

Marina F. M. Tavares

Instituto de Química - Universidade de São Paulo - CP 26077 - 05599-970 - São Paulo - SP

Recebido em 19/4/95; aceito em 26/10/95

CAPILLARY ELECTROPHORESIS: BASIC CONCEPTS. Over the past fifteen years, capillary electrophoresis has emerged as a very resourceful alternative method for the separation of a variety of solutes of industrial, clinical, biomedical and environmental importance. Relevant aspects of the technique such as high efficiency, high resolving power, high speed, full automation, and a diversity of injection and detection schemes have been extensively investigated. In this work, an overview of the basic principles underlying electrophoretic and electroosmotic migrations as well as the instrumental aspects of the technique have been thoroughly reviewed.

Keywords: capillary electrophoresis; electroosmotic flow; mobility.

INTRODUÇÃO

Eletroforese é uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de compostos iônicos ou ionizáveis, em um campo elétrico.^{1,2} Vários modos de separação, com mecanismos singulares e seletividade característica, são possíveis: fronteira móvel, zona, isotacoforese e focalização isoeletrica. A figura 1 apresenta, esquematicamente, a separação progressiva de dois solutos pelos quatro modos da eletroforese.

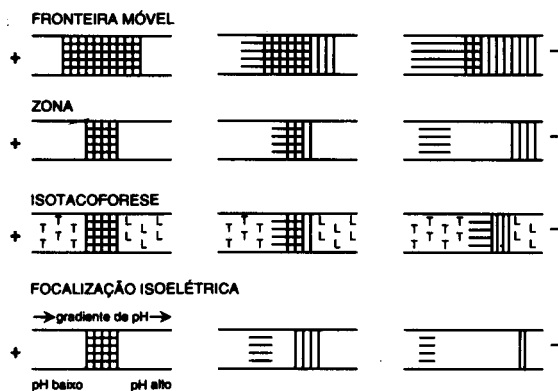


Figura 1. Seqüência de eventos na separação de dois solutos pelos quatro modos da eletroforese.

Na eletroforese por fronteira móvel, uma quantidade apreciável de amostra é colocada em um tubo, preenchido com solução tampão. Após o estabelecimento do campo elétrico, os componentes da amostra migram em uma dada direção, e com uma velocidade característica, dependente da mobilidade do componente. A separação completa de todos os componentes da amostra nunca é atingida. Apenas os componentes de maior mobilidade podem ser parcialmente purificados, enquanto que as outras bandas sofrem diversos graus de sobreposição.

A eletroforese de zona, em princípio, é também uma técnica de fronteira móvel, em que a amostra é introduzida no meio tamponado, como uma banda de pequena espessura. Quando o potencial é aplicado, cada zona migra independentemente, com velocidade constante mas diferenciada, característica de sua própria mobilidade. As modalidades da eletroforese em solução livre, gel e micelar pertencem a essa categoria.

Em isotacoforese, a amostra é inserida entre duas soluções, o eletrólito "líder" e o eletrólito "terminador". Ambos, cátions e ânions, podem ser analisados por este modo, entretanto em misturas distintas. A figura 1 ilustra a separação isotacoforética de uma mistura de cátions. Neste exemplo particular, o eletrólito líder deve conter um cátion cuja mobilidade é maior que a mobilidade de qualquer componente catiônico da amostra. Por outro lado, o eletrólito terminador deve conter o cátion de menor mobilidade. Quando o campo elétrico é estabelecido, diferentes gradientes de potencial evoluem em cada banda, de tal forma que todos os cátions eventualmente migram com velocidade constante e única. Em regiões onde cátions de menor mobilidade estão presentes, o campo elétrico é mais intenso. Estes solutos, entretanto, movem-se com a mesma velocidade que os solutos de maior mobilidade, estes últimos submetidos a campos elétricos mais fracos. Portanto, as velocidades das bandas individuais são auto-normalizadas.

A focalização isoeletrica envolve a separação de solutos anfotéricos em um gradiente de pH. Sob a influência do campo elétrico, um soluto negativamente carregado migra em direção ao anodo. Durante sua migração, o soluto experimenta regiões de pH progressivamente menor. Assim, uma fração cada vez maior do soluto torna-se protonada, e desta forma, a carga efetiva é alterada durante a migração. Eventualmente, a carga total do soluto torna-se zero, e sua migração é interrompida. Cada componente da amostra migra para uma região de pH igual ao seu ponto isoeletrico, e permanecerá nesta posição enquanto o campo elétrico for operante.

A maior limitação para a rapidez, eficiência e aumento de escala de separações eletroforéticas é a falta de habilidade de dissipar calor, causado pela passagem de corrente através do meio condutor (efeito Joule). O calor, gerado uniformemente através do meio condutor, é dissipado somente pelas extremidades do recipiente, gerando gradientes de temperatura. Gradientes de temperatura induzem gradientes de densidade, que por sua vez podem causar convecção. Fluxos convectivos servem para misturar bandas já separadas. Outro fator desfavorável, decorrente do efeito Joule, é a introdução de uma dependência especial para a mobilidade dos solutos. As moléculas localizadas na região central do meio de separação irão migrar mais rapidamente que as moléculas localizadas nas bordas, causando dispersão da zona. Adicionalmente, se a temperatura do meio se torna muito alta, pode haver um comprometimento da integridade estrutural da amostra.

Tradicionalmente, para contrabalançar os distúrbios causados pelo efeito Joule são empregados suportes sólidos, tal como papel, amido, agarose, acetato de celulose e géis de poliacrilamida. Esta prática, no entanto, tem o inconveniente de aumentar a área disponível para adsorção do soluto, o que pode causar sérias distorções da banda. Além disso, a preparação e tingimento de géis, como prática, requer uma manipulação intensiva que, freqüentemente, pode levar a resultados analíticos de baixa qualidade. Apesar dos suportes anti-convectivos aumentarem a eficácia na remoção do calor, o campo elétrico é limitado a um intervalo pequeno (10 - 50 V/cm).

Uma solução simples para o problema do efeito Joule em eletroforese é a utilização de tubos com dimensões capilares (15 - 100 μm). A geometria do capilar (elevada área superficial interna relativa ao volume) favorece a dissipação de calor. A remoção eficiente do calor através das paredes do capilar, praticamente elimina a convecção, sendo possível o estabelecimento de campos elétricos substancialmente maiores, *i.e.* 100 - 500 V/cm. Nestas condições, as bandas se aproximam do limite teórico, de serem alargadas apenas por difusão longitudinal. Em casos favoráveis, aproximadamente um milhão de pratos podem ser obtidos, fazendo da eletroforese capilar a técnica eletroforética de maior eficiência.

A eletroforese capilar oferece outras vantagens sobre os métodos eletroforéticos convencionais, como o manuseio de volumes bastante reduzidos (1 - 10 nL) de amostra, e a completa automação da análise, com possibilidade de injeção e detecção em fluxo. Outra vantagem é a compatibilidade com uma variedade de sistemas de detecção disponíveis para cromatografia líquida, como absorção no UV-VIS, fluorescência, métodos eletroquímicos, condutividade, e espectrometria de massas, entre outros, que fazem da eletroforese capilar uma técnica muito mais sensível e reprodutível que os métodos eletroforéticos empregando géis.

