



Faculdade de Ciências Farmacêuticas de  
Ribeirão Preto - USP

## ELETROFORESE CAPILAR

### Fundamentos e Aplicações

Profa. Alessandra Vincenzi Jager

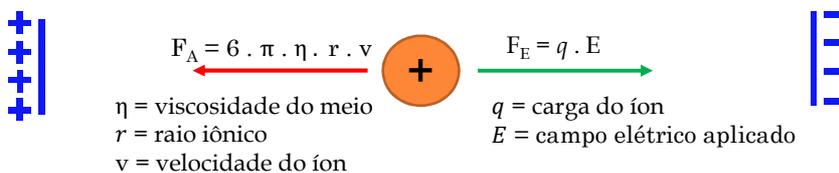
[alejager@usp.br](mailto:alejager@usp.br)

Bloco S - 2º. Andar - sala 046A

*Eletroforese Capilar*

## Eletroforese

A eletroforese é o movimento de partículas ou moléculas eletricamente carregadas em um meio líquido condutivo, geralmente aquoso, sob a influência de um campo elétrico.



$$F_A = F_E$$

$$6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v = q \cdot E$$

$$v = \frac{q}{6 \pi \eta r} \cdot E$$



## Eletroforese

$$v = \frac{q}{6 \pi \eta r} \cdot E$$

$$v = \mu_{ef} \cdot E$$

$$\mu_{ef} = \frac{q}{6 \pi \eta r}$$

A mobilidade eletroforética de um analito é uma propriedade relacionada ao tamanho e a carga deste analito.

A grandeza da mobilidade eletroforética,  $\mu_{ef}$ , é diretamente proporcional à carga,  $q$ , e inversamente proporcional à viscosidade do meio,  $\eta$ , e ao raio,  $r$  do analito.



3

## Mobilidade Eletroforética e Mobilidade Efetiva

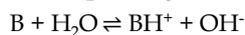
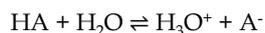
### Mobilidade Eletroforética ou Mobilidade Iônica

- ✓ É uma constante física tabelada
- ✓ É a mobilidade do íon totalmente dissociado a diluição infinita

### Mobilidade Efetiva

- ✓ É a mobilidade do íon medida experimentalmente
- ✓ Dependendo do analito, é altamente dependente do pH da solução

Soluções aquosas de analitos compostos de um **ácido ou base fracos**, existem no mínimo **2 espécies em equilíbrio**:

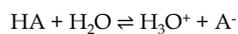
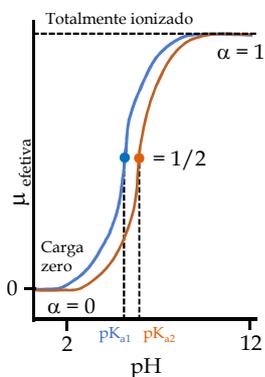


- ✓ A molécula não ionizada HA ou B com mobilidade zero
- ✓ A base conjugada ( $A^-$ ) ou ácido conjugado ( $BH^+$ ) com um valor de mobilidade eletroforética



4

## Mobilidade Eletroforética e Mobilidade Efetiva



A **Mobilidade Efetiva** é calculada pela expressão:

$$\mu_{\text{efetiva}} = \sum (\mu_j \alpha_j)$$

$\alpha_j$  = fração molar de cada espécie individual

$\mu_j$  = mobilidade iônica de cada espécie individual

A fração molar depende da magnitude do  $\text{pK}_a$  e determinam a presença relativa de cada espécie em um intervalo de pH.

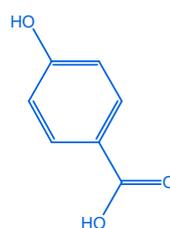
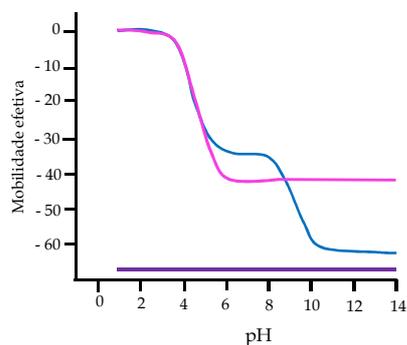
Fração molar ( $\alpha$ ), é o número de mols dividido pelo número total de mols no sistema

A **Mobilidade Efetiva** é a mobilidade de um íon em um determinado pH.



