância entre eletrodos [cm]

V = voltagem aplicada [V]

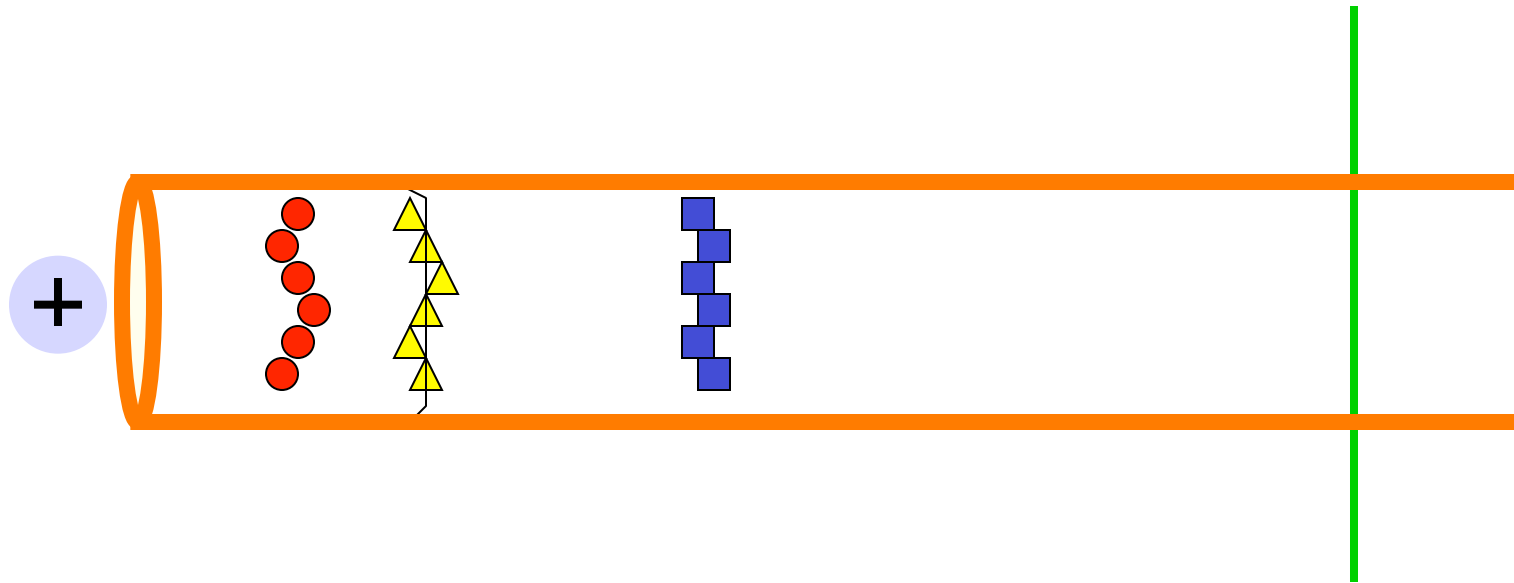
Electrophoretic Mobility



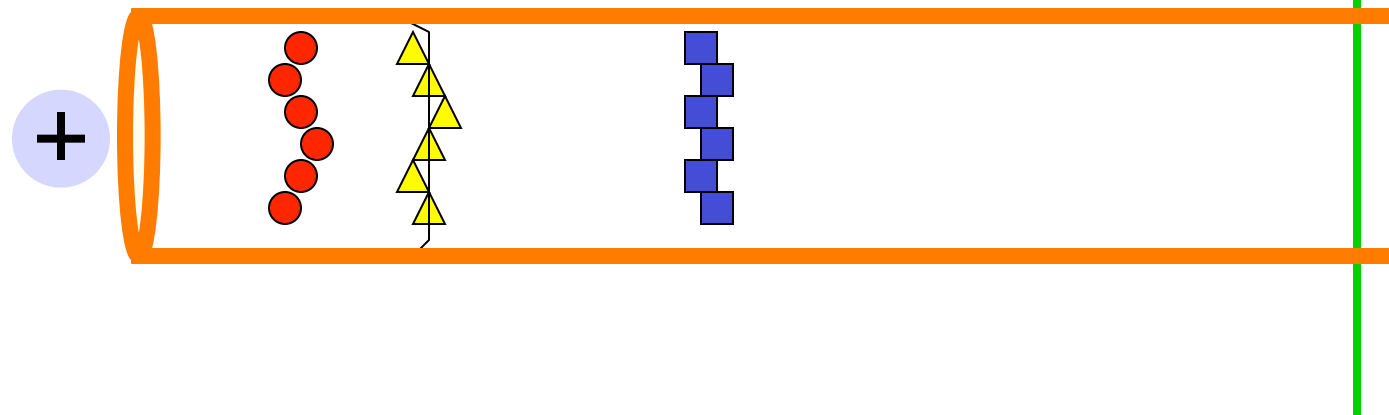
Electrophoretic Mobility



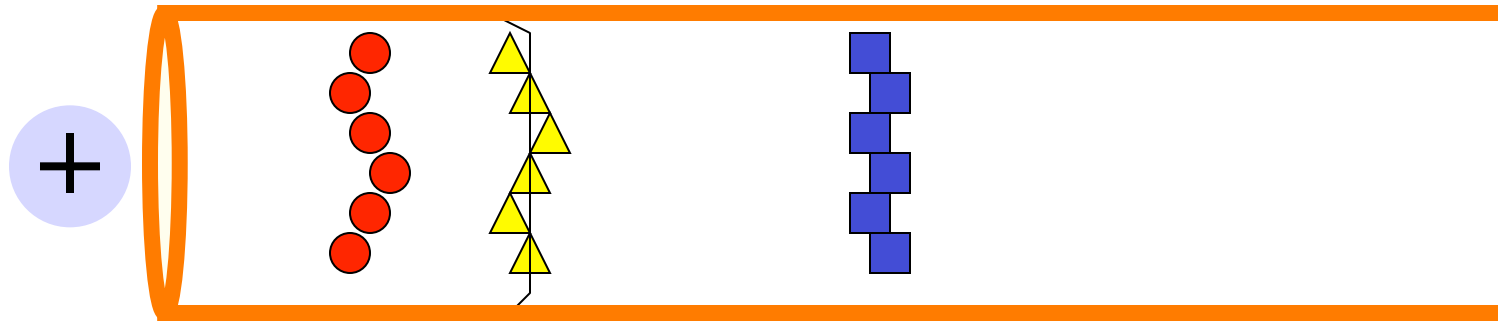
Electrophoretic Mobility



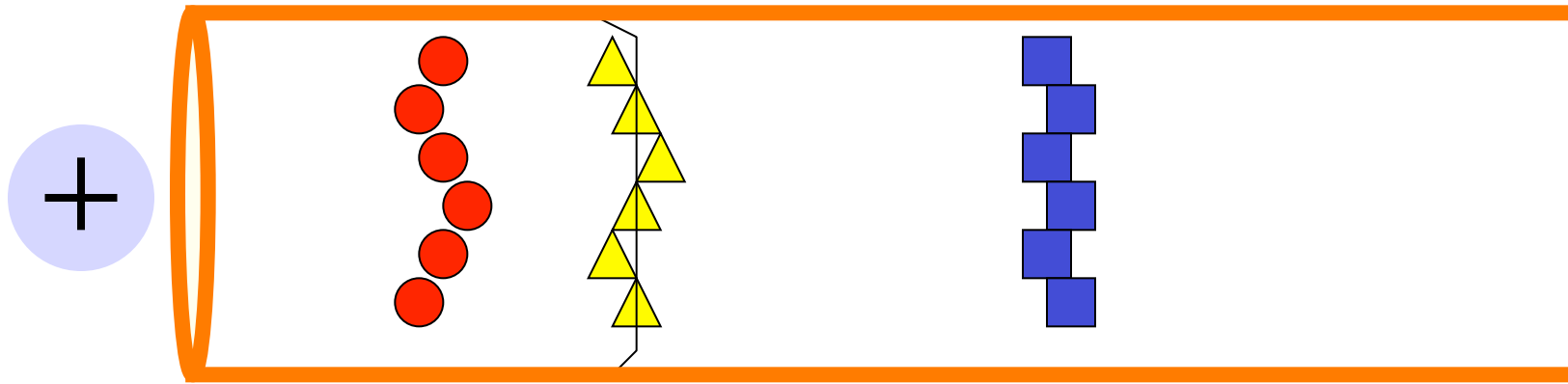
Electrophoretic Mobility



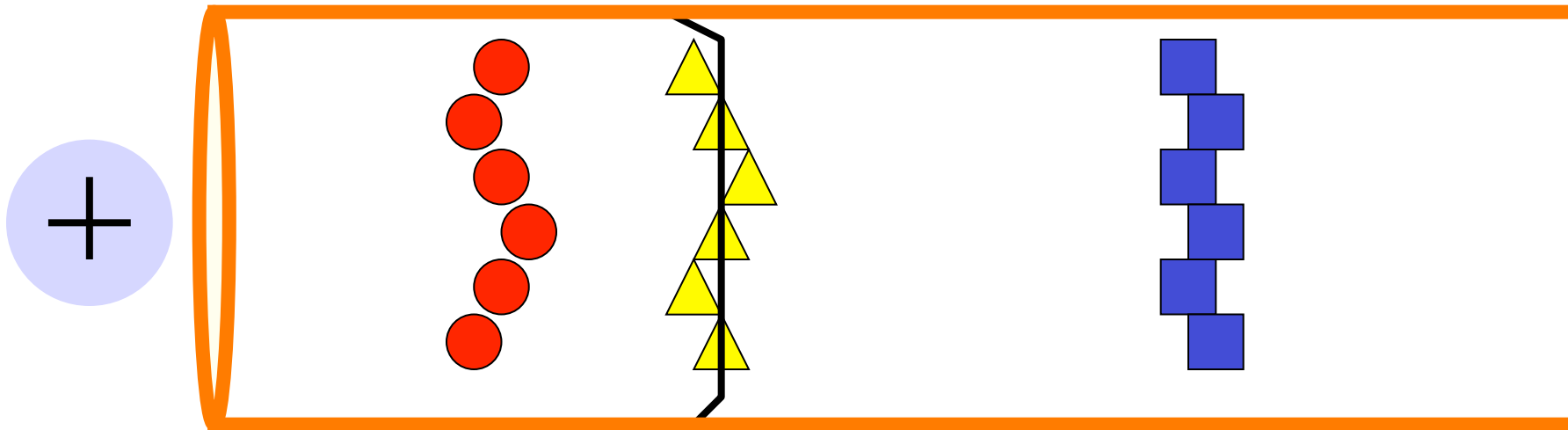
Electrophoretic Mobility



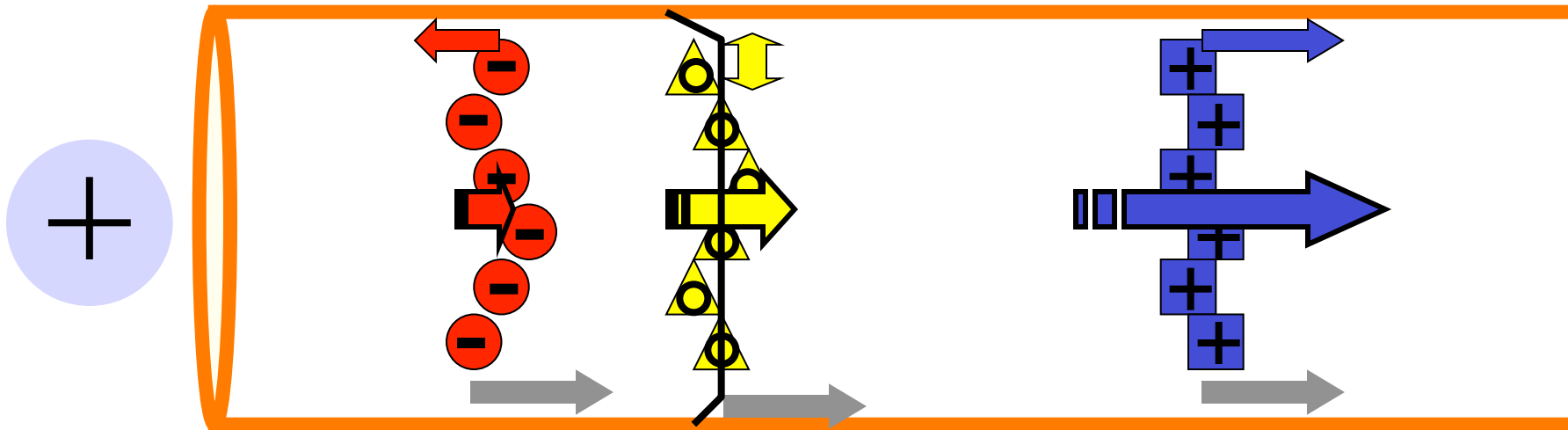
Electrophoretic Mobility



Electrophoretic Mobility



Electrophoretic Mobility



 A velocidade aparente do componente i ($V_{i(ap)}$) é dado por:

$$V_i = V_{i(ap)} - V_{eo} = \frac{L_D}{t_i} - \frac{L_D}{t_{eo}} \quad [\text{cm.s}^{-1}]$$

L_D = comprimento da coluna até o ponto de detecção [cm]

t_i = tempo de migração do soluto i [s]

t_{eo} = tempo de migração do fluxo eletroosmótico [s]

$V_{i(ap)}$ = velocidade aparente do soluto i [cm.s⁻¹]

V_{eo} = velocidade de fluxo eletroosmótico

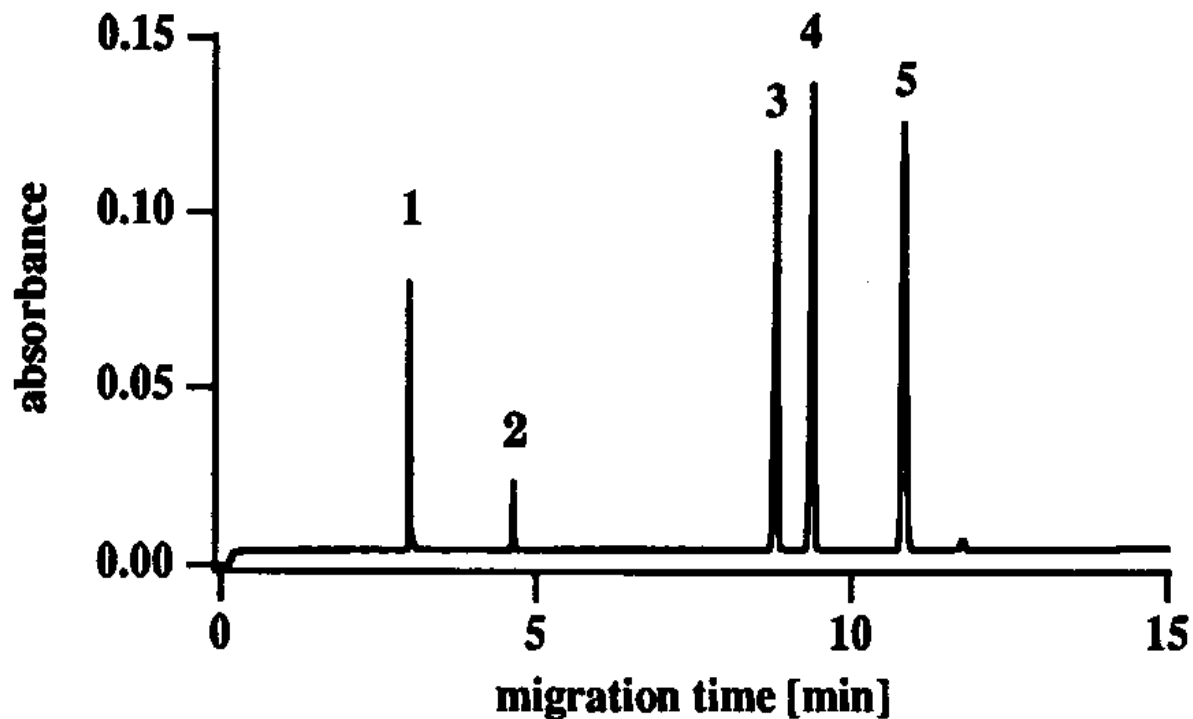



Fig. 2.8. Electropherogram of benzyltrimethylammonium chloride (1), benzyl alcohol (2), acetylsalicylate (3), 4-hydroxybenzoate (4) and benzoate (5). Instrument: Beckman P/ACE 2000; experimental conditions: fused silica capillary, 57 cm x 75 μm i.d., hydrodynamic injection for 1 s, field strength $263 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$, temperature $25 \text{ }^\circ\text{C}$, UV detection at 200 nm, electrolyte system 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0

1. cloreto de benziltrimetilamônio (1+) 2. álcool benzílico (0) 3. salicilato de acetila (1-) 4. 4-hidroxibenzoato (1-) 5. benzoato (1-)

 Na ausência de fluxo eletrosmótico, a mobilidade pode ser calculada por:

$$\mu_i = \frac{v_i}{E} = \frac{L_D \cdot L_T}{t_i V} \quad [\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$$

L_D = comprimento da coluna até o ponto de detecção [cm]

L_T = comprimento total da coluna (distância entre os eletrodos) [cm]

t_i = tempo de migração do soluto i [s]

E = intensidade do campo elétrico [$\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$]

V = voltagem aplicada entre os eletrodos [V]

B. Eletrosmose e Fluxo Eletrosmótico (EOF)

- Eletrosmose ou eletroendosmose é o fenômeno básico que acompanha todo processo eletroforético
- Dentro de um tubo de sílica fundida a eletrosmose provocará o aparecimento de um fluxo dentro da coluna
- O fluxo origina-se da ionização dos grupos silanóis na superfície da coluna (ácidos fracos - $pK_a \sim 3$)
- Para medir o fluxo eletrosmótico é necessário um marcador neutro (substância visível pelo detector porém não iônica)

$$v_{EOF} = \frac{L}{t_m}$$

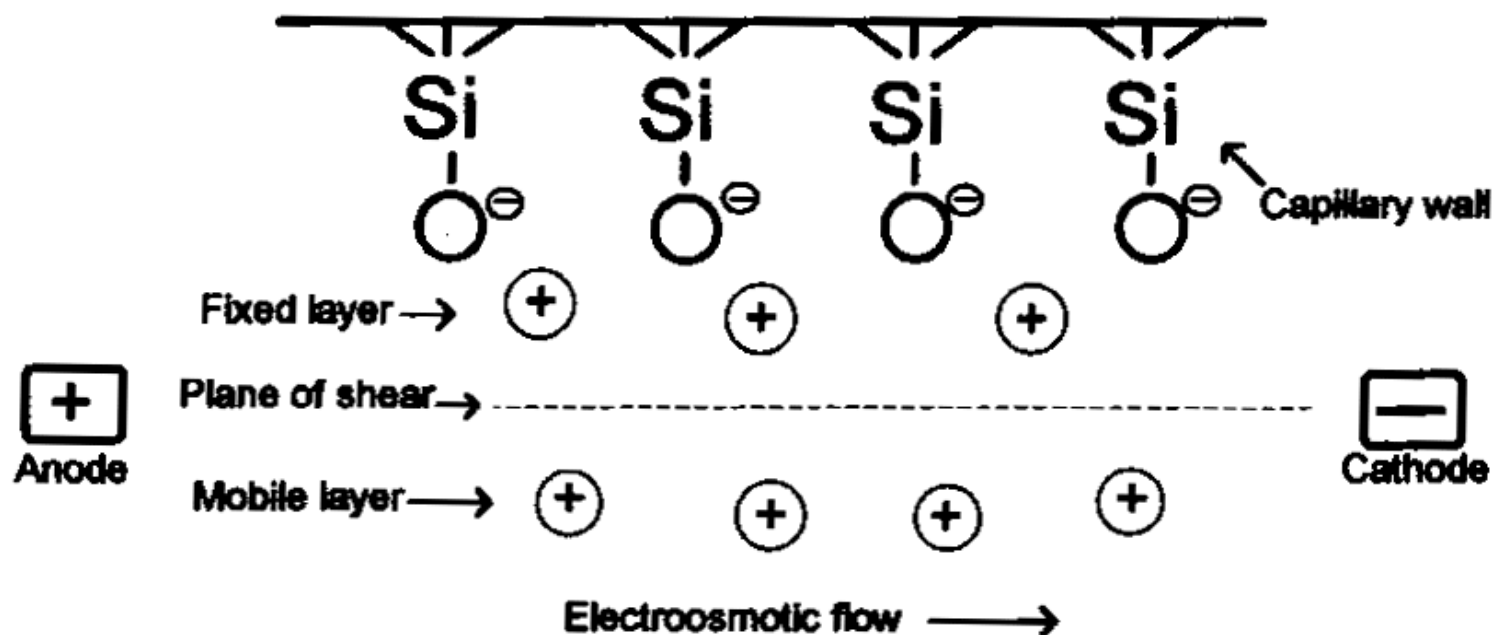


Fig. 2.3. Representation of electroosmotic flow in a capillary. Electroosmotic flow is caused by the negatively charged Si-O⁻ groups on the inner wall of the capillary attracting the positively charged cations, represented by the circled '+'s, forming the fixed layer. The mobile layer of cations is pulled toward the cathode, dragging the bulk buffer solution with it. The anions and the solvation of the cations are not shown.

- **Camada fixa** - cátions fortemente atraídos pelos grupos silanóis são imóveis
- **Camada móvel** - formada pela dupla camada difusa, é atraída eletroforeticamente ao cátodo
- **Entre as duas camadas** - plano de cisalhamento

Potencial Zeta (ζ):

diferença de potencial químico criado pelo desbalanceamento elétrico através do plano de cisalhamento.

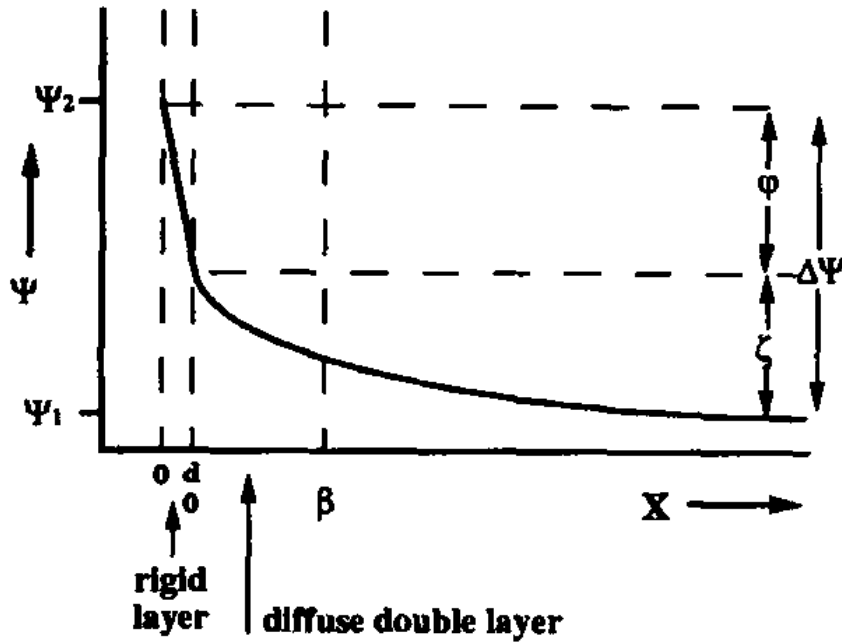
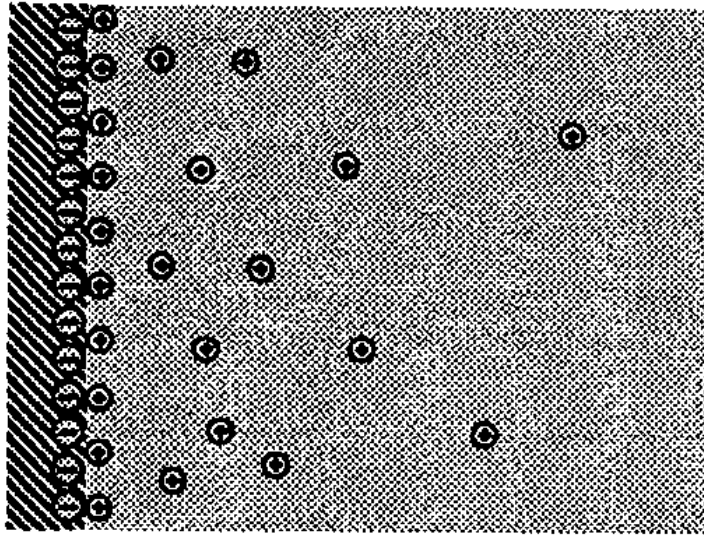


Fig. 2.10. Sterns model of the double layer occurring at the interface between an electrolyte solution and the surrounding surface

👉 Note que a μ_{eo} depende somente das características do tampão e independente do campo elétrico aplicado

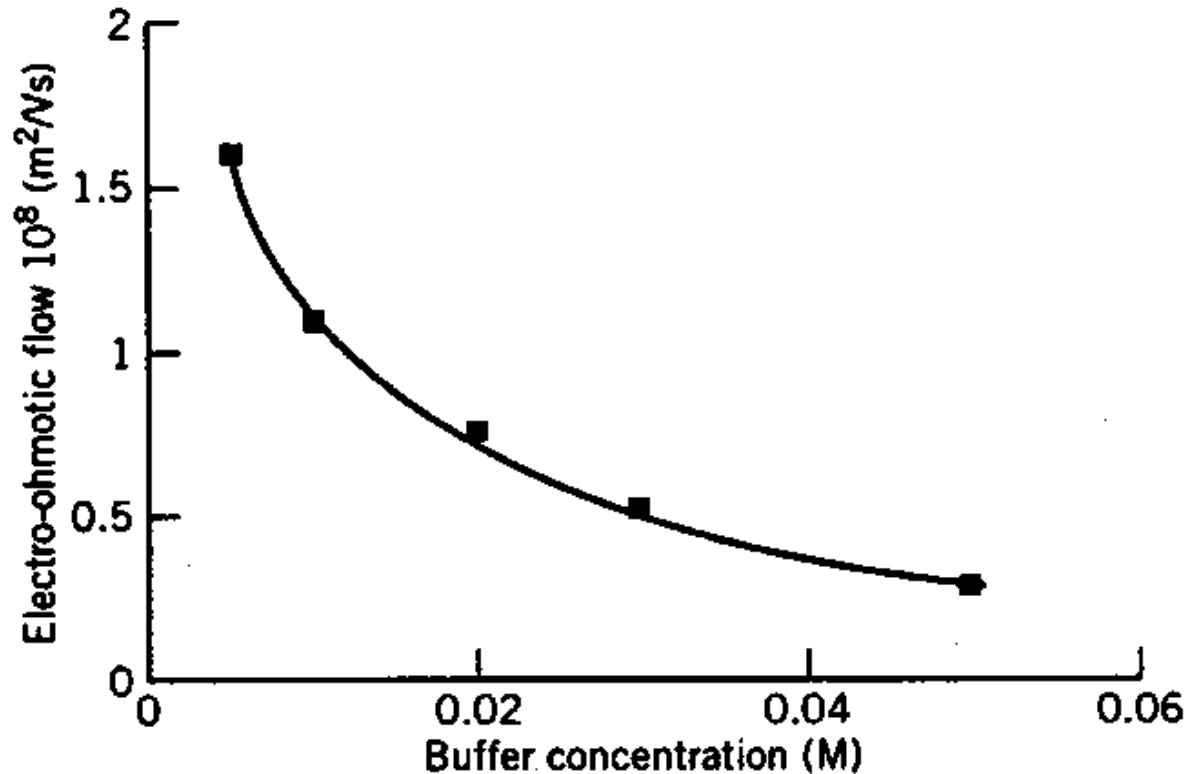


Fig. 2.8. Effect of phosphate buffer concentration on electroosmotic flow in a fused silica capillary, at a constant pH of 3.8. β -naphthol was used as a neutral marker to measure electroosmotic flow.

- **pH:** a superfície da sílica comporta-se como um ácido fraco e aumenta a dissociação com o aumento do pH

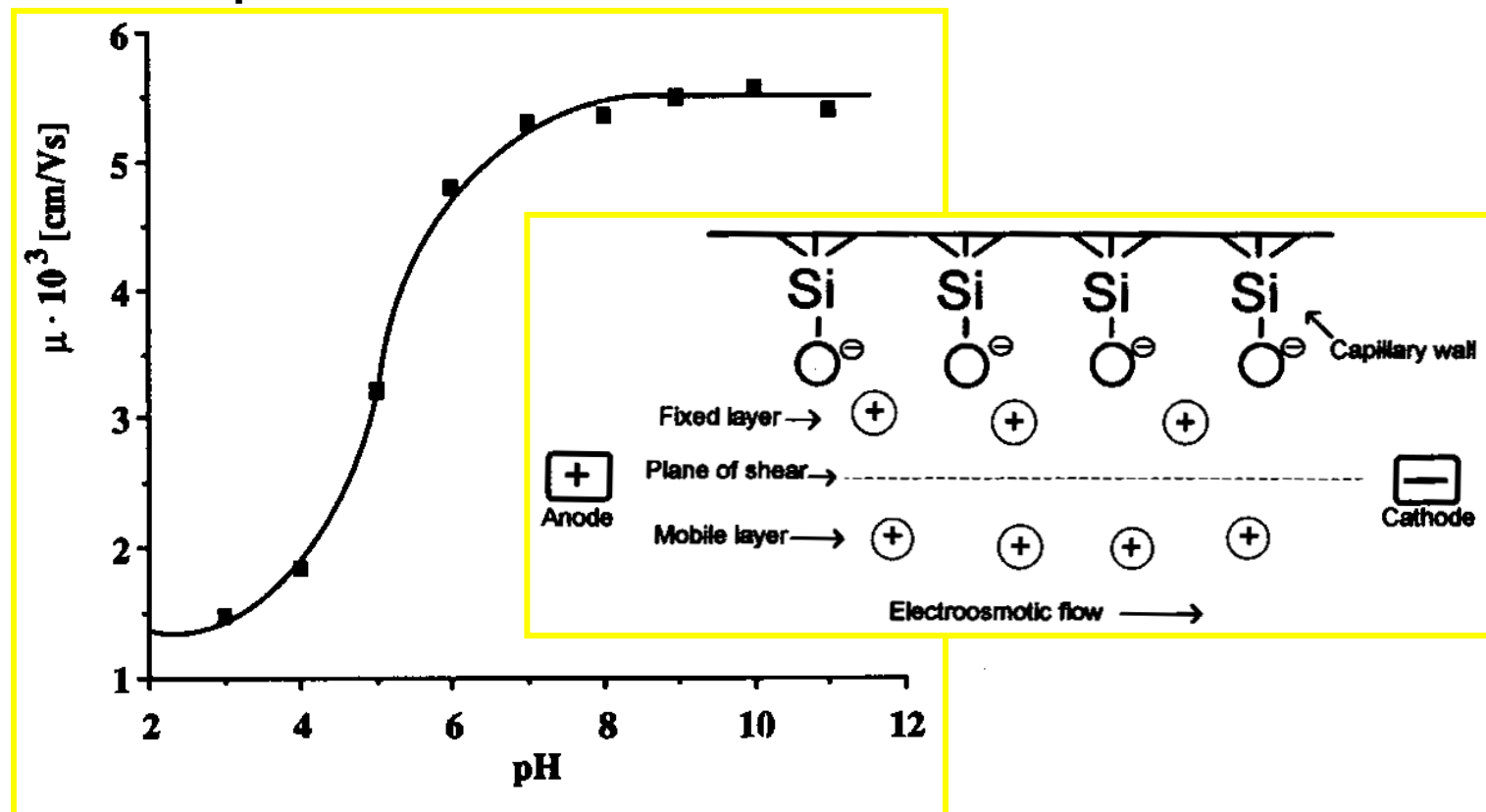


Fig. 2.12. Plot of pH versus electroosmotic mobility. Instrument: Beckman P/ACE 2000; experimental conditions: fused silica capillary, 57 cm x 75 μm i.d., hydrodynamic injection for 1 s, field strength 263 $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$, temperature 25 $^{\circ}\text{C}$, electrolyte system 50 mM sodium phosphate buffer. Benzyl alcohol is used as EOF marker and detected at 200 nm

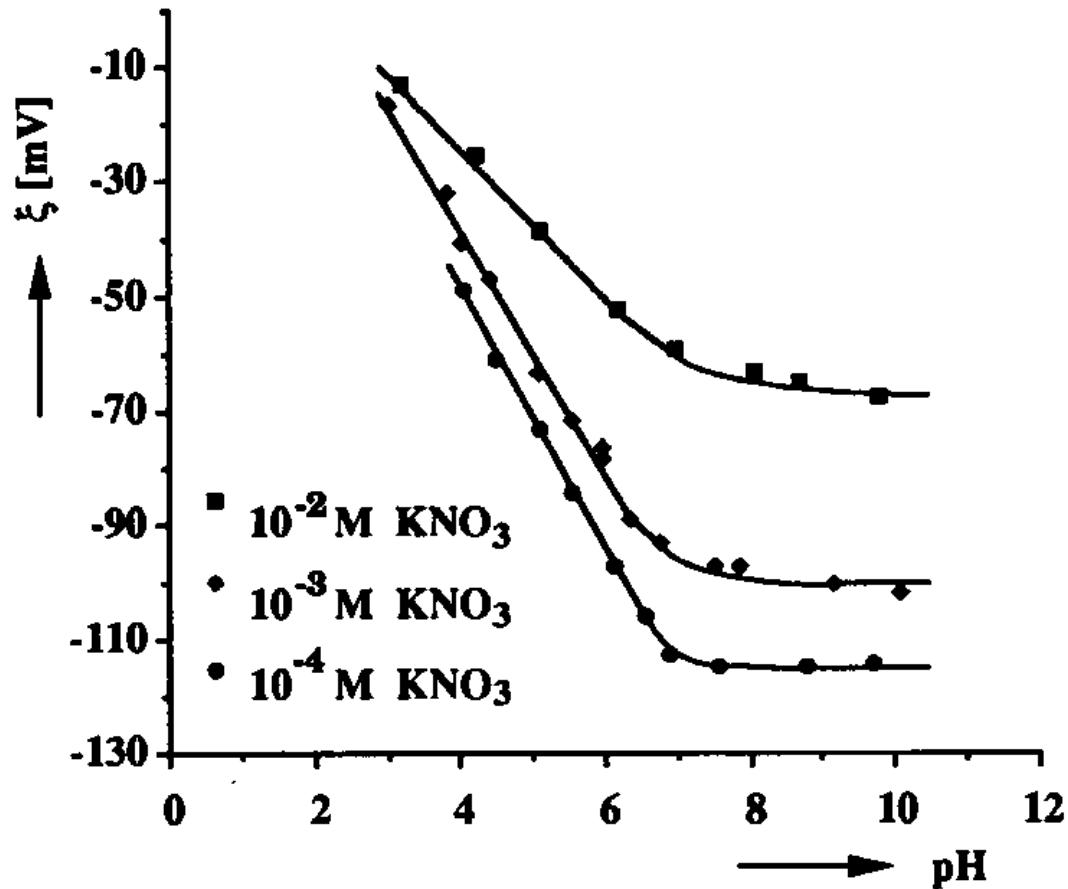
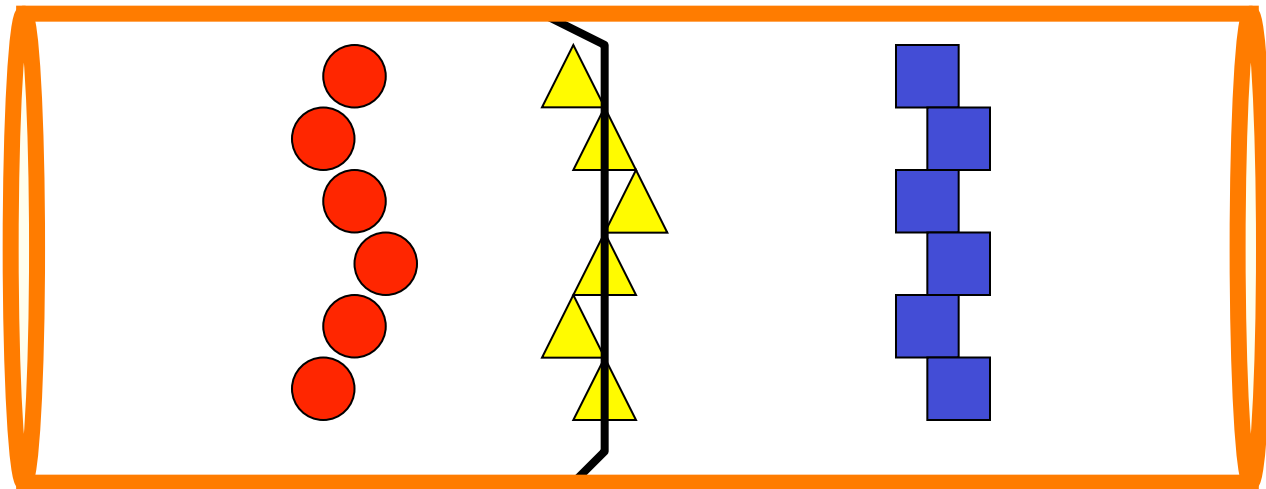


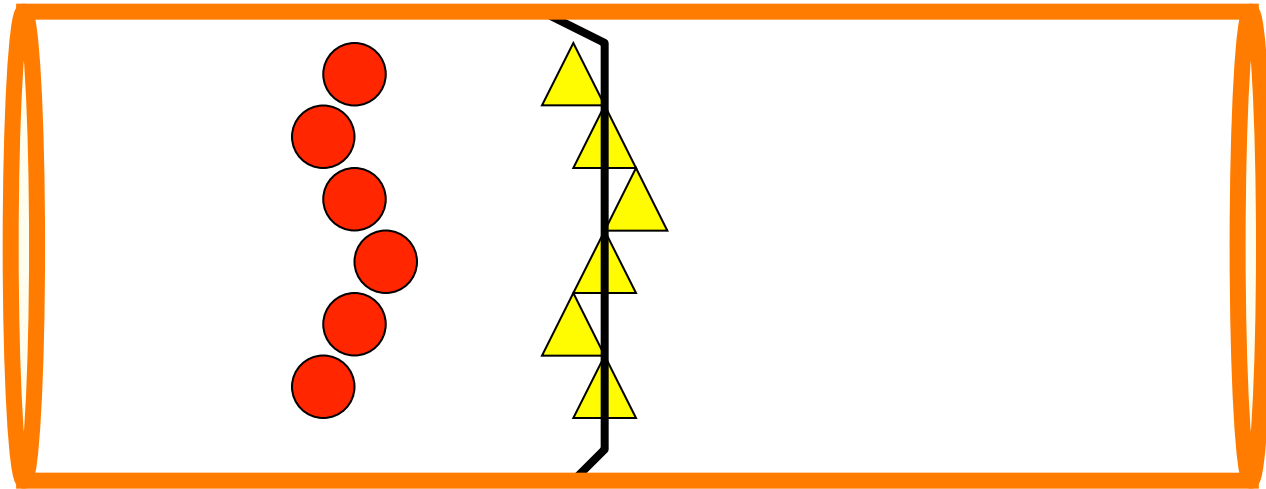
Fig. 2.11. The variation of the zeta potential of vitreous silica as a function of pH in aqueous solutions of potassium nitrate. (With permission from Ref. 13)

👉 o pH também influencia a ionização dos solutos
 \therefore além de afetar μ_{eO} , afeta μ_i

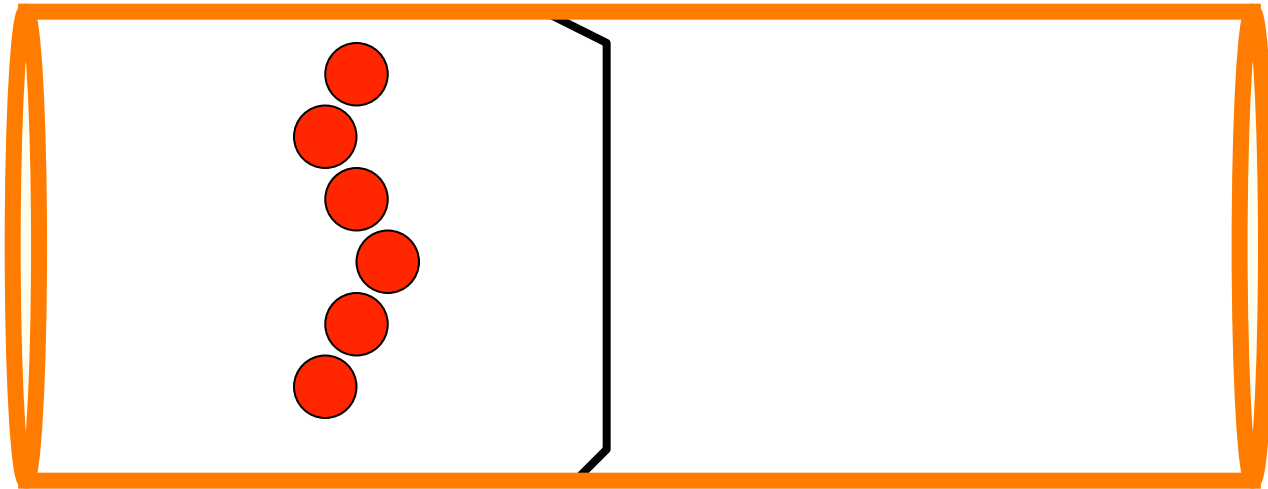
Electroosmotic Flow (EOF)