Historicamente, a eletroforese foi introduzida por Tiselius,^{3,4} no início da década de 30, através do elegante método da fronteira móvel, descrito anteriormente (figura 1). Por este trabalho pioneiro, no qual a separação parcial de algumas proteínas constituintes do soro sanguíneo é demonstrada, foi concedido a Tiselius o prêmio Nobel de 1948. Desde então, a eletroforese tem ocupado uma posição única entre as metodologias empregadas para biomoléculas. Mas foi somente na última década, com a implementação das técnicas capilares, que a eletroforese evoluiu de um formato de manipulação intensiva para um formato totalmente automatizado, ganhando o *status* de técnica analítica de rotina.

A primeira demonstração do uso de campos elétricos elevados em eletroforese data de 1967, e é atribuída a Hjerten,⁵ que empregou um tubo de quartzo, em rotação, com dimensões de 300 μm de diâmetro e 36 cm de comprimento, e voltagens de 2,5 a 3 kV (aproximadamente 75 V/cm). Em 1974, Pretorius *et al.*⁶ demonstraram o efeito de bombeio do fluxo eletroosmótico, salientando as vantagens deste modo, em comparação aos métodos tradicionais de bombeio de fase móvel em cromatografia. Nessa mesma época, Virtanen⁷ advogava as vantagens do uso de tubos de pequeno diâmetro (50 - 200 μm) para separações eletroforéticas. Essa tendência em breve iria culminar em 1979, com a primeira demonstração da eletroforese de zona em tubos de teflon de pequeno *bore* (200 μm de diâmetro), na Holanda, pelo grupo de Everaerts.⁸ Neste trabalho, conseguiu-se a separação de uma mistura de 16 ânions, com pratos de 10 μm , em aproximadamente 10 minutos.

Durante o começo da década de 80, nos Estados Unidos, Jorgenson e colaboradores,^{9,10} além de uma série de outros grupos de pesquisa, liderados por Ewing, Zare e Yeung,¹¹⁻¹³ contribuíram significativamente para o crescimento inicial da eletroforese capilar, investigando a viabilidade de seu uso, como técnica analítica instrumental. Cabe ainda salientar as contribuições de Karger e colaboradores,^{14,15} que lograram a introdução e desenvolvimento da eletroforese capilar em gel,

estendendo a técnica a macromoléculas, através da inclusão de uma dependência do tamanho da molécula no mecanismo de separação. Relevantes também foram as contribuições de Terabe e colaboradores,¹⁶ que introduziram uma versão modificada de eletroforese capilar, a electrocromatografia micelar. Nessa modalidade, micelas são introduzidas na solução tampão, fornecendo um sistema cromatográfico de duas fases para a separação de moléculas neutras.

Nos últimos quinze anos, a eletroforese capilar tem conquistado a atenção da comunidade científica internacional, como uma poderosa técnica alternativa para a separação e análise de compostos de interesse industrial, farmacêutico, clínico, e ambiental. A bibliografia da eletroforese capilar conta com vários livros didáticos,¹⁷⁻²⁴ e artigos de revisão,^{11,25-29} abrangendo os aspectos teóricos da técnica e compilando suas inúmeras aplicações.

INSTRUMENTAÇÃO

Um aspecto bastante importante da eletroforese capilar é a simplicidade da instrumentação. Um diagrama de blocos, mostrando os componentes de um sistema para implementar a eletroforese capilar, é esquematizado na figura 2. O sistema consiste de uma fonte de alta tensão, capilares (sílica fundida é o material mais comumente empregado), eletrodos (geralmente platina), e um detector apropriado. Uma fonte cc regulada, de alta tensão, é usada para estabelecer um campo elétrico ao longo do capilar. Tais fontes podem, em geral, ser operadas à voltagem constante e/ou corrente constante, com valores típicos de voltagem no intervalo de 0 - 50 kV e corrente, de 0 - 200 μA . O operador é protegido contra um contato acidental com a alta voltagem pela inclusão do sistema inteiro, ou pelo menos o terminal de alta voltagem, numa caixa de acrílico, equipada com chaves de segurança. A fonte de alta tensão é conectada, através de eletrodos de platina, a dois reservatórios contendo uma solução de um eletrólito conveniente. Tubos capilares de sílica fundida são então preenchidos com a solução, e servem como canal de migração. As extremidades do capilar são imersas nos reservatórios da solução para completar o contato elétrico. Para minimizar efeitos térmicos, o capilar deve ser mantido à temperatura constante. Há várias possibilidades para termostatização do sistema, incluindo circulação de um líquido ou ar através de um cartucho contendo o capilar, além do uso de ventiladores, e fornos.

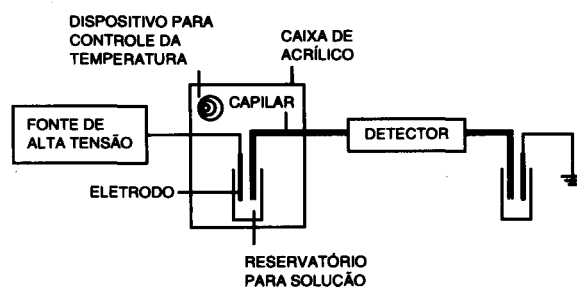


Figura 2. Instrumentação para eletroforese capilar.

Introdução de Amostra.

A maneira pela qual a amostra é introduzida no capilar tem implicação direta em análise quantitativa. A reprodutibilidade da área do pico, ou altura, reflete a precisão da técnica de injeção. Em eletroforese capilar, amostras podem ser introduzidas no capilar por métodos eletrocinéticos ou hidrodinâmicos. Na injeção eletrocinética, um gradiente de potencial é estabelecido ao longo do comprimento do capilar por um período de tempo conhecido, enquanto que na injeção hidrodinâmica utiliza-se um gradiente de pressão. O gradiente de pressão pode

ser estabelecido por diferentes mecanismos: pressurização ou vácuo em um dos reservatórios de solução, ou por gravidade, onde um dos reservatórios é elevado em relação ao outro e a amostra é introduzida por sifonagem.

A injeção hidrodinâmica introduz no capilar uma alíquota representativa da composição do soluto na amostra. O volume de injeção (nL) depende do tempo de injeção, dimensões do capilar, viscosidade da solução tampão e da diferença de pressão estabelecida. A injeção hidrodinâmica é usualmente mais precisa que a eletrocínética porque é baseada estritamente na transferência de volume (a reprodutibilidade de área é de aproximadamente 1% do desvio padrão relativo). Entretanto, pode ocorrer um alargamento significativo da zona, como resultado do perfil de velocidade parabólico, característico do fluxo induzido por pressão. Injeções hidrodinâmicas são preferidas em aplicações de eletroforese de zona em solução livre e micelar, particularmente quando a concentração da amostra está dentro dos limites de sensibilidade do detector.