5

## Mobilidade Efetiva x pH



Ácido p-hidroxibenzoico  
( $\text{pK}_{a1} = 4,53$  e  $\text{pK}_{a2} = 9,31$ )



HCl  
Ácido Clorídrico

Figura adaptada de: SPUDEIT, Daniel Alfonso; DOLZAN, Maressa Danielli; MICKE, Gustavo Amadeu. Conceitos básicos em eletroforese capilar. *Scientia Chromatographica*, v. 4, n. 4, p. 287-297, 2012.

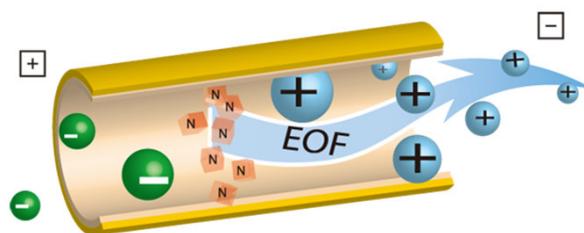


6

## Eletroforese Capilar

### o Definição:

A Eletroforese Capilar é uma **técnica analítica instrumental de eletromigração** baseada na diferença de mobilidades de espécies carregadas (analitos) em um meio líquido (aquoso ou não-aquoso) quando submetidos à ação de um campo elétrico no interior de tubo capilar.



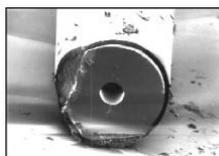
RIEKKOLA, M.-L.; JÖNSSON, Jan Åke; SMITH, Roger M. Terminology for analytical capillary electromigration techniques (IUPAC Recommendations 2003). *Pure and Applied Chemistry*, v. 76, n. 2, p. 443-451, 2004.



7

## Capilares

- ✓ Capilares de sílica fundida de 25, 50 e 75  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno
- ✓ Revestimento de poliimida que confere resistência e flexibilidade



Capilar de 75  $\mu\text{m}$  de  $\varnothing$ ;  
Aumento de 170 vezes

Figura adaptada de: LANDERS, James P. (Ed.). *Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques*. CRC press, 2007.



Revestimento de poliimida (5  $\mu\text{m}$ )

### Efeito Joule

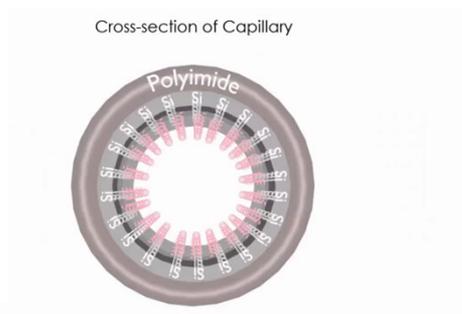
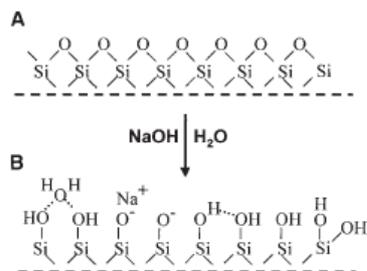
Geração de calor em um meio condutivo causada pela passagem de corrente elétrica



8

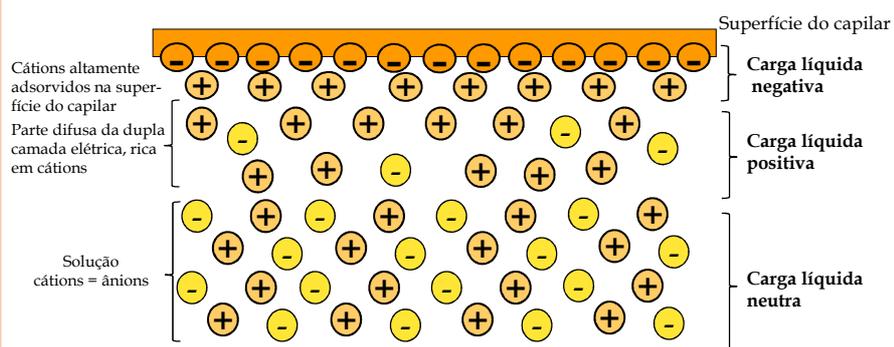
## Estrutura dos Capilares

Em capilares de sílica fundida...