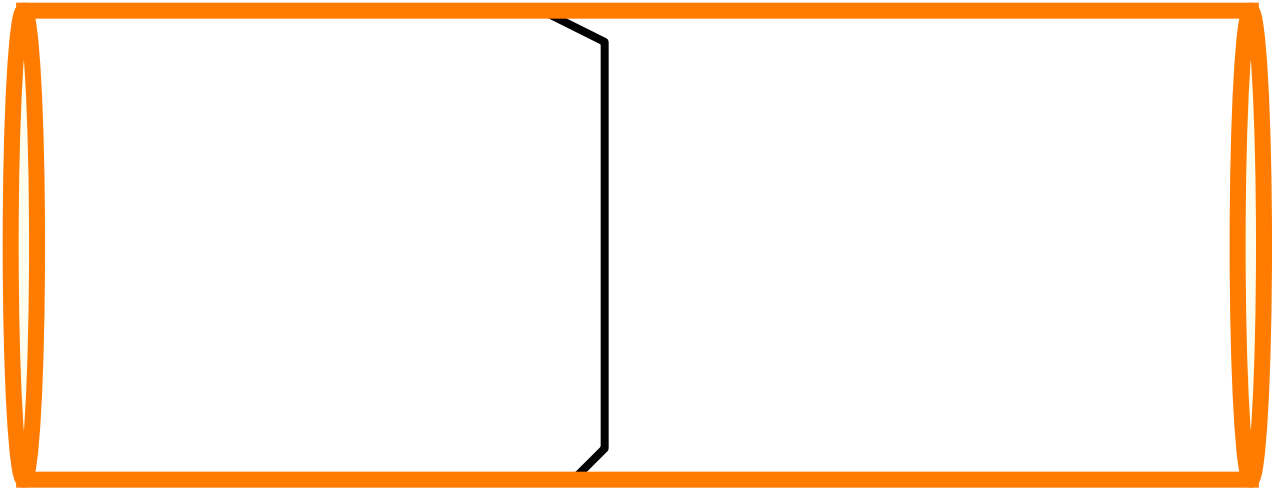
EOF



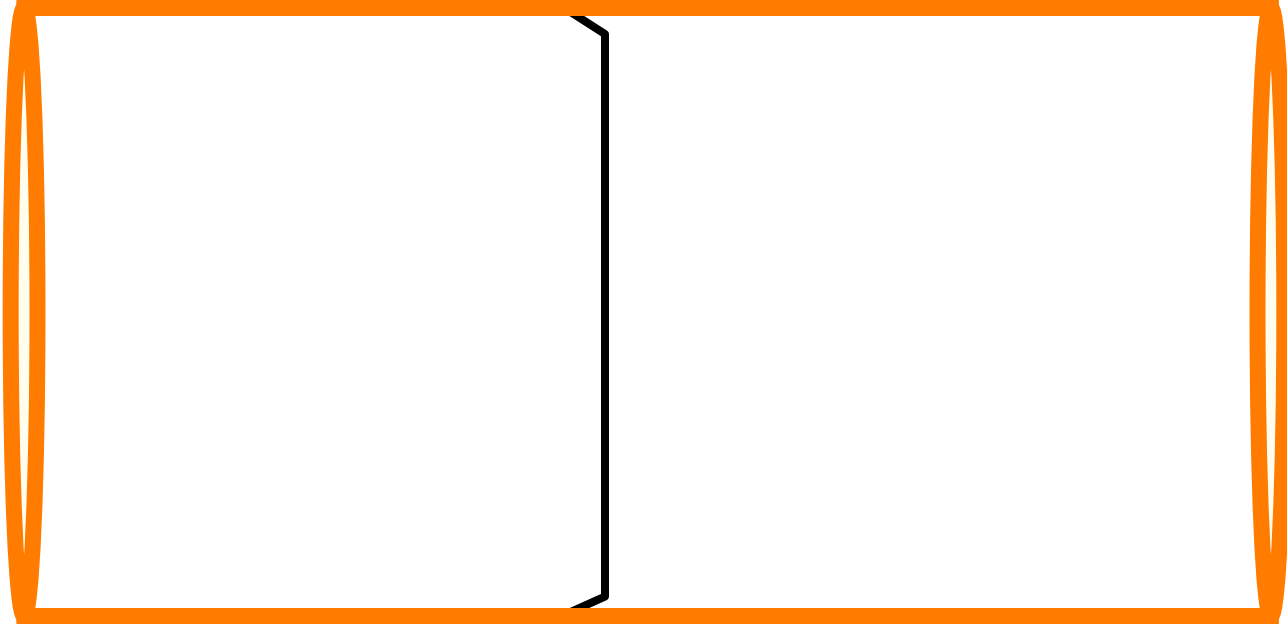
EOF

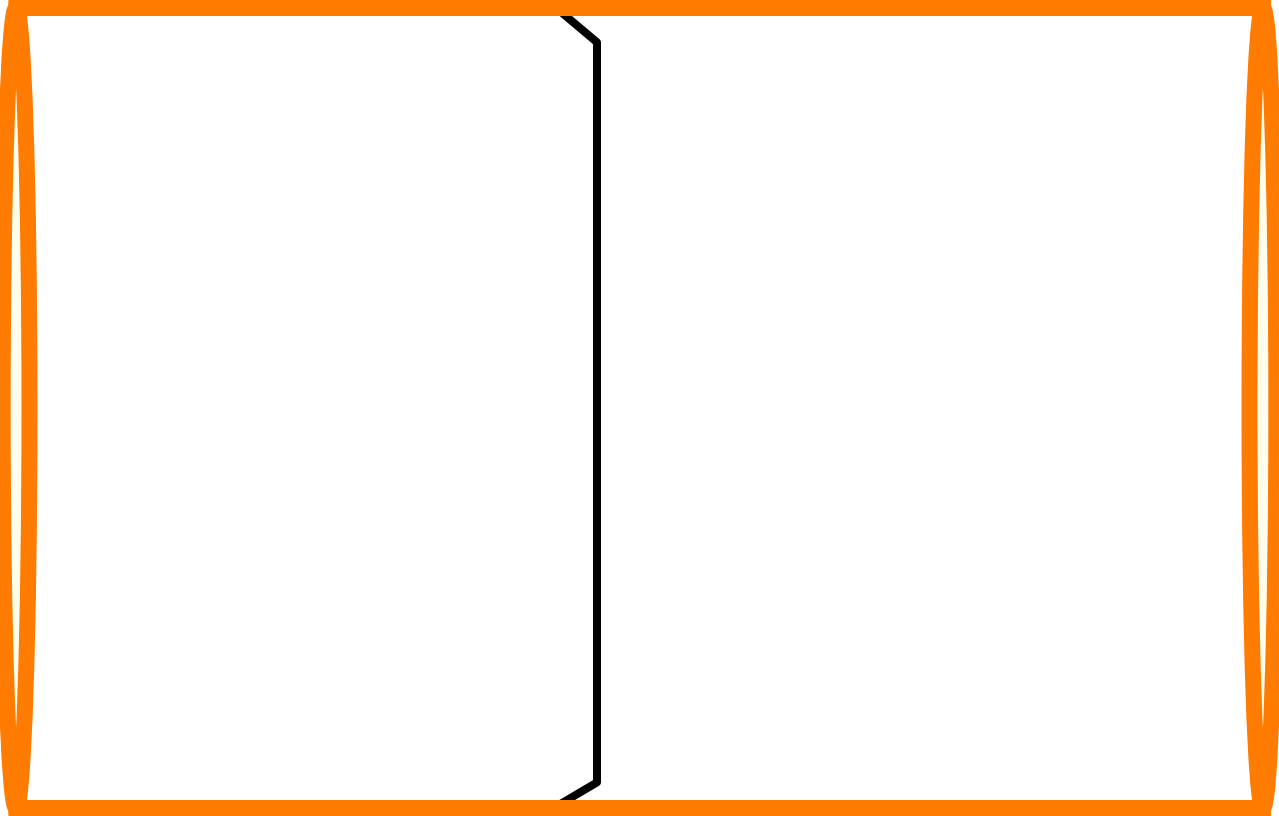


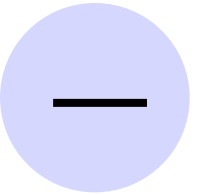
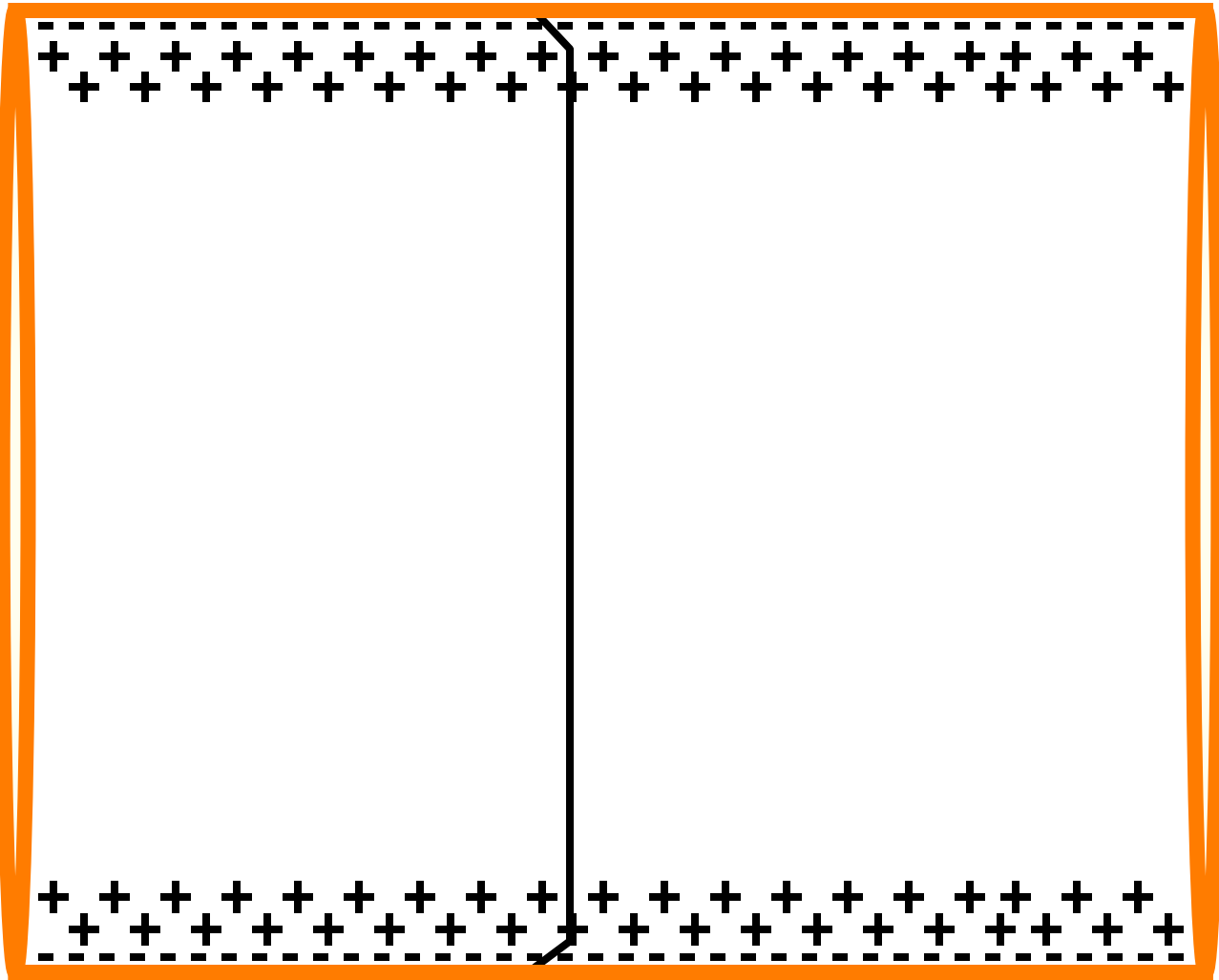
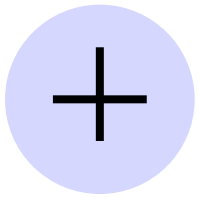
EOF

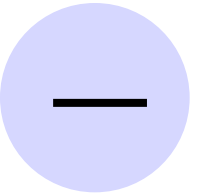
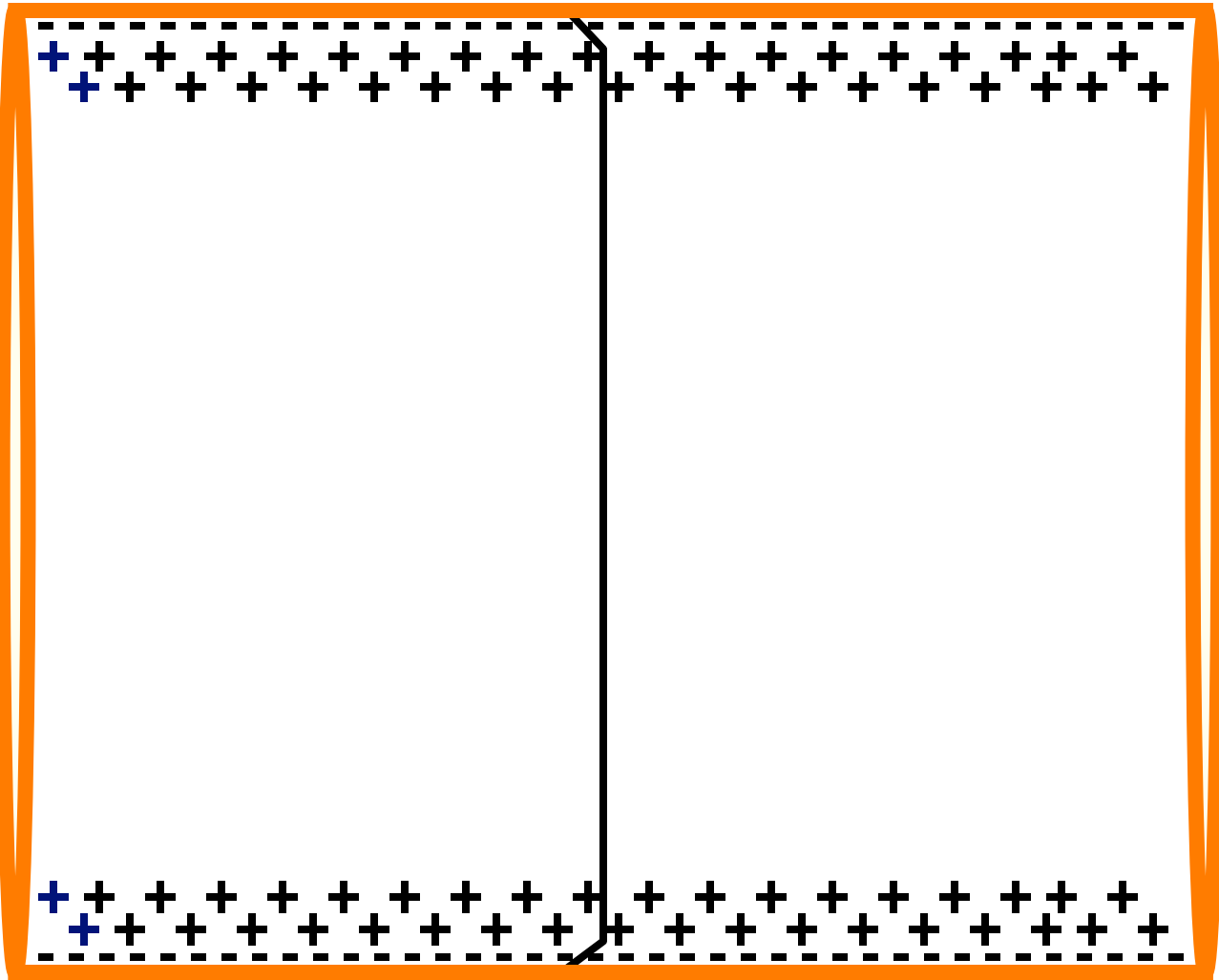
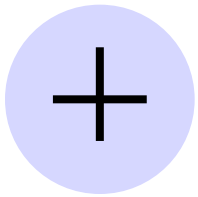


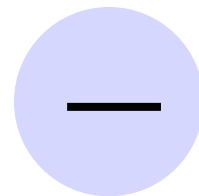
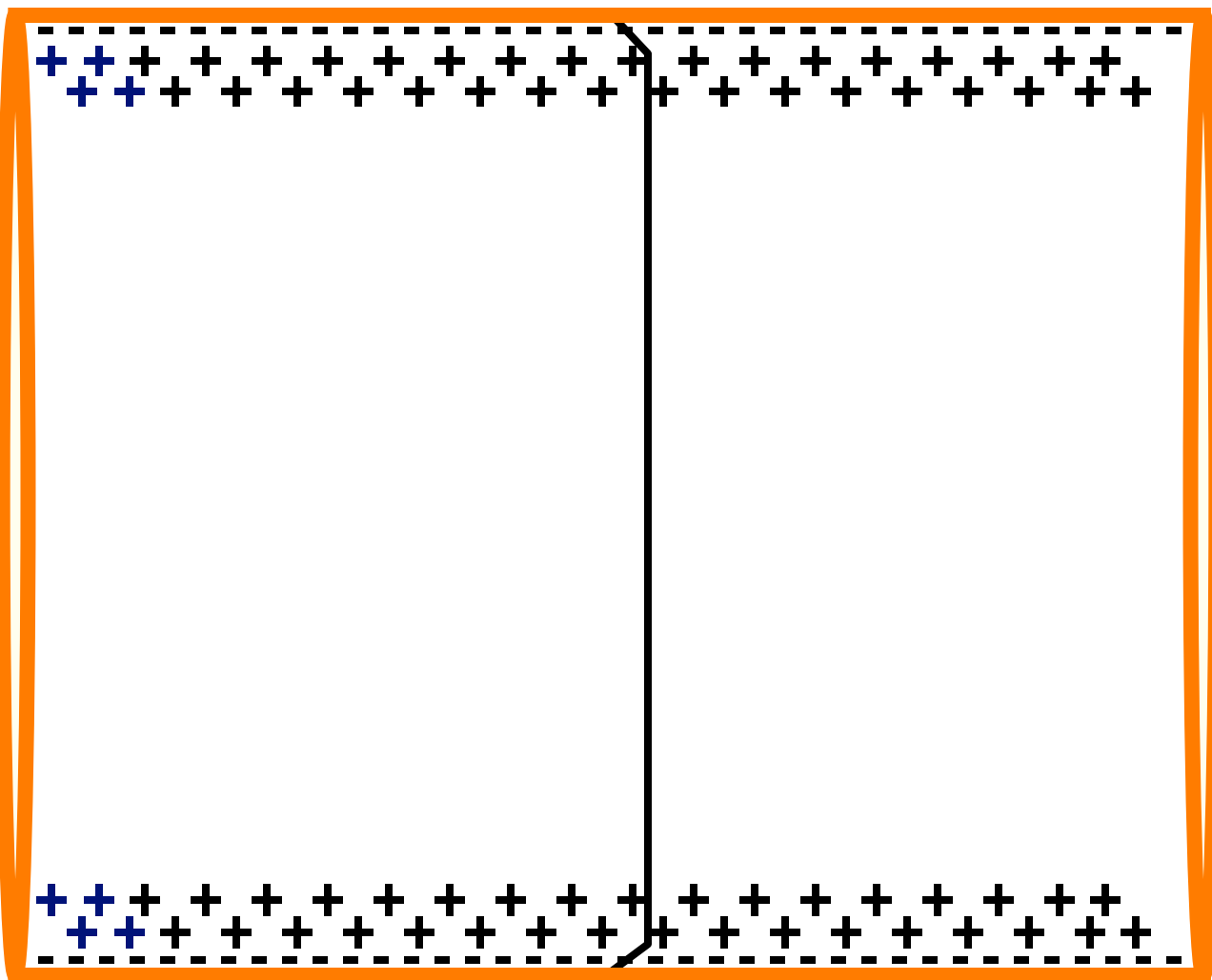
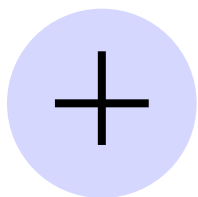
EOF

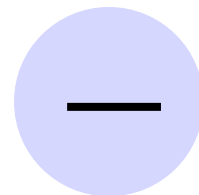
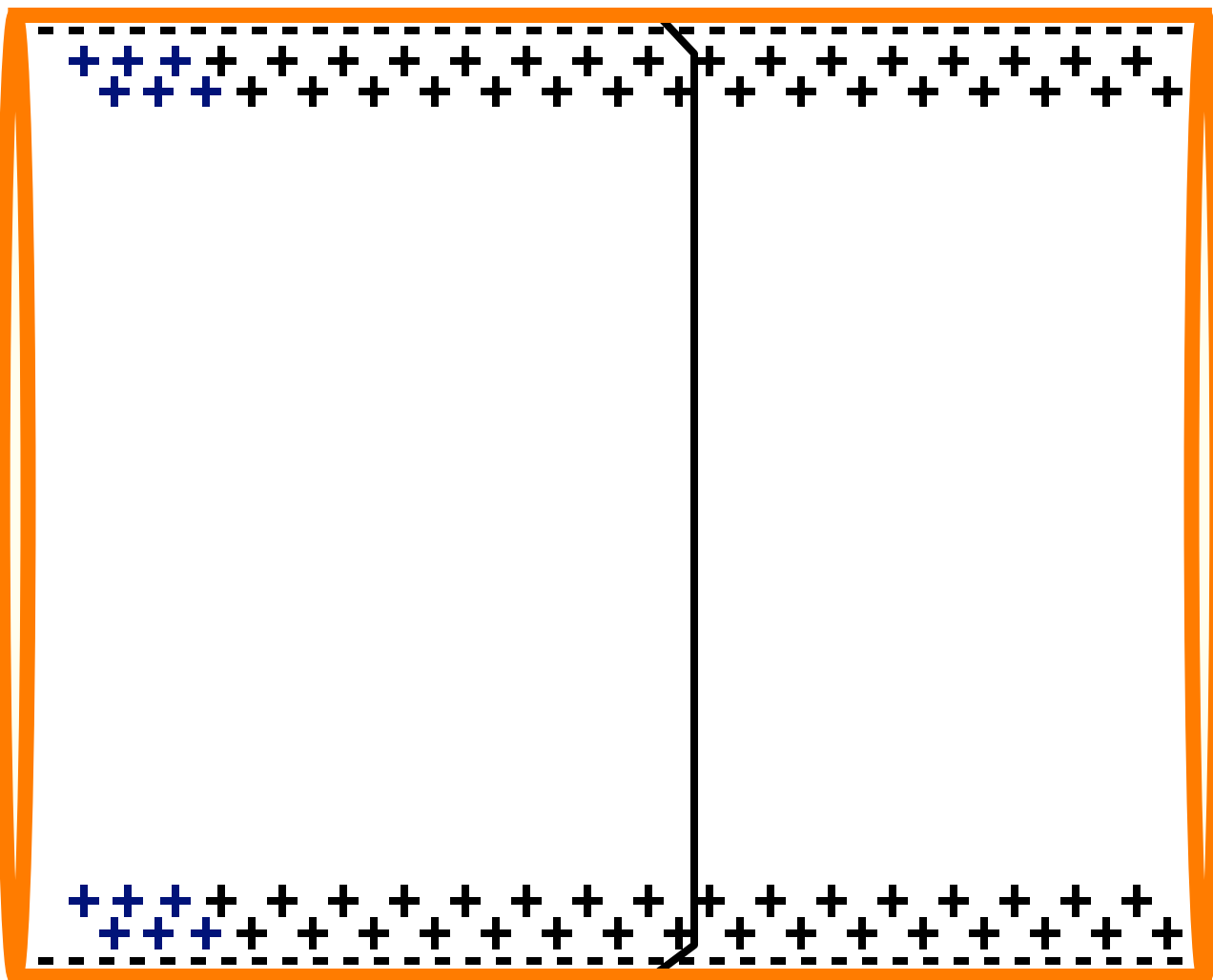
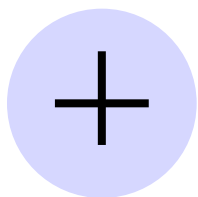


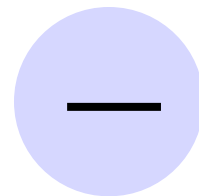
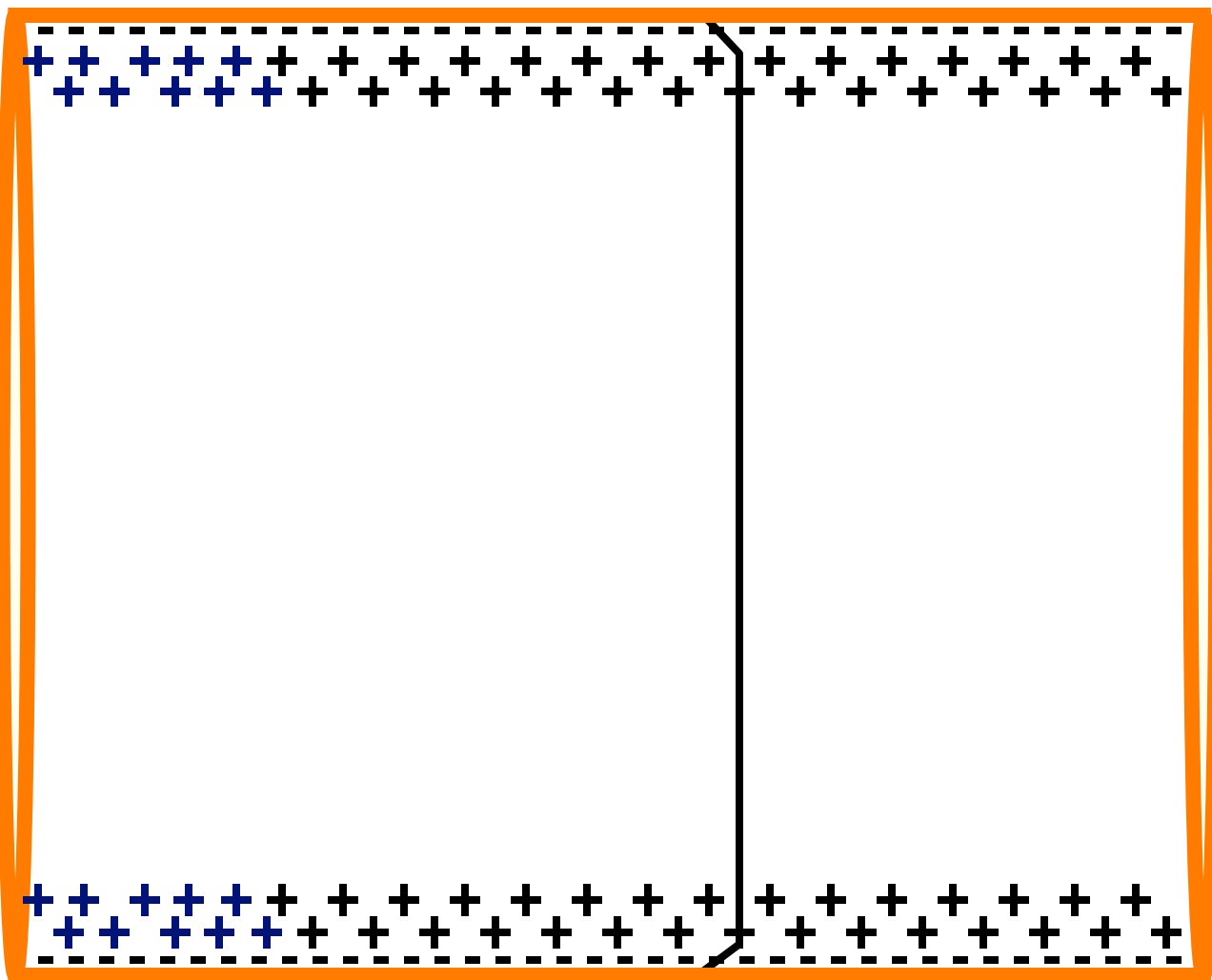
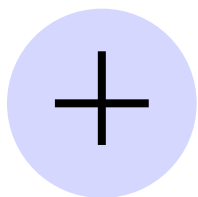


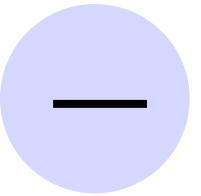
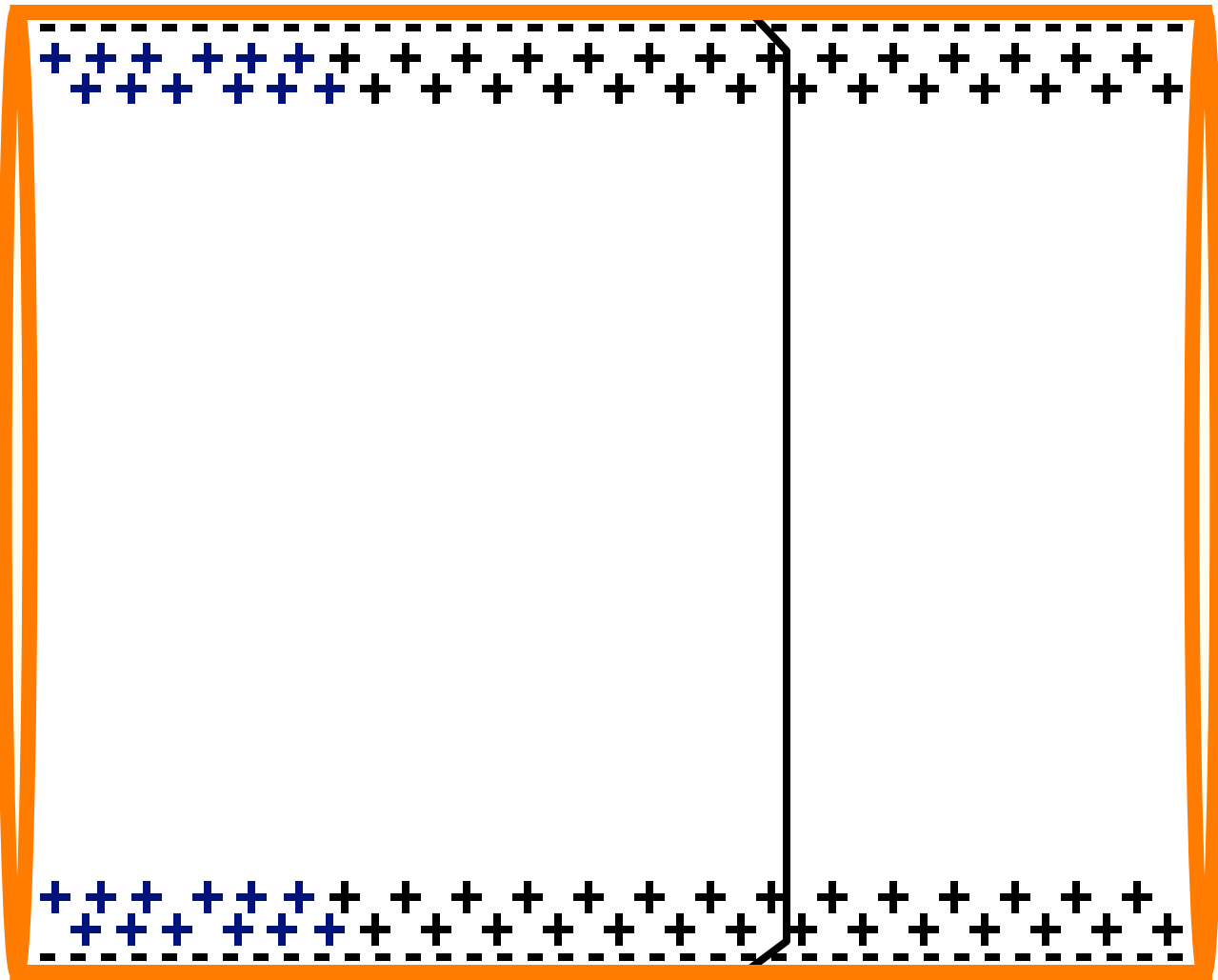
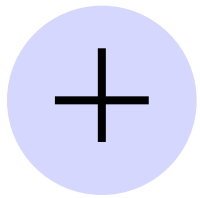


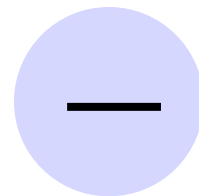
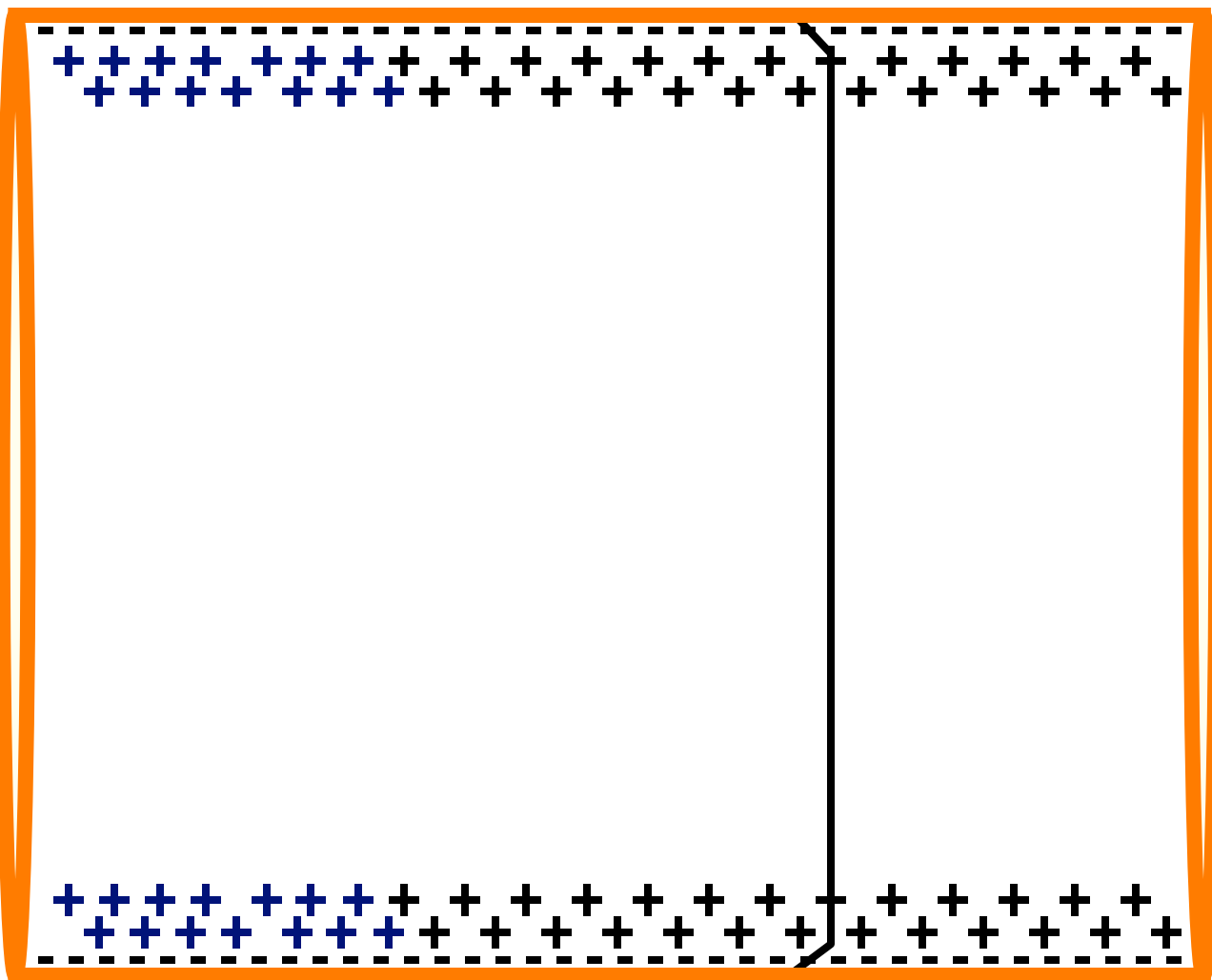
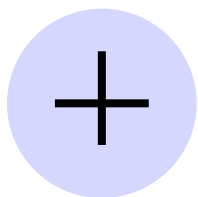


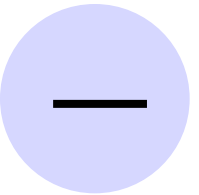
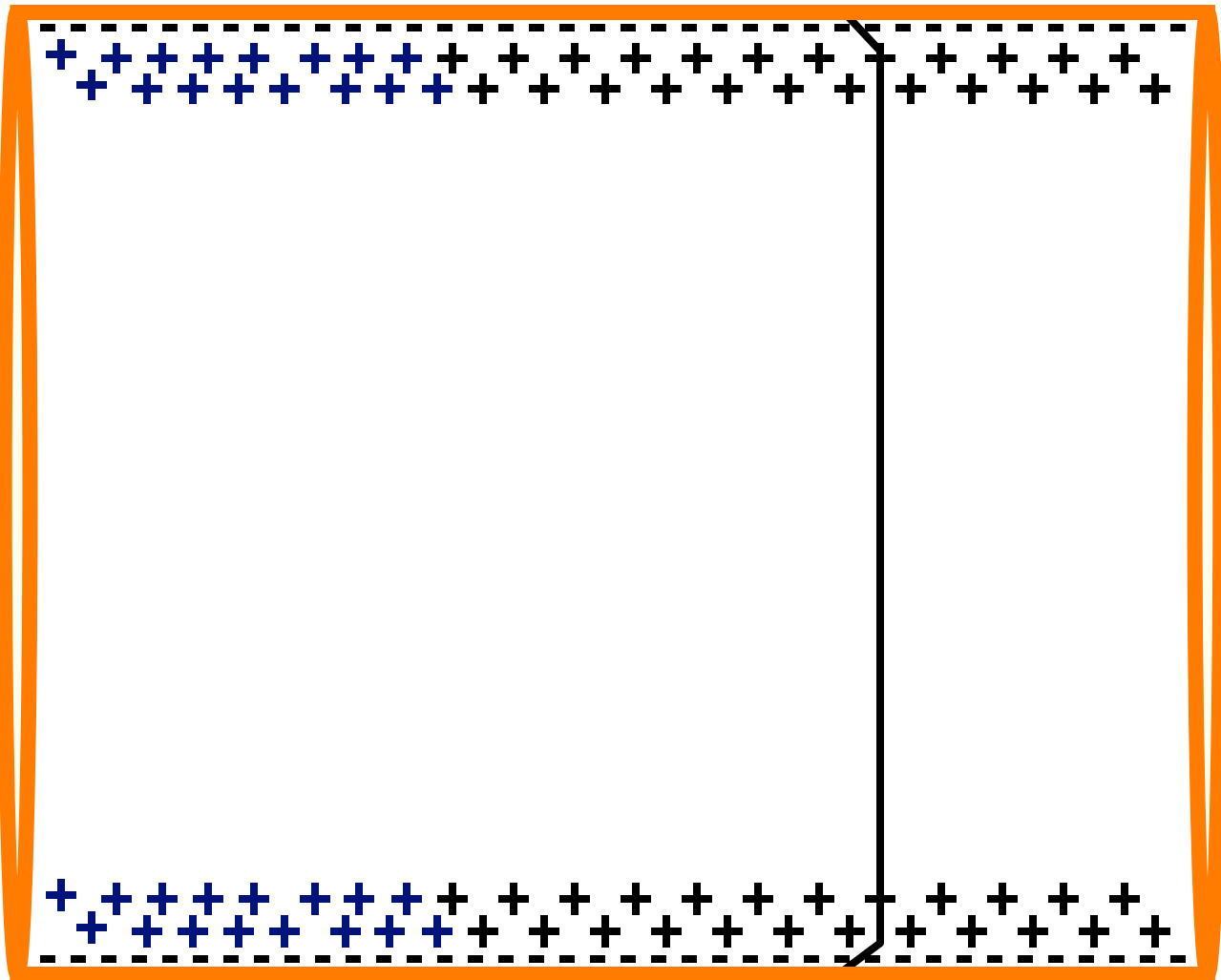
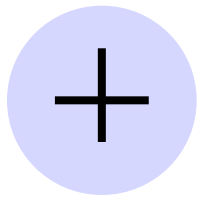












C. Perfil do Fluxo Eletrosmótico

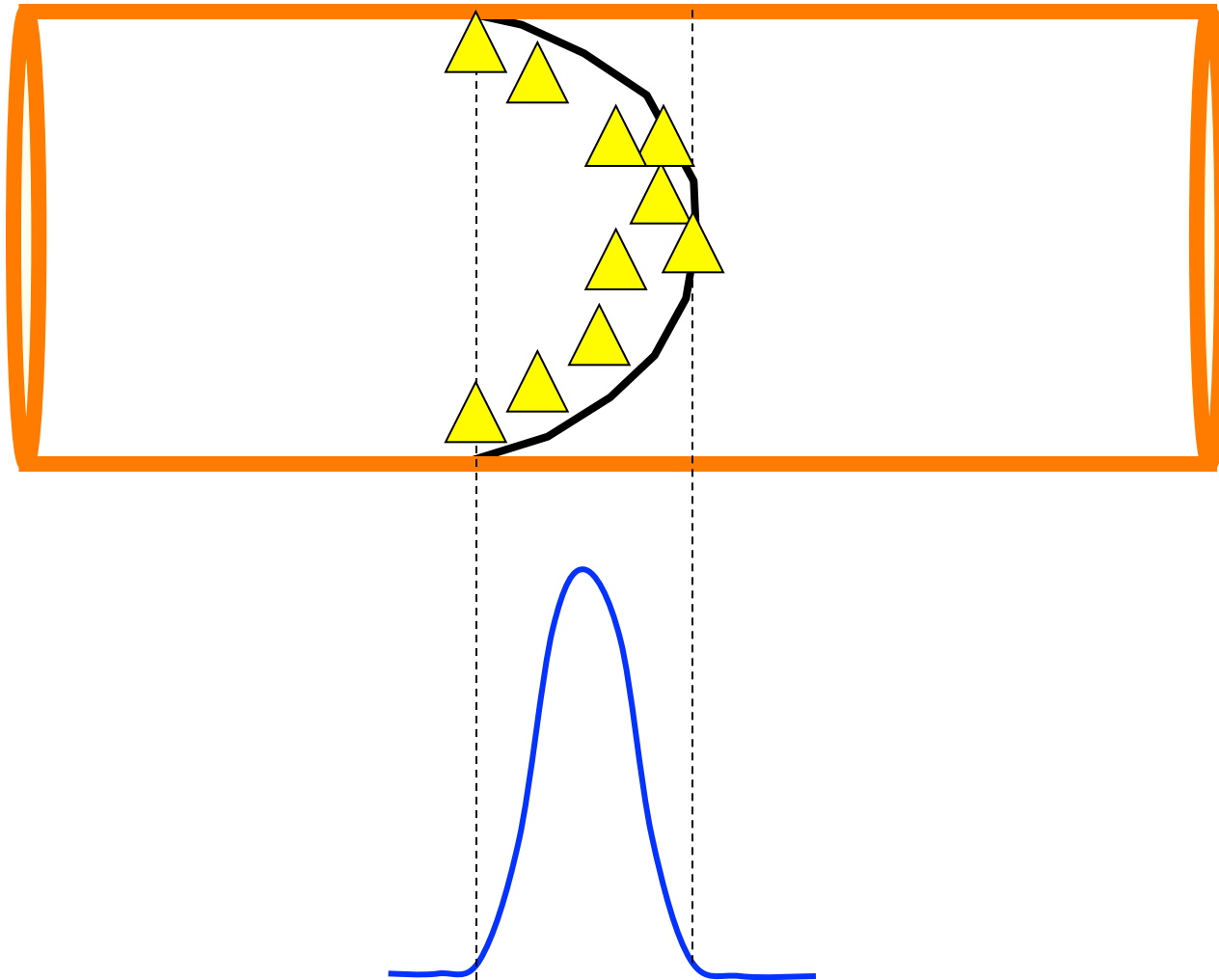
- Em todo sistema com fluxos existirá um perfil de velocidade através da área seccional do tubo
- **Sistemas hidrodinâmicos**



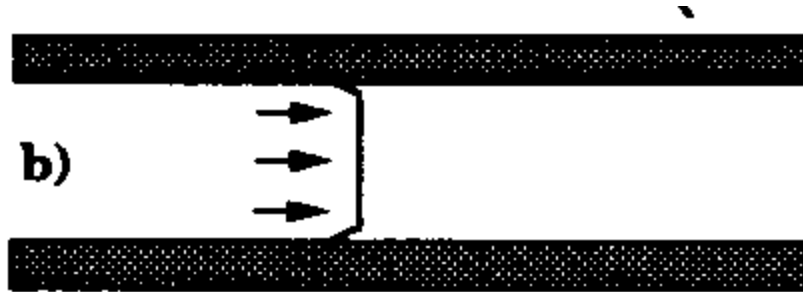
As setas indicam o vetor de velocidade ao longo do eixo radial e são decorrentes da ação friccional entre as diversas camadas .

O gradiente de velocidade vai de zero, próximo a parede do tubo, à máxima velocidade no centro do tubo.

Efficiency in HPLC

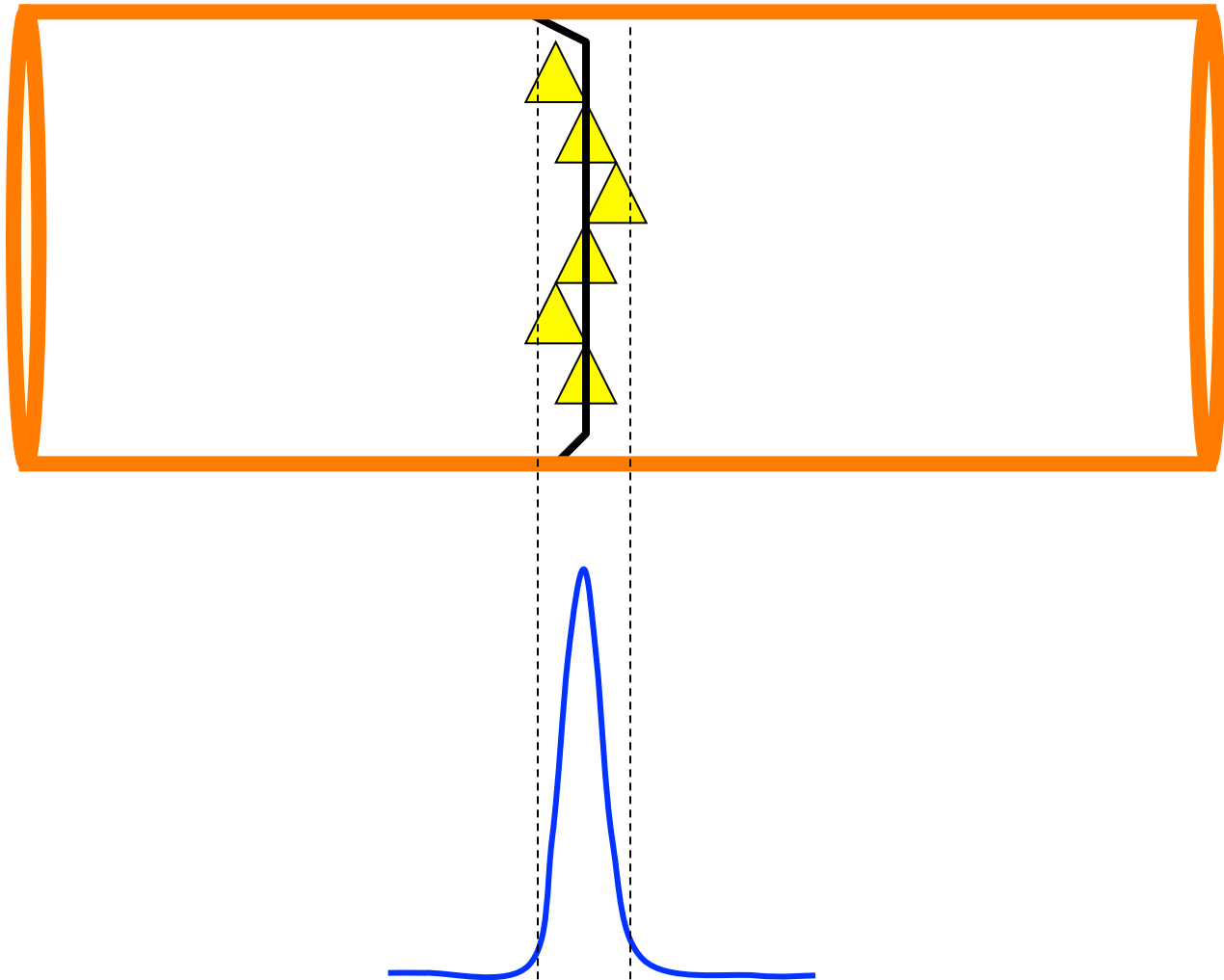


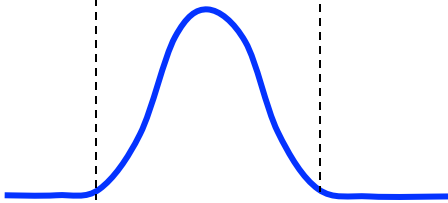
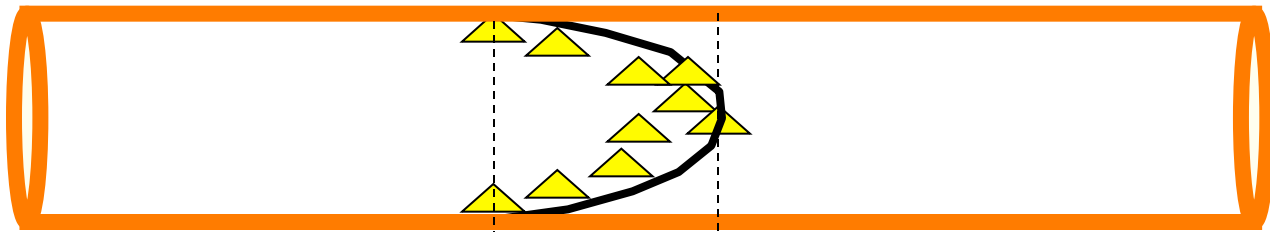
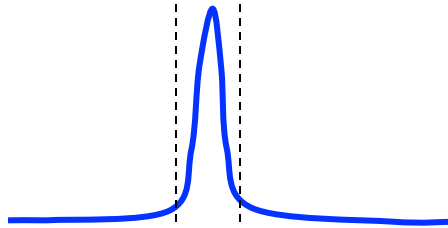
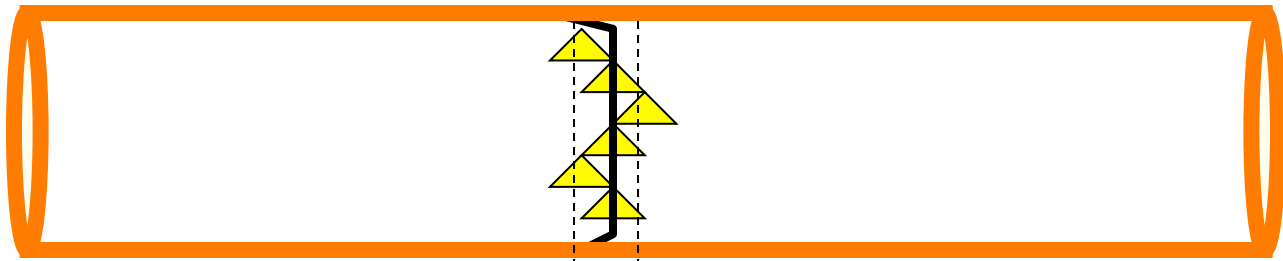
- **Sistemas eletrodinâmicos**



Em sistemas movidos por eletrosmose, a camada próxima à parede também é imóvel, porém o gradiente de velocidade se prolonga somente até a dupla camada. Como não existe diferença de pressão, não há formação de gradiente de velocidade através do tubo capilar.