Na injeção eletrocínética, a amostra é introduzida no capilar como resultado da combinação entre as velocidades eletroforética e eletroosmótica (*vide* próxima seção). Assim sendo, a quantidade de material injetado é uma função da mobilidade eletroforética do soluto, das condutividades da amostra e meio condutor, assim como da magnitude do fluxo eletroosmótico. Uma importante consequência deste modo de injeção é a amostragem não-representativa, que resulta da discriminação entre os componentes da amostra com diferentes mobilidades. Este é particularmente um problema, quando a amostra é composta de solutos de baixa mobilidade, que podem estar presentes em concentrações próximas ao limite de detecção. A injeção eletrocínética encontra a sua maior aplicação em eletroforese capilar em gel, onde a injeção por transferência de volume é impossível.

Detecção.

O desenvolvimento de novos sistemas de detecção em eletroforese capilar tem sido uma área de intensa pesquisa desde a implementação da técnica. O rápido avanço tecnológico nessa área tem sido atribuído à relativa facilidade com que alguns detectores, de uso geral para cromatografia líquida, são adaptados para eletroforese capilar. Pequenas modificações nestes detectores são suficientes para acomodar capilares de sílica fundida, como células de detecção em fluxo. Além disso, a diversidade de moléculas que se beneficiam do uso de métodos eletroforéticos tem contribuído para a implementação de uma variedade de princípios de detecção.

Vários critérios devem ser considerados na escolha de um detector para uma análise em particular, incluindo sensibilidade, seletividade, intervalo linear de concentração e ruído. A resposta do detector deve produzir uma relação conhecida e reprodutível com a quantidade ou concentração do soluto, além de fornecer um amplo intervalo linear de concentração. Idealmente, o detector deve responder de forma independente ao tipo de solução empregada, não deve contribuir para o alargamento das bandas e deve ser conveniente para o uso.

Os detectores podem ser classificados em dois tipos: os universais e os específicos. Os detectores universais medem a diferença entre alguma propriedade do soluto em relação à solução. Assim, o sinal não depende das propriedades do soluto, mas da diferença entre as propriedades do soluto e solução. Nesta classe estão incluídos os detectores de índice de refração e condutividade, entre outros que empregam métodos indiretos. Apesar de universais, estes detectores apresentam menor sensibilidade e intervalo dinâmico. Os detectores específicos medem uma propriedade específica do soluto. A detecção é, portanto, limitada aos solutos que possuem a referida propriedade. Nesta classe estão incluídos os fotodetectores (baseados na absorção na região do UV/VIS, na fluorescência, ou no espalhamento Raman), os espectrômetros de massas, os detectores

amperométricos e os radiométricos. O uso dos detectores específicos é bastante vantajoso quando a matriz da amostra é complexa, e em situações onde é desejável minimizar interferências do *background*. Este tipo de detector é geralmente mais sensível que os detectores universais e fornece intervalos mais amplos de resposta linear. Além disso, a relação sinal/ruído é melhor. Conseqüentemente, os detectores específicos encontram maior uso que os universais. A tabela 1 compara os limites de detecção de alguns dos sistemas de detecção disponíveis para eletroforese capilar.

Tabela 1. Comparação entre alguns sistemas de detecção usados em eletroforese capilar.²³

MODO DE DETECÇÃO	LIMITES DE DETECÇÃO TÍPICOS (em mol/L)
ÍNDICE DE REFRAÇÃO	
Direto (laser)	10 ⁻⁵ - 10 ⁻⁶
CONDUTIVIDADE	
ABSORBÂNCIA	
Direto	10 ⁻⁵ - 10 ⁻⁶
Indireto	10 ⁻⁴ - 10 ⁻⁵
FLUORESCÊNCIA	
Direto (lâmpada)	10 ⁻⁷ - 10 ⁻⁸
Direto (laser)	10 ⁻⁹ - 10 ⁻¹²
Indireto	10 ⁻⁶ - 10 ⁻⁷
ESPECTROMETRIA DE MASSAS	
AMPEROMETRIA	
RADIOMETRIA	
RAMAN	

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Os fundamentos teóricos discutidos a seguir são rigorosamente aplicáveis à eletroforese de zona em solução livre, praticada em capilares de sílica fundida. As equações fundamentais da separação eletroforética por eletroforese de zona em fase micelar (eletrocromatografia micelar), híbrido de eletroforese e cromatografia, deve incorporar termos descrevendo a partição do soluto na micela, enquanto que a eletroforese de zona em matrizes porosas (géis, polímeros, etc) deve enfatizar a dependência do tamanho da molécula na seletividade da separação. Ambos os modos, entretanto, obedecem aos mesmos fundamentos teóricos da migração eletroforética e eletroosmótica da eletroforese de zona em solução livre. A isotacoforese emprega gradientes de concentração ou soluções descontínuas, enquanto que a focalização isoeletrica utiliza gradientes de pH. Assim, tanto a descrição matemática da migração eletroforética e eletroosmótica como as equações fundamentais de separação por estes dois modos devem incorporar estas particularidades. Na prática da eletroforese de zona em matrizes porosas, da isotacoforese e da focalização isoeletrica, em capilar, é comum a supressão do fluxo eletroosmótico.

Teoria da Migração Eletroforética

A condutância G de um segmento de solução imersa em um campo elétrico E é diretamente proporcional à seção de área transversal A , perpendicular ao vetor campo elétrico, e inversamente proporcional ao comprimento L do segmento. A constante de proporcionalidade é chamada de condutividade, k , e é uma propriedade intrínseca da solução:

$$G = \frac{kA}{L} \quad [1]$$

Uma vez que a corrente que atravessa a solução é gerada pelo movimento independente de diferentes espécies, a condutividade

é de fato uma soma das contribuições de todas as espécies iônicas i . Cada espécie contribui para a condutividade total de maneira proporcional a sua concentração C_i , magnitude da carga z_i , e mobilidade μ_i :

$$k = F \sum (|z_i| \mu_i C_i) \quad [2]$$

onde F é a constante de Faraday. A mobilidade do íon corresponde a sua velocidade limite v_i , em um campo elétrico de valor unitário:

$$\mu_i = \frac{v_i}{E} \quad [3]$$

A velocidade é a distância percorrida pelo íon por unidade de tempo:

$$v_i = \frac{L}{t_i} \quad [4]$$

A intensidade do campo elétrico é expressa pelo valor máximo do gradiente de potencial por unidade de comprimento:

$$E = \frac{V}{L} \quad [5]$$

Voltagem e corrente estão relacionadas pela lei de Ohm ($V = R i$), onde a resistência R é o inverso da condutância G (equação [1]).