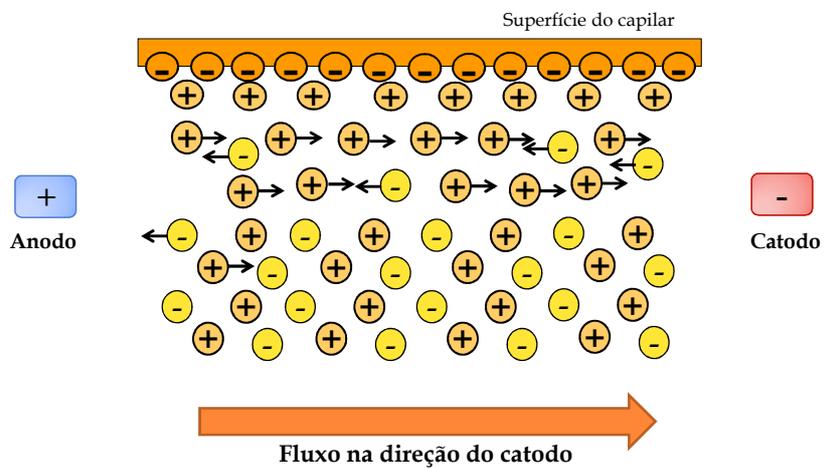
9

## Fluxo Eletrosmótico



10

## Fluxo Eletrosmótico

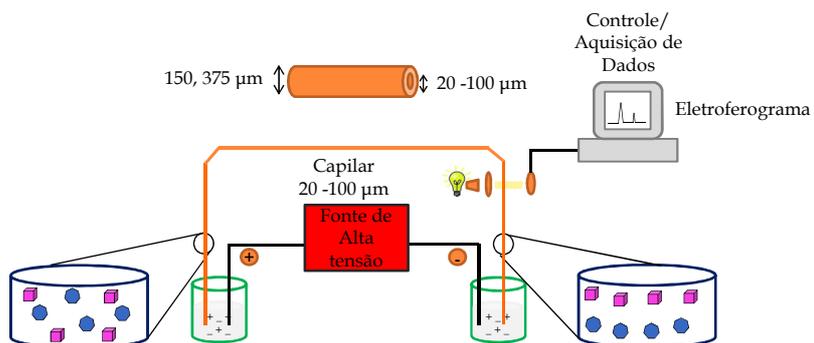


Fluxo Eletrosmótico é chamado de "a bomba da eletroforese capilar"