Efficiency in CZE





CZE × HPLC

- **Tensão aplicada:**

- Aumentando-se E aumenta-se o fluxo eletroosmótico e diminui-se o tempo de análise.
- Voltagens excessivas levam a altas correntes e aquecimento por efeito Joule.
- Potência gerada- $P = V.I$ [W]

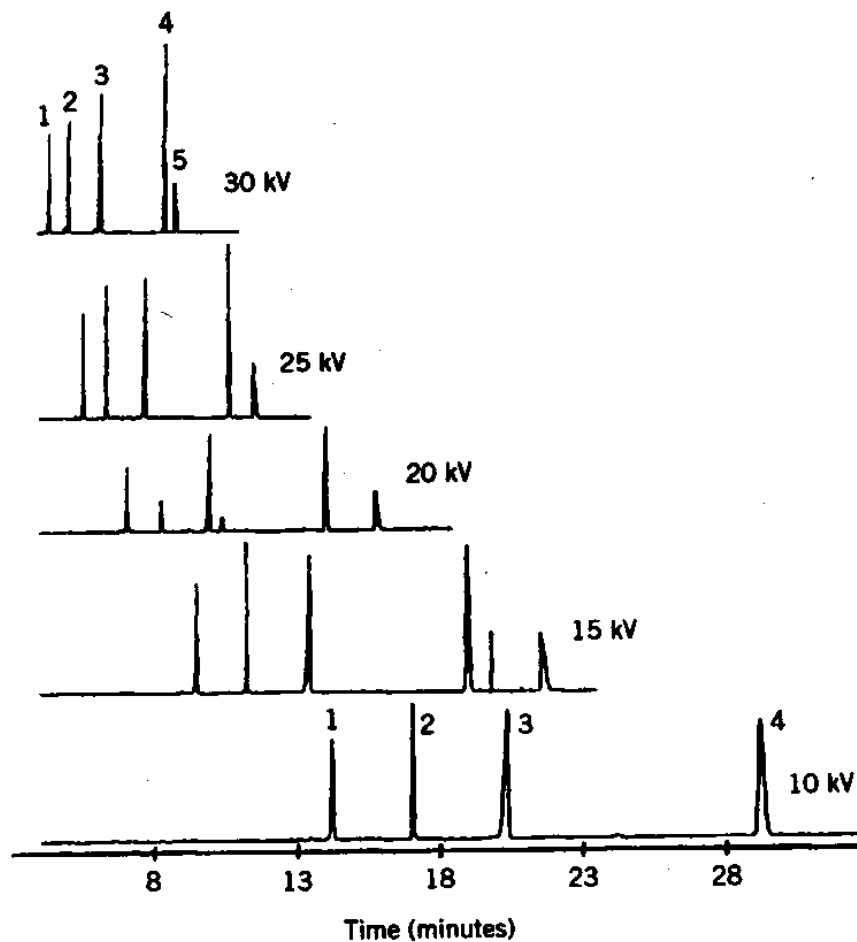


Fig. 2.5. Electropherograms showing the effect of applied voltage on migration times. Peak 5 at 10 kV is not shown. Buffer: 0.06 M sodium dodecyl sulfate, 0.06 M sodium borate, pH 8.92 in 85% water/15% methanol. Capillary: fused silica, 75 μm i.d., 50 cm long to the detector. Detector: UV at 214 nm. Temperature: 25°C. Peaks: 1 = niacinamide, 2 = cyanocobalamin, 3 = pyridoxine HCl, 4 = niacin, and 5 = thiamine HCl. Adapted from [17], p. 979, by courtesy of Marcel Dekker, Inc.

- **Aplicação de Altas Voltagens:**

- altas correntes \Rightarrow alta produção de calor

- \therefore aumenta gradiente de T dentro do capilar

- \Rightarrow muda a viscosidade da solução e

- \Rightarrow aumenta o fluxo

- \Rightarrow degenera a separação

- \Rightarrow separações não reprodutíveis

- \Rightarrow decomposição ou desnaturação da amostra

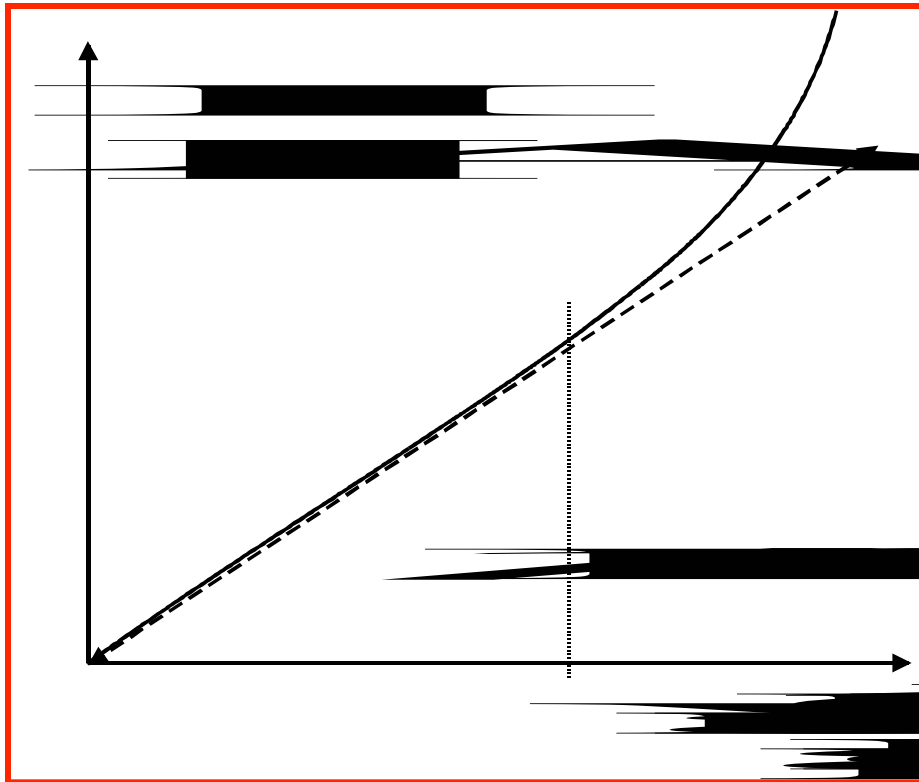
- \Rightarrow fervura do solvente e formação de bolhas

- causando descontinuidade elétrica \therefore

- interrupção da análise



De acordo com a Lei de Ohm: $V = I.R$



I = Intensidade de corrente elétrica [A]

R = Resistência elétrica [Ω]

$$\downarrow L = \downarrow V_{max}$$

$$\downarrow D.I. = \uparrow V_{max}$$

D. Outros fatores que afetam o EOF

Temperatura: ↓ Viscosidade \Rightarrow ↑ Fluxo
 ↓ Cte. dielétrica \Rightarrow ↓ Fluxo

Solventes orgânicos: - difícil previsão do efeito

- viscosidade
- cte. dielétrica
- potencial zeta
- concentração do solvente

Modificação química do capilar:

EOF

- reduzido
- eliminado
- revertido
- controlado

Recursos: - recobrimento dinâmico

- recobrimento estático

- modificadores

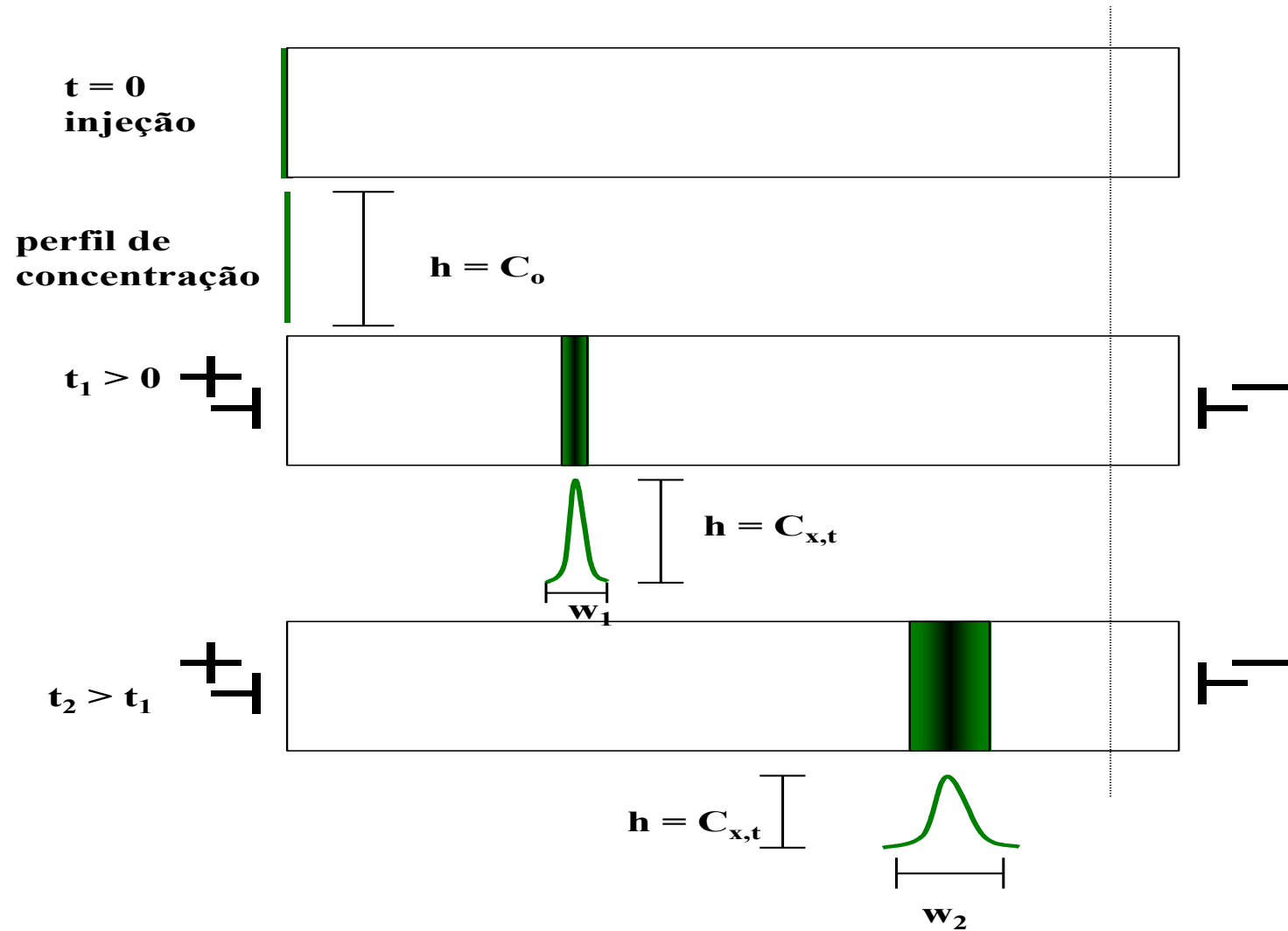
- voltagem radial

RESUMO

- aumento da voltagem aumenta o EOF
- aumento do pH do tampão aumenta o EOF
- aumento da concentração e da força iônica do tampão diminuem o EOF
- adicionando-se solvente orgânico pode-se tanto aumentar como diminuir o EOF
- modificando-se a parede do capilar pode-se reduzir, eliminar ou reverter o EOF

III. Parâmetros de Separação

A. Formato da Banda Eletroforética



 Fator mais importante: difusão molecular no meio de separação

$$C_{x,t} = \frac{K}{2(D_i \cdot \pi \cdot t)^{1/2}} \cdot e^{-\frac{(x-v_i t)^2}{4D_i t}}$$

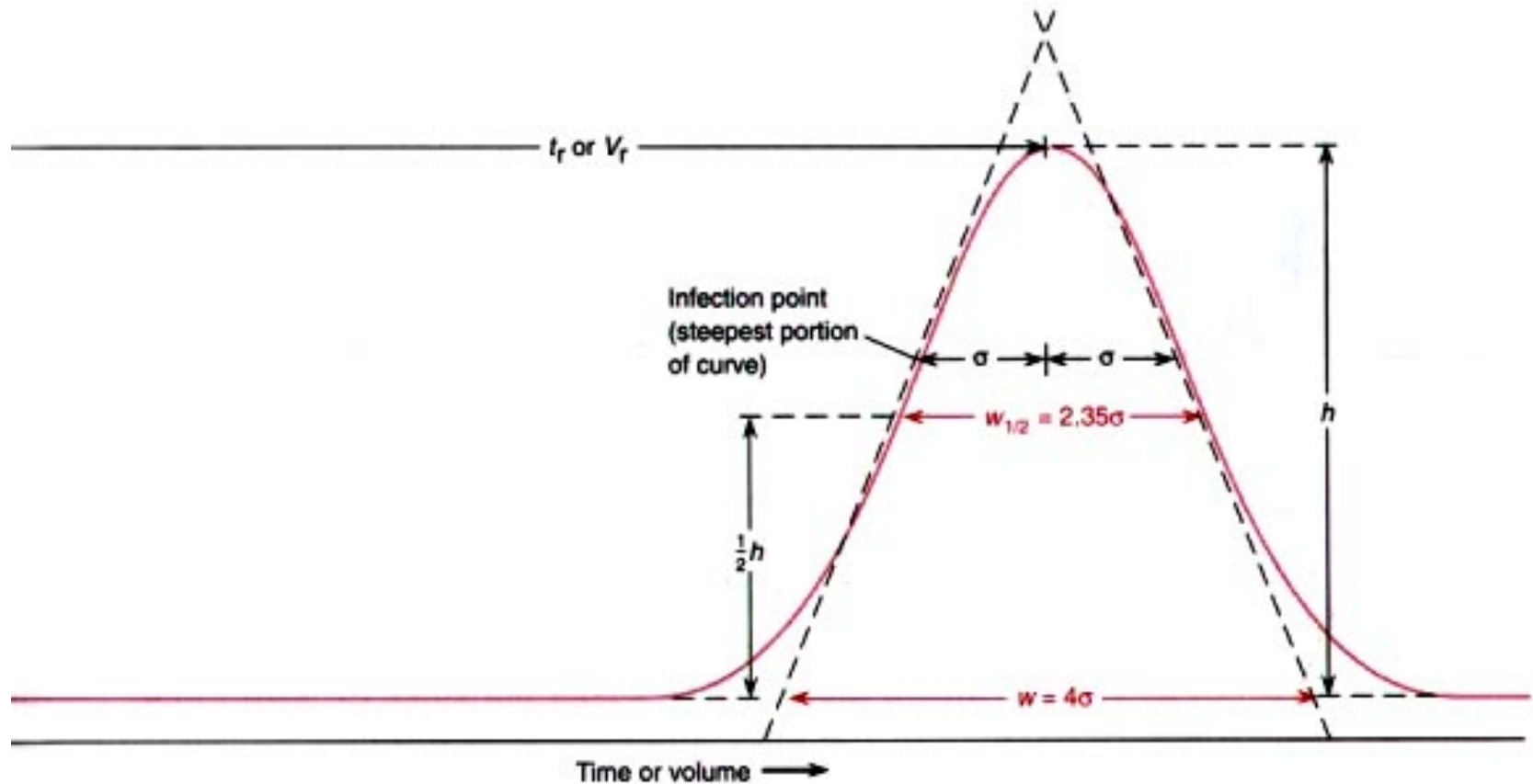
C = concentração do soluto na distância x do ponto inicial após tempo t [mol.L⁻¹]

v_i = velocidade do soluto [cm.s⁻¹]

D_i = coeficiente de difusão [cm².s⁻¹]

- A banda eletroforética pode ser descrita com uma curva gaussiana após o soluto ter migrado à distância x a partir da origem, no tempo t .
- do pico gaussiano:
 - posição de máximo ($\propto C_0$)
 - largura do pico ($\propto t, D_i$) = distância entre os pontos de inflexão

$$\frac{2}{(2D_i t)^{1/2}}$$



- Similarmente aos cálculos estatísticos, a largura de uma curva gaussiana é definida como desvio padrão, σ

$$\sigma = (2D_i t)^{1/2} \quad [\text{cm}]$$

- Por definição, o quadrado do desvio padrão é chamado variância, σ^2

$$\sigma^2 = 2D_i t \quad [\text{cm}^2]$$

Lembrando que:

$$t_i = \frac{L_D}{v_i} = \frac{L_D L_t}{\mu_{ap} V} = \frac{L_D}{\mu_{ap} E}$$

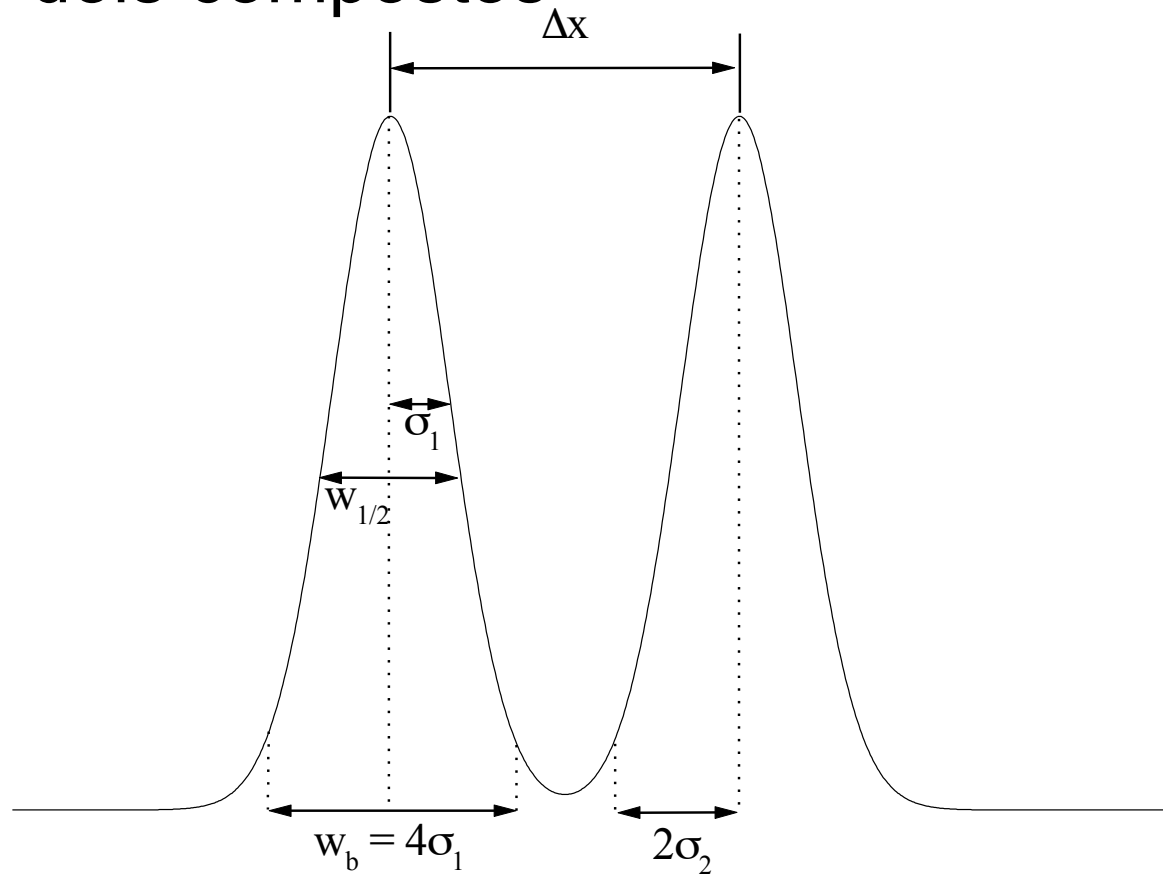
L_D = distância da origem até o ponto de detecção [cm]

L_T = comprimento total da coluna [cm]

$$\sigma^2 = \frac{2D_i L_D}{(\mu_{ap} E)}$$

B. Resolução das Bandas Eletroforéticas e Eficiência da Separação

A resolução R_s mede o grau de separação entre dois compostos



$$R_s = \frac{2(x_2 - x_1)}{w_1 + w_2} = \frac{\Delta x}{\bar{w}}$$

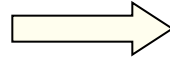
X_i = distância de migração [cm, s]

w_i = largura do pico na linha de base [cm, s]

w = para picos próximos $w_1 \cong w_2$

Para uma curva gaussiana, a largura do pico na base é:

$$w = 4\sigma$$



$$R_s = \frac{\Delta x}{4\sigma}$$

Resolução pode ser redefinida considerando-se:

$$x_i = v_i t_i \quad \text{e} \quad \sigma = (2D_i t)^{1/2}$$

$$R_s = \frac{\Delta\mu_{ap} Et}{4(\overline{2D_i t})^{1/2}}$$

$\Delta\mu_{ap}$ = diferença na mobilidade eletroforética aparente

$\overline{D_i}$ = difusão média

A variância total de um processo é a somatória de todas as variâncias individuais.

$$\sigma^2_{tot} = \sum \sigma_i^2$$

∴ A medida da eficiência de separação é calculada pelo número de pratos

$$N = \frac{L^2}{\sigma^2_{tot}}$$

Substituindo-se
 L e σ ,

$$N = \frac{(\bar{\mu}E)^2 t^2}{2\bar{D}_i t}$$

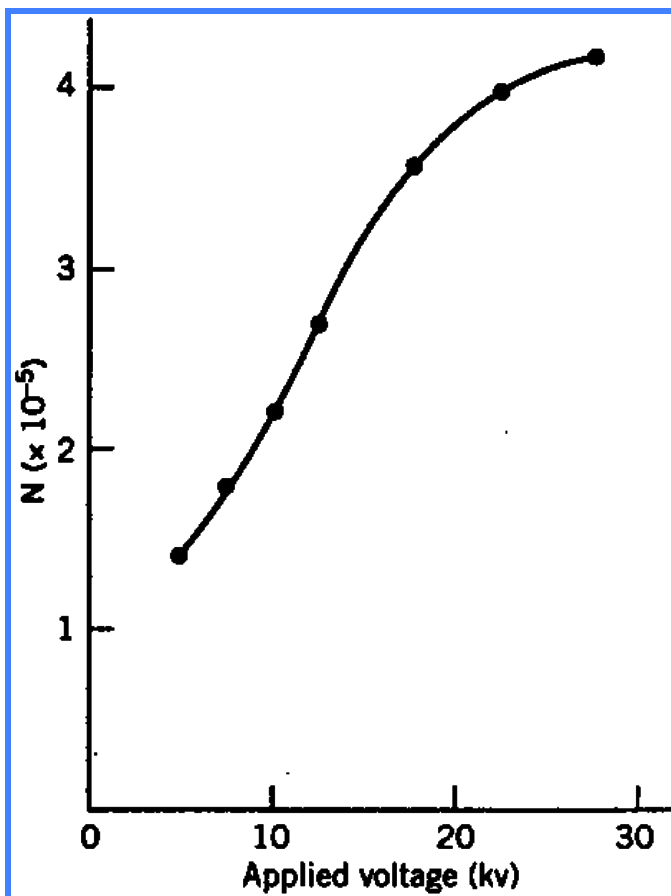


Fig. 2.22. Effect of applied voltage on efficiency, N . Reprinted with permission from [1]. Copyright (1981) American Chemical Society.

Comparando as expressões de R_s e N

$$R_s = \frac{1}{4} \left(\frac{\Delta\mu_{ap}}{\bar{\mu}} \right) N^{1/2} = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{\Delta\mu_{ap}}{\mu_{ap}} = R_s$$


$\therefore R_s = \text{eficiência} \times \text{seletividade}$

- Experimentalmente:

$$N = 16 \left(\frac{t}{w} \right)^2 \quad \text{e} \quad R_s = \frac{\Delta t}{\bar{w}}$$

N não é representativo como em cromatografia, entretanto:

$$HETP = \frac{L}{N} = \frac{\sigma_{tot}^2}{L}$$

HETP  Representa a fração do capilar tomada pelo analito e expressa melhor o índice de eficiência de separação.

A variância total de um processo é igual a soma das variâncias parciais:

$$\sigma_{tot}^2 = \sigma_D^2 + \sigma_t^2 + \sigma_i^2 + \sigma_{D_i}^2 + \sigma_{ad}^2$$

Resumo sobre os parâmetros de separação

- Tempo de análise: $\propto 1/V$; $\propto L$
- Eficiência: $\propto V$
- Seletividade: otimizado pelo pH e composição do meio
- Resolução: $\propto V$, pH e tampão, L , EOF

IV- Fatores que Influenciam a Performance

1. Efeitos dispersivos fundamentais

A dispersão total do sistema é a medida de eficiência

- Difusão
- Adsorção
- Efeito Joule
- Dispersão eletroforética
- Injeção
- Detecção
- Outros

• Efeito Joule:

- A passagem de corrente pelo capilar aquece o meio

$$P = U \cdot I = R \cdot I^2$$

P = Potência [W];

U = Potencial [V]

I = Corrente [A];

R = Resistência [Ω]

- A temperatura interna pode ser calculada relacionando-se através de uma relação com a viscosidade $\Rightarrow (\mu_{eo} \approx 1/\eta)$

$$\mu_{eo} = C \cdot e^{-\frac{E_A}{RT}}$$

- Medindo-se μ_{eo} em duas voltagens (uma baixa e outra mais elevada), é possível calcular a temperatura

$$\frac{\mu_{eo_1}}{\mu_{eo_2}} = e^{-\frac{E_A}{RT_1} + \frac{E_A}{RT_2}}$$

Para uma solução aquosa a temperatura ambiente $\Rightarrow E_A/R = 1820$ K. Se $T_1 = 289$ K:

$$T_2 = \frac{1820}{\ln(\mu_{eo_1}) - \ln(\mu_{eo_2}) + 6,11}$$

A dissipação do calor ocorre através das paredes e depende do meio que circunda a coluna.

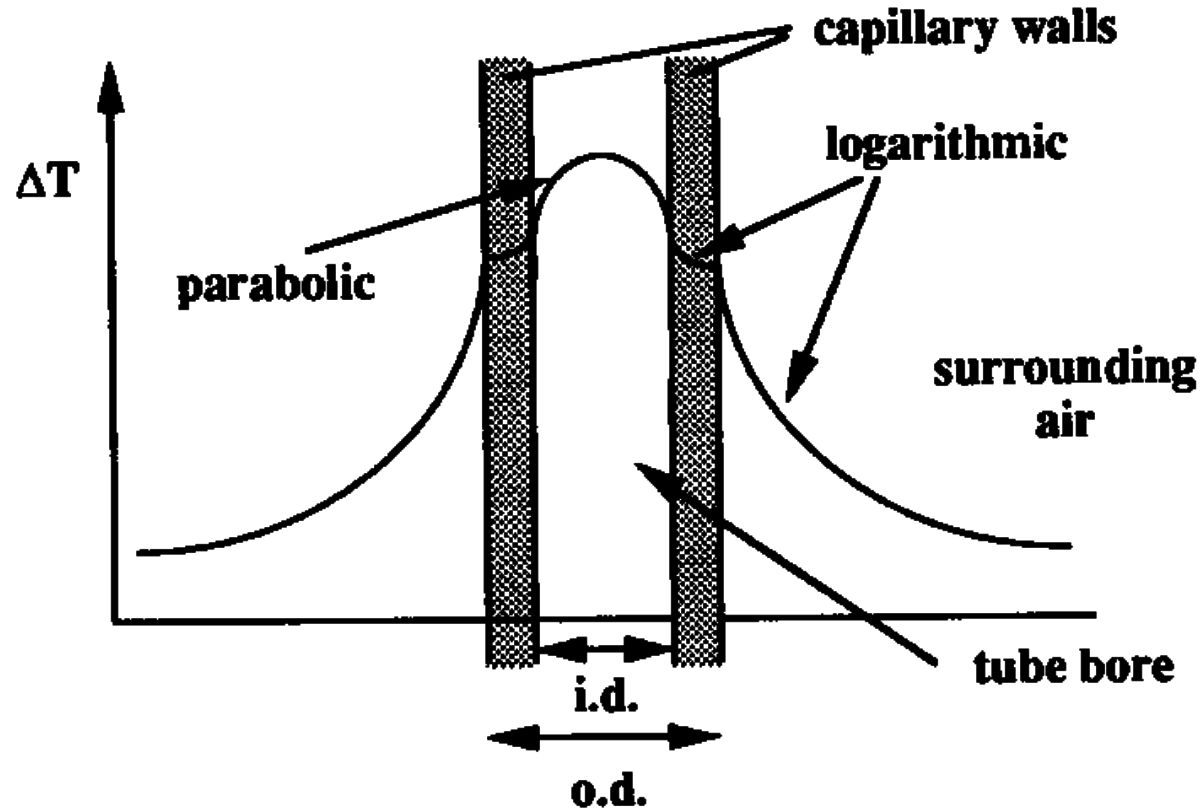


Fig. 3.1. Schematic representation of the temperature profile as a result of current flow across a capillary which contains an electrolyte solution. (With permission from Ref. 21)

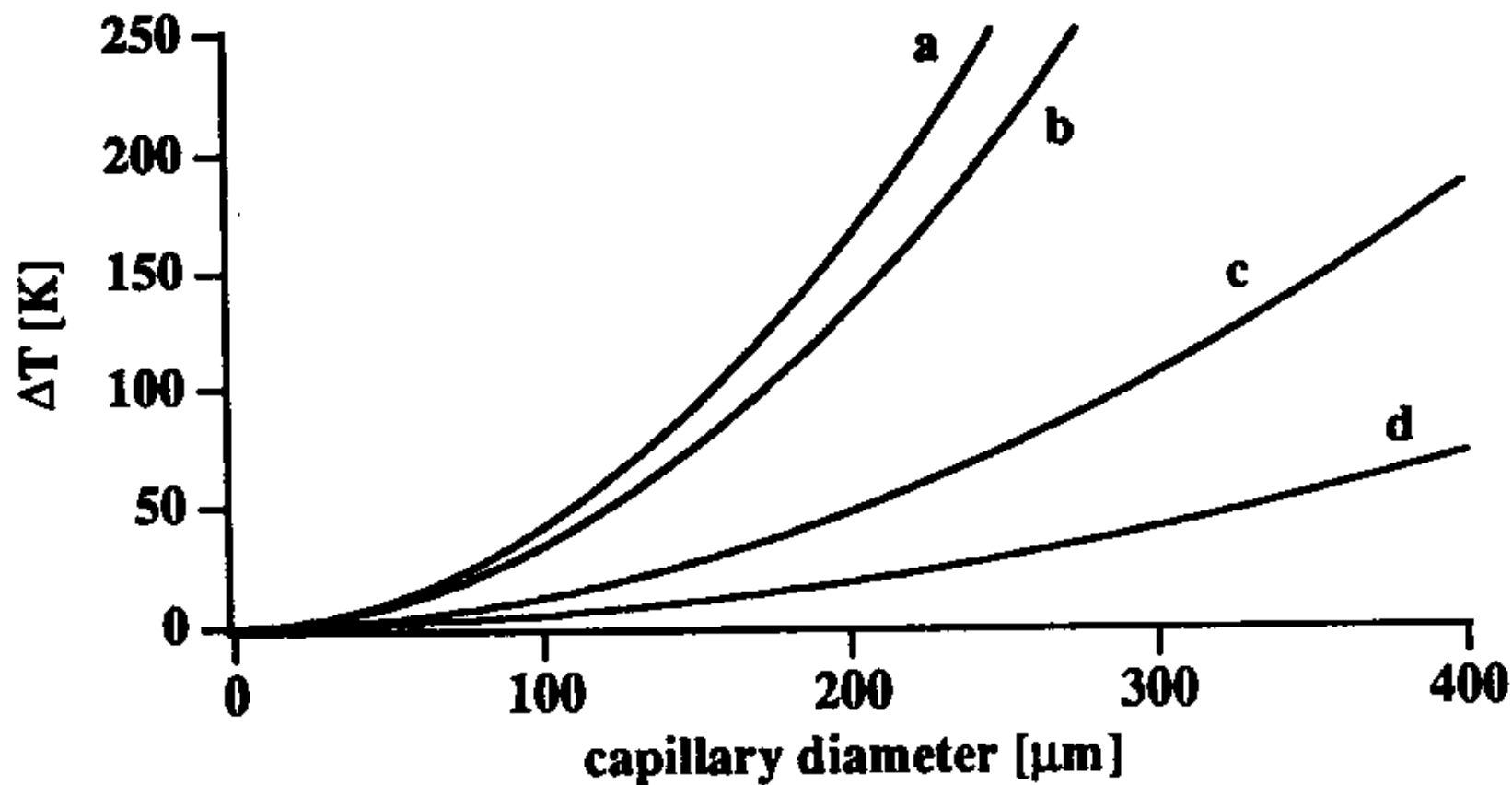


Fig. 3.2. Differences in temperature, ΔT , for various tube diameters under natural and forced convection according to Ref. 21. Air velocities: natural convection (a), $0.1 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ (b), $1 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ (c) and $10 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ (d)

• **Recomendações gerais:**

- A temperatura deve ser controlada
- 50-75 μm de diâmetro representa um bom compromisso em relação aos efeitos térmicos e adsortivos, assim como à detecção
- [amostra] \cong 1% [tampão]; $\mu_s \approx \mu_b$; $R_s < R_b$
- tamanho da injeção deve ser mínimo
- condutância específica e força iônica do tampão devem ser as menores possíveis.

B. Parâmetros Operacionais:

- **Força do campo elétrico:**

Como observado previamente, o campo elétrico pode exercer o papel de mocinho e bandido!

↑ $E \Rightarrow$ ↑ Eficiência

↑ Resolução

↓ Tempo de Análise

↑ Efeito Joule

↑ Dispersão

↑ Gradiente de Temperatura



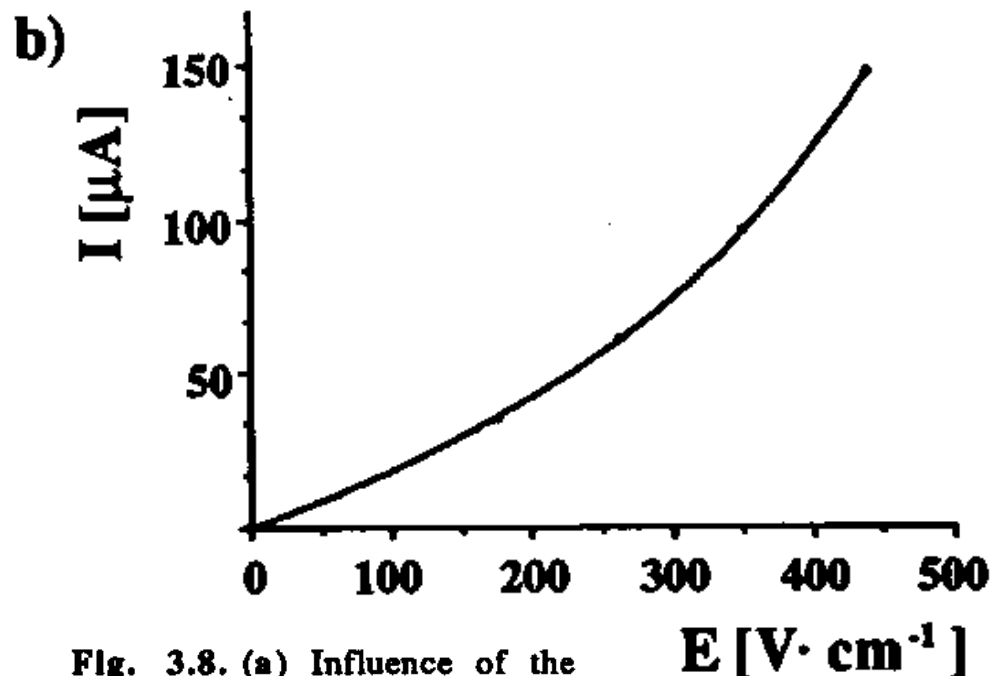
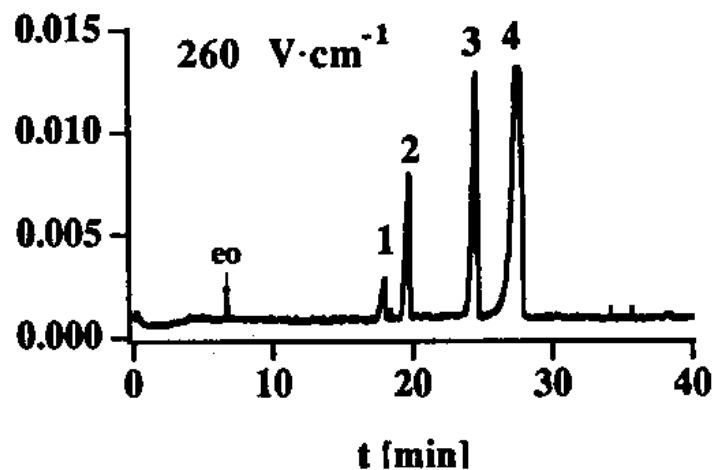
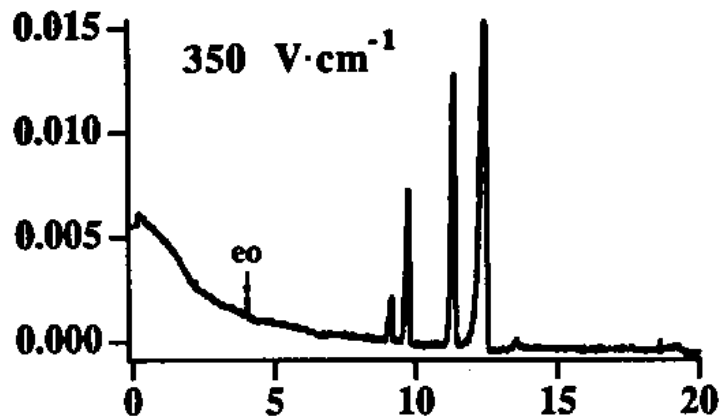
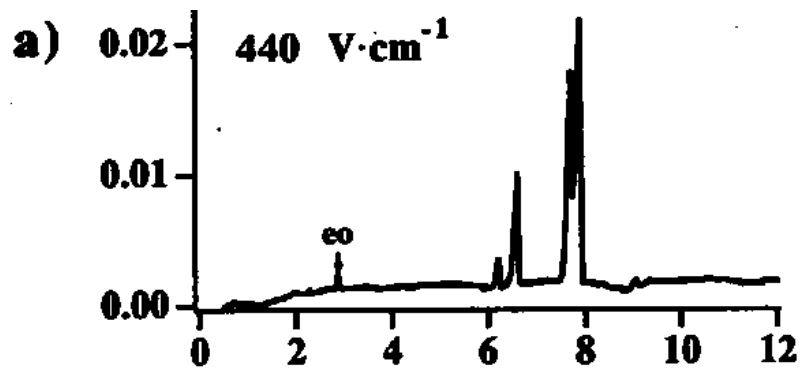


Fig. 3.8. (a) Influence of the field strength on the electrophoretic separation of four positional isomers of dihydroxybenzoic acid. Elution order of the isomers: 1) 2,4-, 2) 2,3-, 3) 2,6- and 4) 2,5-dihydroxybenzoic acid. Instrument: Beckman P/ACE 2000; experimental conditions: fused silica capillary 57 cm x 75 μm i.d., hydrodynamic injection for 1 s, temperature 25 °C, UV detection at 200 nm, electrolyte system 25 mM Na₂HPO₄ - 25 mM Na₂B₄O₇, pH 9.0. Benzyl alcohol is used as EOF marker. (b) Plot of field strength versus resulting current for the buffer given in (a)

• Temperatura

- Normalmente utilizado em cromatografia a gás e a líquido para melhorar e resolver problemas de eluição
- Em eletroforese, está associado com perda de desempenho
- Vários parâmetros são afetados pela temperatura:
 - viscosidade
 - pH
 - dissociação
 - EOF
 - velocidade de reação

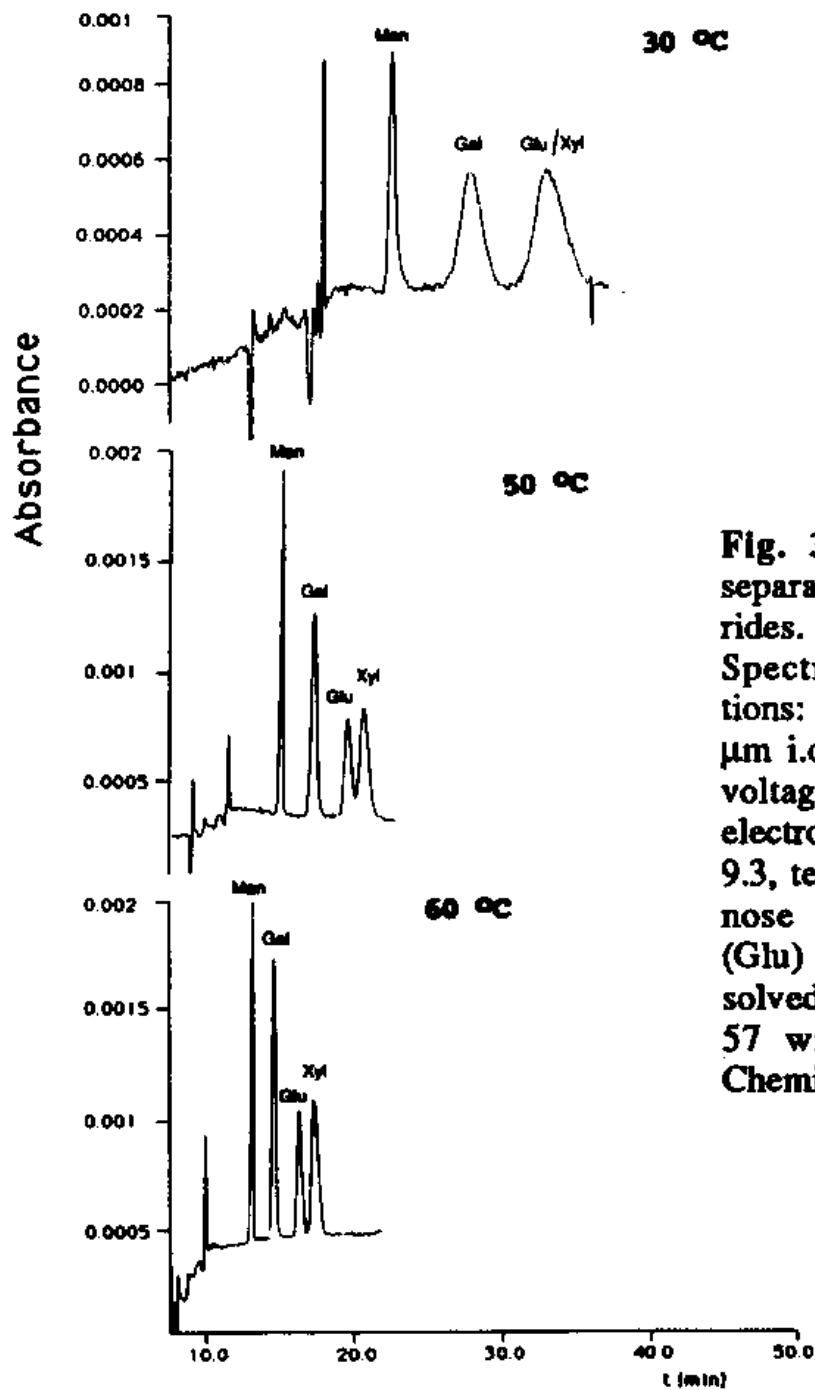


Fig. 3.13. Effect of temperature on the separation of underivatized monosaccharides. Instrument: SpectraPhoresis 1000, SpectraPhysics; experimental conditions: fused silica capillary, 94 cm x 75 μm i.d., hydrodynamic injection for 1 s, voltage 20 kV, UV detection at 195 nm, electrolyte system 50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, pH 9.3, temperature 20- 60 °C; sample: mannose (Man), galactose (Gal), glucose (Glu) and xylose (Xyl), each 10 mM, dissolved in water. (Reproduced from Ref. 57 with permission of the American Chemical Society)

C) Sistema Eletrolítico:

- **Tampões:**

- não devem interferir na separação
- alta capacidade tamponante sobre uma extensa faixa de pH
- não devem diminuir a sensibilidade do detector
- mobilidade eletroforética similar à da amostra
- mobilidade eletroforética do contra-íon deve ser a menor possível

- **pH:**

- parâmetro mais importante para controle da seletividade
- pode alterar a carga, tamanho e EOF

A relação entre as concentrações de espécies ionizadas e não ionizadas é dada pela equação de Henderson-Hasselbalch.

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

- Quando $pH = pK_a$, $[A^-]/[HA] = 1 \Rightarrow 50/50$
- Para substâncias anfotéricas \Rightarrow negativa - neutra - positiva

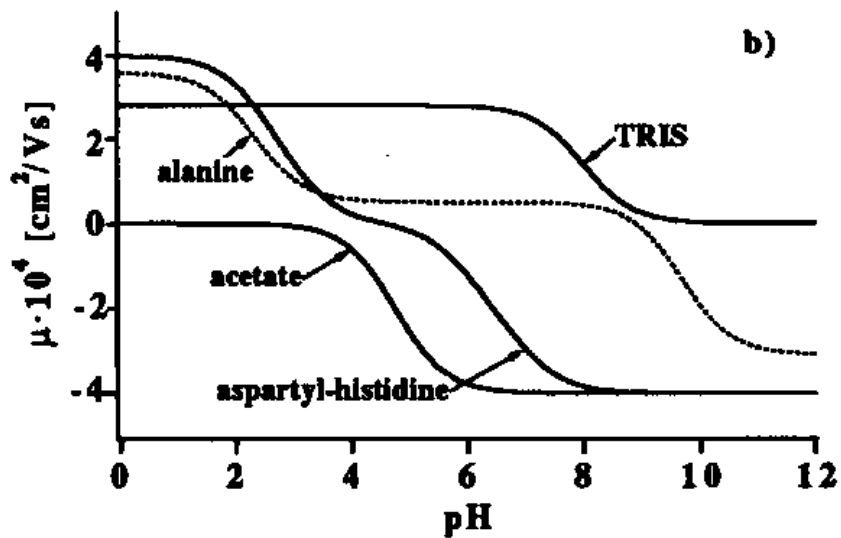
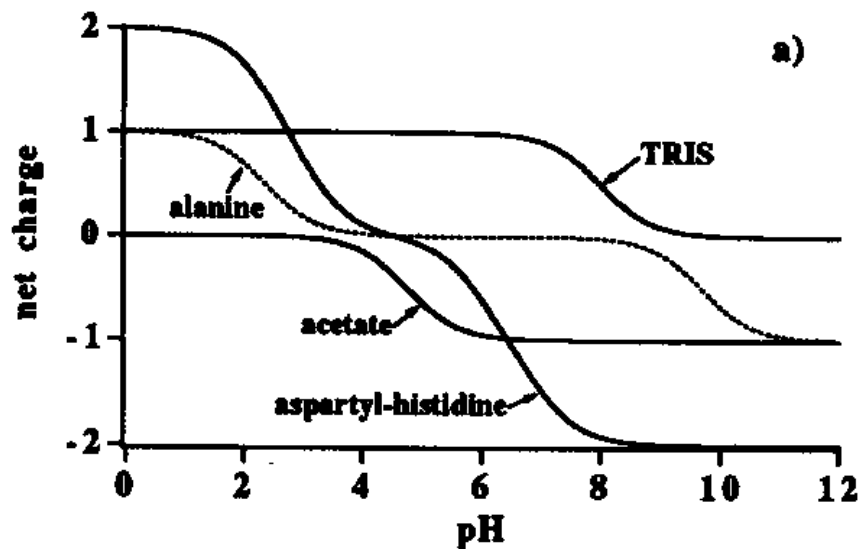


Fig. 3.15. Net charge (a) and net mobilities (b) of weak acids and bases dependent on the pH. The absolute mobilities in $\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ are $-4 \cdot 10^{-4}$ for acetate, $2.8 \cdot 10^{-4}$ for TRIS, $-3.6 \cdot 10^{-4}$ and $3.1 \cdot 10^{-4}$ for alanine, and $\pm 2.0 \cdot 10^{-4}$ for aspartyl-histidine

• Força Iônica:

Como já visto, a força iônica I , afeta diretamente a mobilidade das espécies, por conseqüência, a resolução também será afetada.