A figura 3 representa, esquematicamente, a migração de um íon e sua esfera iônica, sob a influência de um campo elétrico. Inicialmente, o íon é acelerado até que forças de atrito, entre outras (retardamento e relaxação), contrabalançam a força elétrica. Um estado estacionário é atingido, onde o íon continua sua trajetória em movimento constante, com a velocidade final adquirida. A força elétrica é dada por um produto envolvendo a carga do íon, z_i , a carga elementar, e , e o campo elétrico:

$$F_{\text{elétrica}} = F_1 = |z_i| e E \quad [6]$$

A força de atrito pode ser aproximada pela lei de Stokes, para íons de forma esférica como:

$$F_{\text{atrito}} = F_2 = 6 \pi \eta r_i v_i \quad [7]$$

onde η é a viscosidade do meio e r_i é o raio iônico efetivo. As forças de retardamento (F_3) e relaxação (F_4) estão associadas à presença da esfera iônica e , portanto, são mais difíceis de quantificar. O retardamento aparece porque a esfera iônica possui carga oposta à do íon e , conseqüentemente, tende a

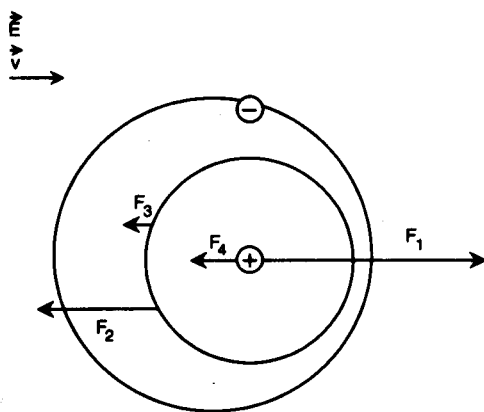


Figura 3. Forças atuantes em um íon e sua esfera iônica durante migração eletroforética: força elétrica (F_1), força de atrito (F_2), força de retardamento (F_3), e força de relaxação (F_4).

migrar em direção oposta. A relaxação se relaciona à tendência da esfera iônica em se redistribuir simetricamente ao redor do íon. Entretanto, como o íon está em movimento constante, existe um tempo finito para a esfera iônica se rearranjar. O resultado é um alongamento da esfera iônica em relação à posição central do íon.

Quando o íon atinge a velocidade final, a resultante de forças é nula, e as equações [6] e [7] se equivalem:

$$|z_i| e E = 6 \pi \eta r_i v_i \quad [8]$$

Para efeito de simplificação, a contribuição das forças de retardamento e relaxação ao movimento final do íon será ignorada. Assim, a mobilidade iônica pode ser aproximada pela combinação das equações [3] e [8]:

$$\mu_i = \frac{|z_i| e}{6 \pi \eta r_i} \quad [9]$$

O Conceito de Mobilidade Efetiva.

Para soluções de eletrólitos compostos de um ácido ou base fracos, existem pelo menos duas espécies em equilíbrio, a molécula não ionizada (com mobilidade zero), e a base ou ácido conjugado, cada qual com um valor particular de mobilidade. Assim, da mesma forma que os íons simples são caracterizados por um valor de mobilidade iônica (μ_i), o conceito de mobilidade efetiva é utilizado para descrever a migração de eletrólitos fracos. A mobilidade efetiva (μ_{ef}) pode ser calculada pela definição clássica de Tiselius, na qual qualquer substância i presente em solução em diferentes formas j , relacionadas entre si por um equilíbrio ácido-base rápido, irá migrar em um campo elétrico como um soluto único, possuindo uma certa mobilidade efetiva dada por:

$$(\mu_{ef})_i = \sum (\mu_j \alpha_j) \quad [10]$$

onde α_j é a fração molar ou função de distribuição,³⁰ e μ_j a mobilidade iônica de cada espécie individual j .

As funções de distribuição dependem da magnitude das constantes de dissociação do soluto (pK_a), e determinam a predominância relativa das várias espécies num intervalo de pH. Desta forma, a equação [10] sugere uma dependência indireta entre a mobilidade efetiva e o pH do meio. A figura 4 apresenta curvas de mobilidade efetiva versus pH para alguns solutos de interesse geral (dados de pK_a e mobilidade individual das espécies foram obtidos da compilação de Hirokawa *et al.*).³¹ Curvas desse tipo são excelentes indicadores da condição de pH mais propícia para a separação ocorrer, ou seja, o pH onde as diferenças entre as mobilidades efetivas dos solutos são maximizadas.

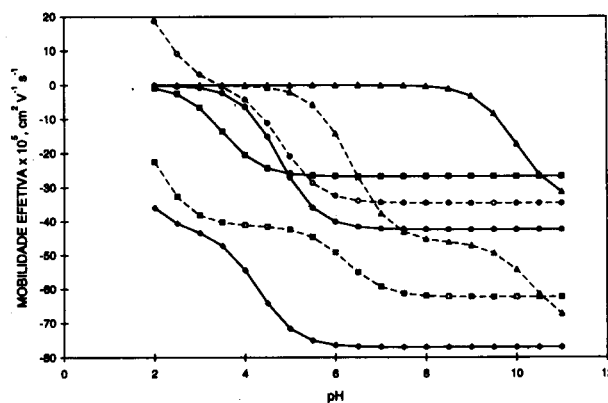


Figura 4. Mobilidade efetiva em função do pH para os compostos: ácido oxálico (◆), ácido acético (●), fenol (▲), aspirina (■), ácido carbônico (Δ), ácido málico (□) e ácido nicotínico (○).

Teoria da Migração Electrosmótica

Interface Solução - Capilar.

Entre os vários materiais utilizados na fabricação de capilares, a sílica fundida, uma forma pura de dióxido de silício amorfo, tem encontrado maior uso. Este material confere aos capilares muitas propriedades interessantes, como dimensões precisas, alta constante dielétrica, baixa condutividade elétrica, alta condutividade térmica, resistência mecânica, maleabilidade, resistência ao ataque químico e, particularmente, alta transmissão óptica para um intervalo apreciável de comprimento de onda (190 a 900 nm). No entanto, o uso de capilares de sílica é também responsável por um importante fenômeno em eletroforese capilar: o fluxo electrosmótico.

Quimicamente, a sílica fundida é caracterizada pela presença de vários tipos de grupos silanol (figura 5), os quais, em média, apresentam um caráter ácido. Em contato com o meio aquoso, alguns desses grupos são ionizados e, com a ionização, a superfície do capilar se torna negativamente carregada. Outra possibilidade para a presença de carga na superfície do capilar é a adsorção de espécies iônicas. Em ambos os casos, o resultado é o mesmo: surge na solução em proximidade à superfície, uma distribuição espacial não-homogênea de carga, conhecida como *dupla camada elétrica*.^{1,32}

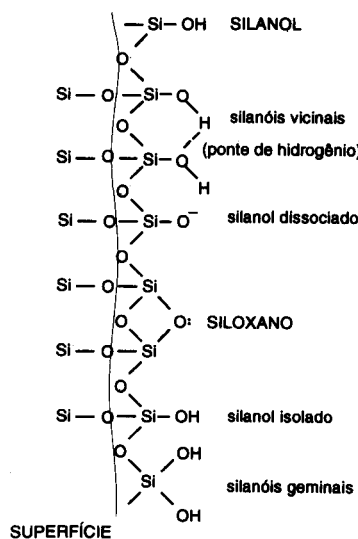


Figura 5. Representação esquemática da estrutura química da superfície de um capilar de sílica fundida.

O modelo combinado de Gouy-Chapman-Stern-Grahame (figura 6) descreve a região imediatamente adjacente à superfície como ocupada por camadas de moléculas de água orientadas e alguns íons, provavelmente desidratados, os quais são fortemente atraídos pela superfície por forças eletrostáticas e/ou de coesão (adsorção específica). O centro destes íons define um plano, conhecido como o plano interno de Helmholtz (IHP). Íons hidratados se aproximam da superfície a uma distância correspondente aos seus raios de hidratação. Estes íons são mais fracamente ligados à superfície, e a interação é dependente das propriedades químicas dos íons (adsorção não-específica). O plano definido pelo centro dos íons hidratados é conhecido como o plano externo de Helmholtz (OHP), ou camada de Stern, e delimita a *camada compacta* da dupla camada elétrica. Devido a um movimento térmico randômico, alguns íons difundem, se afastando da superfície. A concentração de íons de carga oposta à superfície decresce com a distância e, eventualmente, aproxima-se do valor da concentração dos íons na solução. Esta região é conhecida como a *camada difusa* da dupla camada elétrica.