11

## Instrumentação



12

## Instrumentação

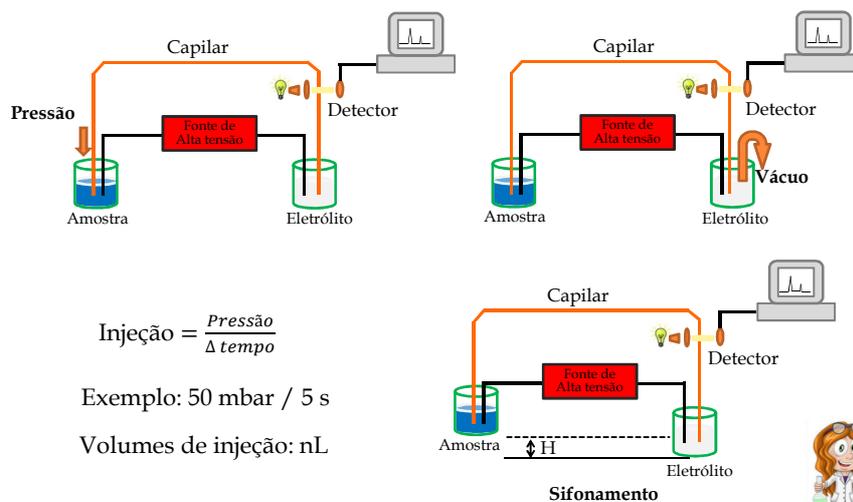


13

## Injeção da Amostra

### Hidrodinâmica:

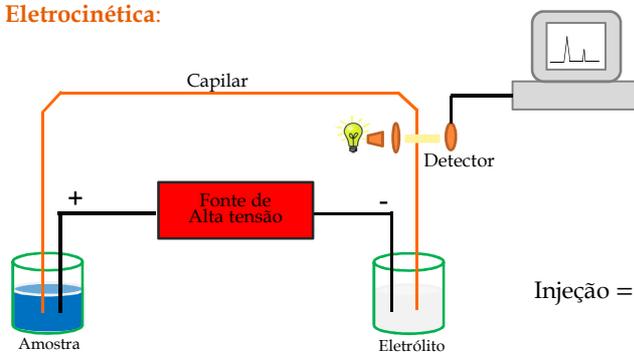
- ✓ Injeção representativa de todo o conteúdo da amostra



14

## Injeção da Amostra

Eletrocinética:



$$\text{Injeção} = \frac{\text{Diferença de Potencial (V)}}{\Delta \text{ tempo}}$$

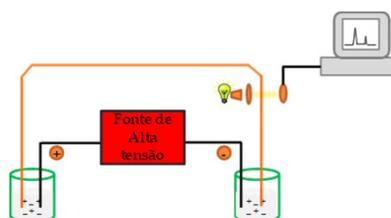
Exemplo: 20 kV / 5 s



15

## Sistemas de Detecção

UV-Vis (Detecção Direta e Indireta)  
Fluorescência  
Espectrômetro de Massas  
Condutividade / Amperométrico



Modo de detecção	Limite de Detecção (mol.L <sup>-1</sup> )
UV-Vis	10 <sup>-5</sup> - 10 <sup>-7</sup>
Fluorescência	10 <sup>-13</sup> - 10 <sup>-16</sup>
Espectrometria de Massas	10 <sup>-8</sup> - 10 <sup>-10</sup>
Amperométrico	10 <sup>-7</sup> - 10 <sup>-10</sup>
Condutométrico	10 <sup>-7</sup> - 10 <sup>-9</sup>



16

## Técnicas de Eletromigração em Capilar

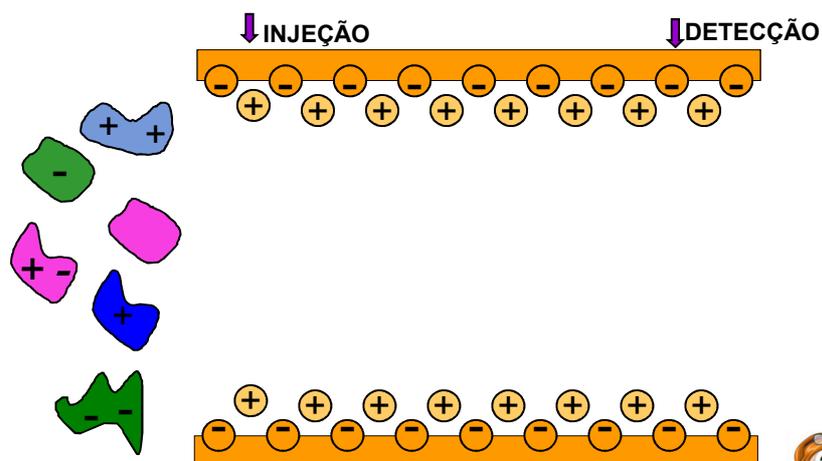
- Eletroforese Capilar de Zona (CZE) ou em Solução Livre (FSCE)
- Cromatografia Eletrocinética Micelar (MEKC)
- Cromatografia Eletrocinética em Microemulsão (MEEKC)
- Eletroforese Capilar de Afinidade (CAE)
- Eletroforese Capilar de Peneiramento (CSE)
- Eletroforese Capilar em Gel (CGE)
- Focalização Isoelétrica (CIEF)
- Isotacoforese Capilar (CITP)
- Eletrocromatografia Capilar (CEC)