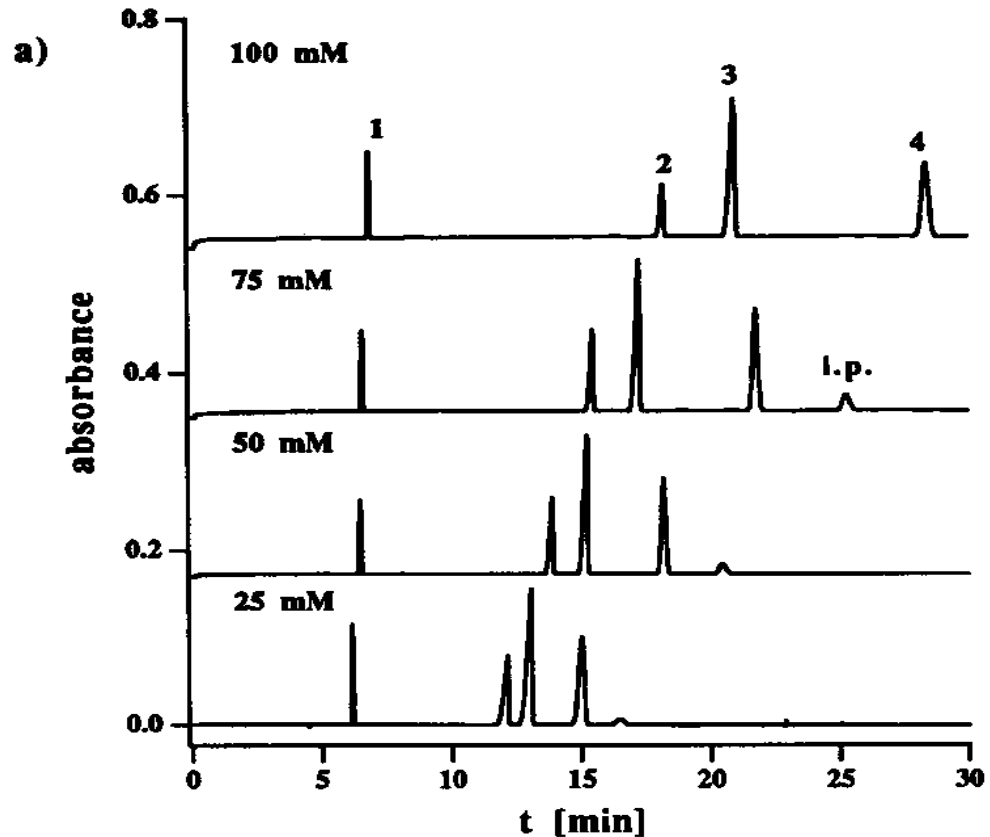


Fig. 3.18. (a) Electrophoretic separations of benzyl alcohol (1), acetylsalicylate (2), benzoate (3) and *p*-hydroxybenzoate (4) at different sodium phosphate concentrations. The impurity (i.p.) is probably salicylate produced by hydrolysis of acetylsalicylic acid. Experimental conditions as in Fig. 3.17. except for the voltage which is 15 kV.

Cátions

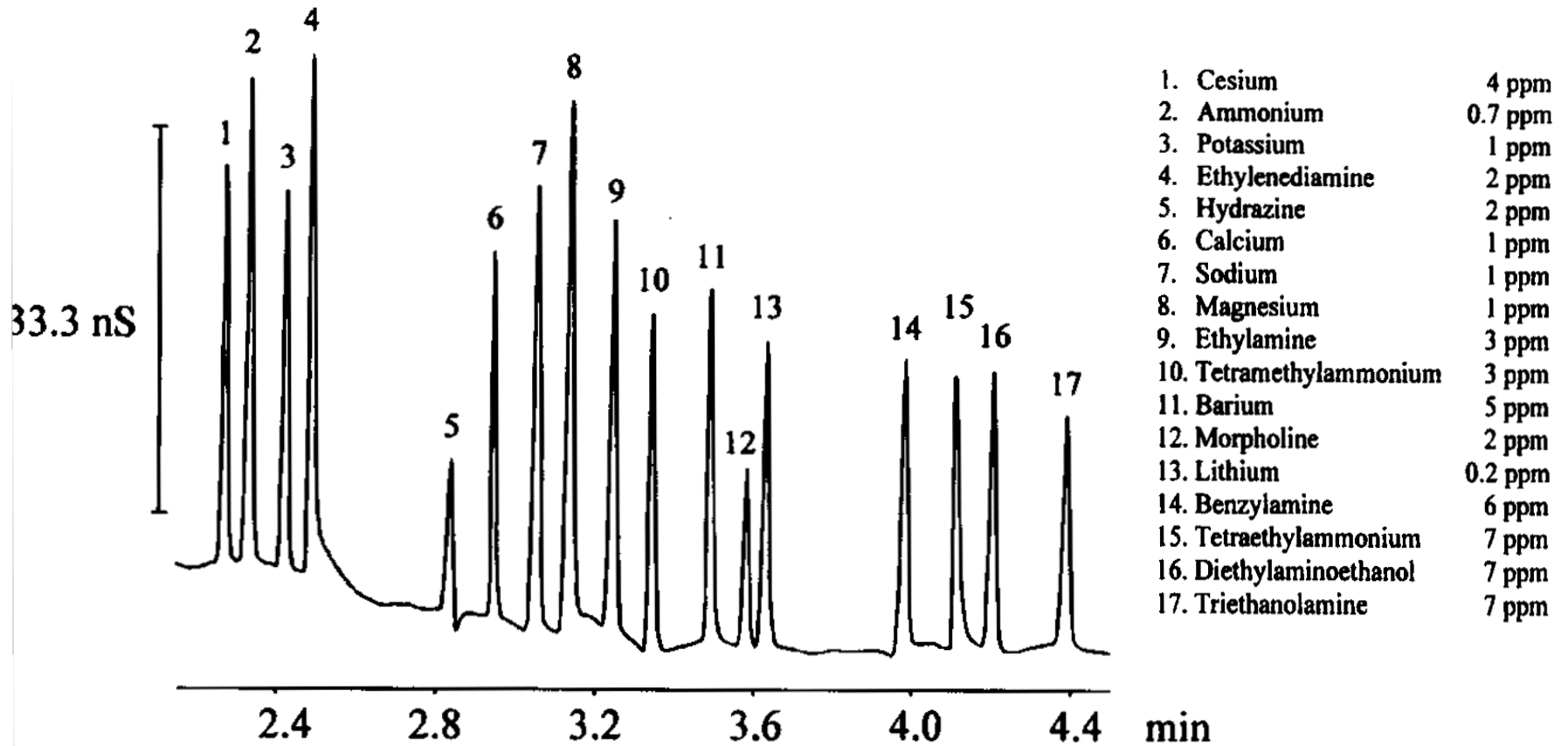


FIGURE 6. Direct-conductometric detection of cations and amines separated by CE. Electrolyte: 30 mM HIS/MES, 2 mM 18-Crown-6, pH 6.1; Capillary: ConCap™ I, 50 μm i.d., length 60 cm; pressure injection, 25 mbar < 12 s; separation voltage 25 kV; Capillary and detector at 35 C. (From Haber, C., et al., *J. Cap. Electrophor.*, 3, 1996. With permission.)

Ānions

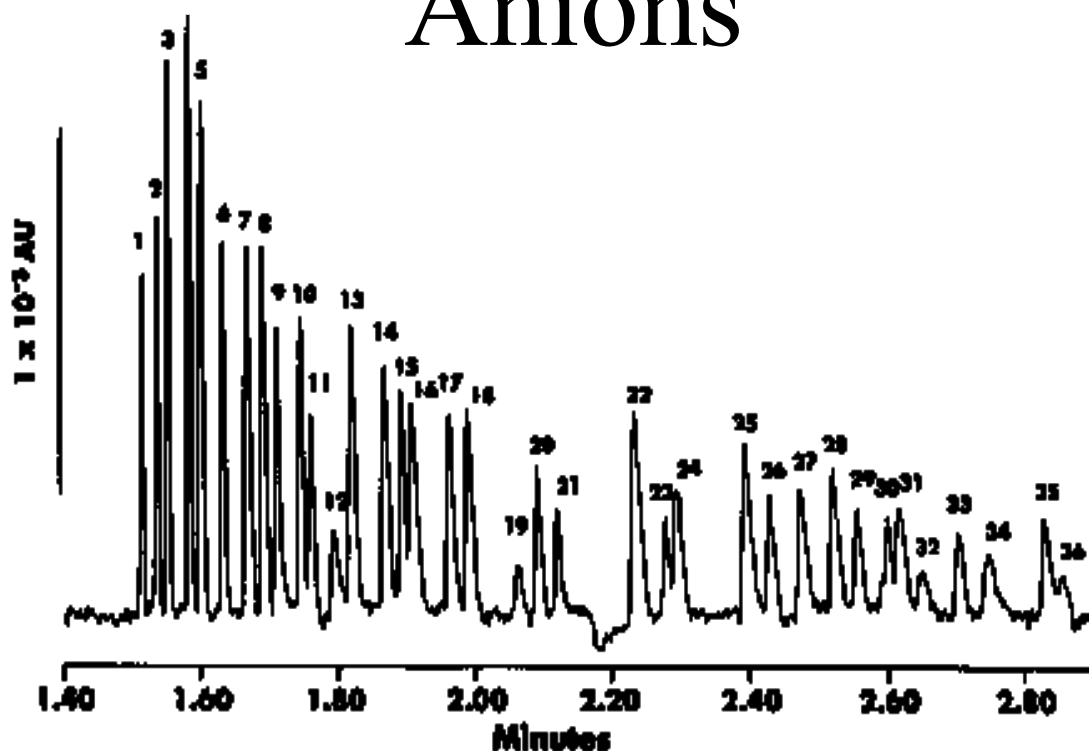


FIGURE 27. Separation of 36 anions in under 3 min using OFM Anion-BT™ in the separation buffer. Conditions: 5 mM chromate/0.4 mM OFM Anion-BT™ at pH 8.0; 30 kV (reversed polarity); 50 μ m i.d. 60 cm total length, 52 cm effective length capillary. Peak identities: 1, thiosulfate; 2, bromide; 3, chloride; 4, sulfate; 5, nitrite; 6, nitrate; 7, molybdate; 8, azide; 9, tungstate; 10, monofluorophosphate; 11, chlorate; 12, citrate; 13, fluoride; 14, formate; 15, phosphate; 16, phosphite; 17, chlorite; 18, glutarate; 19, o-phthalate; 20, galactarate; 21, carbonate; 22, acetate; 23, chloroacetate; 24, ethanesulfonate; 25, propionate; 26, propanesulfonate; 27, di-aspartate; 28, crotonate; 29, butyrate; 30, butanesulfonate; 31, valerate; 32, benzoate; 33, l-glutamate; 34, pentanesulfonate; 35, d-glucuronate; 36, d-galacturonate. (From Jones, *Handbook of Capillary Electrophoresis*, Landers, J., Ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1994, p. 210. With permission.)

Carboidratos

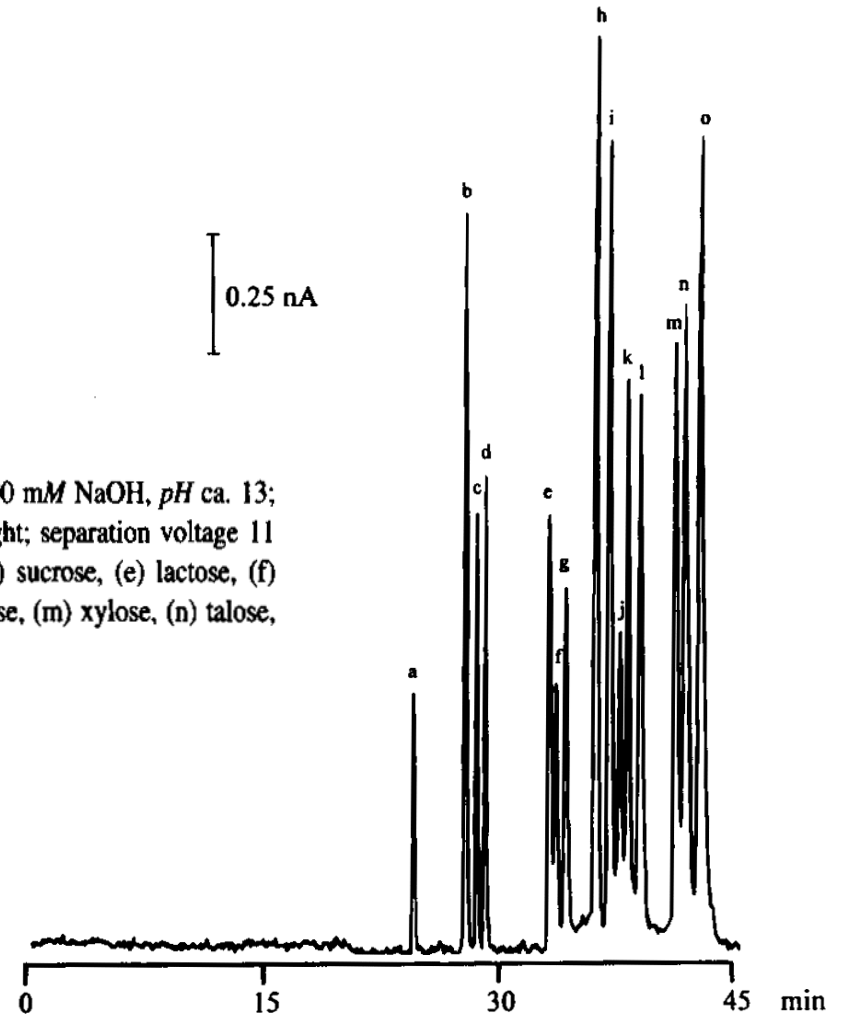


FIGURE 8. Amperometric detection of carbohydrates separated by CE. Electrolyte 100 mM NaOH, *pH* ca. 13; fused-silica capillary, 50 μm i.d., length 73 cm; injection by gravity, 10s at 10 cm height; separation voltage 11 kV; sample carbohydrates (80–150 μM), (a) trehalose, (b) stachyose, (c) raffinose, (d) sucrose, (e) lactose, (f) lactulose, (g) cellobiose, (h) galactose, (i) glucose, (j) rhamnose, (k) mannose, (l) fructose, (m) xylose, (n) talose, (o) ribose. (From Colón, L. A., et al., *Anal. Chem.*, 65, 476, 1993. With permission.)

DNA

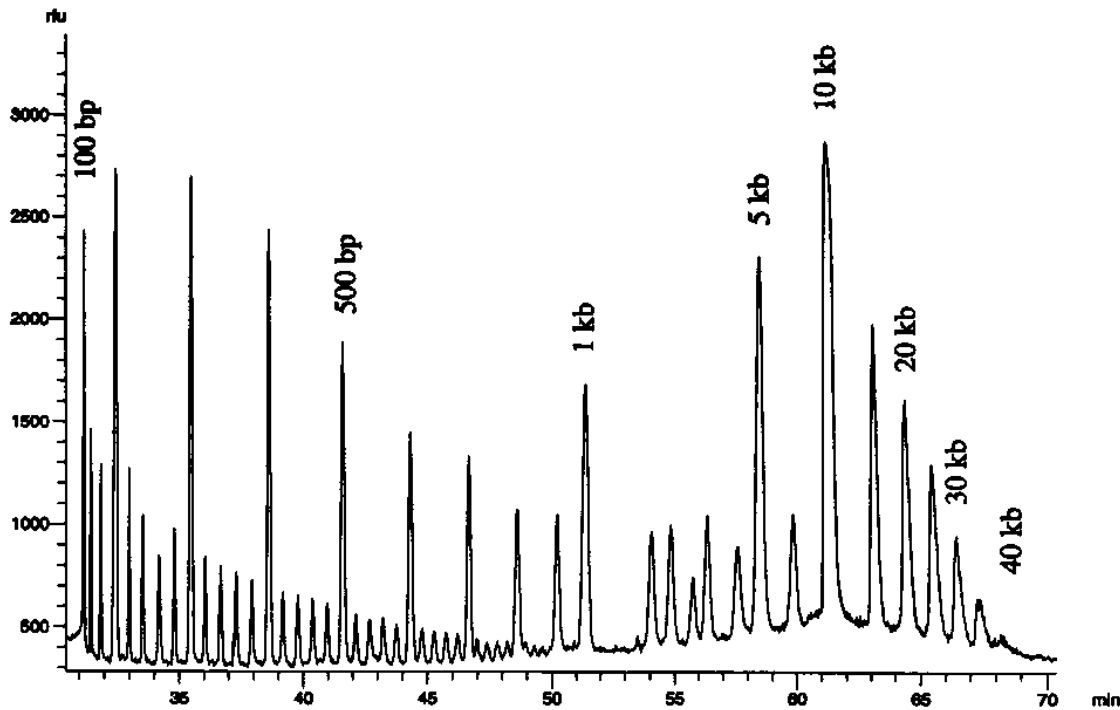
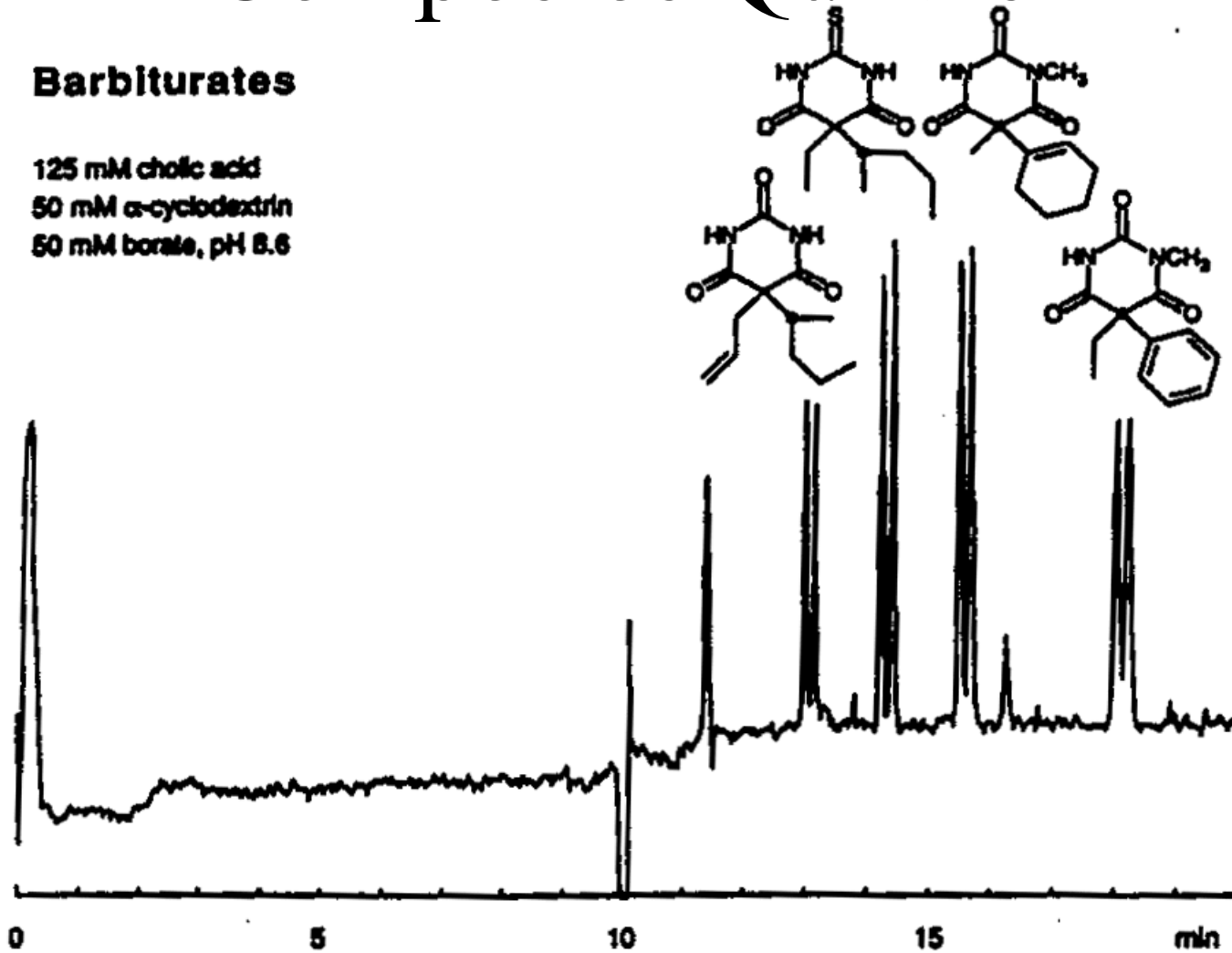


Figure 5. Separation of fragments from a mixture of 20 bp, 100 bp, 1 kbp, and 5 kbp ladders. Sample contains 65 fragments between 20 bp–40 kbp (every 20 bp–1 kbp, and fragments at 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, 10, 15, 20, 25, 30, 35 and 40 kbp). Separation matrix: 0.5% PEO ($M_n 10^6$) and 0.1% PEO ($M_n 8 \times 10^6$) in $1 \times$ TBE. For other experimental conditions, see Fig. 2.

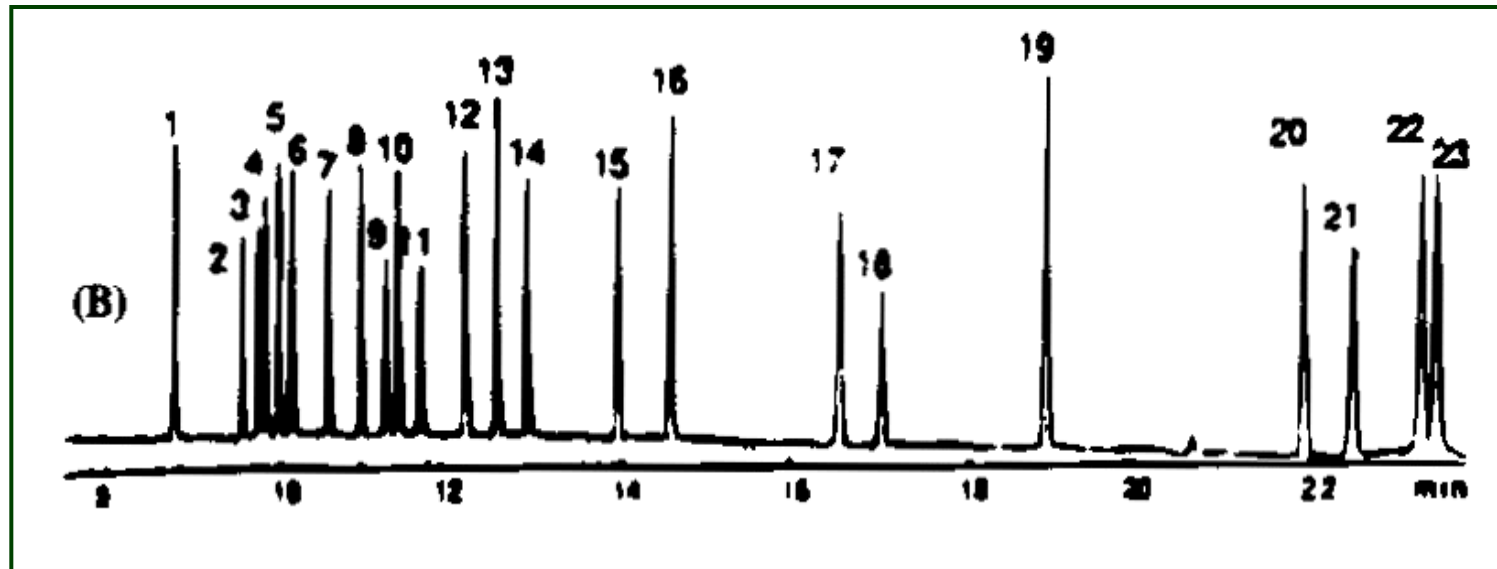
Compostos Quirais

Barbiturates

125 mM cholic acid
50 mM α -cyclodextrin
50 mM borate, pH 8.6



Aminoácidos



Separation of dansyl amino acids in 102.5 mM SDS, 20 mM borate, pH 9.2, 50 $\mu\text{m} \times 57.5$ cm uncoated capillary; +25 kV; 214 nm (from Skocir *et al.*, *Chromatographia*, **1994**, 39, 7)

V - Instrumentação

Sistema Genérico

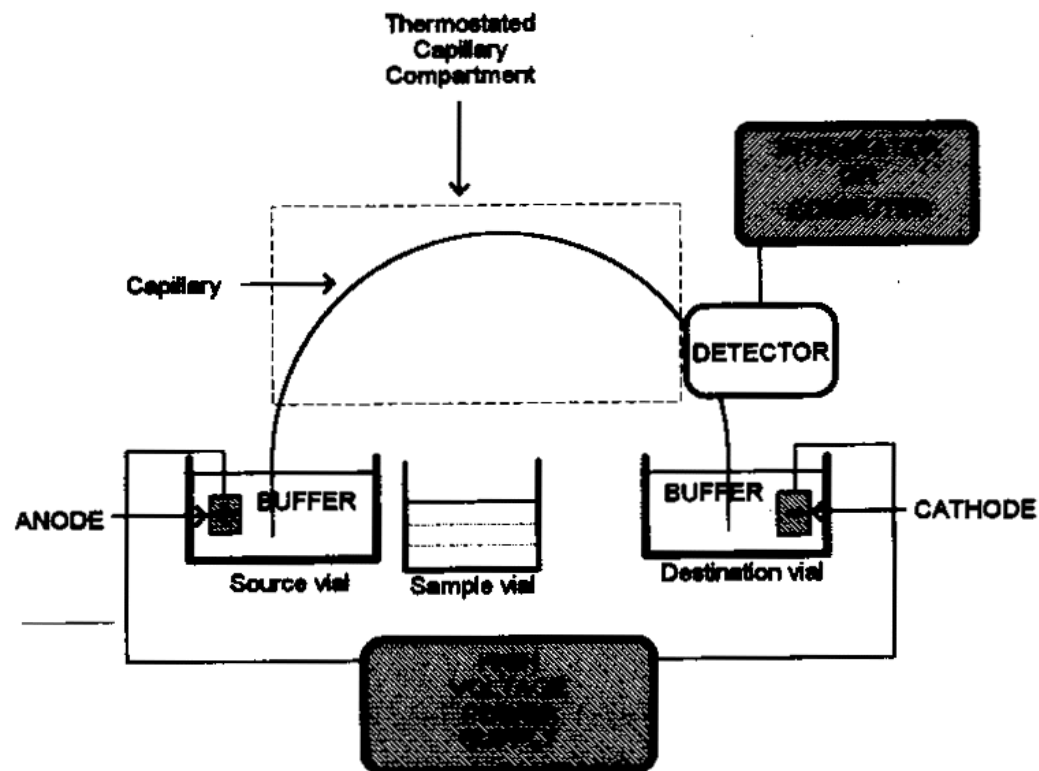


Fig. 4.1. Drawing of the main components of a capillary electrophoresis system. The capillary inlet is in the source vial and the outlet in the destination vial. For an injection, the capillary inlet and anode are placed in the sample vial.

A) Injeção ou Introdução da Amostra

- Diferença de pressão
- Voltagem
- **Injeção Hidrodinâmica (Diferença de Pressão)**
 - pressão: positiva ou negativa
 - gravidade

• Injeção hidrodinâmica com pressão positiva

$$V_i = \frac{\Delta P r^4 \pi t}{8\eta L_T} \quad (\text{Poiseulle})$$

V_i = volume injetado [$\text{m}^3 = 10^{12}$ nL]

ΔP = diferença de pressão entre as extremidades [Pa]

r = raio da coluna [m]

t = tempo de injeção [s]

η = viscosidade [Pa.s = 10^3 cP]

L_T = comprimento total do capilar [m]

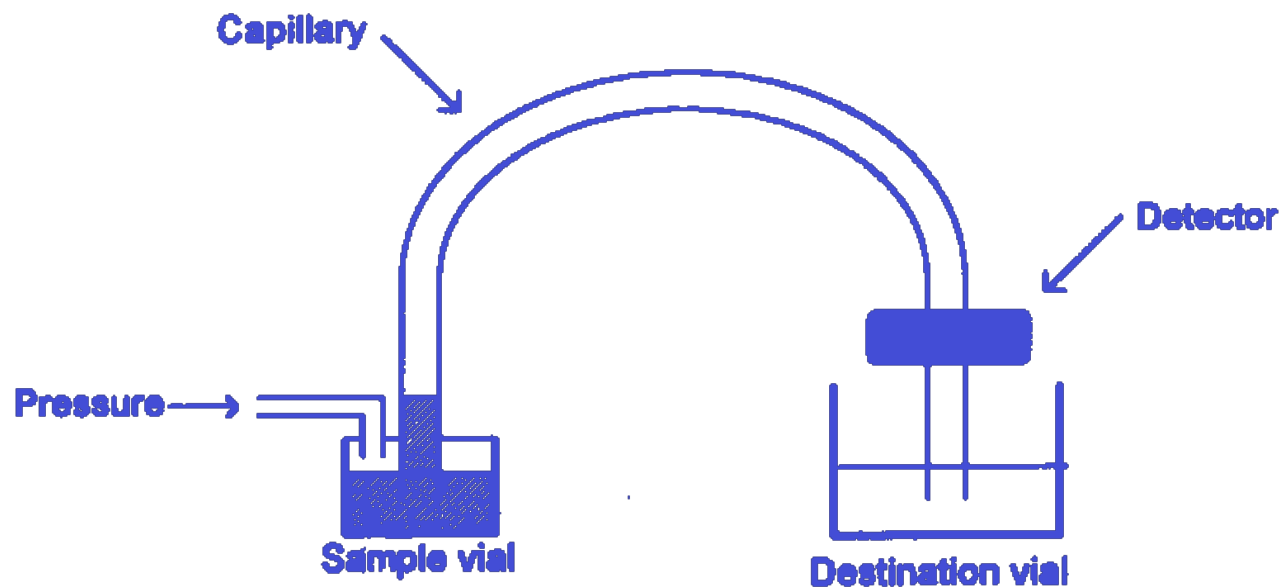


Fig. 4.3. Hydrodynamic injection by pressure. The sample vial is pressurized, forcing the sample solution into the capillary. The volume of sample injected depends on the magnitude and duration of pressure applied, sample solution viscosity, and capillary dimensions. After injection, the capillary is placed back into the source vial and an electric field applied.

- Injeção Hidrodinâmica com Pressão Negativa

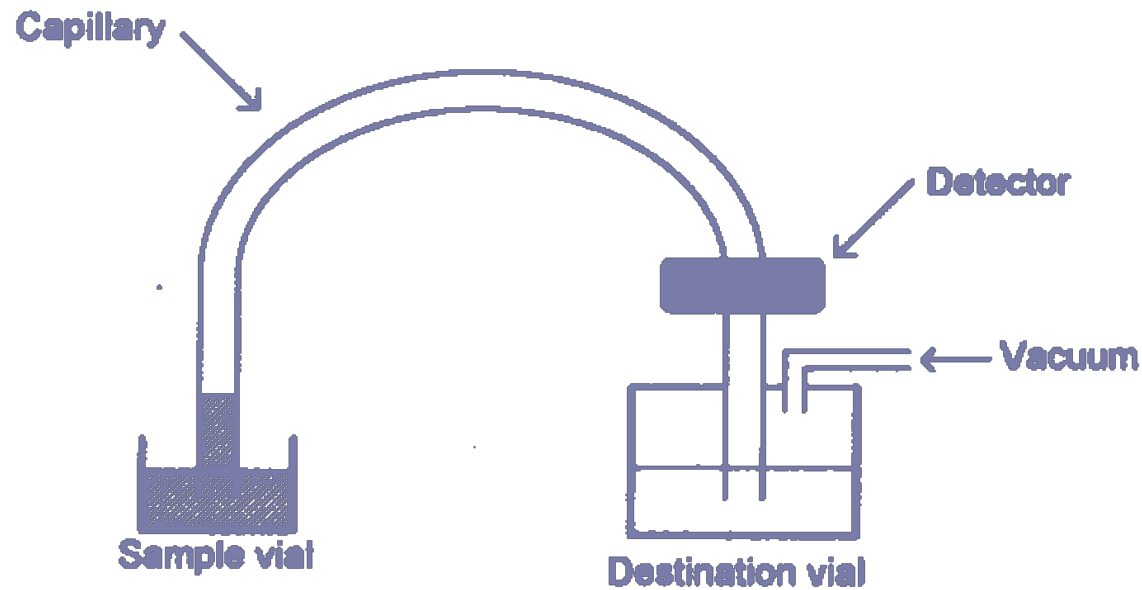


Fig. 4.4. Hydrodynamic injection by vacuum. A vacuum is applied to the destination vial, pulling the sample solution into the capillary. The volume of sample injected depends on the magnitude and duration of vacuum applied, sample solution viscosity, and capillary dimensions. After injection, the capillary is placed back into the source vial and an electric field applied.

• Injeção Hidrodinâmica por Gravidade (Sifonagem)

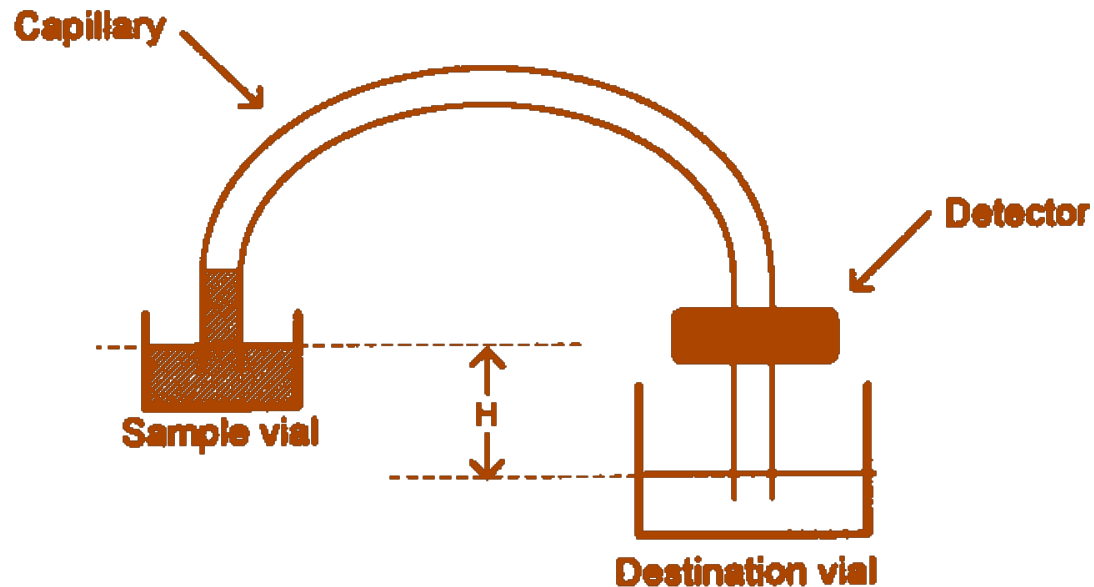


Fig. 4.5. Hydrodynamic injection by gravity (also called siphoning). The capillary is placed into the sample vial, and the vial and capillary are raised a distance, H , above the destination vial, causing the sample solution to siphon into the capillary. The volume of sample injected depends on H , the length of time the vial is raised, capillary dimensions, and the sample solution viscosity. After injection, the capillary is placed back into the source vial and an electric field applied.

$$\Delta P = \rho g \Delta h$$

ΔP - Diferença de pressão entre as extremidades [Pa]

ρ - Densidade da solução da amostra [Kg.m^{-3}]

g - Aceleração da gravidade [9.8066 N.Kg^{-1}]

Δh - Diferença de altura entre o nível dos líquidos [m]

A injeção hidrodinâmica é razoavelmente reprodutível e pouco discriminatória e por isso bastante indicada para análises quantitativas. A reprodutibilidade dependerá da temperatura da amostra (viscosidade).

• Injeção Eletrocínética

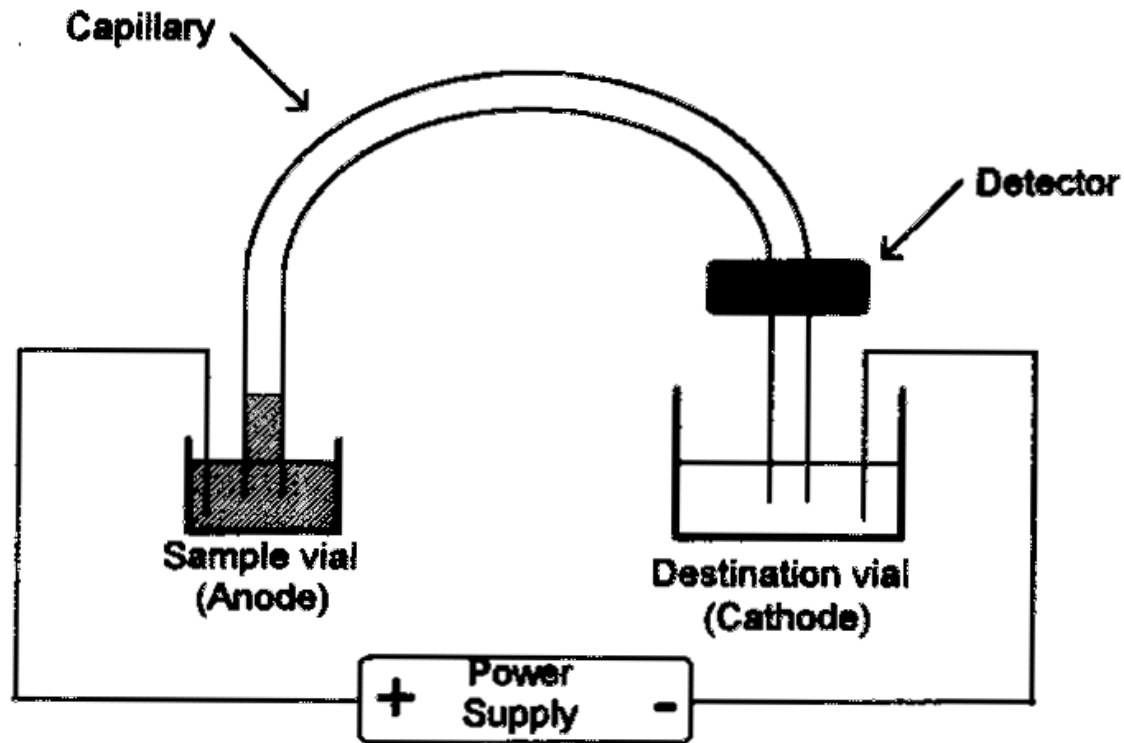


Fig. 4.6. Electrokinetic injection. The capillary and the anode (in this example) are placed in the sample vial. A voltage is applied which causes the sample ions to migrate into the capillary due to electroosmosis and electrophoretic mobility. The amount of sample injected depends on the electrophoretic mobility of the solutes, electroosmotic flow rate, applied voltage, capillary dimensions, and solute concentrations. After sample injection, the capillary and anode are placed back into the source vial and a voltage is applied.

$$Q_i = \frac{(\mu_i + \mu_{i^o}) \cdot \pi \cdot r^2 \cdot V \cdot c_i \cdot t}{L_T}$$

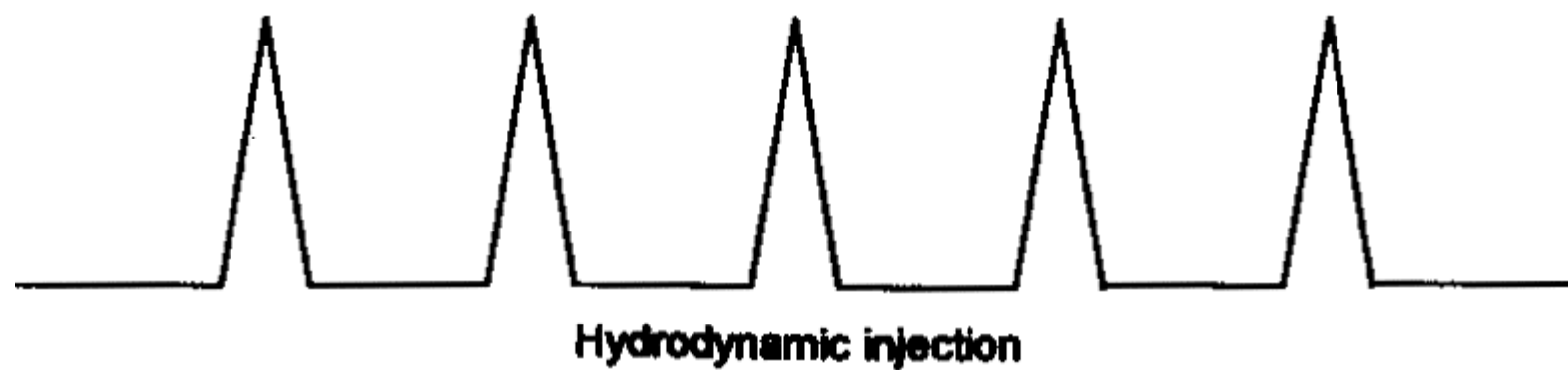
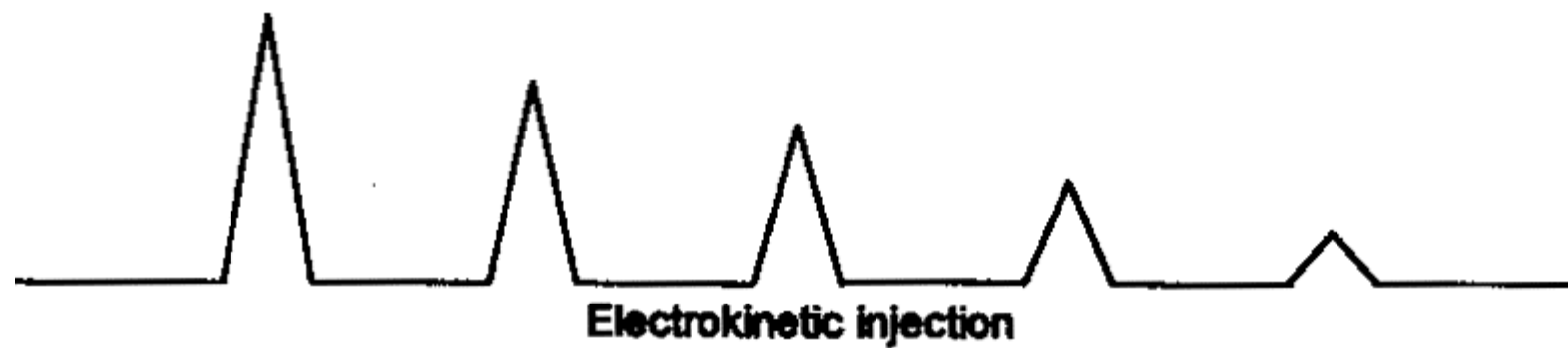
Q_i = Quantidade de soluto i introduzido no capilar [M]

V = Voltagem [V]

C_i = concentração [M]

L_T = comprimento total da coluna [m]

Discriminação da amostra em introdução eletrocinética é inevitável, uma vez que a quantidade injetada depende da mobilidade iônica e eletroosmótica. Sempre haverá discriminação com relação às espécies mais lentas.



Time →

B) Sistemas de Detecção - Detectores

• Requerimentos do Sistema

- Volume da cela de detecção pequeno
- Pequena (mínima) contribuição para o alargamento do pico
- Faixa dinâmica de resposta ampla
- Fator de resposta rápido
- Inerte à mudança de T
- Uso confiável e conveniente
- Detecção tanto seletiva quanto universal

⇒ **Em resumo:** Quase impossível encontrar um sistema com todos os requisitos.

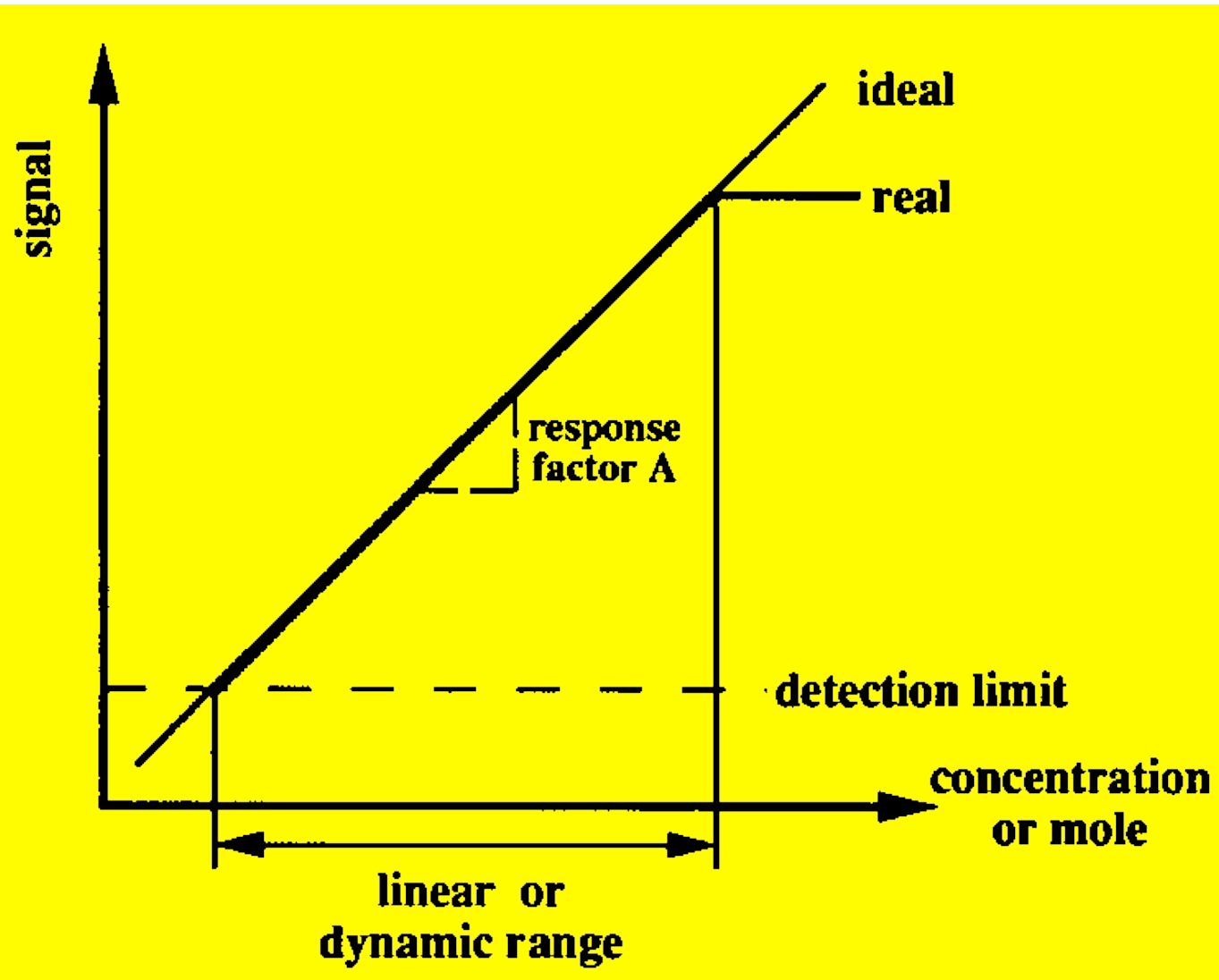


Fig. 4.4. Graph of the function $y = A \cdot c$

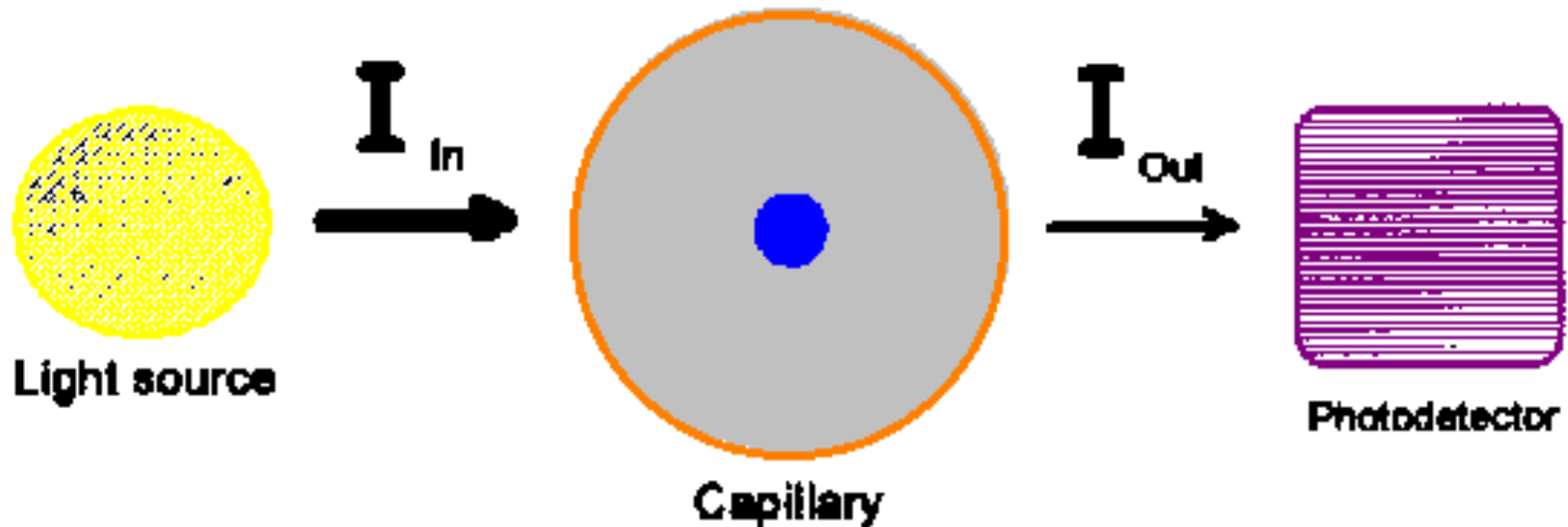
TABLE 4.1 Capillary Electrophoresis Detectors and Their Approximate Detection Limits

Detector	Approximate Detection Limits	
	Moles	Molarity ^a
UV/vis absorbance	10^{-13} – 10^{-16}	10^{-5} – 10^{-7}
Indirect absorbance	10^{-12} – 10^{-15}	10^{-4} – 10^{-6}
Fluorescence	10^{-15} – 10^{-17}	10^{-7} – 10^{-9}
Indirect fluorescence	10^{-14} – 10^{-16}	10^{-6} – 10^{-8}
Laser-induced fluorescence	10^{-18} – 10^{-20}	10^{-13} – 10^{-16}
Mass spectrometry	10^{-16} – 10^{-17}	10^{-8} – 10^{-10}
Amperometric	10^{-18} – 10^{-19}	10^{-7} – 10^{-10}
Conductivity	10^{-15} – 10^{-16}	10^{-7} – 10^{-9}
Refractive index	10^{-14} – 10^{-16}	10^{-6} – 10^{-8}
Radiometric	10^{-17} – 10^{-19}	10^{-10} – 10^{-12}

^aDepends upon volume of sample injected.