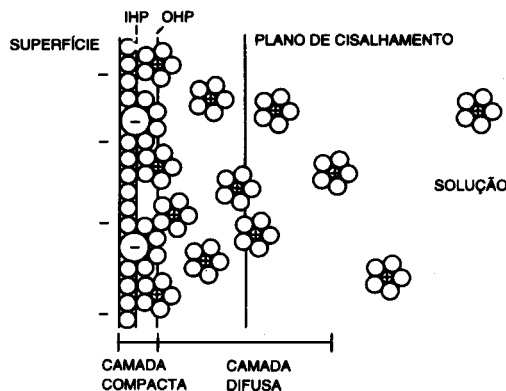


Figura 6. Modelo para a interface capilar/solução.

Quando um campo elétrico é imposto tangencialmente à superfície, forças elétricas atuam nas cargas da camada difusa, causando um movimento unilateral de íons em direção ao eletrodo de carga oposta. Durante a migração, os íons transportam moléculas de água, induzindo um fluxo de solução como um todo, conhecido como fluxo electrosmótico. A distância na qual uma fração da camada difusa consegue escapar às forças de atração da superfície é caracterizada como o plano de cisalhamento. Este plano delimita a parte imóvel da região difusa da dupla camada elétrica. O potencial desenvolvido no plano de cisalhamento é conhecido como o potencial electrocinético ou potencial zeta, ζ . Sua magnitude tem implicações bastante importantes no desenvolvimento e caracterização do fluxo electrosmótico.

A distribuição do potencial na dupla camada elétrica pode ser derivada, resolvendo-se a equação de Poisson-Boltzmann para casos limite^{1,32}. Se o potencial na superfície (ψ_0) é suficientemente pequeno (< 50 mV), o perfil de potencial com a distância (x) pode ser aproximado conforme a teoria de Debye-Hückel:

$$\psi = \psi_0 \exp(-\kappa x) \quad [11]$$

Um dos parâmetros mais importantes que emergem desta teoria é o parâmetro κ , o qual correlaciona propriedades da solução com a dimensão da dupla camada elétrica:

$$\kappa^2 = \frac{1000 e^2 N_A}{\epsilon' \epsilon T} \sum (z_i^2 M_i) \quad [12]$$

onde z_i é a carga e M_i a molaridade do íon i , ϵ' é a constante dielétrica do meio, ϵ é a carga elementar, N_A é o número de Avogadro, k é a constante de Boltzmann e T é a temperatura absoluta. A quantidade κ^{-1} , conhecida como o comprimento de Debye, é frequentemente usada para caracterizar a espessura da dupla camada elétrica.

Fluxo Electrosmótico.

Os princípios que hoje são usados para relacionar as propriedades da solução com a magnitude do fluxo electrosmótico foram introduzidos no princípio do século, no contexto da química de colóides.¹ Para entender o desenvolvimento do fluxo electrosmótico é preciso examinar as forças que atuam na proximidade da superfície do capilar, quando um campo elétrico tangencial é estabelecido (figura 7). Para tanto, a solução dentro do capilar é dividida em camadas concêntricas; cada camada possui uma distribuição de íons do tipo Boltzmann, e espessura infinitesimal (dx).

As forças atuantes são de natureza elétrica e de atrito. A força elétrica atua em todos os íons presentes no segmento da solução, sendo proporcional à magnitude do campo elétrico e à densidade da solução (ρ):

$$F_{\text{elétrica}} = F'_1 = E \rho dx \quad [13]$$

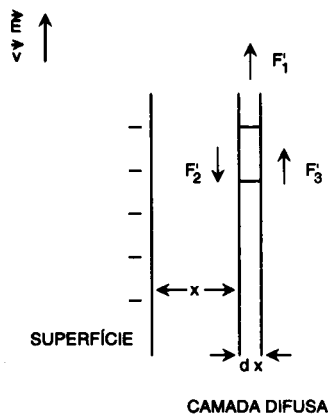


Figura 7. Forças atuantes em um segmento de solução, situado na proximidade da superfície do capilar, durante migração eletrosmótica: força elétrica (F_1) e forças de atrito (F_2 , F_3).

As forças de atrito atuam entre camadas de solução adjacentes e dependem da viscosidade da solução (η) e da posição da camada de solução em relação à superfície:

$$F_{\text{atrito}}(x) = F'_2 = \eta (dv/dx)_x \quad [14]$$

$$F_{\text{atrito}}(x+dx) = F'_3 = \eta (dv/dx)_{x+dx} \quad [15]$$

onde dv/dx é o valor do gradiente de velocidade na posição especificada. Observe que o gradiente de velocidade só existe em virtude da distribuição não-homogênea dos íons. A velocidade é zero na superfície, aumenta abruptamente dentro da dupla camada elétrica e alcança um valor máximo a uma distância bastante próxima da superfície. O restante da solução migra com a velocidade máxima. Entretanto, cada camada de solução migra com uma velocidade constante, característica da posição da camada, pois a resultante de forças atuando em cada camada é nula.

A expressão que relaciona o fluxo eletrosmótico com as propriedades da solução resulta do balanço de forças dentro da dupla camada elétrica:

$$E \rho dx = \eta (dv/dx)_{x+dx} - \eta (dv/dx)_x = \frac{d}{dx} \left(\eta \frac{dv}{dx} \right) dx \quad [16]$$

e emprega a equação de Poisson para a densidade de carga:

$$\rho = - \frac{d}{dx} \left(\epsilon \frac{d\psi}{dx} \right) dx \quad [17]$$

Combinando as equações [16] e [17]:

$$-E \frac{d}{dx} \left(\epsilon \frac{d\psi}{dx} \right) = \frac{d}{dx} \left(\eta \frac{dv}{dx} \right) \quad [18]$$

e integrando, obtêm-se:

$$-E \epsilon \frac{d\psi}{dx} = \eta \frac{dv}{dx} + \text{constante} \quad [19]$$