RIEKKOLA, M.-L.; JÖNSSON, Jan Åke; SMITH, Roger M. Terminology for analytical capillary electromigration techniques (IUPAC Recommendations 2003). *Pure and Applied Chemistry*, v. 76, n. 2, p. 443-451, 2004.

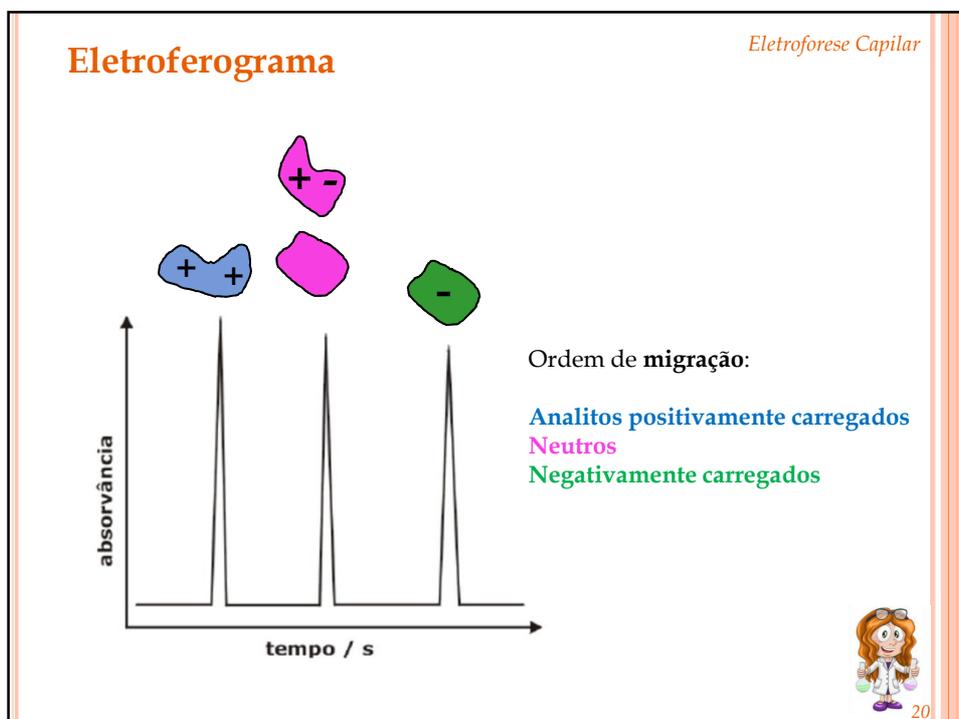
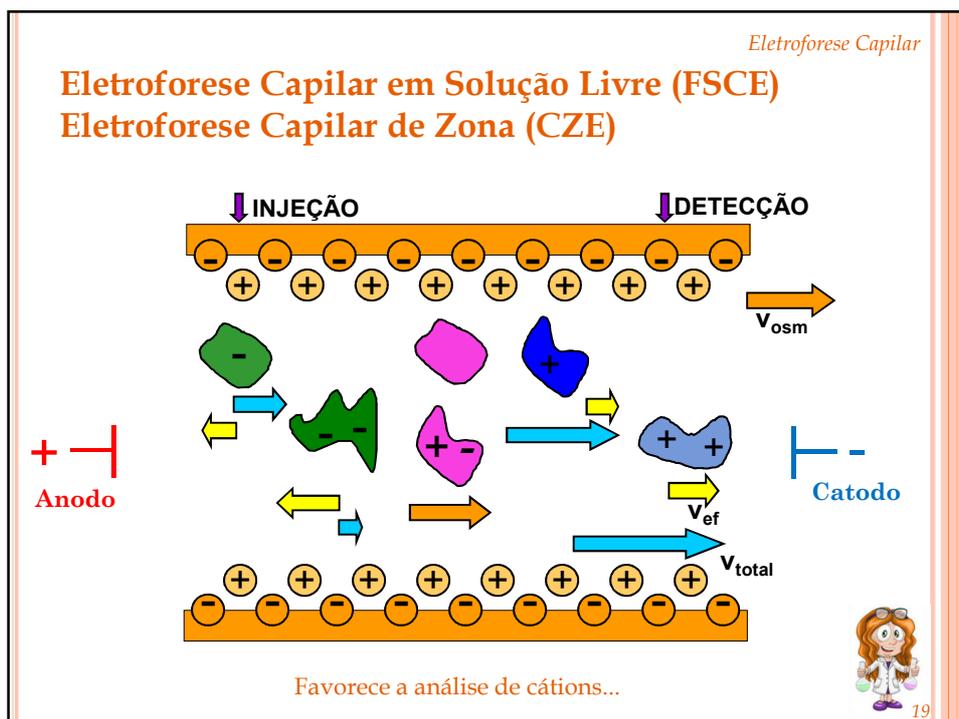