1- Ultravioleta / Visível (UV/Vis) - Absorbância

A transmitância de um sistema óptico é dado pela razão entre a intensidade de luz emergente e luz incidente.



$$T = I_{out} / I_{in}$$
$$A = -\log T = \epsilon \cdot b \cdot C$$

- Segundo a Lei de Lambert-Beer

$$\log \frac{1}{T} = A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

A = Absorbância da amostra [u.a.]

ε = Absortividade molar [L.mol⁻¹.cm⁻¹]

b = Caminho ótico [cm]

C = Concentração [M]

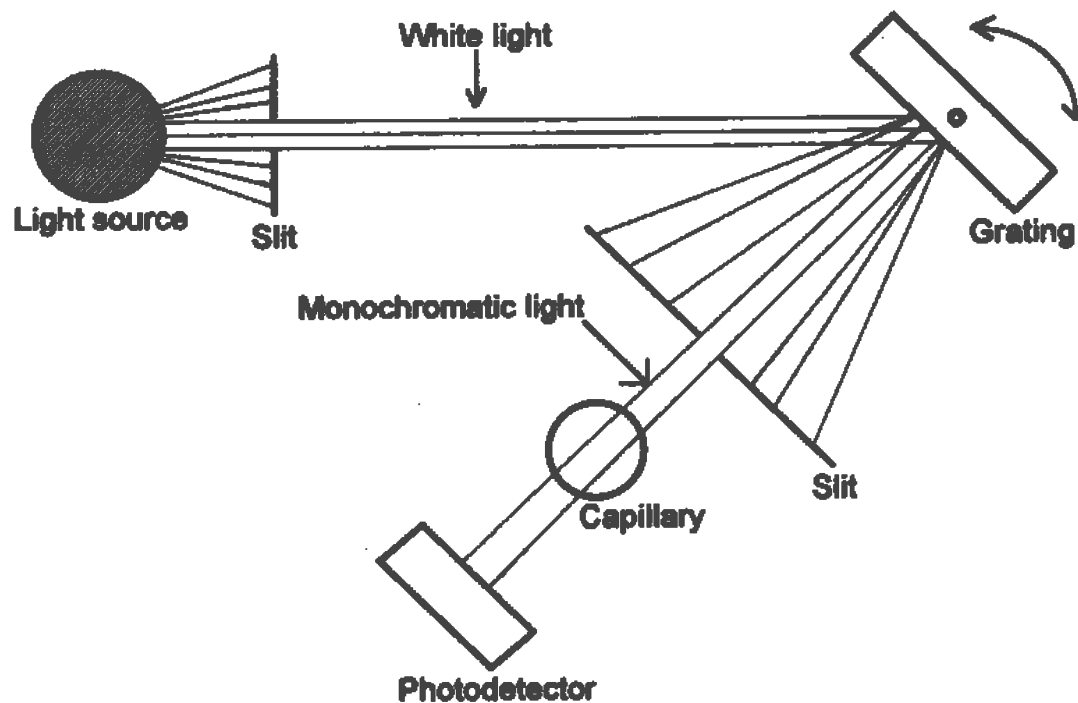


Fig. 4.14. Variable wavelength UV/vis detector. White light of all wavelengths is diffracted into individual wavelengths by the grating. The grating is turned, as indicated by the curved arrow, to select the wavelength that impinges on the capillary. After the light passes through the capillary, its intensity is measured by the photodetector and the detector converts this to absorbance units.

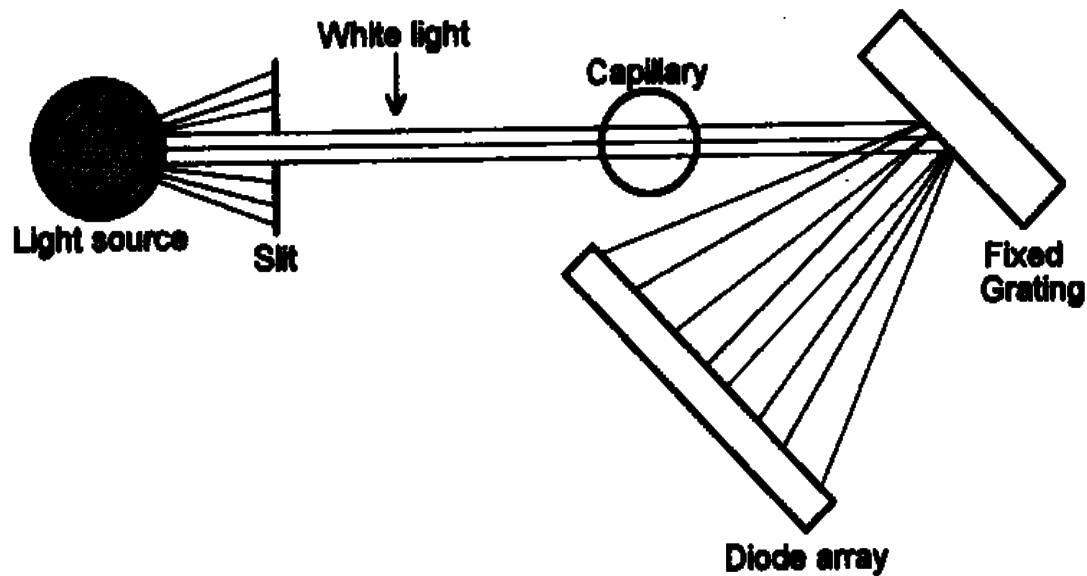


Fig. 4.15. Diode array detector. White light of all wavelengths passes through the capillary and is diffracted into individual wavelengths by the grating. The diffracted light impinges on an array of diodes. Wavelength is selected by electronically sampling from a range of diodes.

Alternativas para Aumentar o Caminho Ótico

Cela em Z

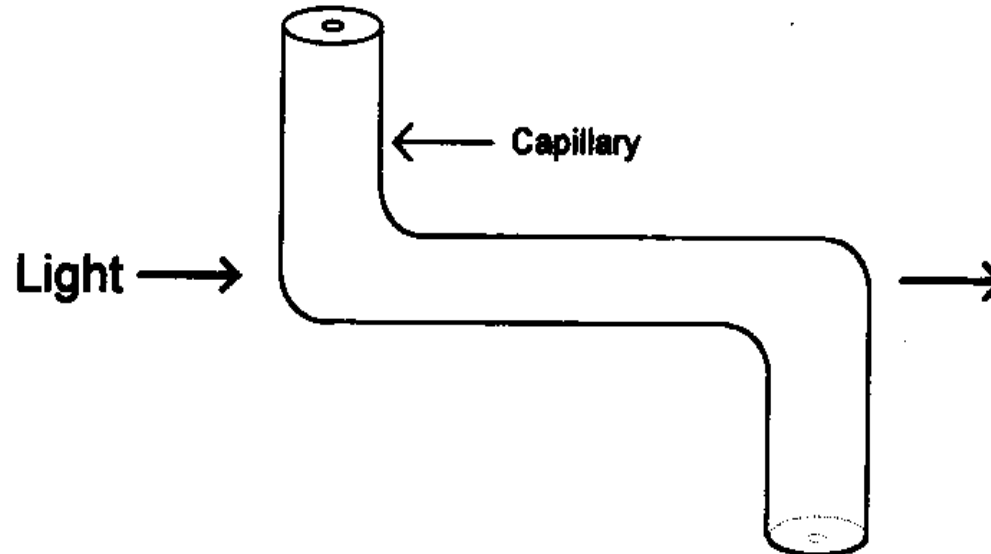
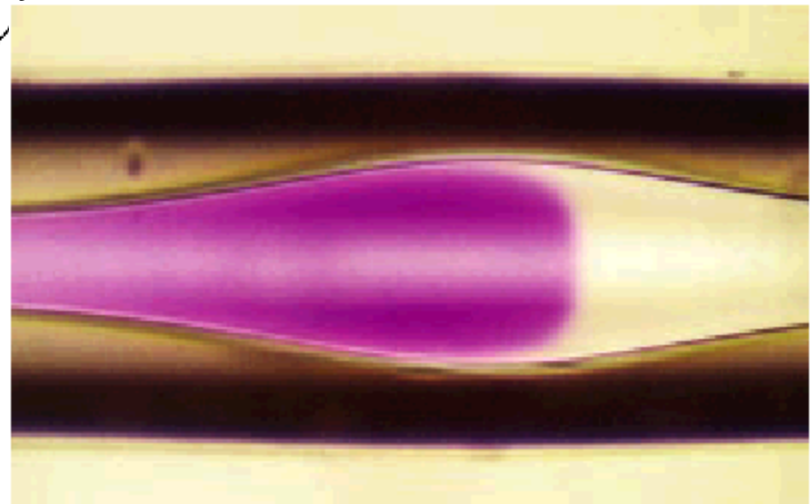
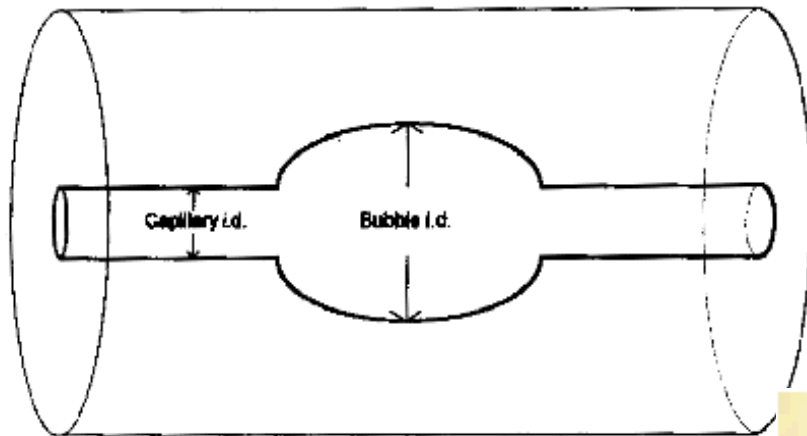



Fig. 4.16. Drawing of a z-cell. Light passes through the capillary as indicated by the arrow, thus increasing the pathlength from the inner diameter of the capillary to the length of the illuminated capillary.

Extended Path Detection Cell



2- Detecção por Fluorescência

Seletivo e mais sensível do que o detector de absorção devido à redução do sinal de fundo.

 O comprimento de onda da excitação e emissão dependem da natureza do analito

Fluorescência com Resolução Espectral

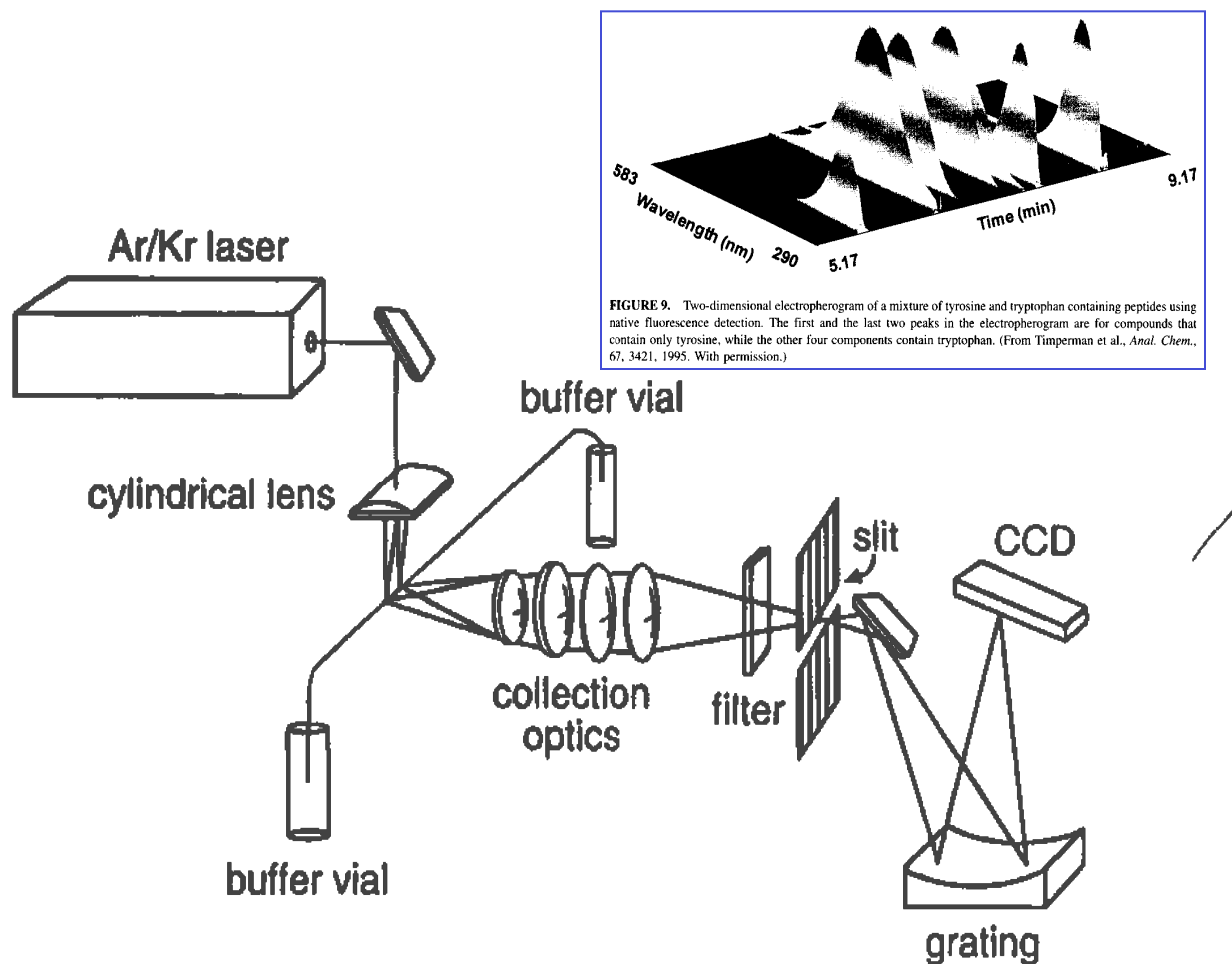


FIGURE 8. Detailed schematic of the optical system for a wavelength-resolved CE system. The spectrograph slit acts as a spatial filter and the grating disperses the fluorescence emission across one axis of the CCD. (From Timperman et al., *Anal. Chem.*, 67, 139, 1995. With permission.)

3- Espectrometria de Massas

Características: - relativamente sensível

- universal
- altamente seletivo
- informação qualitativa e quantidade

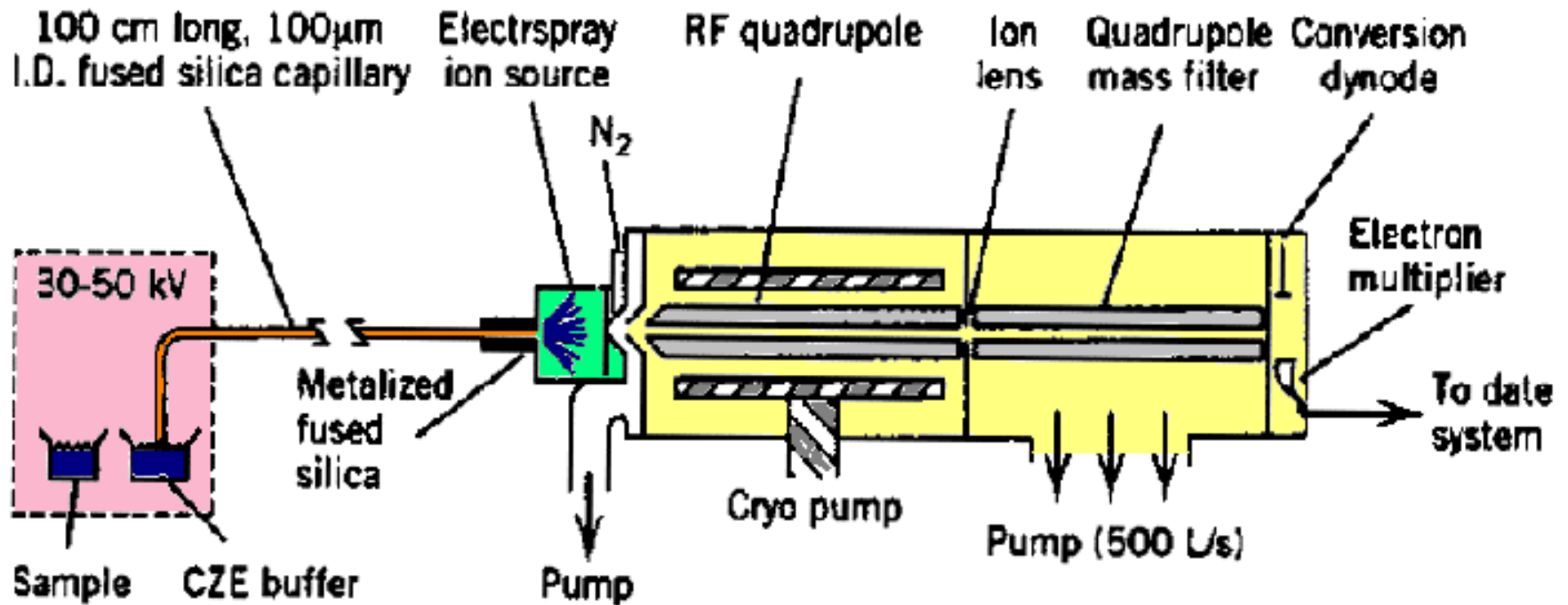
Interfaces: - fluxo axial

- junção líquida

- sem fluxo líquido

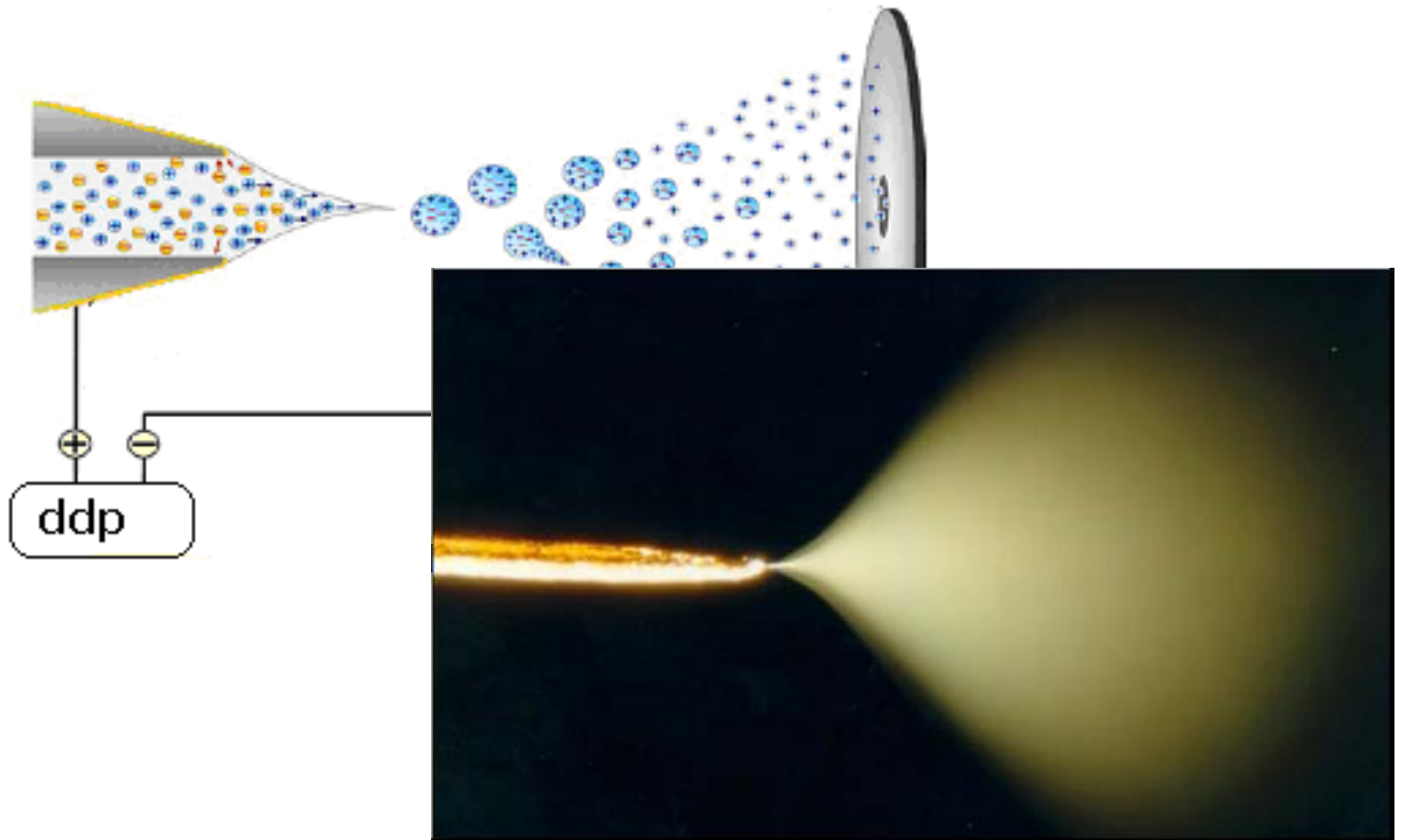
} “Electrospray”

Acoplamiento CE-MS

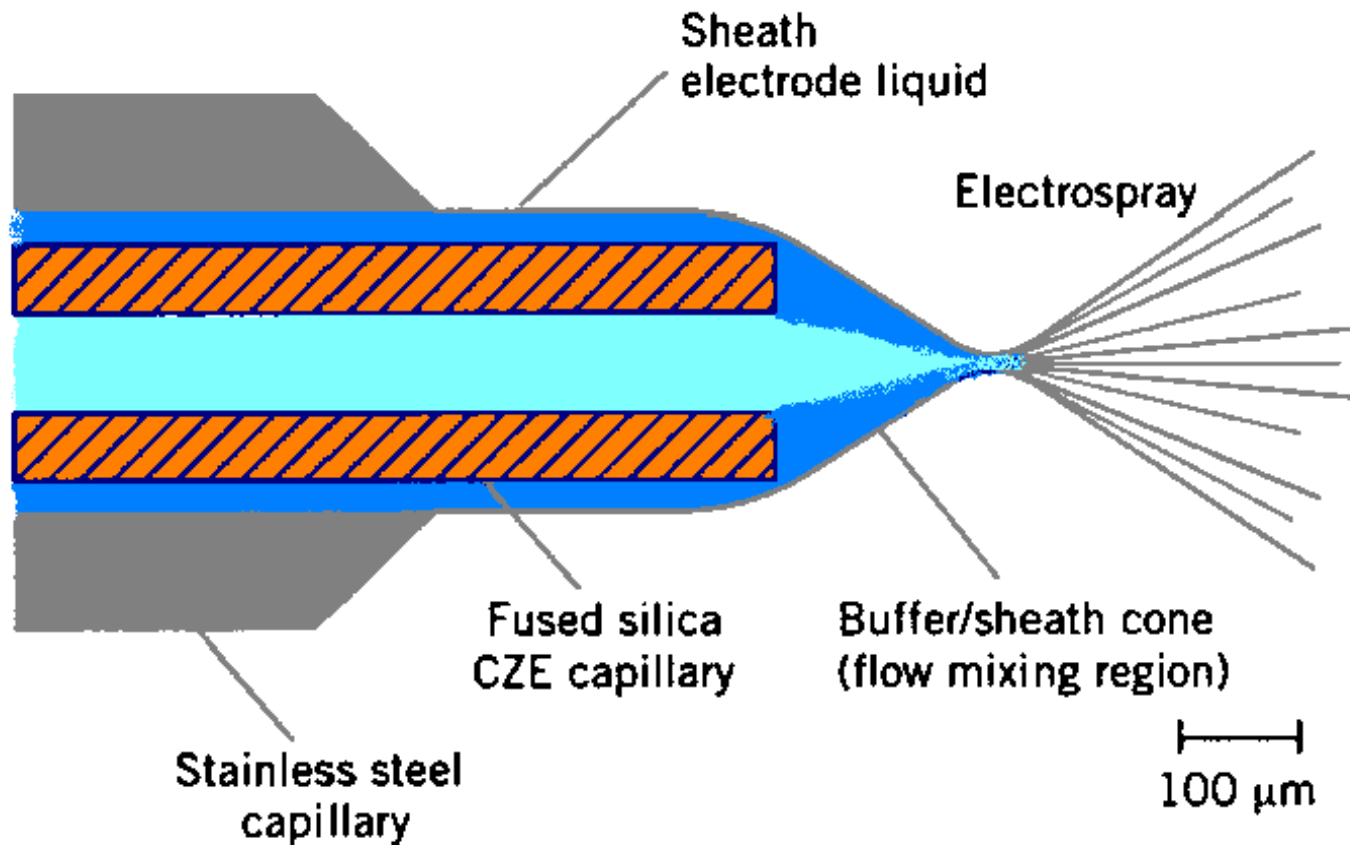


High voltage region
(interlocked with
automated injection)

Electrospray



Ionização electrospray CE-MS



CE-MS de proteínas

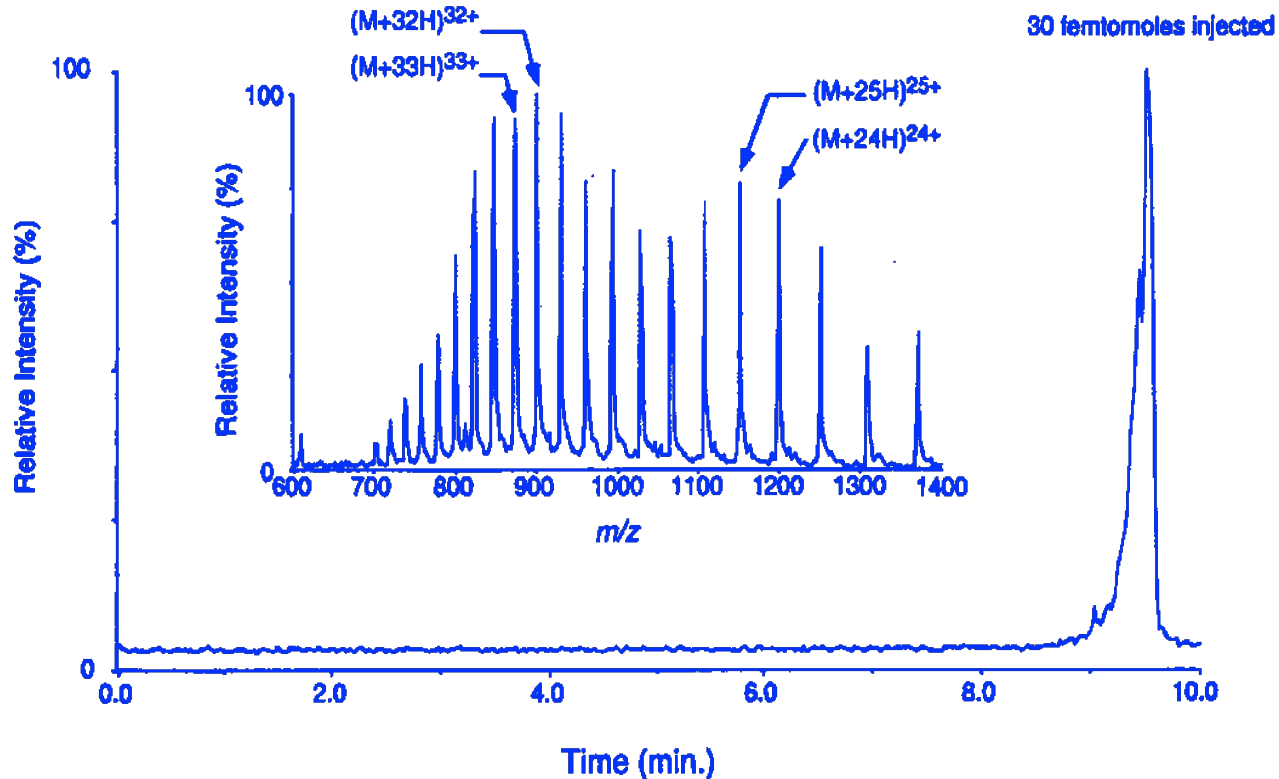
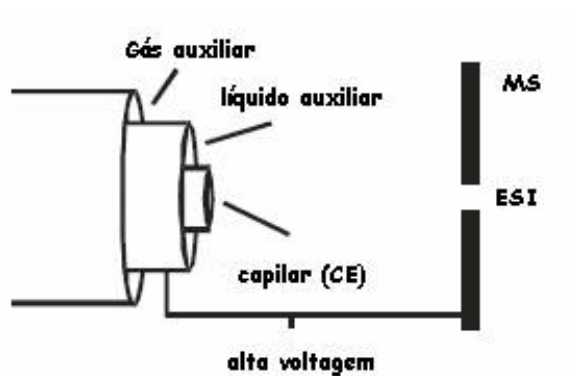
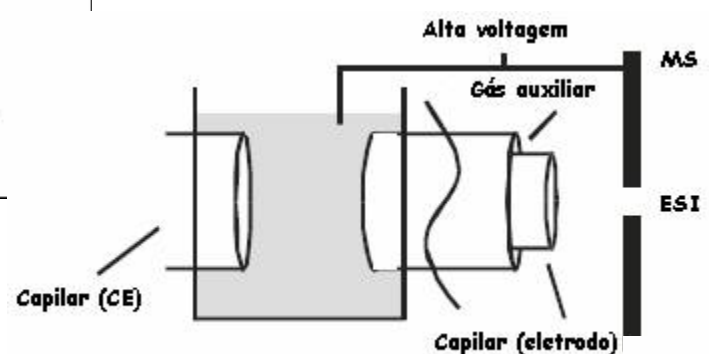


FIGURE 4. CE-ESI-FTICR-MS of 30 fmol of carbonic anhydrase I, injected onto a 20 μm i.d. capillary treated with 3-aminopropyltrimethoxysilane. Also see Figure 28-12. (From *Anal. Chem.*, 65, 576A, 1993. With permission.)

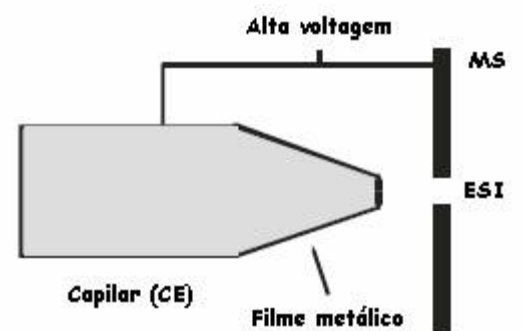
Interfaces CE-MS



Líquido auxiliar



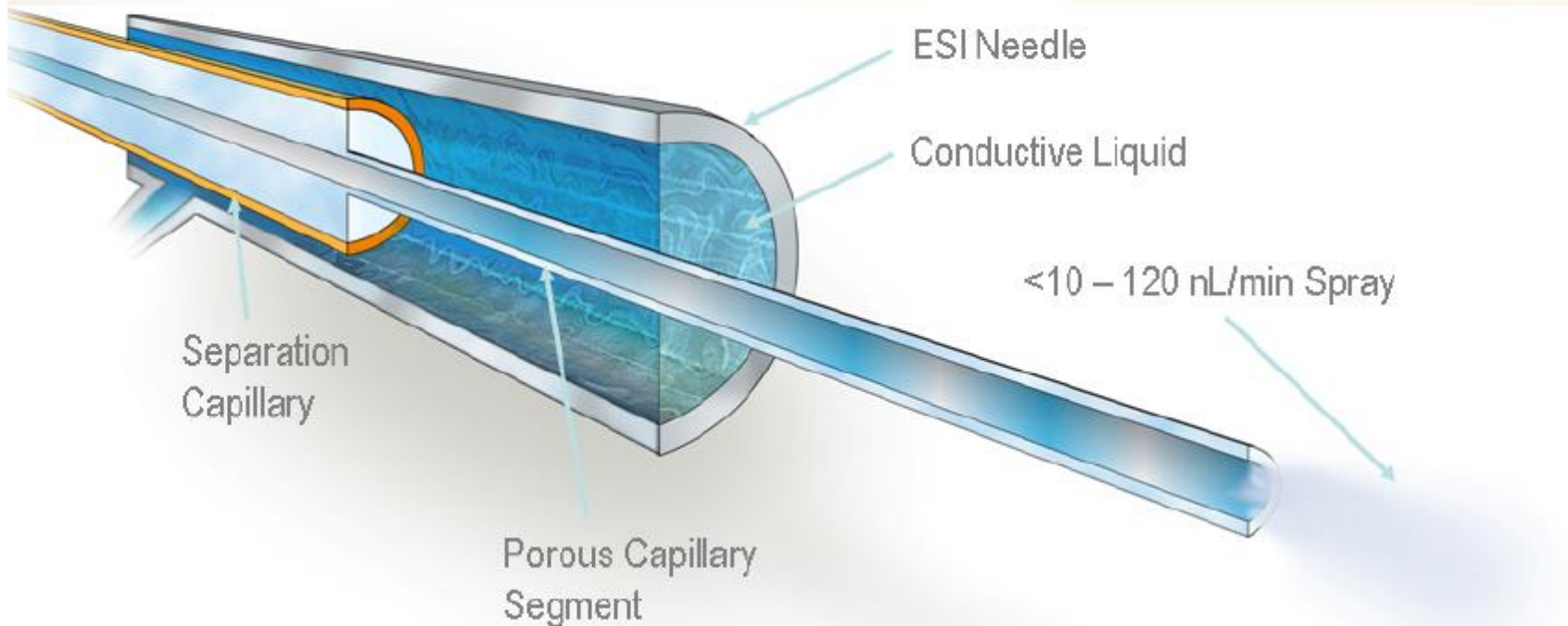
Junção líquida



Sem líquido auxiliar

Assunção, Bechara, Simionato, Tavares,
Carrilho. *Quim. Nova*, Vol. 31, No. 8,
2124-2133, 2008

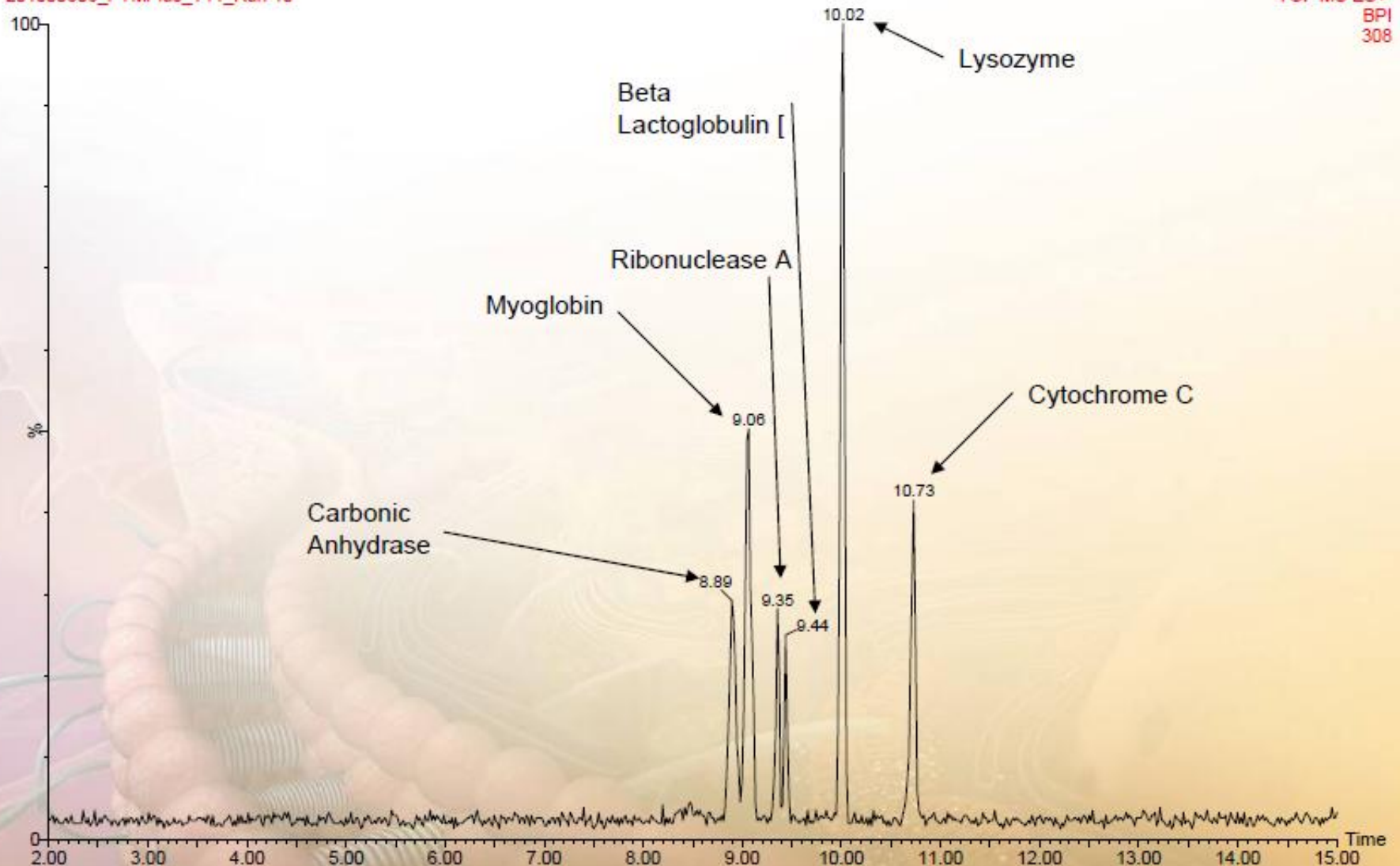
Sheathless Interfacing CE and ESI-MS with a Porous Tip



Intact Proteins Base Peak Intensity

201000506_PTMPPlus_T11_Run 10

TOF MS ES+
BPI
308

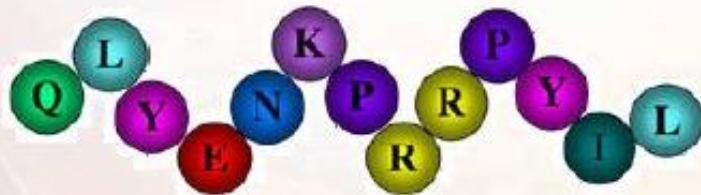


Advantages of low flow rates in ESI-MS

Schmidt, Karas, Dulcks

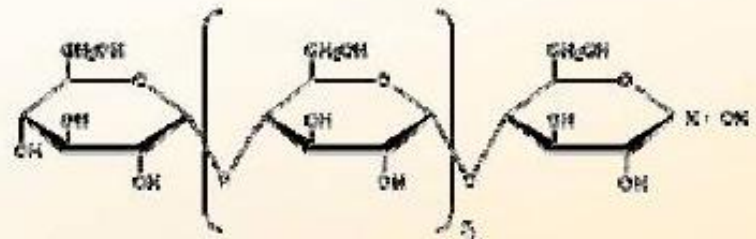
J Am Soc Mass Spectrom 2003, 14, 492–500

Neurotensin



+

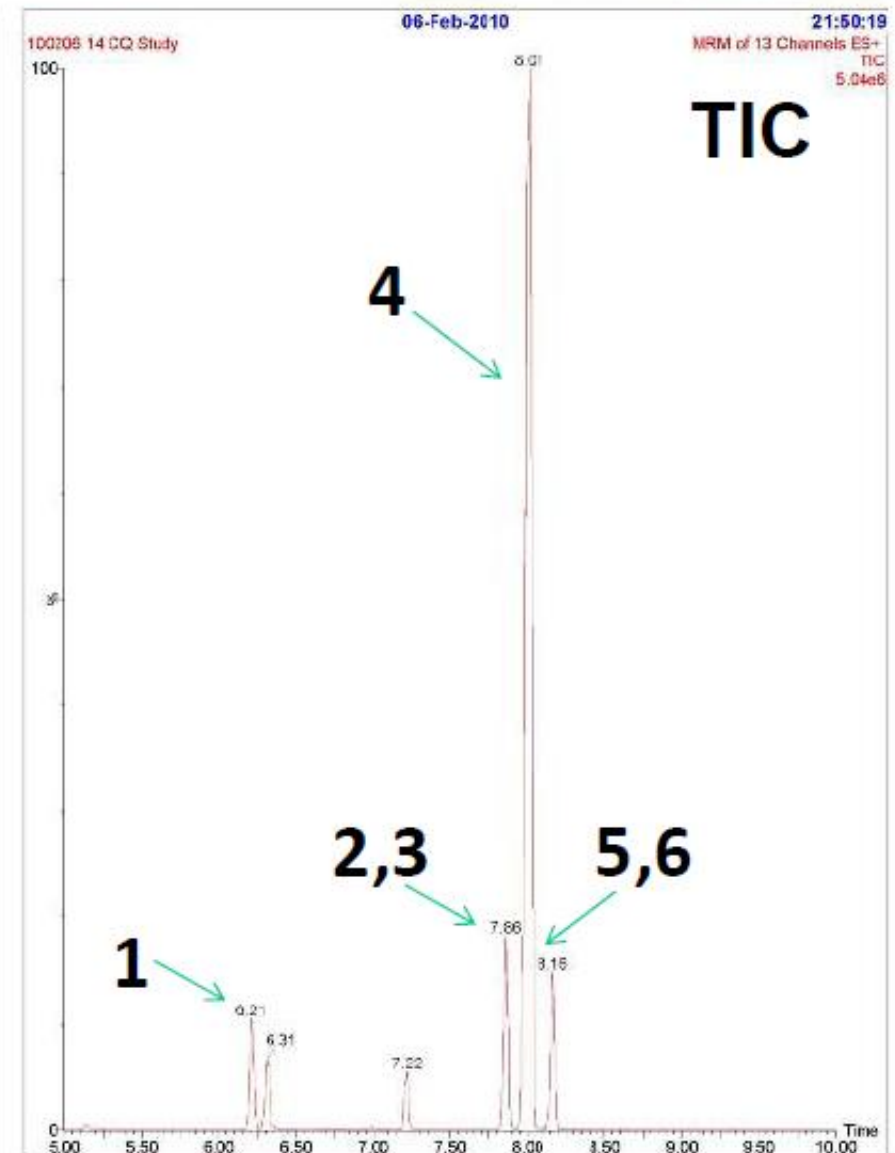
Maltoheptaose



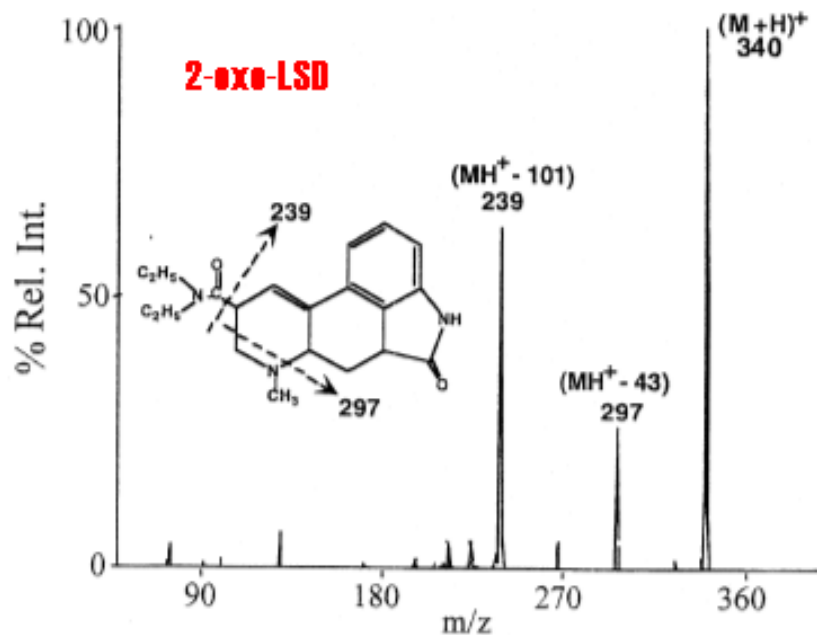
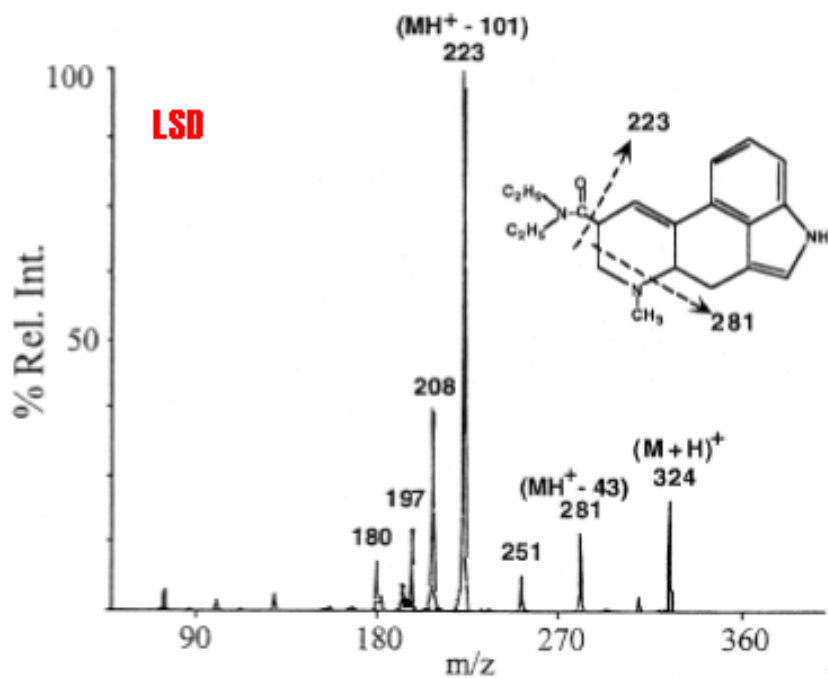
“Analyte suppression is practically absent at minimal flow rates below 20 nL/min”

Metabolite Identification CQ Study (M+1)

1. Doxapram IS 379.5
2. CQ, N-Desethyl-hydroxy- 308.2
3. CQ, Hydroxy- 336.4
4. CQ, 320.3
5. CQ, N-Desethyl- 294.2
6. CQ, N,N-Didesethyl- 264.3



CE-MS/MS



MS/MS of (M+H)⁺

Outros Métodos de Detecção:

Detectores Eletroquímicos:

- potenciométrico
- amperométrico
- condutimétrico

Detecção Indireta:

- pode ser usado com detector universal
- absorvância UV/vis, fluorescência, amperometria

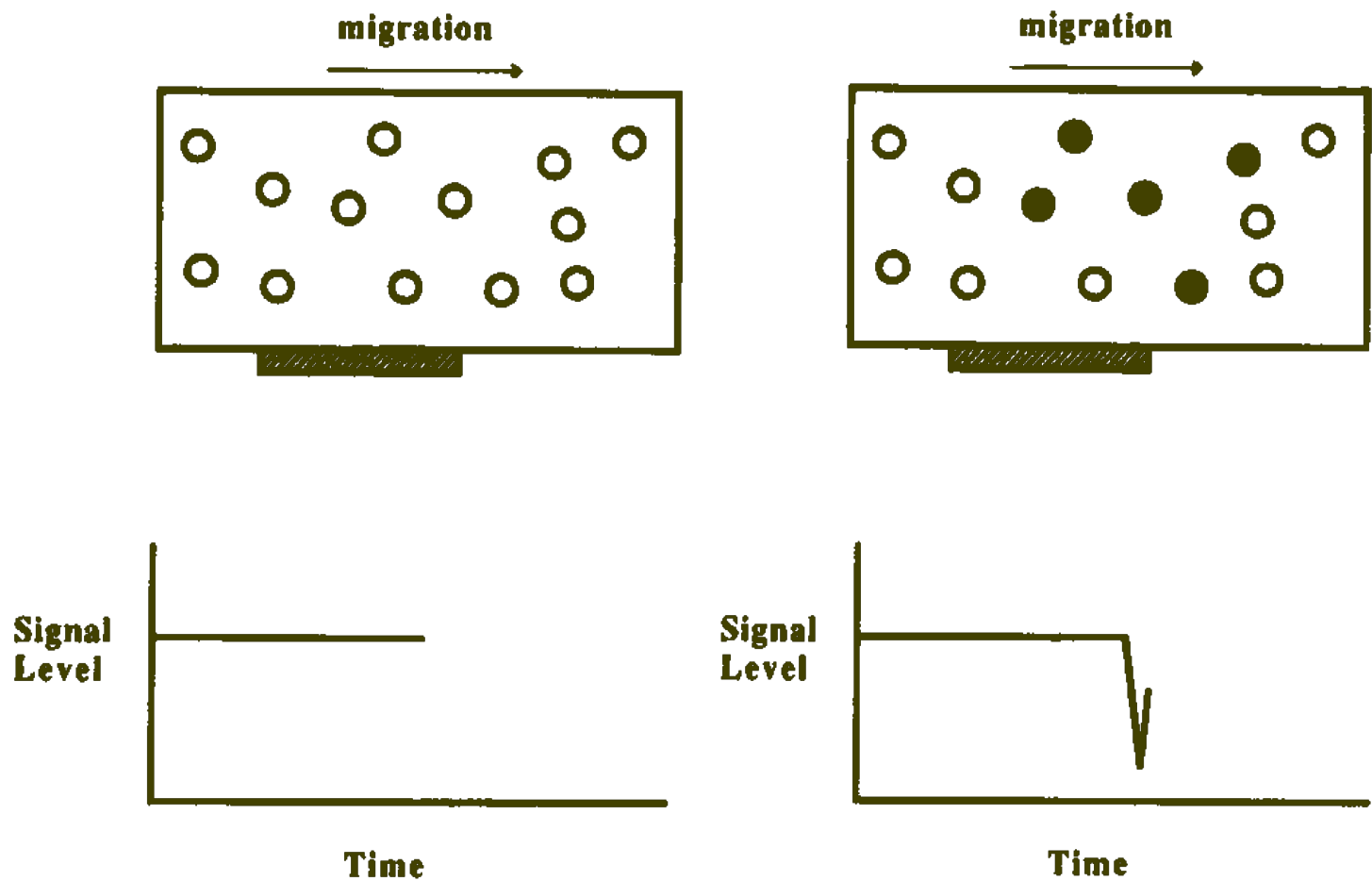


FIGURE 1. Diagram illustrating the principal of indirect detection. The open circles represent the signal generating molecules that have been added to the separation medium. On the right, the analyte molecules are represented by shaded circles and have displaced some of the signal generating molecules. This results in a loss of signal at the detector. (Adapted from Yeung, E. S., *Acc. Chem. Res.*, 22, 125, 1989.)