Quando $x = \infty$, $d\psi/dx = 0$ e $dv/dx = 0$, portanto, a constante de integração é nula. Uma nova integração da equação [19], assumindo ϵ' e η constantes em toda parte móvel da camada difusa, resulta em:

$$-E \epsilon' \psi = \eta v + \text{constante} \quad [20]$$

Nas condições limite, quando $x = \infty$, $\psi = 0$ e $v = v_{\text{osm}}$ (velocidade eletrosmótica); quando $x = 0$ (plano de cisalhamento), $\psi = \zeta$ e $v = 0$. Desta forma, a equação [20] pode ser simplificada como:

$$-E \epsilon' \zeta = \eta v_{\text{osm}} \quad [21]$$

que rearranjando fornece:

$$v_{\text{osm}} = - \frac{\epsilon \epsilon_0 \zeta}{\eta} E \quad [22]$$

A relação acima, conhecida como a equação de Helmholtz-Smoluchowski, prevê a dependência entre a velocidade linear máxima dos íons na solução (v_{osm}) e o campo elétrico (E). A constante de proporcionalidade, que representa a mobilidade eletrosmótica (μ_{osm}), é constituída por várias constantes, tais como a constante dielétrica (ϵ) e a viscosidade (η) da solução, a permissividade do vácuo (ϵ_0) e o potencial zeta (ζ):

$$\mu_{\text{osm}} = - \frac{\epsilon \epsilon_0 \zeta}{\eta} \quad [23]$$

A equação de Helmholtz-Smoluchowski é válida quando o raio do capilar (r) é grande quando comparado com a espessura da dupla camada elétrica (κ^{-1} , obtido por rearranjo da equação [12]), ou quando o produto (κr) é muito maior que o valor 100. Note que na dedução teórica da equação [22], nenhuma consideração é feita sobre a estrutura intrínseca da dupla camada elétrica, exceto pela existência do plano de cisalhamento. É interessante observar que, quando os vetores velocidade e campo elétrico estão na mesma direção e sentido, o que comumente ocorre na prática da eletroforese capilar, o potencial zeta adquire um valor negativo.

A existência do fluxo eletrosmótico tem importantes implicações na eletroforese capilar. O fluxo de solução contribuiu significativamente para a automação da técnica, permitindo a introdução de amostra e detecção diretamente no capilar. Quando a velocidade eletrosmótica é de grande magnitude, o fluxo é responsável pela condução dos solutos, sem distinção de carga, em direção ao detector. Assim, a análise simultânea de amostras contendo tanto solutos catiônicos e neutros como aniônicos é possível, muito embora não haja discriminação temporal entre diferentes solutos neutros. Além disso, as características de alta eficiência da técnica estão, em parte, vinculadas ao perfil radial da velocidade eletrosmótica (figura 8). Sendo linear, o mesmo componente de velocidade é adicionado a todos os solutos, independentemente da sua posição radial. Esta peculiaridade distingue a eletroforese capilar dos métodos cromatográficos em fase líquida em coluna, que apresentam um perfil de velocidade parabólico, característico do fluxo induzido por pressão.

Nos últimos anos, várias estratégias têm sido desenvolvidas no sentido de exercer um controle apropriado do fluxo eletrosmótico. Talvez, o meio mais efetivo de controle seja a alteração das propriedades físico-químicas da solução. Neste contexto, alterações de pH, concentração e força iônica da solução tampão, tipo e concentração de um eletrólito inerte ou aditivo orgânico, assim como alteração na viscosidade do solvente, constante dielétrica e temperatura têm sido praticadas satisfatoriamente.

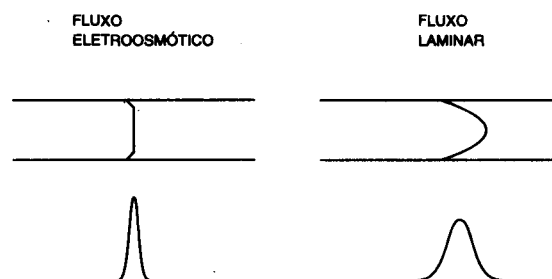


Figura 8. Perfil de velocidade radial para um fluxo induzido por um campo elétrico (eletrosmótico) e um fluxo induzido por pressão (laminar), e correspondente efeito na variância da distribuição.

A figura 9 apresenta o efeito do pH e concentração na magnitude do fluxo eletroosmótico para soluções tamponadas de fosfato de sódio³³. Essas curvas podem, de fato, ser interpretadas como curvas de titulação da superfície. Desta forma, o potencial zeta e, portanto, a velocidade eletroosmótica (equações [22] e [23]), são bastante elevados em meio básico, decrescem rapidamente entre pH 8 e 4 e, praticamente, estabilizam em meio ácido. As curvas sigmoidais apresentam um ponto de inflexão único, correspondente ao pK_a médio dos vários grupos silanol da superfície (pK_a 5,9). Outra característica interessante dessas curvas é a indicação do ponto de carga zero (PZC), que para sílica gel é sabido ocorrer a pH 2,5.³⁴ Quando o pH da solução atinge o ponto de carga zero, há um colapso da dupla camada elétrica e o fluxo eletroosmótico deixa de existir.

Outra forma efetiva de alterar, ou mesmo inibir o fluxo eletroosmótico, consiste em modificar a composição química do material do capilar e, portanto, a densidade de carga superficial. Além de sílica fundida, outros materiais têm sido testados, como vidro e teflon. Outra possibilidade consiste em alterar a natureza da superfície interna do capilar, através de revestimentos físicos e/ou métodos de derivatização química. E, finalmente, a aplicação de um campo elétrico externo, transversal ao capilar, é a maneira mais elegante de manipular o fluxo eletroosmótico.

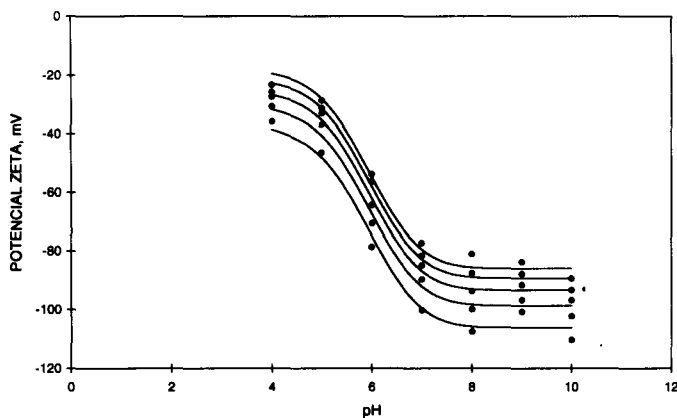


Figura 9. Variação do potencial zeta em função do pH de soluções tamponadas de fosfato contendo cloreto de sódio. Concentração total de sódio: 5 (curva inferior) a 15 mM (curva superior), incremento de 2,5 mM.

Equações Fundamentais

Resolução e Eficiência.

Em qualquer problema analítico envolvendo separação, o objetivo fundamental é o de atingir completa resolução entre todos os componentes da mistura. A resolução entre as bandas de dois solutos adjacentes é definida pela diferença entre o tempo de migração (t), dividida pelo valor médio entre as larguras de base de cada banda (w_b), expressas nas mesmas unidades dos tempos de migração:

$$R_{S_{i,j+1}} = \frac{2(t_{i+1} - t_i)}{w_{bi} + w_{bi+1}} \quad [24]$$

Na presença de fluxo eletroosmótico, o tempo de migração do soluto i , do ponto de injeção até a posição do detector (L_{det}), é determinada por sua velocidade aparente de migração (v_i), que é a combinação vetorial da velocidade eletroosmótica (v_{osm}) e eletroforética (v_{ep}), de acordo com:

$$t_i = \frac{L_{det}}{v_i} = \frac{L_{det}}{v_{osm} + v_{ep}} = \frac{L_{det} L_{tot}}{(\mu_{osm} + \mu_{ep}) V} \quad [25]$$

onde μ_{osm} e μ_{ep} são as mobilidades eletroosmótica e eletroforética, respectivamente, V é o potencial aplicado e L_{tot} é o comprimento total do capilar. A figura 10 ilustra a separação de alguns solutos com aproximadamente o mesmo tamanho, mas cargas distintas, na situação de velocidade eletroosmótica maior, em magnitude, que a velocidade eletroforética de qualquer um dos solutos presentes. Na prática, esta situação é conseguida quando o eletrólito é uma solução de pH elevado e baixa concentração. Note que o detector é fixo em uma posição conveniente, perto do final do capilar. O soluto catiônico migra com uma velocidade maior que a que migraria na ausência de fluxo, e portanto chega ao detector em um tempo menor. O soluto neutro (velocidade eletroforética nula) migra exclusivamente pela ação do fluxo eletroosmótico. Se a amostra contém vários solutos neutros, com tamanhos aproximadamente iguais, estes passariam pelo detector no mesmo tempo, como uma banda única, não resolvida. O soluto aniônico é arrastado pelo fluxo eletroosmótico para o polo de carga similar, e migra com uma velocidade menor que a do soluto neutro.