17

## Eletroforese Capilar em Solução Livre (FSCE) Eletroforese Capilar de Zona (CZE)



18



## Eletofórese Capilar de Zona (CZE)

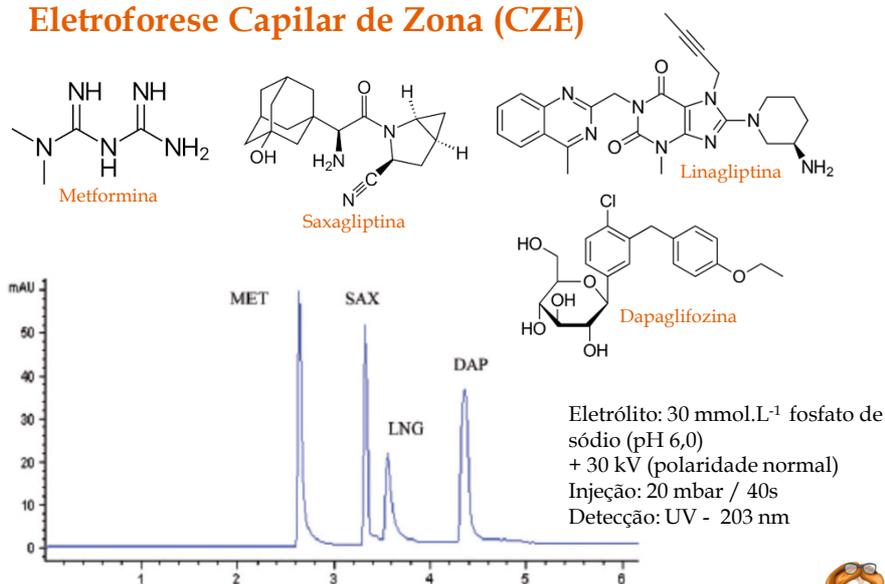


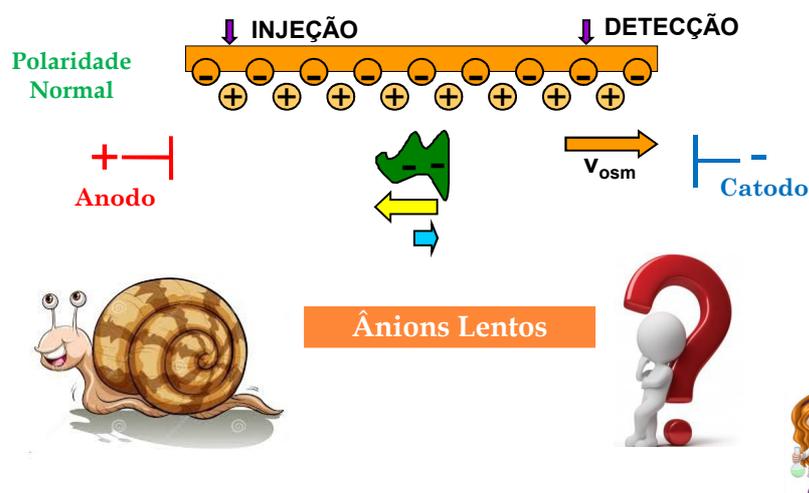
Figura adaptada de: MAHER, Hadir M. et al. Stability-indicating capillary electrophoresis method for the simultaneous determination of metformin hydrochloride, saxagliptin hydrochloride, and dapagliflozin in pharmaceutical tablets. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 42, n. 5-6, p. 161-171, 2019.