C - Coluna Capilares

- A alma de cada sistema eletroforético - feita de sílica fundida, possui alta resistência mecânica, química, transparência no UV, disponibilidade de uma variedade de diâmetros interno e externo, alta condutividade térmica.
- Preparo básico de uma coluna capilar
 - Corte um pedaço da coluna riscando a camada de poliimida com um cortador de vidro.
 - Cuidadosamente dobre a coluna.
 - Meça e corte outro pedaço de tamanho desejado de coluna.

- Remova alguns milímetros de poliimida de cada ponta (mini-tocha ou lâmina).
- Meça o comprimento efetivo da coluna (LD) e remova a poliimida, fazendo uma janela.
- Limpe a janela com acetona/metanol.
- Instale a coluna cuidadosamente no cartucho apropriado de cada instrumento.
- Faça uma lavagem com 1 M NaOH (10 min), depois com 0,01 M NaOH (30 min) e finalmente com tampão de separação (30 min).
- Sistema está pronto para uso.

– Para operação em pHs ácidos, a estabilização é mais exigente. Para utilização na faixa de pH 3-7 recomenda-se antes de cada análise:

→ lavar com 0,1 M NaOH (5 min.)

→ lavar com água bidestilada (2 min.)

→ lavar com tampão de análise (10 min.)

– Para a armazenagem da coluna:

→ lavar o capilar com água bidestilada

→ secar o capilar com ar ou nitrogênio (2 min)

→ retire o capilar

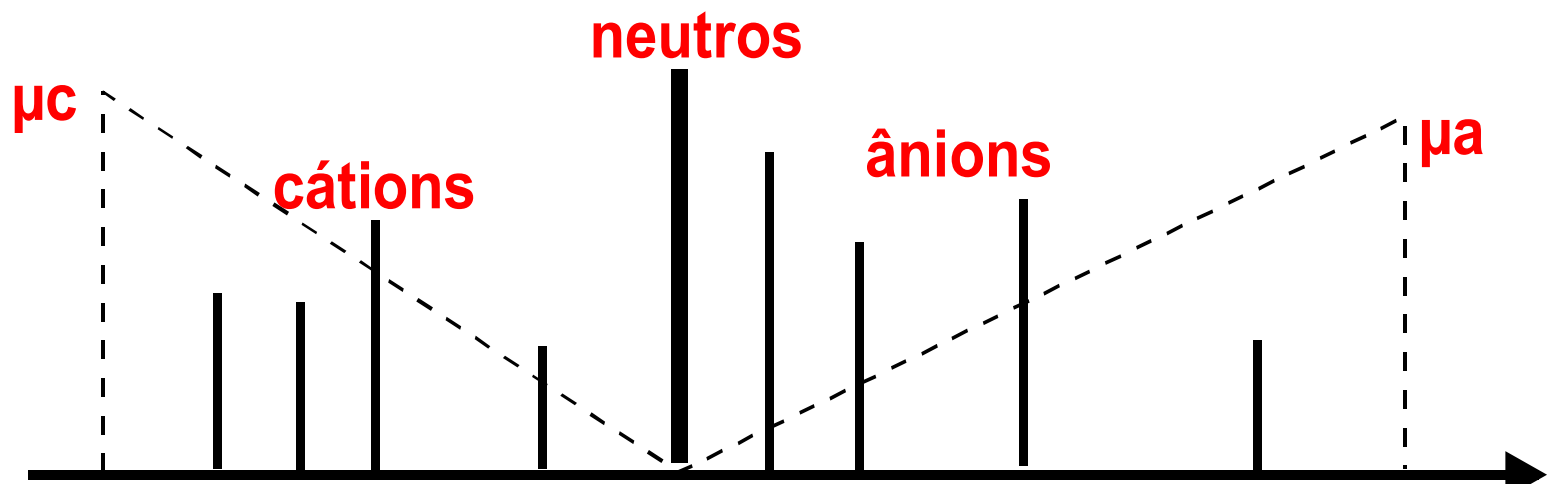
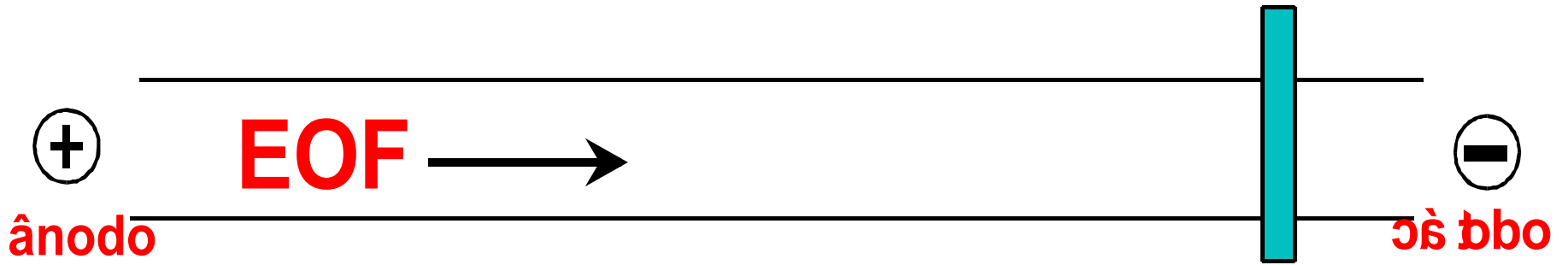
- Uso e preparo de colunas com interior recoberto

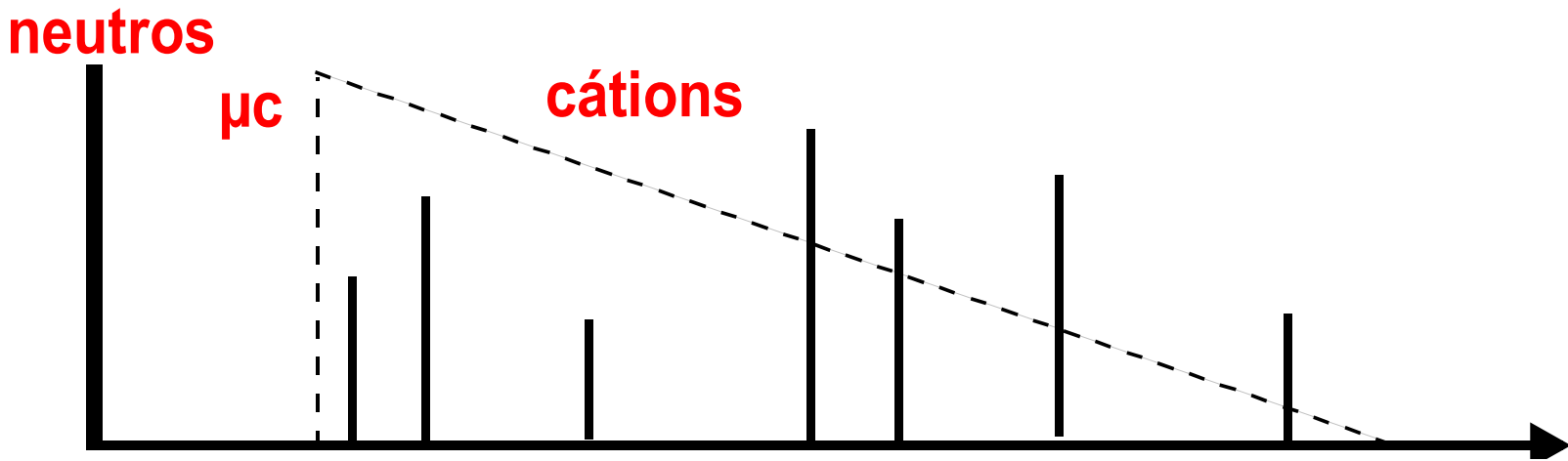
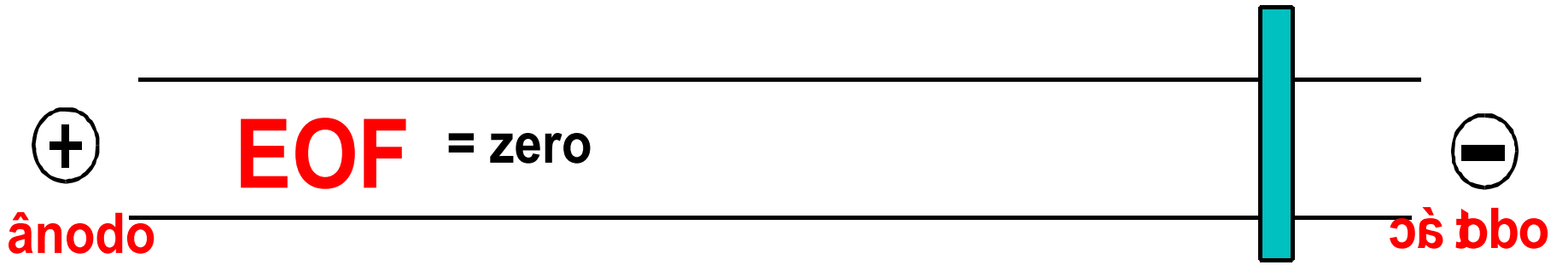
⇒ **Objetivos:**

- evitar a adsorção de analitos - minimizar as interações soluto-parede;
- estabilização/eliminação do EOF sobre ampla faixa de pH;
- reprodutibilidade no preparo;
- estável por longos períodos e grande número de corridas.

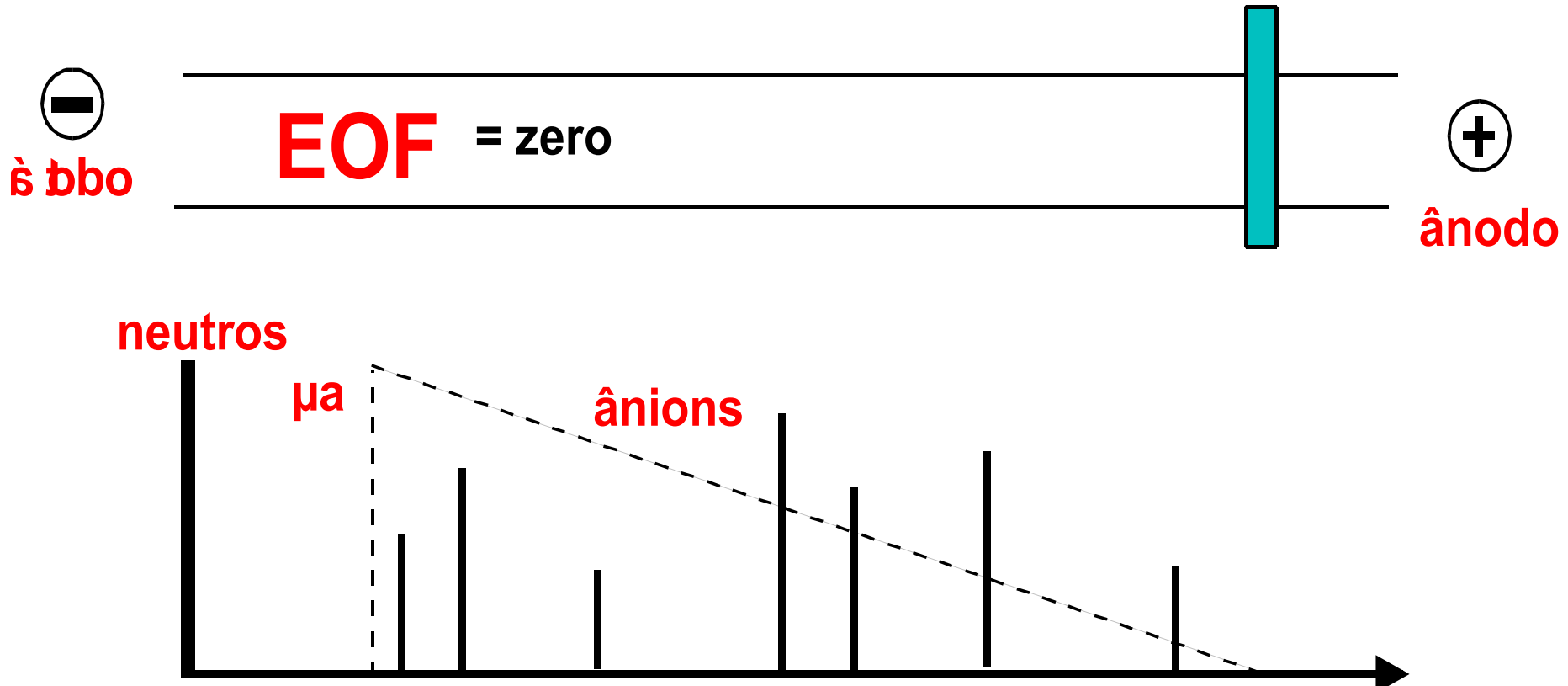
⇒ **Implicações**

- **eliminação do fluxo eletrosmótico;**
- cátions analisados com polaridade normal
- neutros não migrarão e ânions serão eliminados da coluna

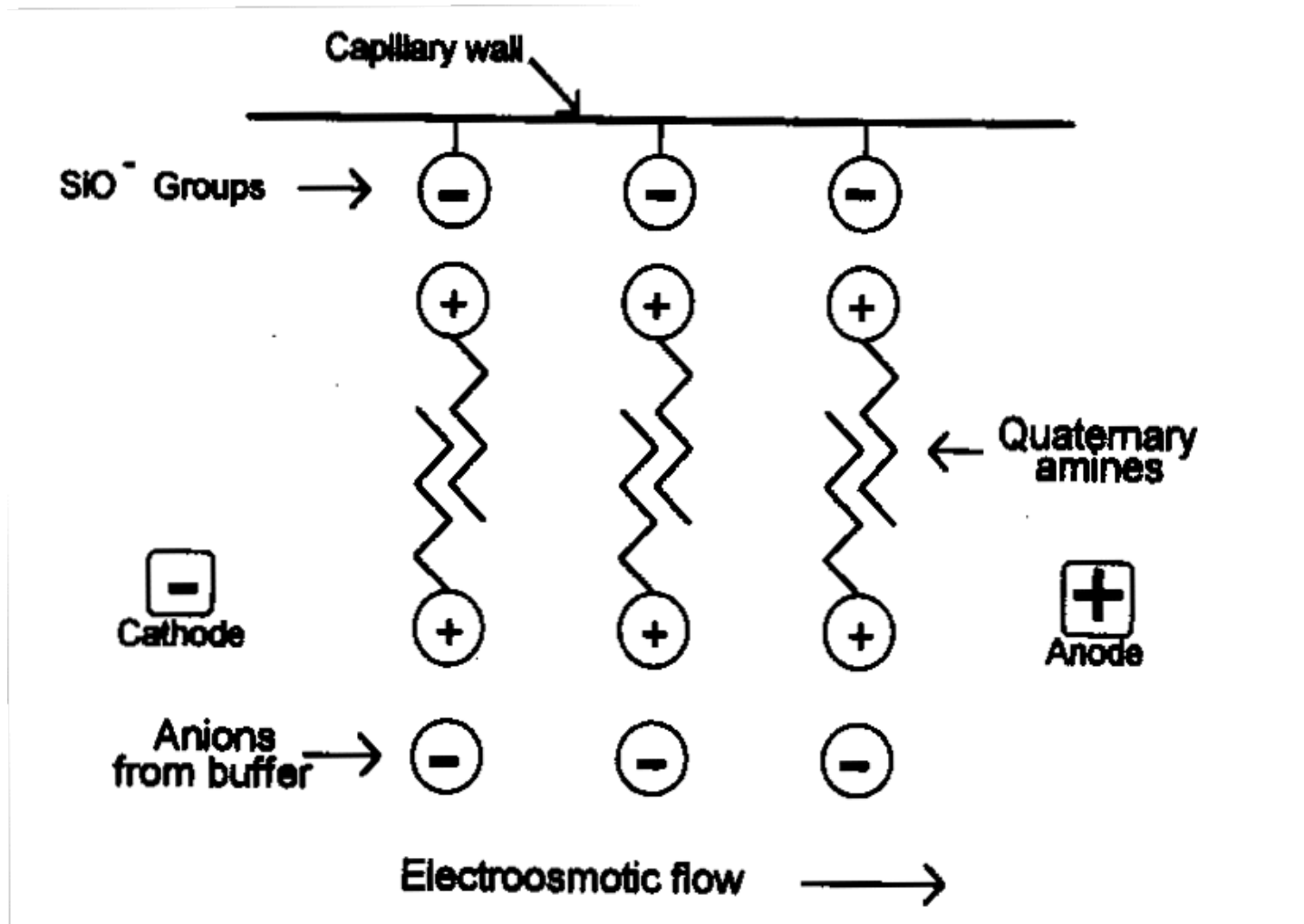


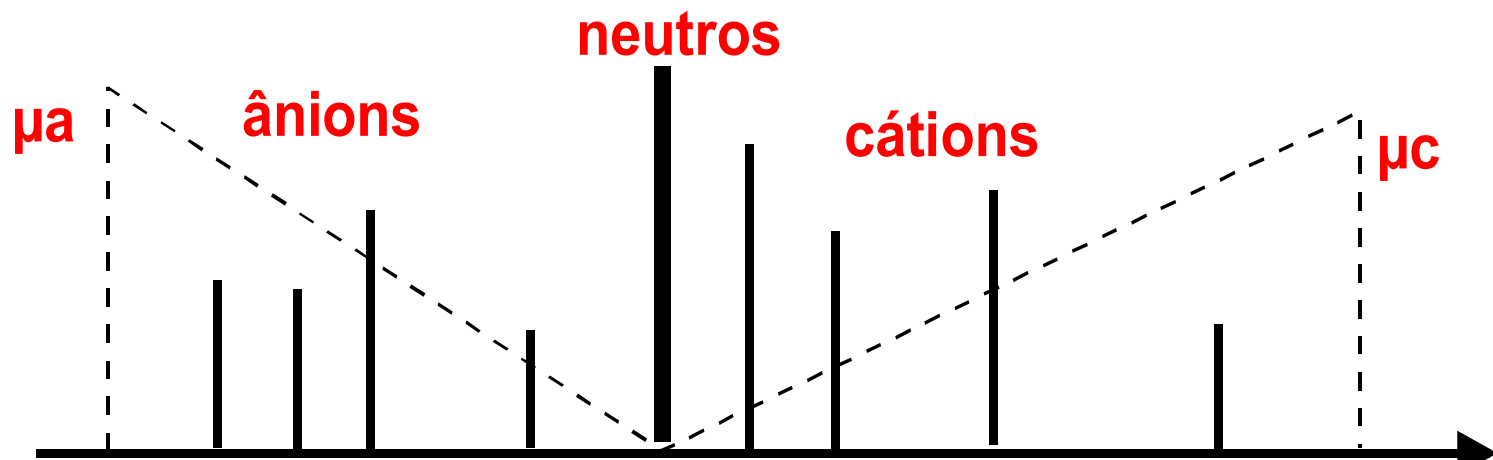


- ânions analisados com polaridade reversa: neutros não migrarão e cátions serão eliminados



– Inversão de fluxo eletrosmótico:





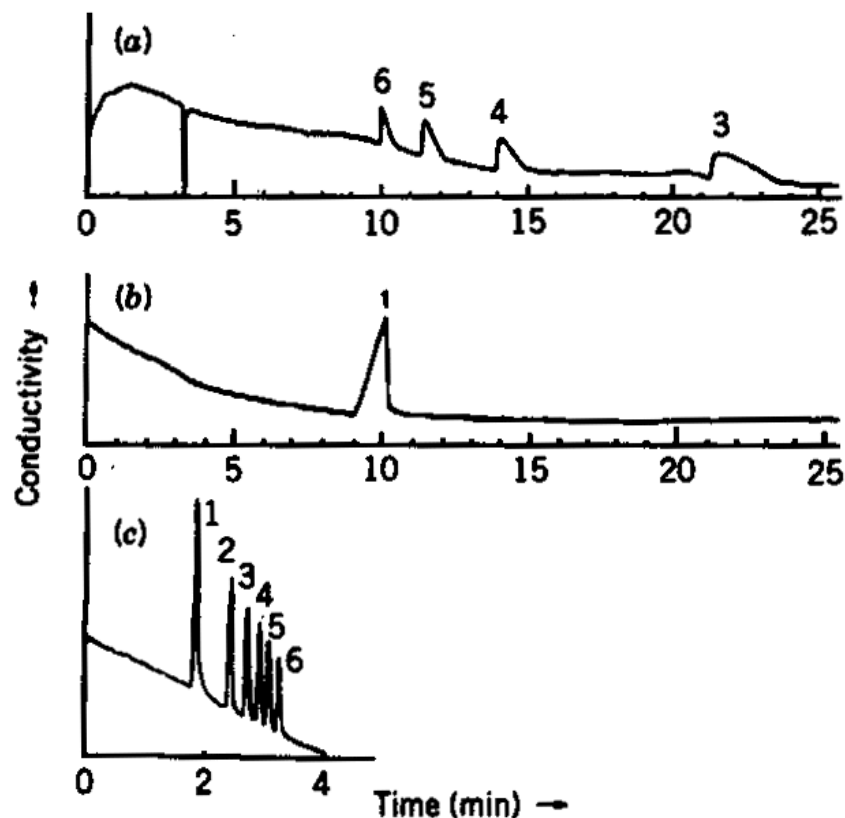


Fig. 2.13. Electropherograms of carboxylic acids showing the effect of flow and polarity reversal on elution order. (a) "Normal" separation with the detector cathodic. (b) Separation with the polarity of the voltage reversed. (c) Separation with voltage polarity and the direction of electroosmotic flow reversed by the addition of 0.5 mM tetradecyltrimethylammonium bromide (TTAB) to the buffer. Buffer: 10 mM 2-morpholinoethanesulfonic acid/His at pH 5.9 [0.5 mM TTAB was added for the electropherogram shown in (c)]. Capillary; fused silica, 75 μm i.d., 40 cm long to the detector. Detection: conductivity. Injection: gravity. Voltage: 20 kV. Peaks: 1 = formate, 2 = acetate, 3

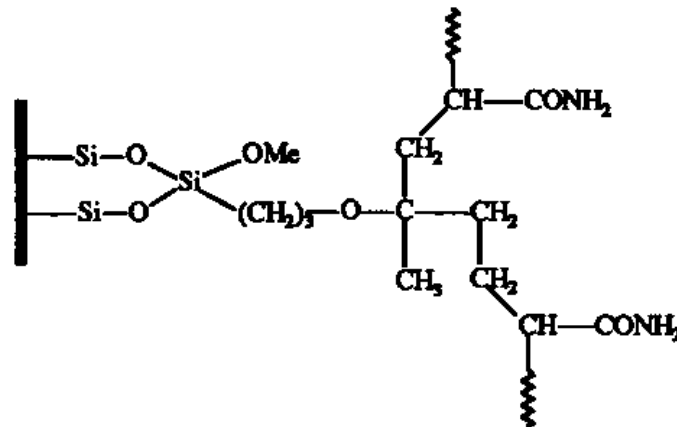
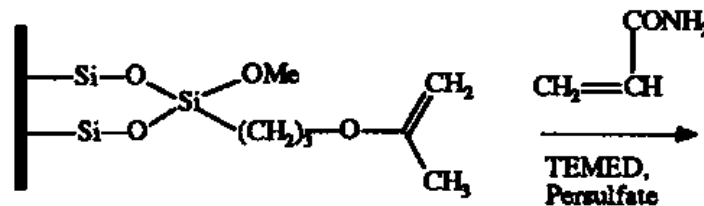
- Tipos de Recobrimento

- recobrimento covalente
- recobrimento dinâmico

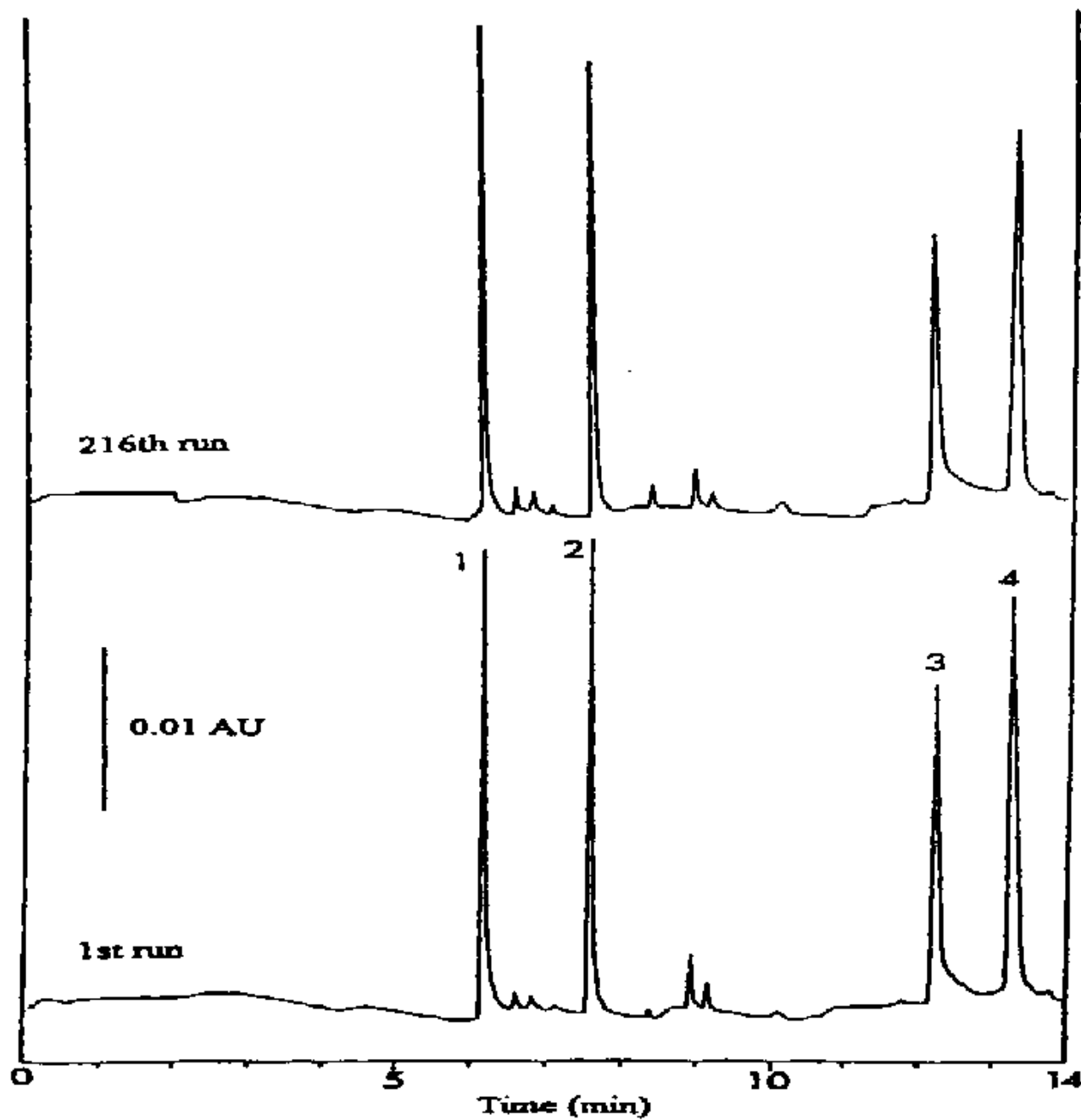
a) Filme polimérico covalente: mudança estrutural da superfície da sílica.

Modificação da superfície com poliacrilamidas

ligação via siloxano: baseia-se no uso do composto bifuncional (Hjerten, 1985)



Absorbance



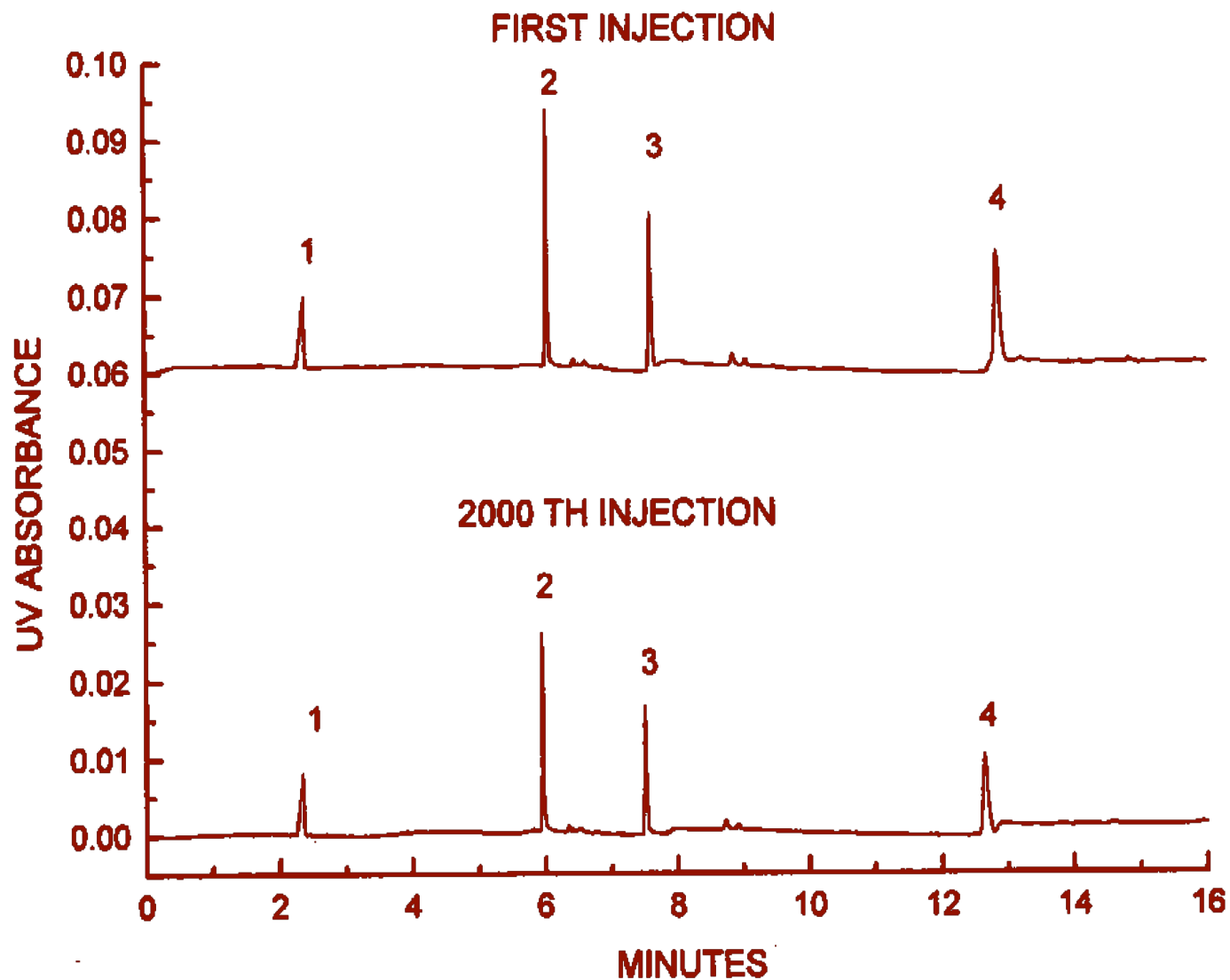


FIGURE 13. Capillary stability study on polyvinyl alcohol coated capillary. Separation conditions: 20 mM citrate and 20 mM MES at pH 6.0, 500 V/cm 27 cm total length and 20 cm effective length capillary. Peaks are as follows: 1) Histamine, 2) lysozyme, 3) cytochrome c, 4) myoglobin.

VI - MODOS DE OPERAÇÃO EM CE

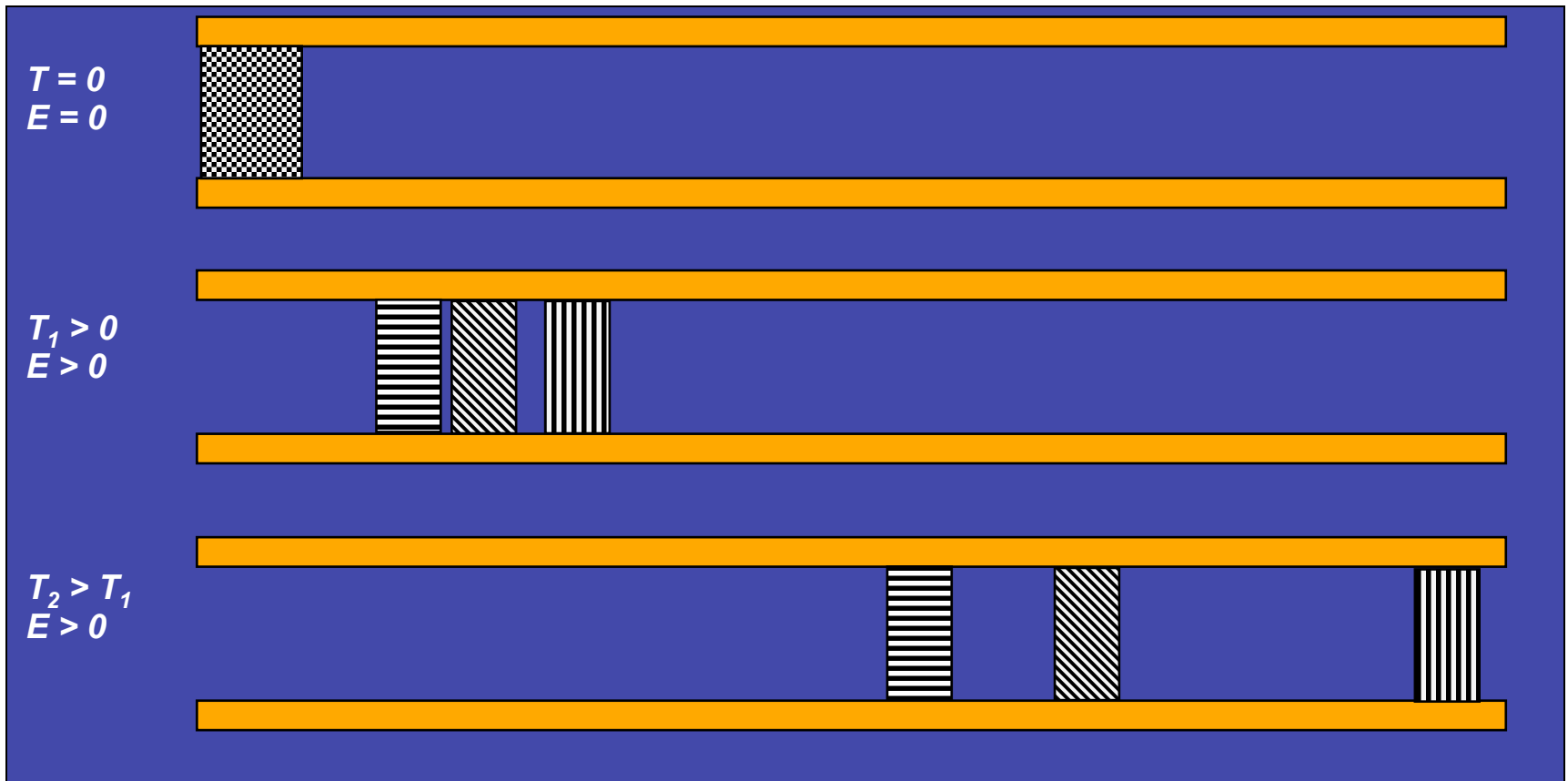
- Métodos em Solução
- Métodos em Meio Polimérico
- Métodos Cromatográficos

Métodos em Solução

- Eletroforese Capilar de Zona (CZE)
- Isotacoforese Capilar (CITP)
- Focalização Isoelétrica Capilar (CIEF)

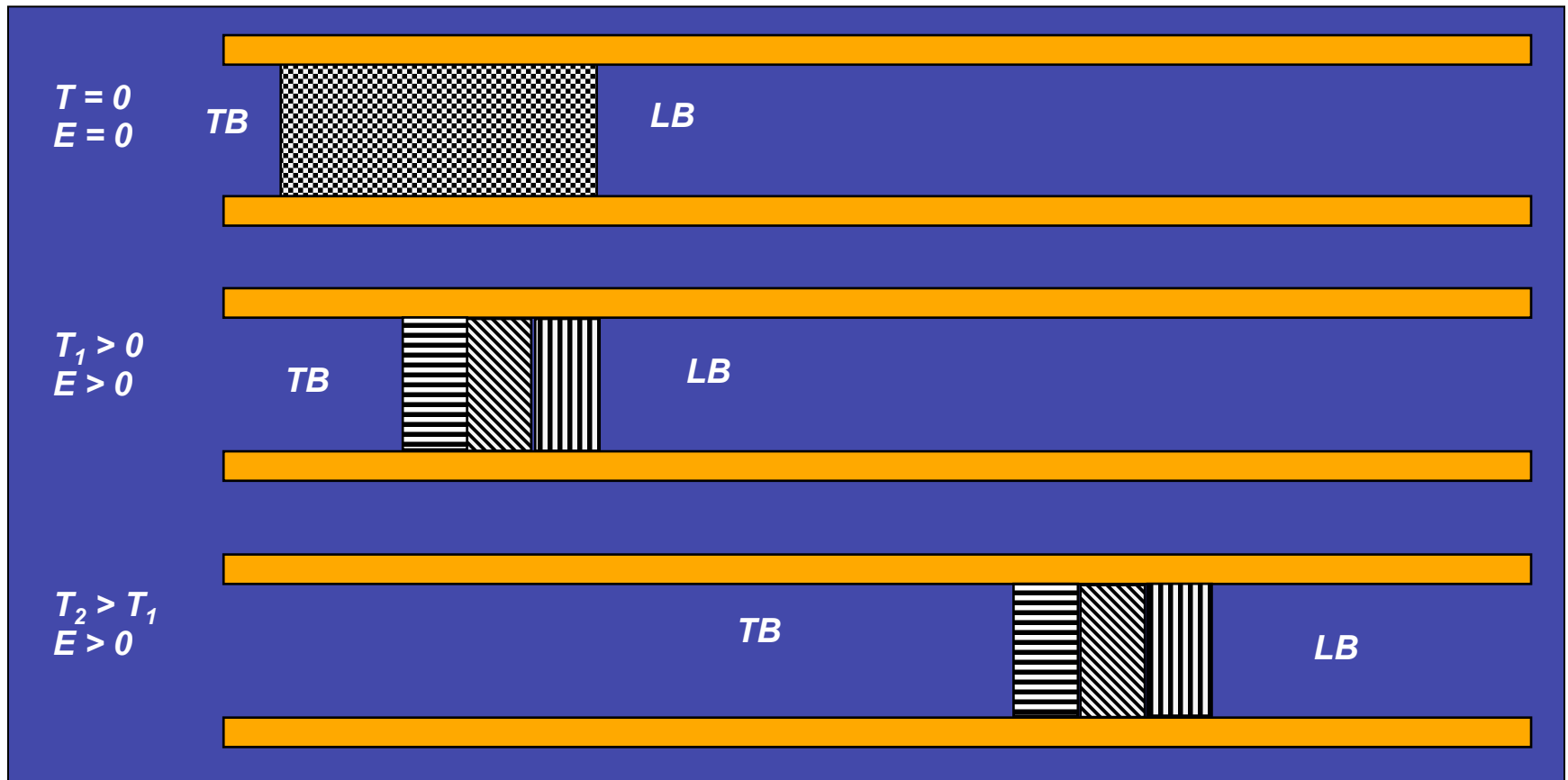
A) Eletroforese Capilar de Zona (CZE)