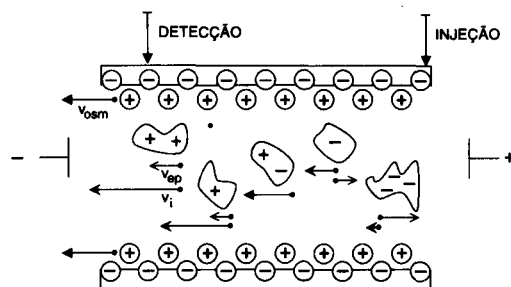


Figura 10. Separação de solutos de tamanho similar e cargas distintas por eletroforese capilar de zona em solução livre. Detalhe mostrando a superfície interna do capilar, carregada negativamente, e a organização da solução nas imediações da superfície. A composição vetorial das velocidades eletroosmótica (v_{osm}) e eletroforética (v_{ep}) resulta na velocidade aparente (v_i) de migração do soluto.

É importante observar que medidas experimentais do tempo de migração sempre levam à determinação de mobilidades aparentes. A mobilidade eletroosmótica precisa ser determinada separadamente, para que a mobilidade eletroforética do soluto possa ser avaliada. O tempo de migração de uma molécula neutra, como indicativo da velocidade eletroosmótica, constitui um dos métodos mais simples. Há ainda a possibilidade de usar moléculas neutras como padrões internos e fazer medidas relativas de tempo de migração do soluto em investigação em relação à molécula neutra. Neste caso, irregularidades introduzidas pela injeção da amostra ou flutuações de voltagem/corrente durante operação podem ser contornadas. Mesmo as alterações do fluxo eletroosmótico, em decorrência de modificações da superfície interna do capilar devido ao uso intensivo, são corrigidas com este procedimento.

Para uma banda normalmente distribuída (Gaussiana), a largura da base é relacionada com o desvio padrão da distribuição temporal (τ):

$$w_{bi} = 4 \tau \quad [26]$$

onde τ é expresso em unidades de tempo e se relaciona ao desvio padrão da distribuição espacial (σ), através da velocidade da zona:

$$\tau = \frac{\sigma}{v_i} \quad [27]$$

A eficiência de uma separação está diretamente relacionada à variância da zona (σ^2) e pode ser expressa em termos do número de pratos (N):

$$N = \frac{L_{det}^2}{\sigma^2} \quad [28]$$

ou pela altura equivalente a um prato (H):

$$H = \frac{L_{det}}{N} \quad [29]$$

O número de pratos pode ser calculado diretamente de um eletroferograma através da expressão:

$$N = 16 \left(\frac{t_i}{w_{hi}} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_i}{w_{hi}} \right)^2 \quad [30]$$

onde w_h é a largura da banda, tomada a meia altura, nas mesmas unidades de t_i .

A variância da distribuição espacial (σ^2) é causada por vários fenômenos dispersivos que ocorrem durante a permanência do soluto no capilar. Se estes processos são independentes, então as variâncias são estatisticamente aditivas:

$$\sigma^2 = \Sigma \sigma_n^2 \quad [31]$$

onde σ_n^2 representa a contribuição individual do processo de dispersão (n) à variância final observada.

Mecanismos de Dispersão.²³

Em eletroforese capilar são vários os fatores que contribuem para o alargamento das bandas. Entre os mais relevantes estão a difusão longitudinal, e os volumes finitos de injeção e detecção. Alguns fatores adicionais de variância incluem os gradientes de temperatura induzidos pelo efeito Joule, as interações soluto/capilar, e as diferenças de condutividade entre a solução e a amostra, além de outros.

A variância resultante da difusão longitudinal (σ_{dif}^2) é dada pela expressão de Einstein:

$$\sigma_{dif}^2 = 2 D_i t_i \quad [32]$$

onde D_i é o coeficiente de difusão do soluto i . Em geral, os coeficientes de difusão de solutos de baixa massa molecular, em meio aquoso, são da ordem de 10^{-5} cm²/s. É interessante lembrar que a difusão na direção radial do capilar não contribui para o alargamento das zonas, devido ao perfil característico da velocidade eletrosmótica (vide figura 8). A variância introduzida pela difusão longitudinal é uma função do tempo de residência do soluto no capilar e, portanto, não depende somente das características do soluto, mas também da mobilidade eletrosmótica e de outros parâmetros instrumentais. Ao substituir o tempo de migração da equação [32] pela equação [25], esta dependência se torna explícita:

$$\sigma_{dif}^2 = \frac{2 D_i L_{det} L_{inj}}{(\mu_{osm} + \mu_{ep}) V} \quad [33]$$

A contribuição à variância da zona causada pela injeção de um volume finito de amostra pode ser aproximada pela expressão introduzida por Sternberg,³⁵ para uma zona de perfil retangular:

$$\sigma_{inj}^2 = \frac{l_{inj}^2}{12} \quad [34]$$

Para avaliar o comprimento inicial da zona de amostra injetada no capilar (l_{inj}), o modo de injeção precisa ser considerado. Na introdução hidrodinâmica de amostra, um gradiente de pressão é

estabelecido no capilar, por um breve período. Sob condições de fluxo laminar, o comprimento da zona é então determinado pela equação de Hagen-Poiseuille:

$$l_{inj,hd} = \frac{\Delta P r^2}{8 \eta L_{tot}} t_{inj} \quad [35]$$

onde t_{inj} é o tempo de injeção, η é a viscosidade da solução e ΔP é a diferença de pressão estabelecida entre as extremidades do capilar. Quando a injeção hidrodinâmica é feita por aplicação de pressão na entrada do capilar, ou vácuo na saída do capilar, a diferença de pressão é conhecida. Quando a injeção é feita através de sifonagem, a diferença de pressão pode ser calculada por:

$$\Delta P = \rho g \Delta h \quad [36]$$

onde Δh é a diferença de altura entre o nível de solução nos dois reservatórios, ρ é a densidade da solução e g é a aceleração da gravidade. A dispersão causada pelo perfil parabólico de velocidade, característico do fluxo induzido por pressão, não está sendo considerada no cálculo do comprimento da zona pela equação [35].