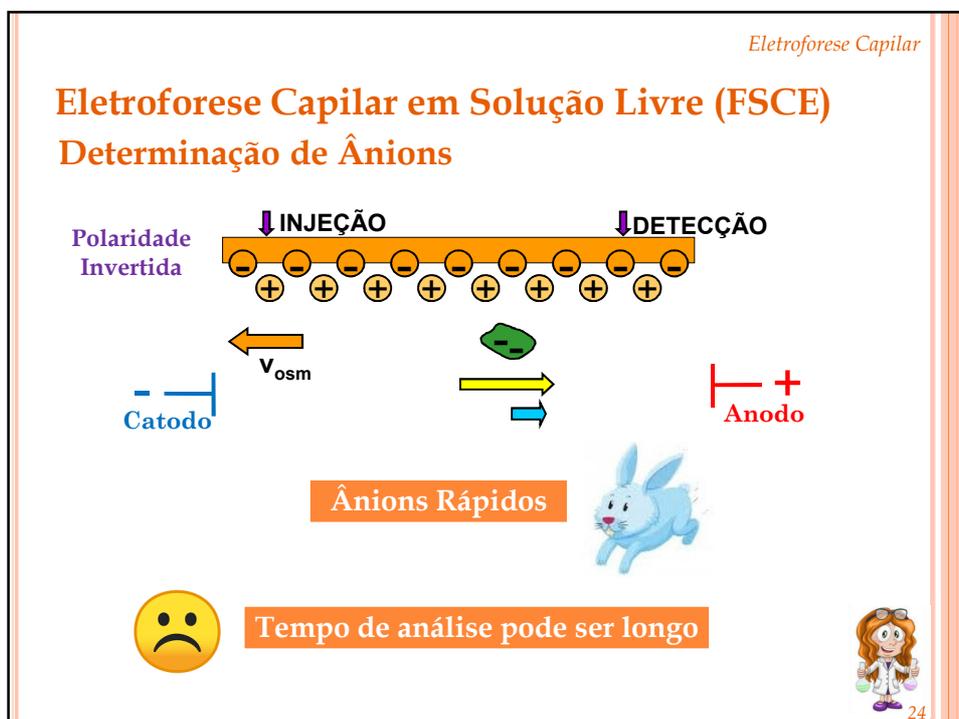
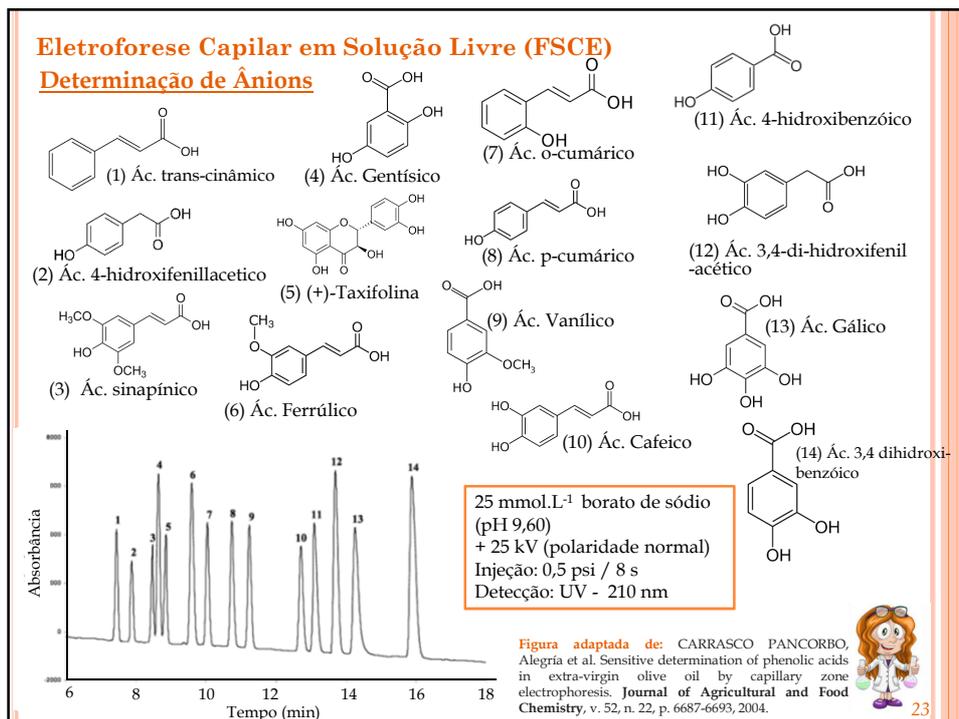