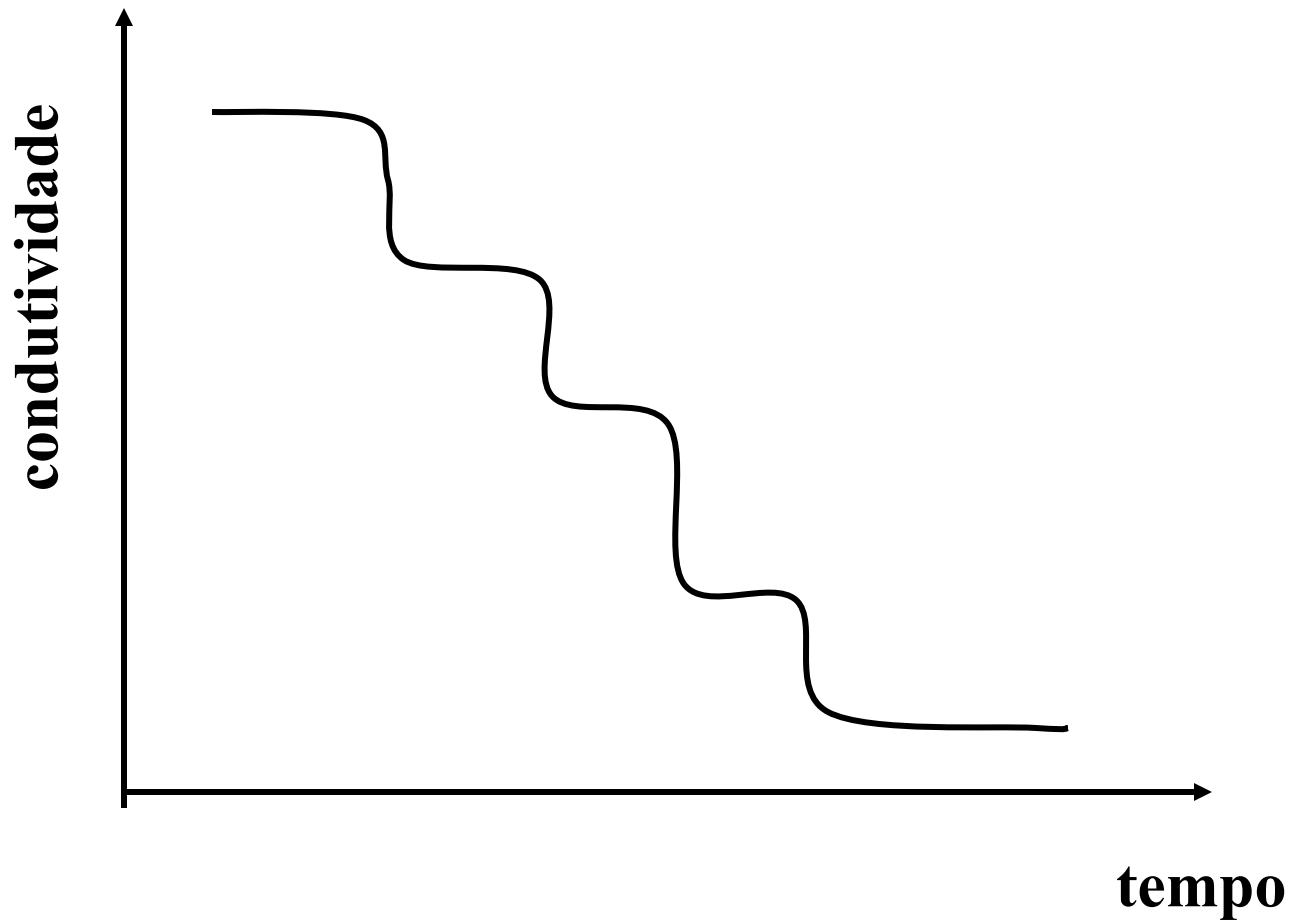
- Também descrito como eletroforese em solução (FSCE)



B) Isotacoforese Capilar (CITP)

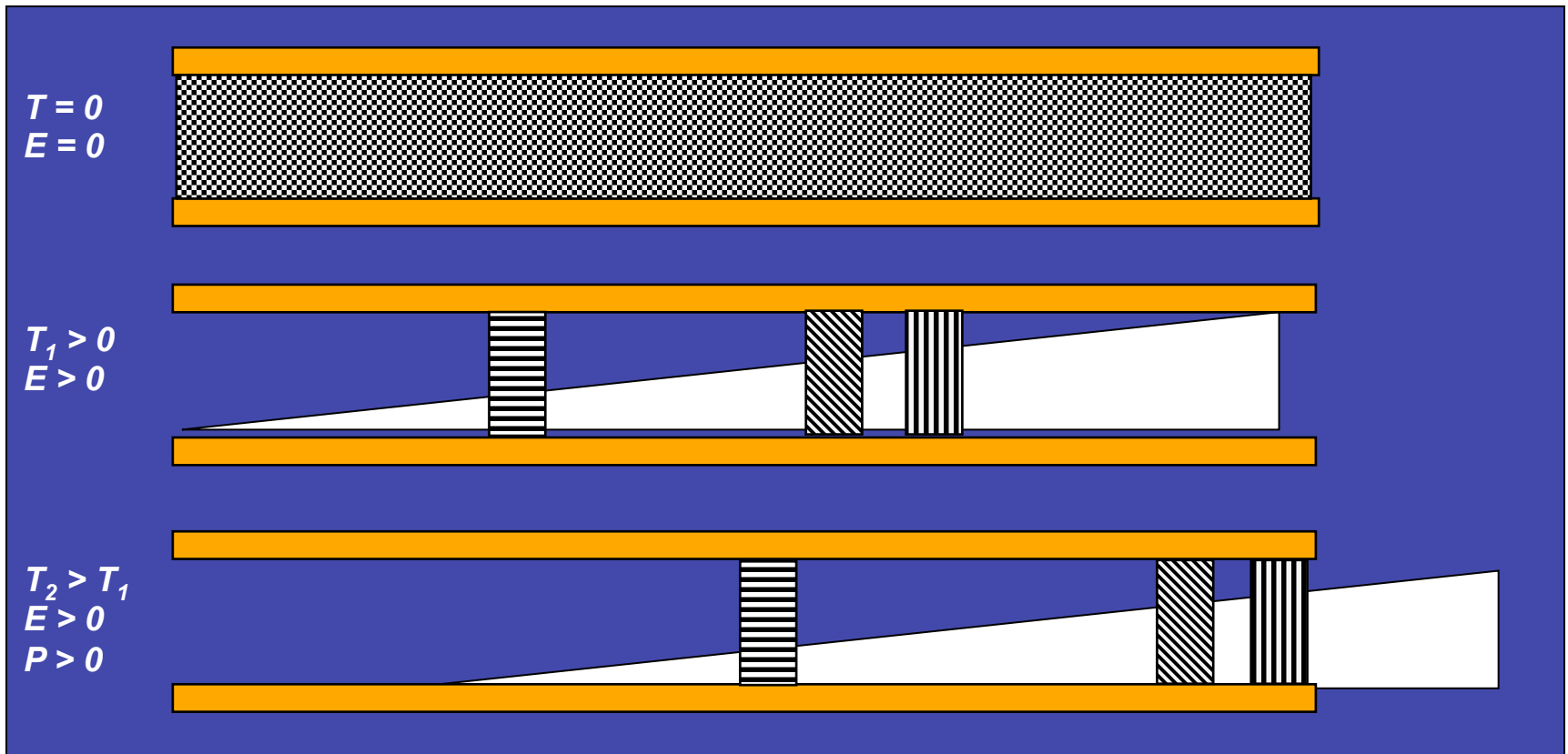
- Seletividade baseada na mobilidade de cada espécie
- Separação efetuada a velocidade constante

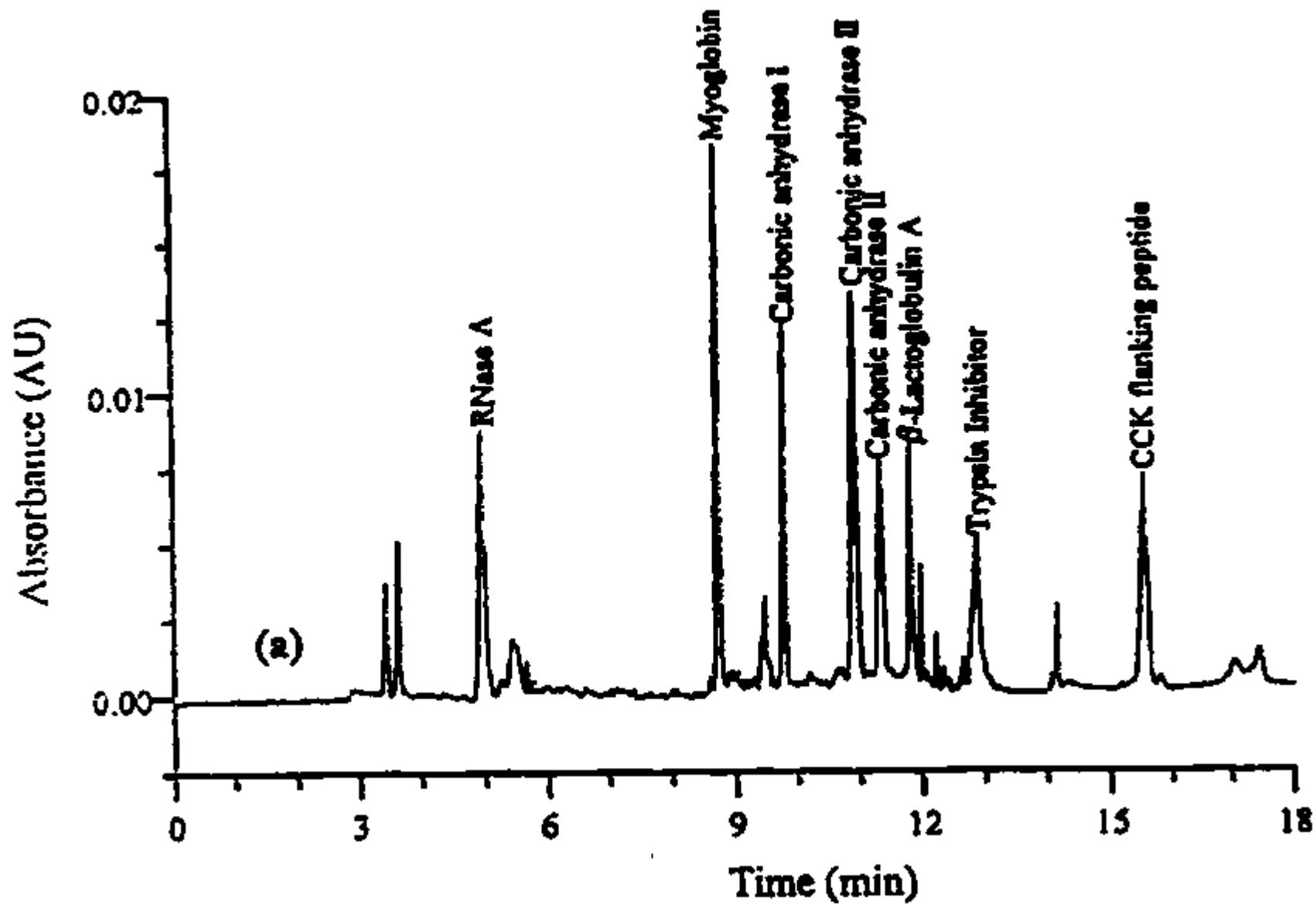


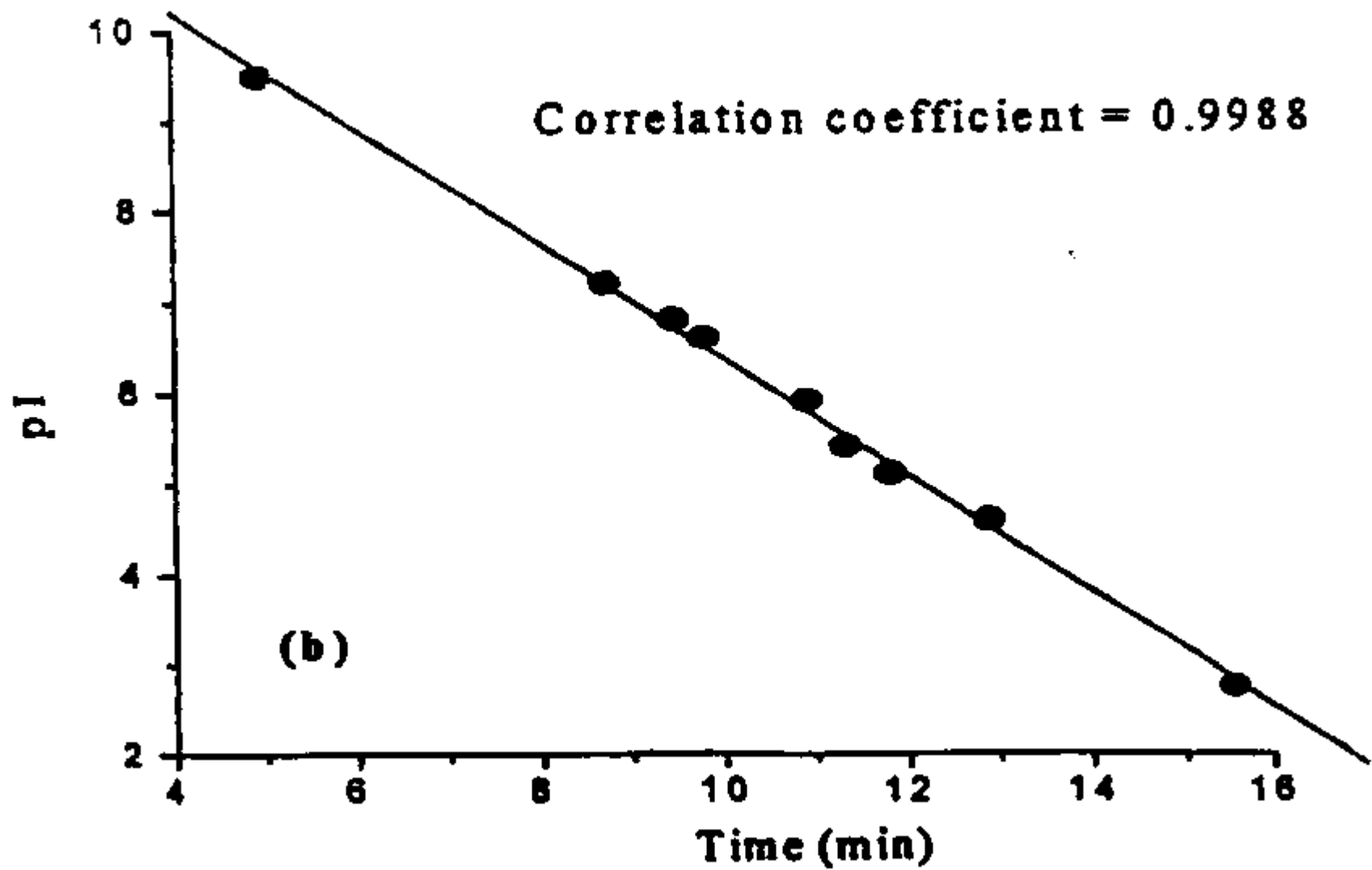


C) Focalização Isoelétrica Capilar (CIEF)

- Separação efetuada de acordo com o valor de ponto isoelétrico de (pI) de cada proteína
- Seletividade baseada no gradiente de pH imposto



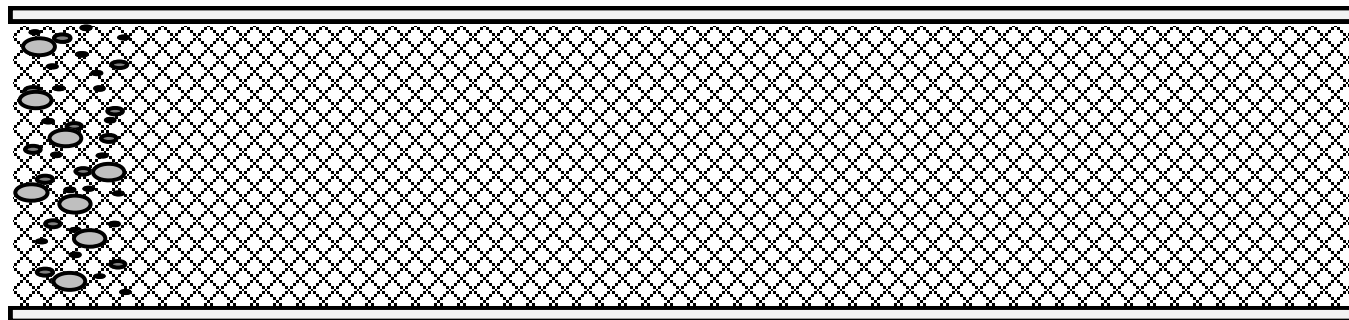




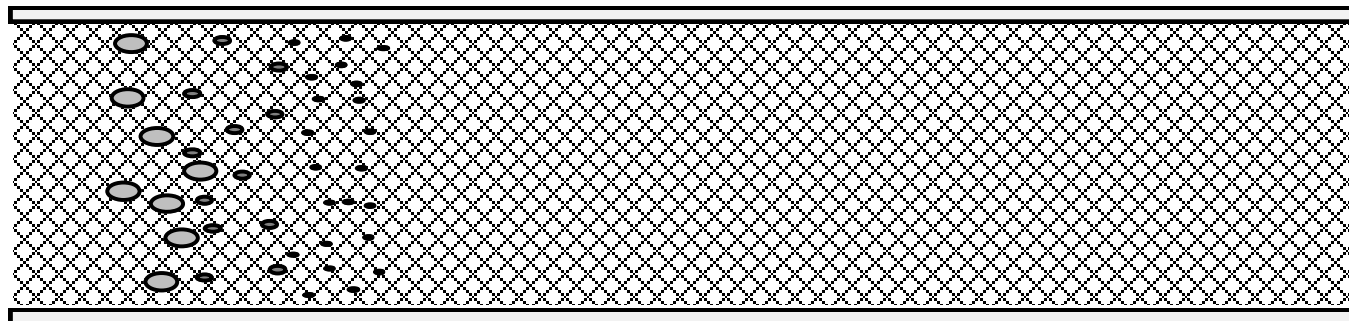
Métodos em Meio Polimérico

- Eletroforese Capilar com Gel (CGE)
- Eletroforese Capilar com Polímeros Enovelados (CEPS)

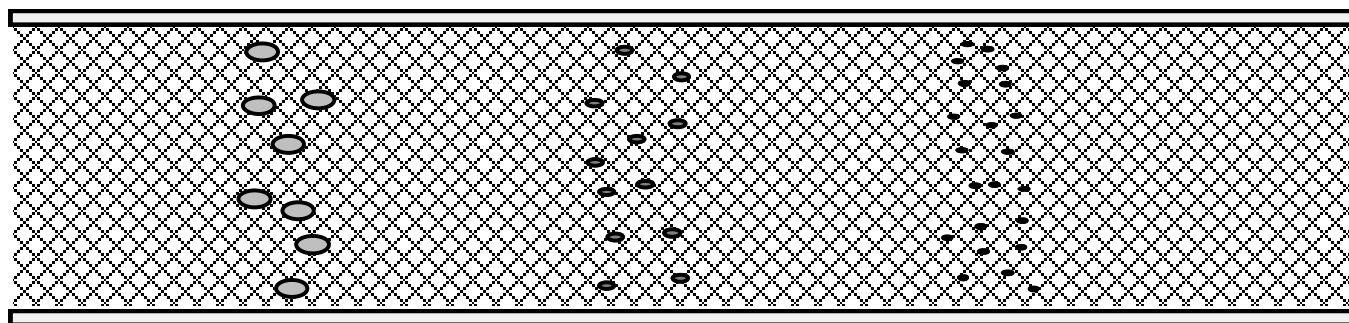
$$T = 0$$
$$E = 0$$



$$T_1 > 0$$
$$E > 0$$

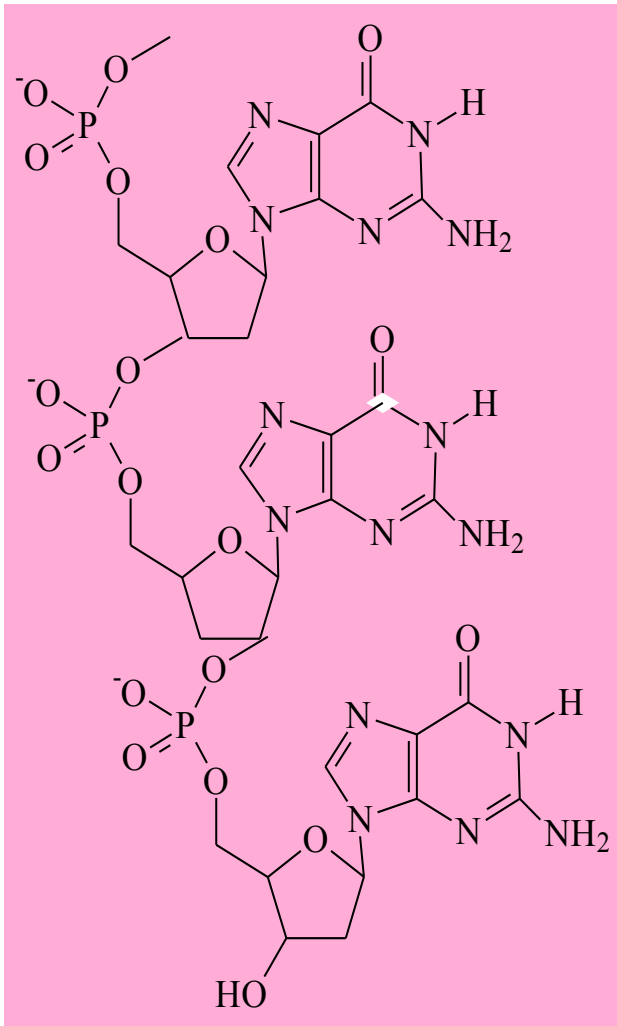


$$T_2 > T_1$$
$$E > 0$$



A) Eletroforese Capilar com Gel (CGE)

- Aplicação à classe de compostos que apresentam mesma razão q/m .
 - Proteínas desnaturadas com SDS (SDS-PAGE)
 - DNA



- Mecanismo de Separação em CZE

- $\mu_{\text{DNA}} \propto q/m$

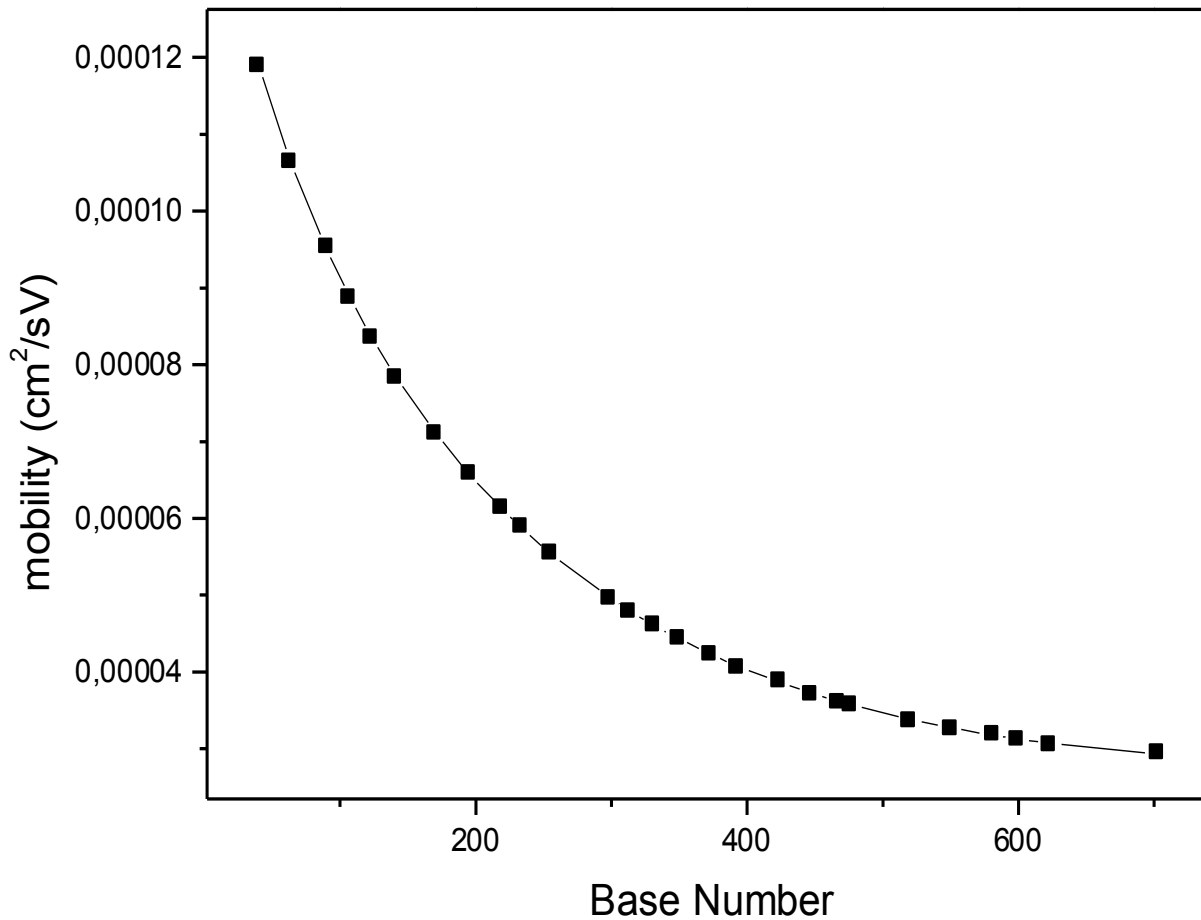
- $q/m = \text{cte} \Rightarrow \text{sem separação}$

- Mecanismo de Separação em CGE

- $\mu_{\text{DNA}} \propto 1/m$

Seletividade em CGE

$$\log u_{ep} = \log u_0 - K_R T$$



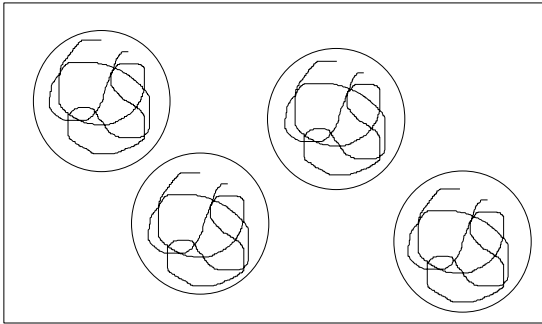
Eletofórese Capilar com Gel (CGE)

- Aplicação à classe de compostos que apresentam mesma razão q/m .
 - DNA
 - Proteínas desnaturadas com SDS
- Seletividade baseada no tamanho molecular dos compostos
- Ordem de migração proporcional ao tamanho

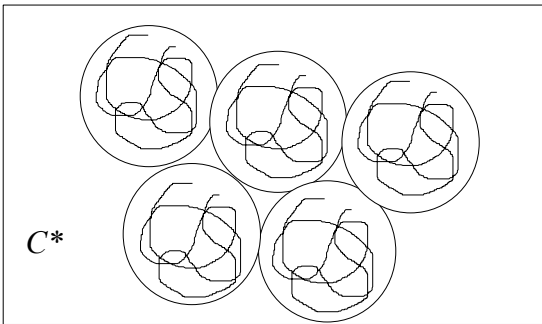
B) Eletroforese Capilar com Soluções Poliméricas (CEPS)

- Mesmos mecanismos que CGE
- Grande vantagem de poder renovar toda a matriz de separação
- Grande longevidade da coluna (>200 corridas)
- Existência do Limiar de Novelamento (C^*)

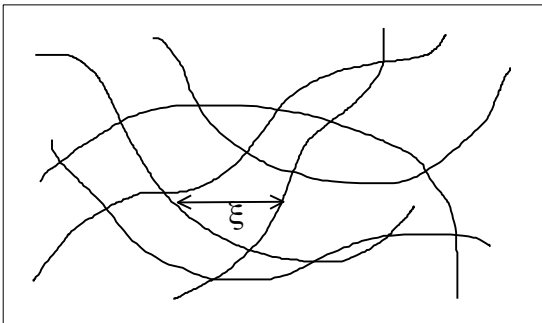
Dinâmica de Enovelamento do Polímero e da Formação do Poro em Função da Concentração do Polímero



A) $C < C^*$; representação de uma solução diluída

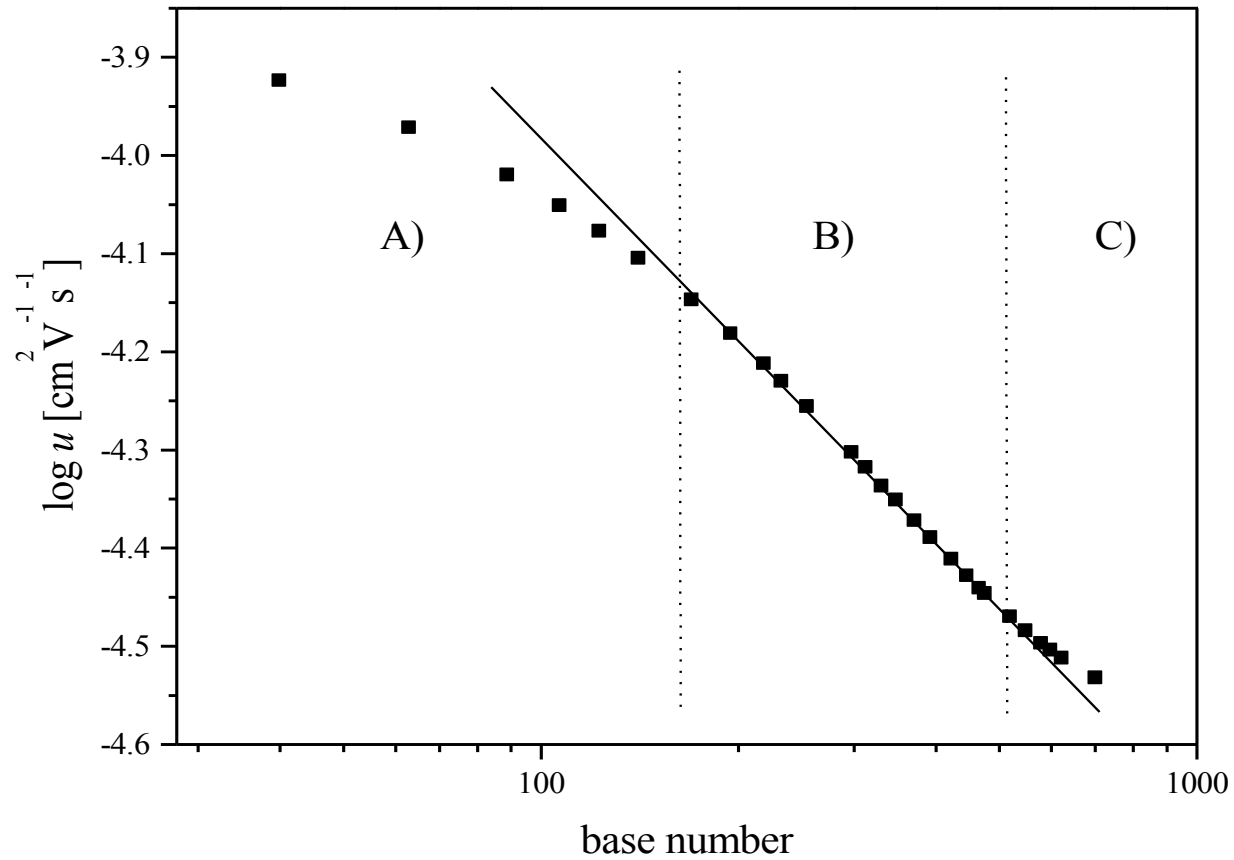


B) $C \approx C^*$, limiar de enovelamento



C) $C > C^*$, solução enovelada com tamanho médio do poro (ξ) mensurável

Seletividade em CEPS



Métodos Cromatográficos

- Cromatografia Eletrocínética Micelar (MEKC)
- Eletrocromatografia Capilar (CEC)

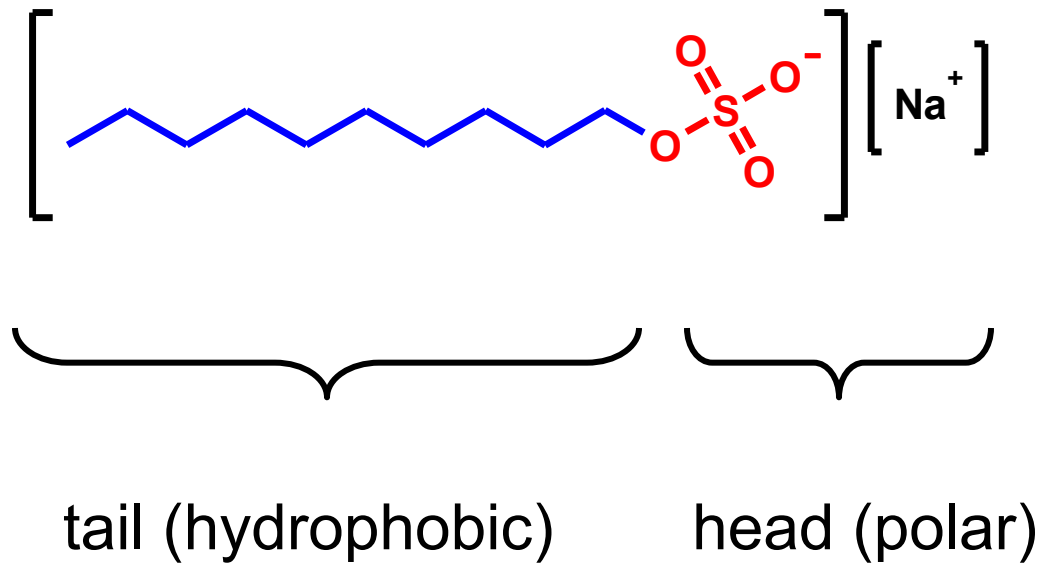
A) Cromatografia Eletrocínética Micelar (MEKC)

- Introduzida em 1984 por Terabe, foi um dos grandes avanços da eletroforese capilar.
- Permite a separação e análise de compostos neutros e hidrofóbicos por um processo verdadeiramente cromatográfico.

- **Micela:** Surfactantes em soluções diluídas, agem como surfactantes, em soluções concentradas acima de um certo valor crítico (cmc) os surfactantes se ordenam em micelas.
- **Concentração Micelar Crítica (cmc):** Valor Característico de cada surfactante para se agregar na micela
⇒ Para SDS, cmc ~ 8 mM

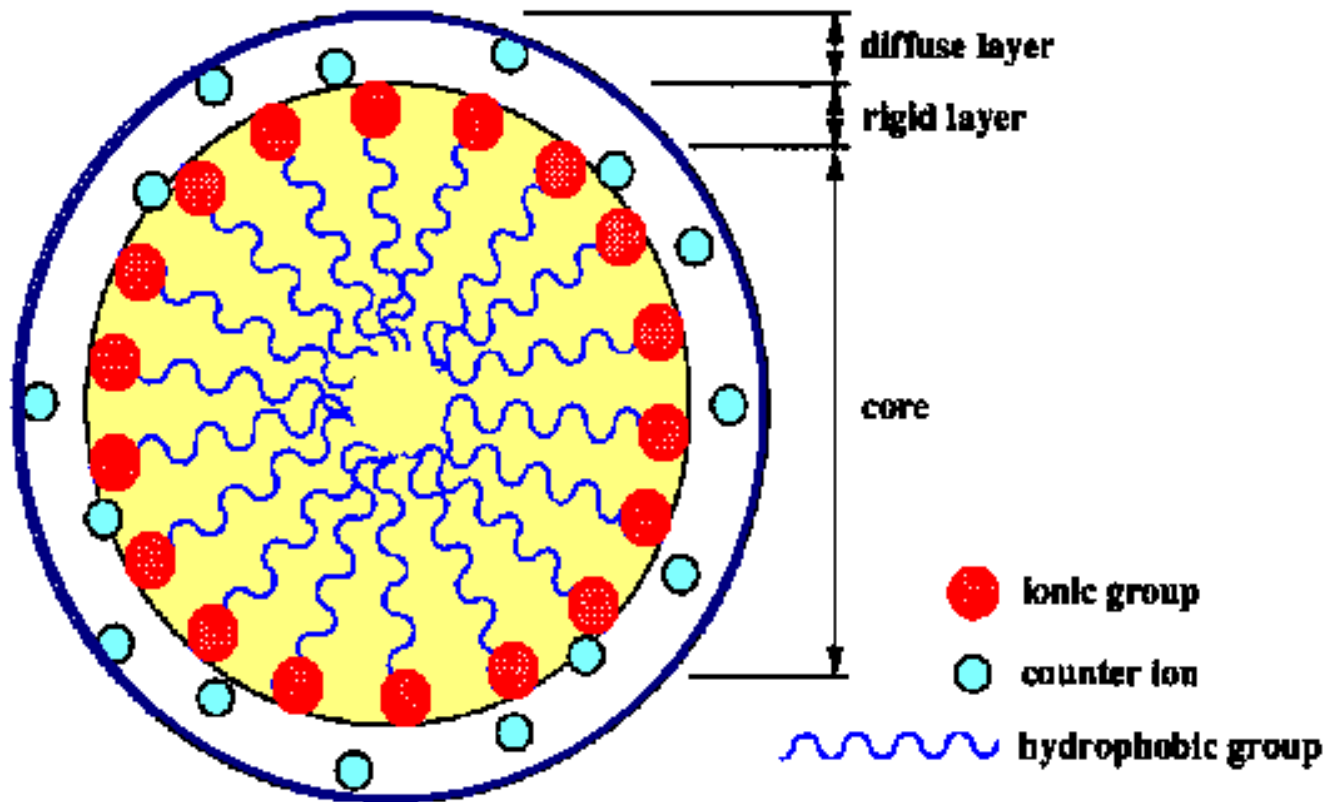
Micellar Electrokinetic Chromatography

- Surfactants
 - Ionic
 - Cationic
 - Anionic
 - Non Ionic

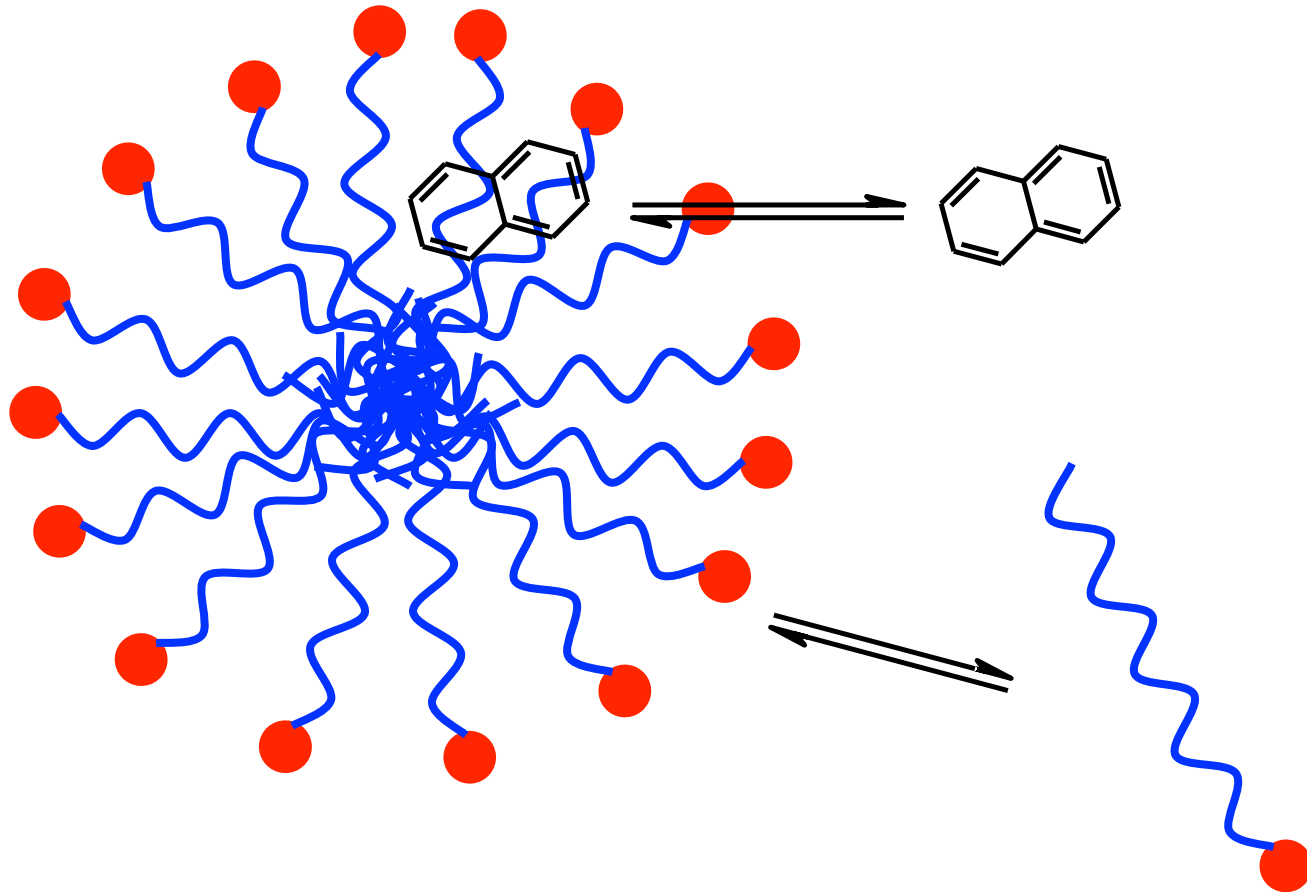


Critical Micelle Concentration

CMC



Separation Mechanism: Partition



Detergente	CMC [mM]	# molec.
<i>Aniônicos</i>		
Ác. Cólico	14	2-4
Ác. Glicólico	13	2
Sulfato sódico de dodecila	8	62
<i>Catiônicos</i>		
Cloreto de cetiltrimetil amônio	1	71
Brometo dodeciltrimetil amônio	14	50
<i>Zwiteriônicos</i>		
CHAPS	8	10
CHPSO	8	11
<i>Não-Iônicos</i>		
n-decil- β -D- glucopiranosídeo	2,2	
Triton X-100	0,24	140

- **Partição:** O soluto, na maioria dos casos, neutros, particionará entre a solução aquosa e o interior hidrofóbico do micela

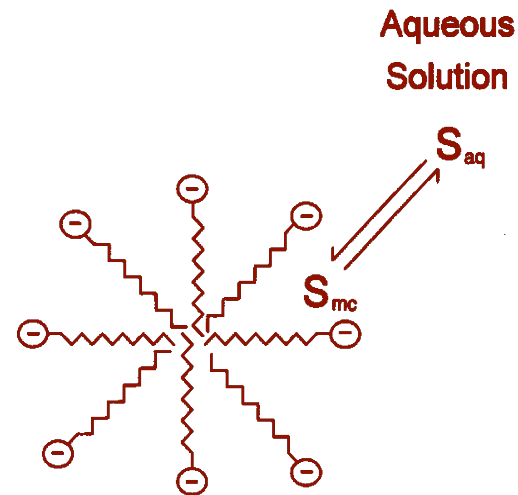
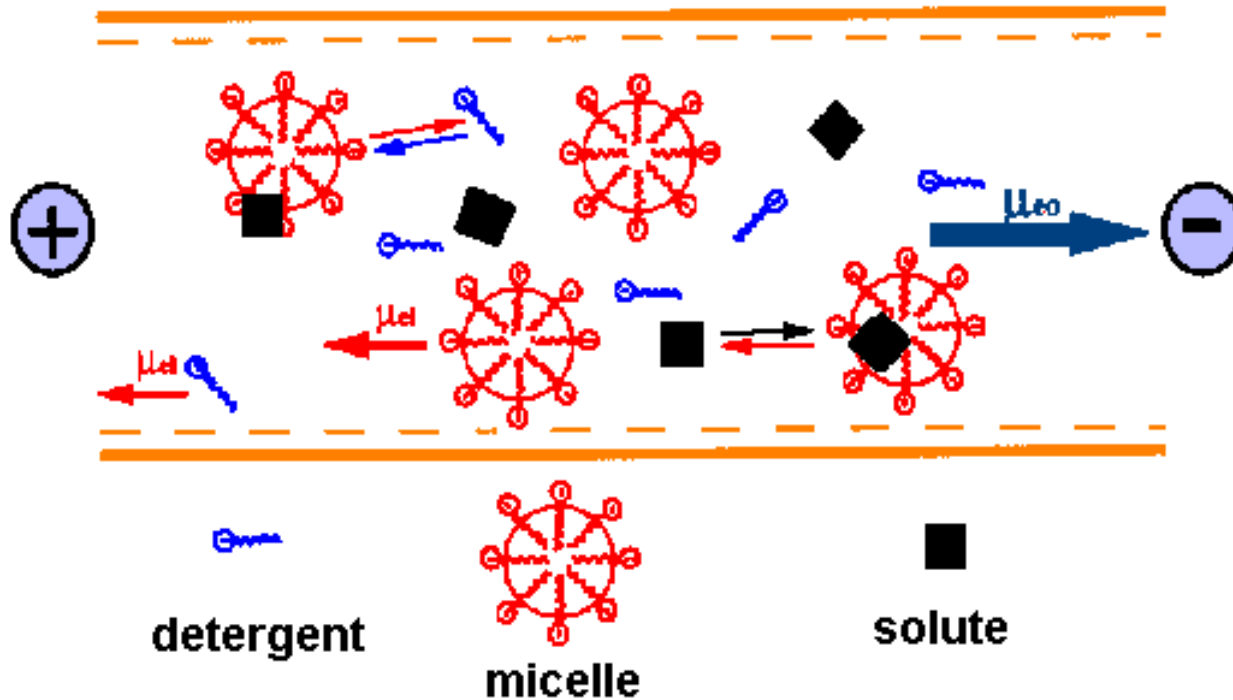


Fig. 3.4. A solute partitioning between an SDS micelle and an aqueous solution. S_{aq} represents the solute in solution and S_{mc} the solute in the micelle. The amount of time a solute spends in the micelle is proportional to its hydrophobicity. The aggregation number for an SDS micelle is 62, but for clarity, the micelle is drawn with only eight SDS molecules.

- **Processo Geral de Separação:**
 - SDS é adicionado ao tampão ($6 < \text{pH} < 10$) acima de sua CMC. A micela migra em direção oposta ao EOF.
 - Os solutos, particionados entre o tampão e a micela, migrarão na mesma proporção do particionamento

Separation Equilibrium



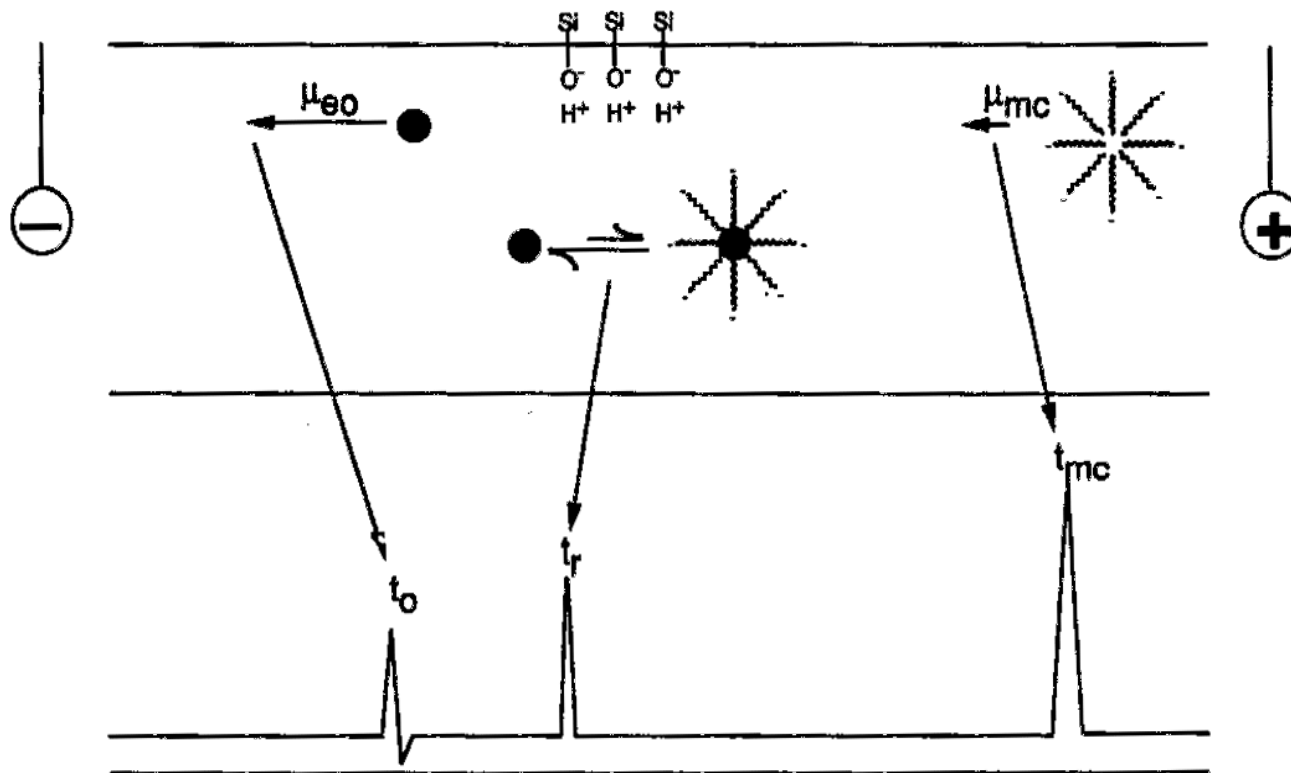


FIGURE 2. Illustration of the MEKC process.