Na introdução eletrocínética de amostra, um gradiente de potencial é estabelecido no capilar, por um breve período. O comprimento da zona injetada é determinado pela mobilidade aparente do componente de maior mobilidade na amostra e do tempo de injeção:

$$l_{inj,ec} = (\mu_{osm} \mu_{ep}) \frac{V}{L_{tot}} t_{inj} \quad [37]$$

É importante que o comprimento da amostra injetada no capilar seja minimizado. Idealmente, o comprimento deve ser menor que o desvio padrão causado por difusão longitudinal, ($\sqrt{2 D t}$). O comprimento exato depende do coeficiente de difusão do soluto e do tempo de análise. Macromoléculas podem apresentar coeficientes de difusão até 100 vezes menores que solutos de baixa massa molecular e, portanto, necessitam comprimentos de injeção menores.

Em qualquer detector, um volume finito de solução está sempre em contato com o transdutor, e o sinal de saída representa uma resposta média. Se o transdutor tem um limite espacial distinto e resposta uniforme no sentido de seu comprimento, a distribuição da zona apresenta um perfil retangular e a variância pode ser aproximada pela expressão de Sternberg:³⁵

$$\sigma_{det}^2 = \frac{l_{det}^2}{12} \quad [38]$$

onde l_{det} é o comprimento da janela no detector, ou o comprimento do capilar exposto ao sistema detector.

CONCLUSÃO

A eletroforese capilar constitui uma técnica moderna de separação, com ampla aceitação no âmbito acadêmico e industrial, que tem mostrado um surpreendente desenvolvimento nos últimos dez anos. No Brasil, esta técnica é ainda muito pouco difundida, apesar da excelência de seu desempenho analítico, da diversidade de suas aplicações e da simplicidade e relativamente baixo custo do instrumental necessário. O presente trabalho procurou introduzir um texto básico sobre a eletroforese capilar, ressaltando os fundamentos teóricos da migração eletroforética e eletrosmótica, e descrevendo os parâmetros instrumentais que influenciam a qualidade da separação.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao CNPq (bolsa de recém-doutor) e FAPESP pelo auxílio concedido para a construção de um equipamento de eletroforese capilar com detectores Raman e

de fluorescência induzida por laser. Gostaria também de estender um agradecimento especial ao Prof. Dr. Joel C. Rubim pelo estímulo e apoio decisivos, que levaram à formação do primeiro núcleo de pesquisa em eletroforese capilar no IQ-USP.

REFERÊNCIAS

1. *Electrophoresis - Theory, Methods and Applications*; Bier, M., Ed.; Academic Press Inc.; New York, 1959
2. *Electrophoresis*; Deyl, A.; Ed.; *J. Chromatogr. Lib.*, Vol. 18; Elsevier; Amsterdam, 1979.
3. Tiselius, A.; Tese de Doutorado; *Nova Acta Regiae Societatis Scientiarum Uppsaliensis*; Ser. IV . Vol 7, p1-107; Almqvist & Wiksell: Uppsala, Suécia, 1930.
4. Tiselius, A.; *Trans. Faraday Soc.* **1937**, *33*, 524.
5. Hjerten, S.; *Chromatogr. Rev.* **1967**, *9*, 122.
6. Pretorius, V.; Hopkins, B. J.; Schieke, J. D.; *J. Chromatogr.* **1974**, *99*, 23.
7. Virtanen, R.; *Acta Polytech. Scand. Chem. Ind. Metall. Ser.* **1974**, *123*, 1.
8. Mikkers, F. E. P.; Everaerts, F. M.; Verheggen, Th. P. E. M.; *J. Chromatogr.* **1979**, *169*, 11.
9. Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D.; *Anal. Chem.* **1981**, *53*, 1298.
10. Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D.; *Science* **1983**, *222*, 266.
11. Wallingford, R. A.; Ewing, A. G.; *Adv. Chromatogr.* **1989**, *29*, 1.
12. Gordon, M. J.; Huang, W.; Pentoney, S. L.; Zare, R. N.; *Science* **1988**, *242*, 224.
13. Yeung, E. S.; *Acc. Chem. Res.* **1989**, *22*, 125.
14. Cohen, A. S.; Karger, B. L.; *J. Chromatogr.* **1987**, *397*, 409.
15. Cohen, A. S.; Paulus, A.; Karger, B. L.; *Chromatographia* **1987**, *24*, 15.
16. Terabe, S.; Otsuka, K.; Ichikawa, K.; Tsuchiya, A.; Ando, T.; *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 111.
17. Weinberger, R.; *Practical Capillary Electrophoresis*; Academic Press; Boston, 1993.
18. Kuhn, R.; Hoffstetter-Kuhn, S.; *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*; Springer-Verlag; New York, 1993.
19. *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*; Camilleri, P., Ed.; New Directions in Organic and Biological Chemistry; CRC Press; Boca Raton, FL, 1993.
20. *Capillary Electrophoresis Technology*; Guzman, N. A., Ed.; Chromatographic Science Series; Dekker; New York, 1993.
21. Jandik, P.; Bonn, G.; *Capillary Electrophoresis of Small Molecules and Ions*; VCH; New York, 1993.
22. Li, S. F. Y.; *Capillary Electrophoresis: Principles, Practice and Applications*; Elsevier; Amsterdam, 1992.
23. *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*; Grossmann, P. D.; Colburn, J. C., Eds.; Academic Press; San Diego, CA, 1992.
24. Vindevogel, J.; Sandra, P.; *Introduction to Micellar Electrokinetic Chromatography*; Hüthig Verlag GmbH: Heidelberg, 1992.
25. Monnig, C. A.; Kennedy, R. T.; *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 280R.
26. Kuhr, W. G.; Monnig, C. A.; *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 389R.
27. McLaughlin, G. M.; Nolan, J. A.; Lindahl, J. L.; Palmieri, R. H.; Anderson, K. W.; Morris, S. C.; Morrison, J. A.; Bronzert, T. J.; *J. Liq. Chromatogr.* **1992**, *15*, 961.
28. Kuhr, W. G.; *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 403R.
29. Karger, B. L.; Cohen, A. S.; Guttman, A.; *J. Chromatogr.* **1989**, *492*, 585.
30. Butler, J. N.; *Ionic Equilibrium - A Mathematical Approach*; Addison-Wesley; Massachusetts, 1964.
31. Hirokawa, T.; Nishino, M.; Aoki, N.; Kiso, Y.; Sawamoto, Y.; Yagi, T.; Akiyama, J.; *J. Chromatogr.* **1983**, *271*, D1.
32. Bard, A. J.; Faulkner, L. R.; *Electrochemical Methods - Fundamentals and Applications*; John Wiley; New York, 1980.
33. Tavares, M. F. M.; *Computer-Assisted Optimization of Separations in Capillary Zone Electrophoresis*; Tese de Doutorado; Michigan State University, East Lansing, MI, 1993.
34. Unger, K. K.; *Porous Silica, J. Chromatogr. Lib.*, Vol. 16, Elsevier Scientific Publishing Co; New York, 1979.
35. Sternberg, J. C.; *Advances in Chromatography*; Giddings, J. C.; Keller, R. A., Eds.; Marcel Dekker, Inc.; New York, 1966; Vol. 2; p. 205.

Publicação financiada pela FAPESP