Tipicamente:

- $\mu_{eo} = 5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
- $\mu_{mc} = -4 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
- $\mu_{ap} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$

Se: $E = 300 \text{ V cm}^{-1}$ e $L = 50 \text{ cm}$, a janela de migração abrangeria de $t_o = 5,6 \text{ min}$ a $t_{mc} = 28 \text{ min}$.

Ordem de Eluição

- Compostos altamente hidrofílicos: $t_i = t_{eo}$
- Compostos altamente hidrofóbicos: $t_i = t_{mc}$
- Compostos intermediários: $t_{eo} < t_i < t_{mc}$

Parâmetros de Retenção em MEKC

A) Fator de Capacidade: A migração/retenção de um composto neutro será dada pelo fator de capacidade k'

$$k' = \frac{n_{mc}}{n_{aq}} = \frac{\text{no. moles de soluto na micela}}{\text{no. moles de soluto na fase aquosa}}$$

Experimentalmente:

$$k' = \frac{t_i - t_{eo}}{t_{eo} (1 - t_i / t_{mc})}$$

$$0 < k' < \infty$$

- **Uso de modificadores orgânicos:**

Reduz particionamento

Reduz interações hidrofóbicas

Aumenta a solubilidade de compostos hidrofóbicos

Modificadores: Metanol

Acetonitrila

Isopropanol

Ciclodextrina

(cavidade hidrofóbica)

B) Eficiência:

Em condições normais, $N > 100.000$, somente limitado pela difusão

Em condições menos ideais, efeito Joule pode contribuir para o alargamento da banda.

A cinética de transferência de massa micela/solução pode diminuir a eficiência

Interações iônicas

C) Seletividade (α): Mede a afinidade relativa de dois solutos pela micela.

$$\alpha = \frac{k_2'}{k_1'}$$

- **Fatores que afetam a seletividade:**

- Surfactantes: a cadeia alifática

- o núcleo polar

- interações diferenciadas com compostos ionizáveis

- **Fatores que afetam a seletividade:**

- pH : muito importante em CE, é normalmente imprevisível em MEKC - pH \geq 6,0 p/ obter EOF estável ionização dos analitos

- Tipo de Tampão: caso típico p/ borato um complexo aniônico particiona menos do que um soluto não complexado.

- Temperatura: grande efeito: solubilidade

equilíbrio

cinética

D) Resolução:

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

eficiência

seletividade

capacidade

janela de retenção

B) Eletrocromatografia Capilar (CEC)

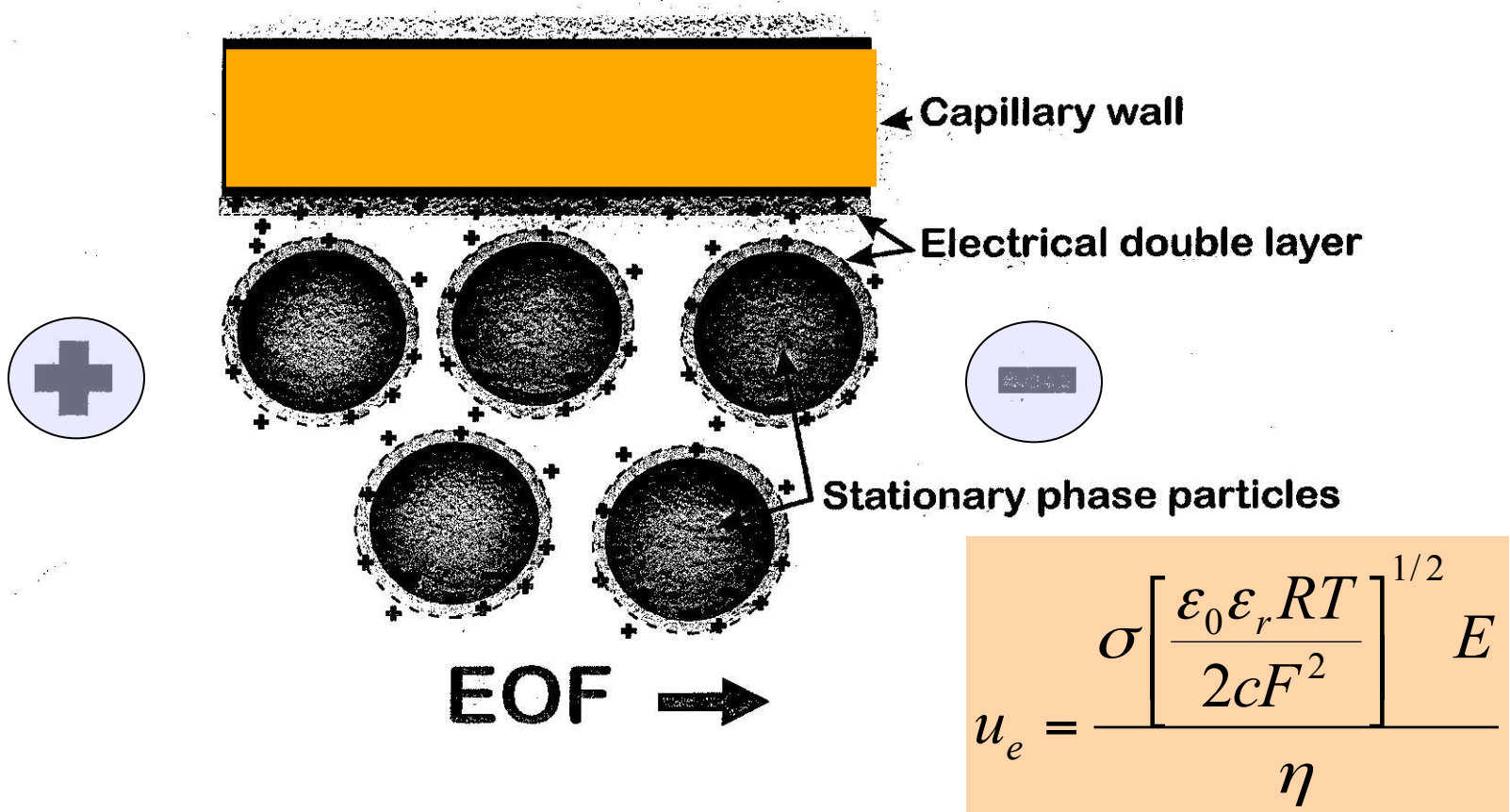
- Colunas capilares de CE preenchidas com fases de HPLC
- Fluxo movido por EOF e não bombas de pressão
- Uso de fases móveis de HPLC tamponadas
- Mecanismo de separação primariamente cromatográfico (fase reversa)

Vantagens da CEC

- Separação de compostos similares
- Instrumentação única CE e CEC
- Separação de compostos neutros e hidrofóbicos
- Compatibilidade com MS
- $N > \text{HPLC}$; α melhor que em CE
- Baixo consumo de solventes

Origem do EOF em CEC

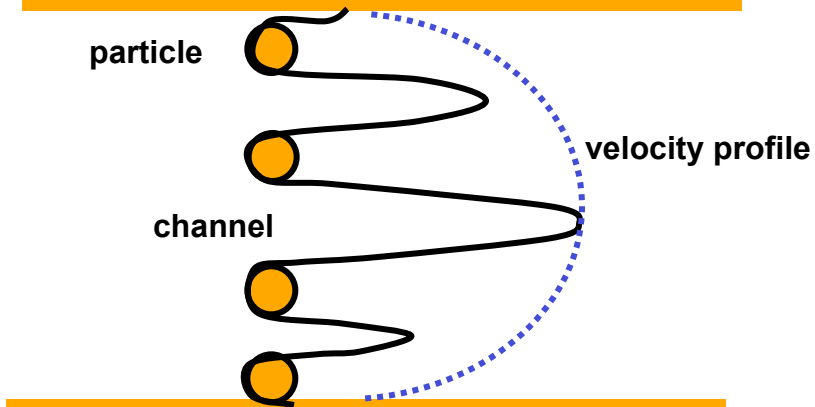
- Parede do tubo de sílica fundida
- Superfície das partículas de sílica



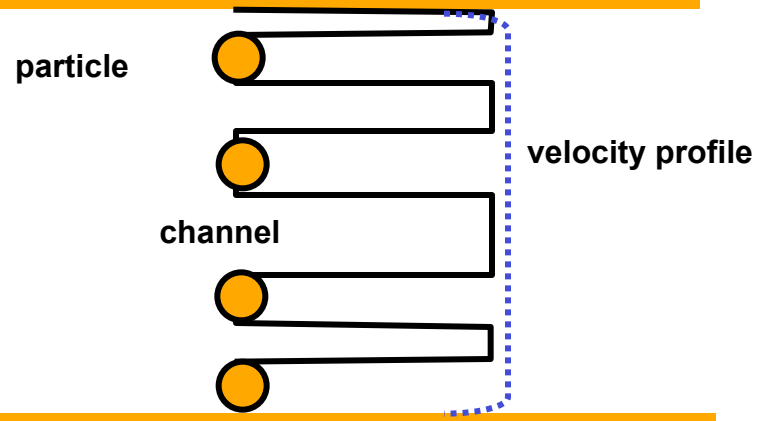
Dispersão em CEC

- Perfil plano de fluxo

pressure drive



electroosmotic drive



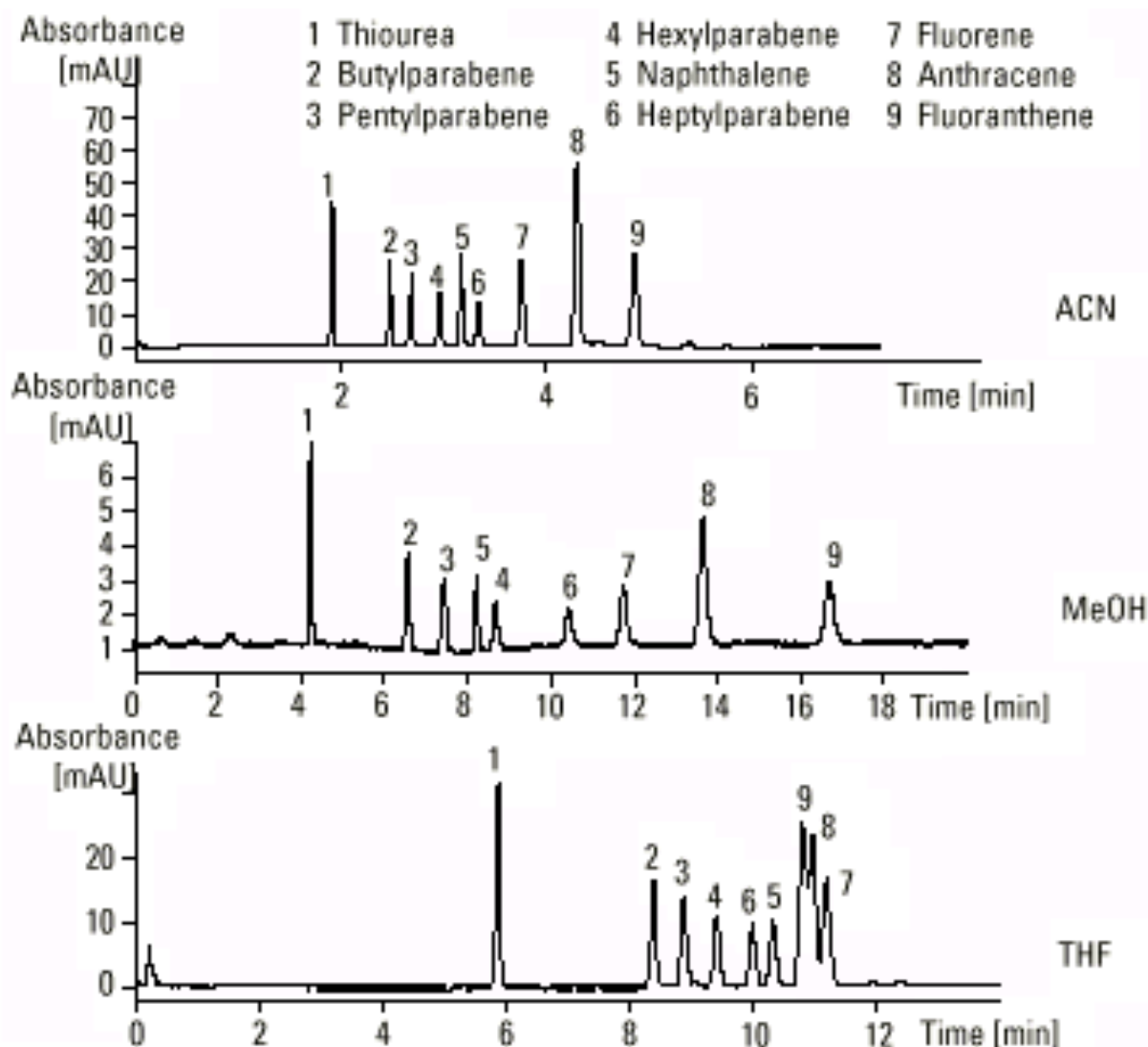


Figure 2
Effect of organic modifier of EOF, retention and selectivity in CEC

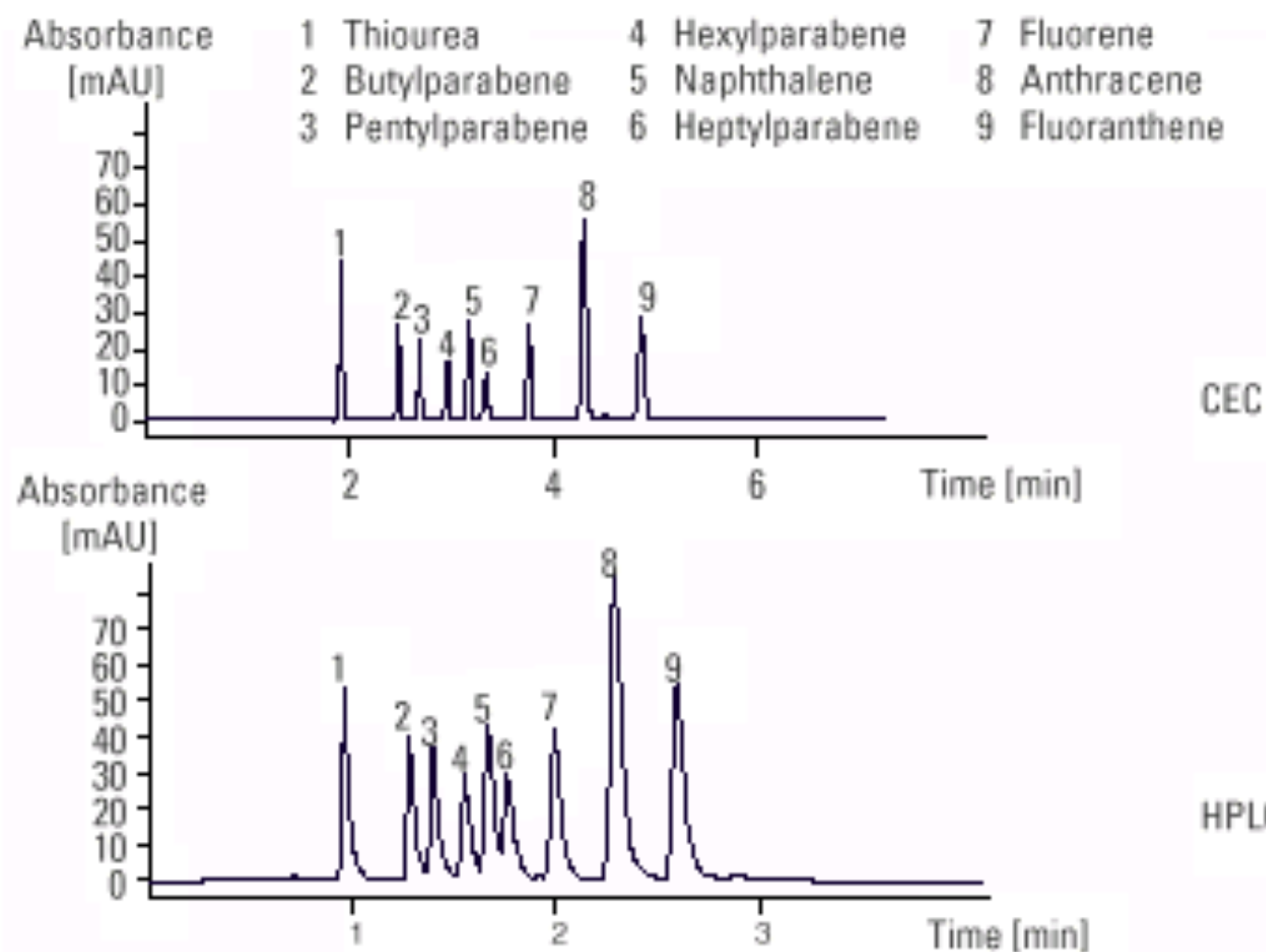
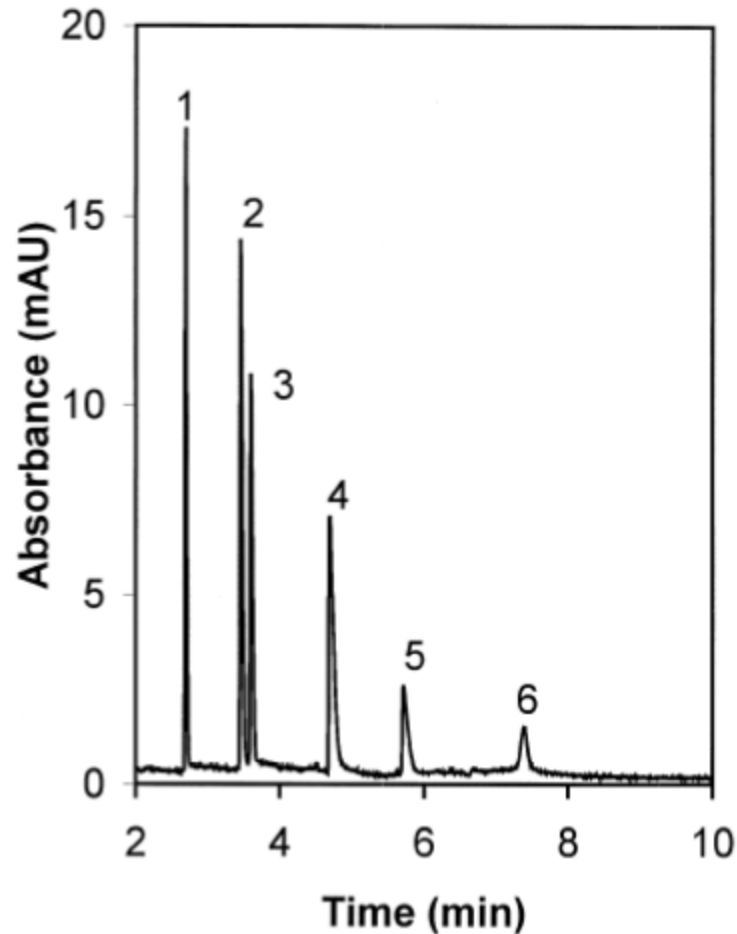


Figure 3
Analysis of test mixture by HPLC and by CEC

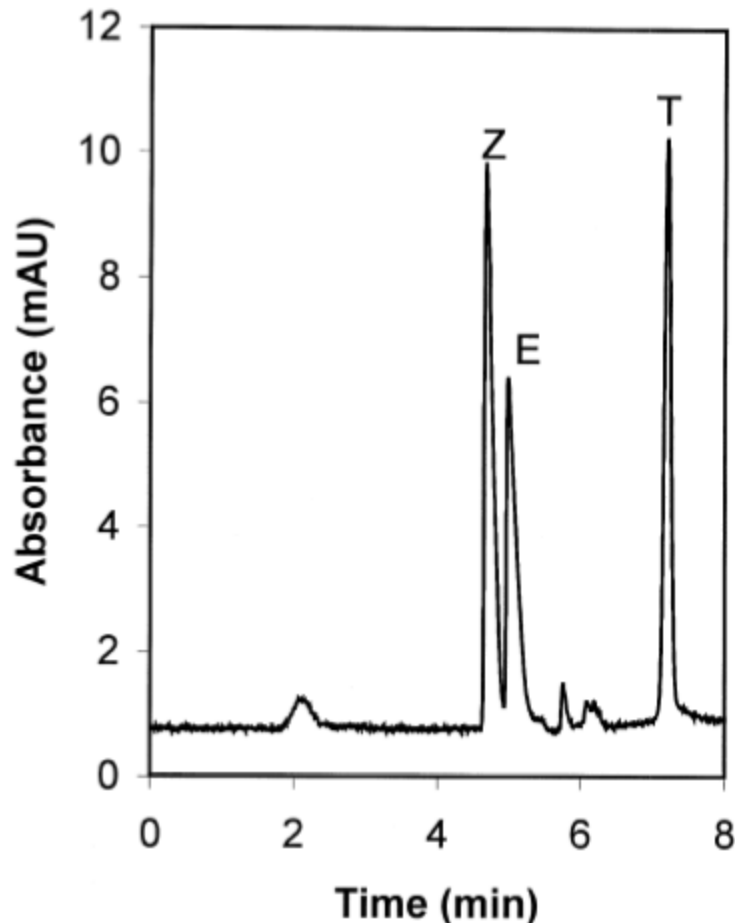
CEC of Basic Drugs



Peak denotation:

- (1) methylamphetamine;
- (2) lidocaine;
- (3) propranolol;
- (4) prometazine;
- (5) oxyphenonium;
- (6) thiourea.

CEC of Isomers



Mobile phase:

acetonitrile – 25 mM phosphate buffer (pH 2.5) (60:40, v/ v);

Column: Spherisorb ODS I;

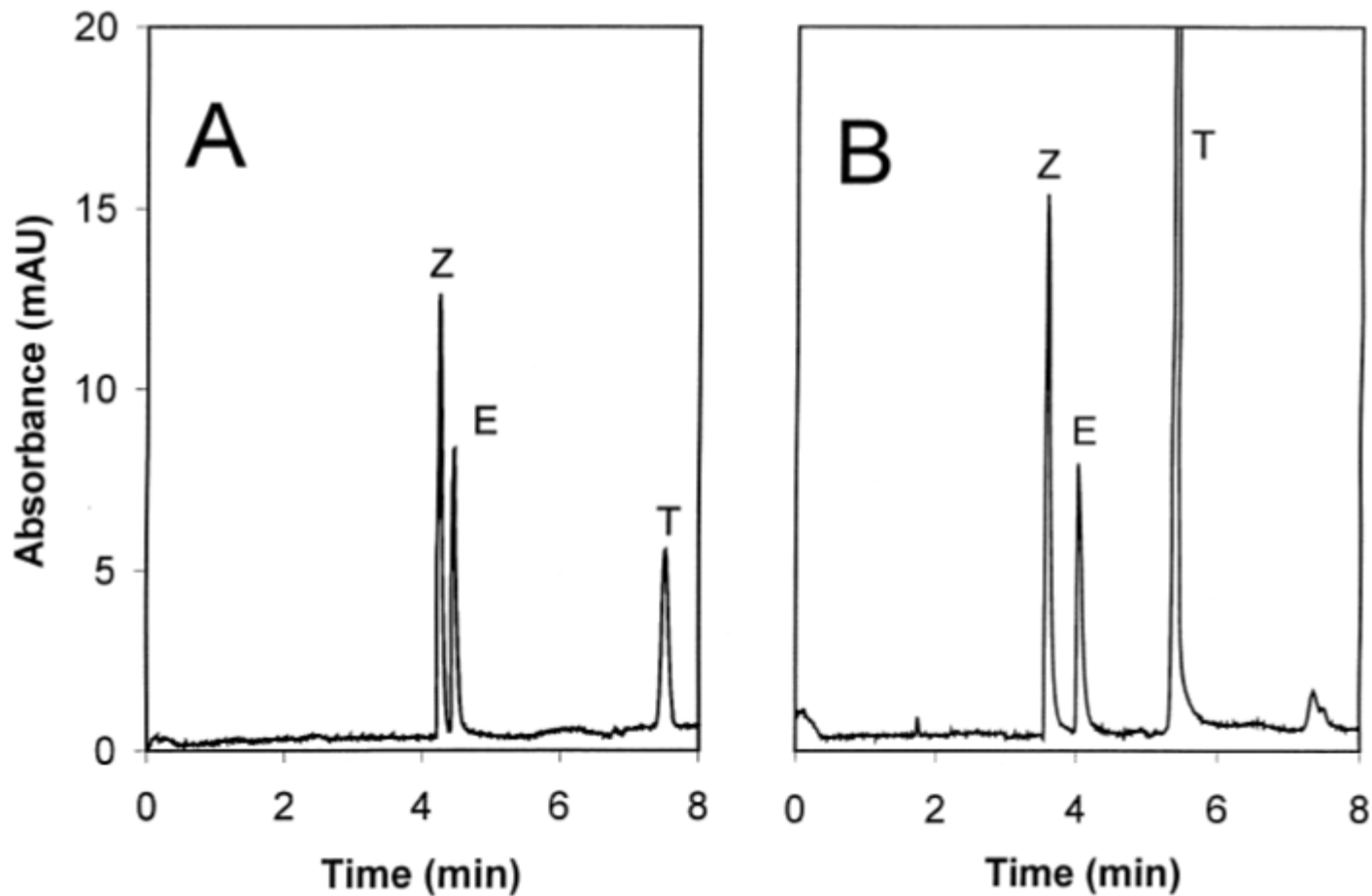
Injection time: 3 s.

Peak denotation:

E, fluvoxamine;

Z, Z-isomer of fluvoxamine;

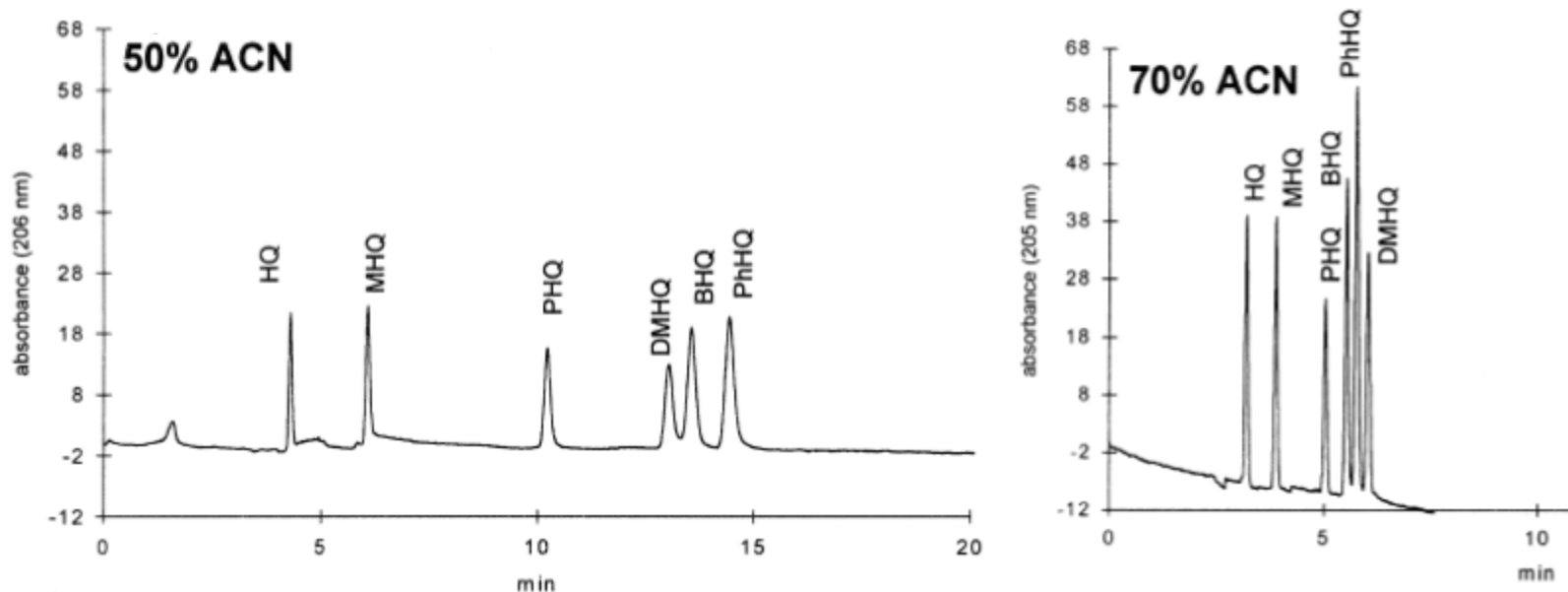
T, thiourea.



Mobile phase: acetonitrile–25 mM phosphate buffer (pH 2.5) (60:40, v/ v) containing 6 mM hexylamine;

Column: 33 cm(25 cm) × 100 μm i.d. (A) 3 μm Spherisorb ODS I or (B) 3 μm Hypersil ODS

Separation of Hydroquinone (HQ) and Derivatives



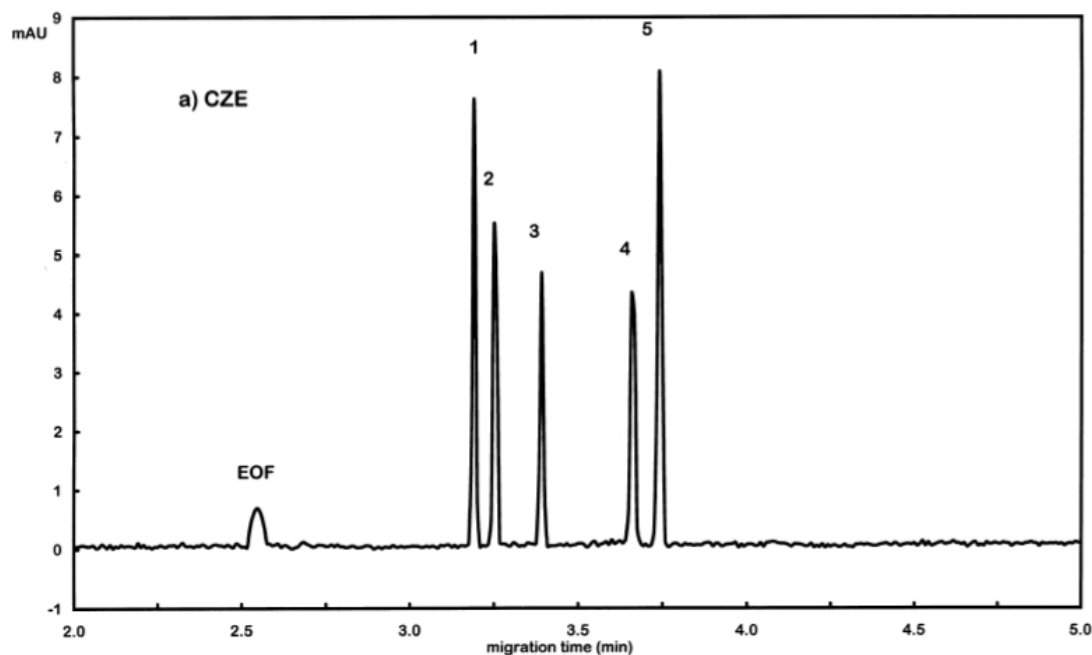
Mobile phase: 20 mM ammonium acetate/acetonitrile (ACN, 50–70% v/v); applied voltage 25 kV, 2.5–4.1 μ A and assisted pressure (both ends of the capillary) 5 bar.

(MHQ) methyl hydroquinone; (PHQ) propylhydroquinone;
(BHQ) benzylhydroquinone; (PhHQ) phenylhydroquinone and
(DMHQ) dimethylhydroquinone

Capillary Electrophoresis or HPLC?

- Separation efficiency;
- Detection sensitivity;
- Sample preparation and matrix effect;
- Selectivity options;
- Method validation;

Systematic Evaluation of CE in Toxicological Analysis



Peak denotation:

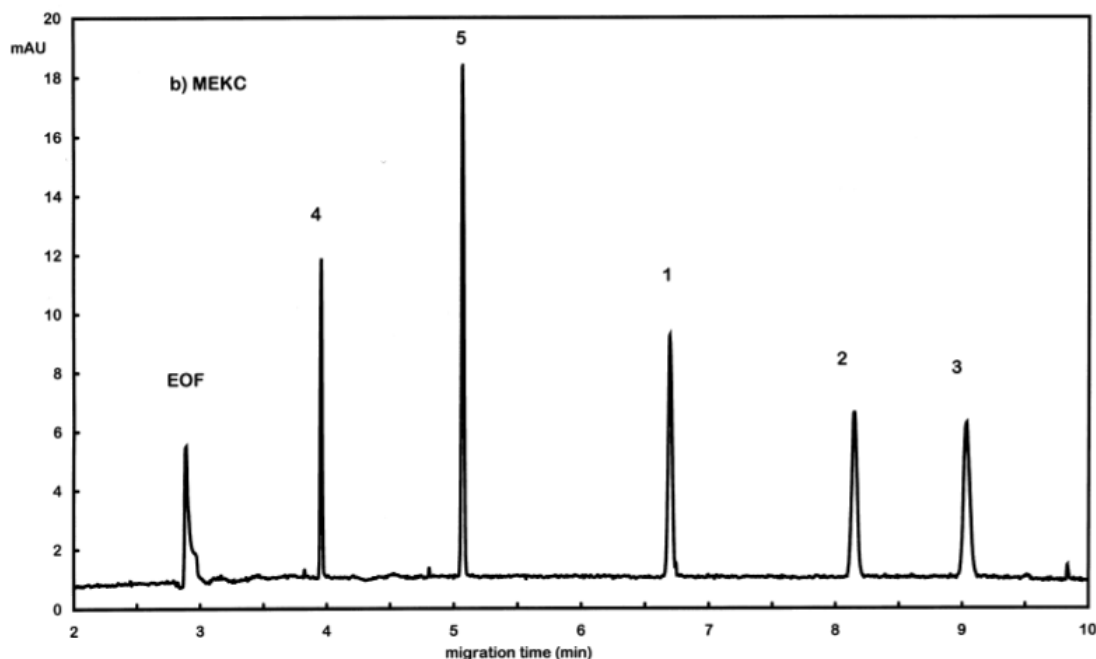
- (1) hexobarbital;
- (2) methohexital;
- (3) secobarbital;
- (4) barbital;
- (5) henobarbital.

Column: bare fused silica capillaries 57 cm (50 cm) × 50 μm i.d. Samples injected for 4 s (pressure 35 mbar). Voltage of 30 kV/20 μA (normal polarity).

DAD at 200 nm, and 25°C.

Buffer: 90 mM sodium borate, pH 8.4

Systematic Evaluation of CE in Toxicological Analysis



Peak denotation:

- (1) hexobarbital;
- (2) methohexital;
- (3) secobarbital;
- (4) barbital;
- (5) henobarbital.

Column: bare fused silica capillaries 57 cm (50 cm) × 50 μm i.d. Samples injected for 4 s (pressure 35 mbar). Voltage of 30 kV/60 μA (normal polarity). DAD at 200 nm, and 25°C.

Buffer: 50 mM SDS in 20 mM Na₂HPO₄, pH 7.5.

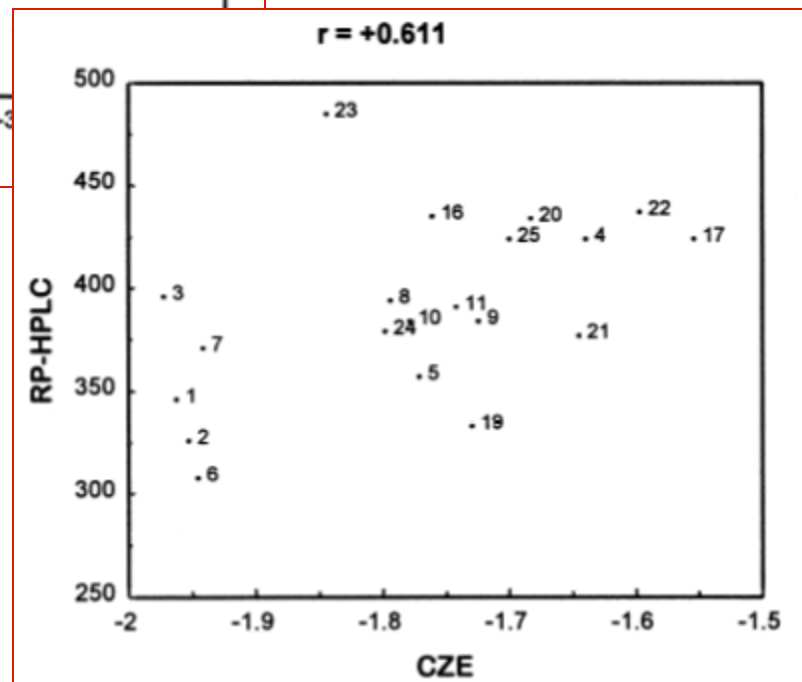
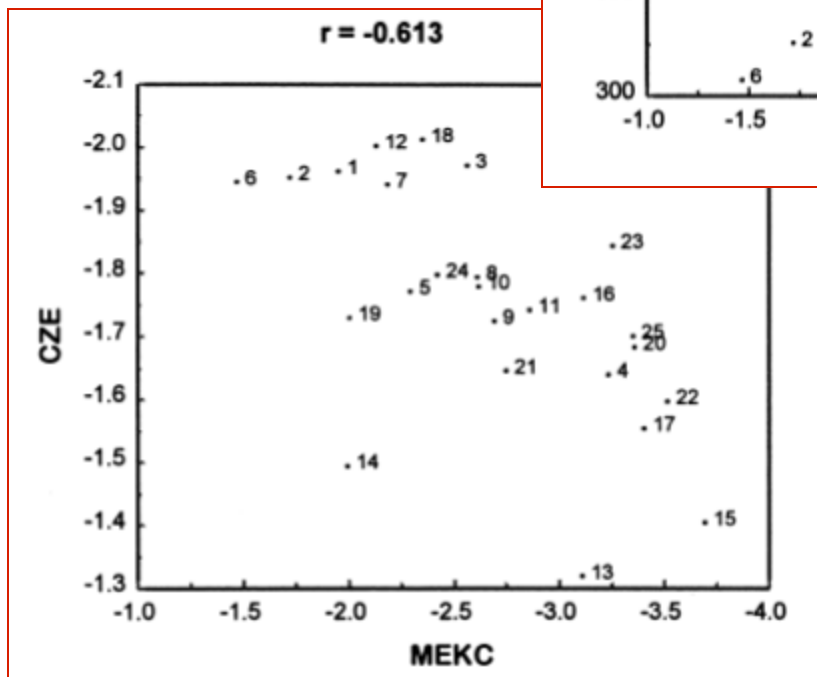
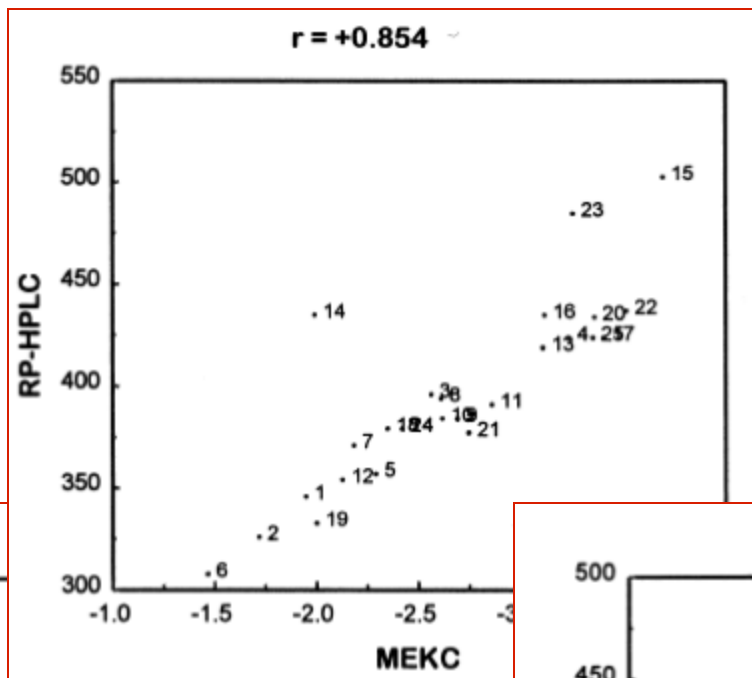
Average values of five identification parameters and their RSDs (%) for the analysis of 20 barbiturates using **CZE** (n = 5): t_m (migration time, min), t^{rel} (relative migration time to secobarbital), t^{ratio} (migration time ratio), μ_{eff} (effective mobility, $\cdot 10^{-8}$ m²/ V s), and μ_{eff}^c (corrected effective mobility, $\cdot 10^{-8}$ m²/ V s).

Barbiturate	t_m (min)	RSD (%)	t_m^{rel} value	RSD (%)	t_m^{ratio} value	RSD (%)	μ_{eff} (10^{-8} m ² / V s)	RSD (%)	μ_{eff}^c (10^{-8} m ² / V s)	RSD (%)
Allobarbitol	4.13	7.8	1.08	1.2	1.51	3.0	-1.961	1.1	-1.962	0.8
Allylethylbarbituric acid	4.15	8.1	1.07	3.6	1.51	2.9	-1.955	0.8	-1.952	0.8
Allylphenylbarbituric acid	4.19	9.1	1.09	2.9	1.52	3.3	-1.965	4.2	-1.972	1.0
Amobarbital	3.81	6.7	1.00	1.5	1.40	2.2	-1.639	1.2	-1.639	0.3
Aprobarbital	3.96	7.6	1.03	1.7	1.44	2.7	-1.772	1.5	-1.771	0.6
Brallobarbitol	4.22	4.0	1.09	6.2	1.52	1.6	-1.950	0.8	-1.941	0.5
Butalbital	4.00	6.7	1.04	2.0	1.45	2.3	-1.795	0.9	-1.794	0.9
Butobarbital	3.93	7.1	1.02	2.7	1.43	2.4	-1.723	1.1	-1.724	0.3
Cyclobarbitol	4.00	6.7	1.04	2.2	1.45	2.3	-1.780	0.9	-1.778	0.8
Cyclopentobarbital	3.94	6.1	1.03	2.9	1.43	2.1	-1.742	1.1	-1.742	0.4
Heptobarbital	4.18	7.2	1.10	1.6	1.52	2.8	-1.984	1.0	-2.002	0.5
Metharbital	3.74	6.6	0.99	2.1	1.36	2.1	-1.503	1.6	-1.494	0.7
Methylphenobarbital	3.94	6.1	1.02	4.2	1.44	2.2	-1.768	1.2	-1.760	0.7
Pentobarbital	3.78	7.3	0.98	2.6	1.37	2.3	-1.560	1.4	-1.553	0.5
Probarbital	3.90	6.3	1.02	4.2	1.43	2.2	-1.735	1.1	-1.729	0.3
Reposal	3.94	4.1	1.04	3.7	1.42	1.5	-1.687	0.9	-1.683	0.8
Secbutobarbital	3.82	6.1	1.00	2.0	1.40	2.0	-1.645	1.2	-1.645	0.6
Thiopental	4.14	6.4	1.08	5.5	1.48	2.3	-1.850	1.1	-1.844	0.7
Vinbarbital	4.10	5.0	1.08	2.9	1.47	1.7	-1.803	0.8	-1.798	0.8
Vinylbital	4.02	5.1	1.05	5.7	1.43	1.7	-1.704	0.8	-1.700	0.7
RSD range		4.0–9.1		1.2–6.2		1.5–3.3		0.8–1.6		0.3–1.0
RSD average		6.5		3.1		2.3		1.1		0.6

Average values of five identification parameters and their RSDs (%) for the analysis of 20 barbiturates using **MEKC** (n=5, except *n=4): t_m (migration time, min), t^{rel} (relative migration time to hexobarbital), t^{ratio} (migration time ratio), μ_{eff} (effective mobility, $\cdot 10^{-8}$ m²/V s), and μ_{eff}^c (corrected effective mobility, $\cdot 10^{-8}$ m²/V s).

Barbiturate	t_m (min)	RSD (%)	t_m^{rel} value	RSD (%)	t_m^{ratio} value	RSD (%)	μ_{eff} (10^{-8} m ² /V s)	RSD (%)	μ_{eff}^c (10^{-8} m ² /V s)	RSD (%)
Allobarbital	4.87	11.8	0.68	6.0	1.59	4.5	-1.928	0.4	-1.951	0.6
Allylethylbarbituric acid	4.48	5.3	0.63	5.3	1.48	1.7	-1.696	0.3	-1.721	0.5
Allylphenylbarbituric acid*	5.90	7.5	0.83	6.1	1.95	3.8	-2.540	0.6	-2.564	0.2
Amobarbital	8.01	16.7	1.13	10.0	2.64	10.8	-3.205	0.9	-3.236	0.4
Aprobarbital	5.38	7.1	0.76	4.8	1.77	3.0	-2.275	0.5	-2.293	0.7
Brallobarbital	5.07	6.7	0.65	10.7	1.69	2.9	-2.169	0.5	-2.184	0.4
Butalbital*	6.10	9.8	0.81	6.1	2.00	5.2	-2.591	0.6	-2.612	0.4
Butobarbital*	6.30	10.2	0.84	4.6	2.06	4.3	-2.671	0.9	-2.692	0.4
Cyclobarbital*	6.09	9.5	0.81	3.5	2.00	5.0	-2.598	0.5	-2.618	0.3
Cyclopentobarbital*	6.73	10.3	0.90	3.0	2.21	5.9	-2.837	0.5	-2.861	0.4
Heptobarbital	5.11	5.0	0.65	8.5	1.68	1.9	-2.114	0.4	-2.131	0.4
Metharbital	4.85	4.9	0.62	9.1	1.61	1.6	-1.976	0.9	-1.995	0.9
Methylphenobarbital	7.46	9.2	0.95	5.9	2.46	6.2	-3.099	1.4	-3.119	1.3
Pentobarbital	8.77	9.6	1.12	4.4	2.87	6.4	-3.378	0.2	-3.406	0.2
Probarbital	4.87	5.0	0.62	9.0	1.61	1.8	-1.984	0.6	-2.003	0.6
Reposal	8.17	9.1	1.05	9.9	2.72	6.1	-3.334	0.5	-3.361	0.2
Secbutobarbital*	6.43	9.9	0.86	3.3	2.11	5.7	-2.727	1.1	-2.749	0.6
Thiopental	7.74	7.9	0.99	9.5	2.58	5.1	-3.234	0.6	-3.257	0.4
Vinbarbital	5.51	6.3	0.70	10.6	1.84	2.9	-2.407	0.2	-2.421	0.3
Vinylbital	8.16	9.5	1.04	9.3	2.71	6.2	-3.324	0.5	-3.353	0.2
RSD range		4.9–16.7		3.0–10.7		1.6–10.8		0.2–1.4		0.2–1.3
RSD average		8.6		6.8		4.5		0.5		0.5

Correlation between techniques



Validation of CE Methods