21

Eletofórese Capilar

## Eletofórese Capilar em Solução Livre (FSCE) Determinação de Ânions

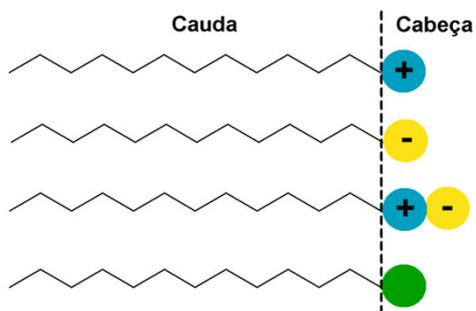




## Eletroforese Capilar em Solução Livre (FSCE) Fluxo Eletrosmótico Invertido

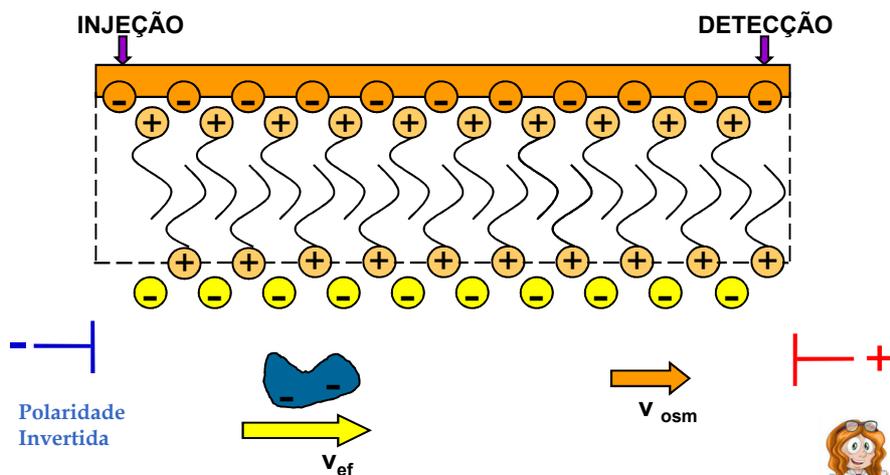
### Uso de Tensoativos

- Compostos anfifílicos
  - A mesma molécula possui grupamentos com caráter hidrofóbico e hidrofílico
- Grupo polar (aniônico ou catiônico) e uma cauda apolar (cadeia alifática)
- Podem ser **catiônicos**, **aniônicos**, **anfotéricos** ou **neutros**



25

## Eletroforese Capilar em Solução Livre (FSCE) Fluxo Eletrosmótico Invertido



26

## Eletroforese Capilar em Solução Livre (FSCE)

### Fluxo Eletrosmótico Invertido

- 1 - Br<sup>-</sup>
- 2 - NO<sub>3</sub><sup>-</sup>
- 3 - NO<sub>2</sub><sup>-</sup>
- 4 - I<sup>-</sup>
- 5 - SCN<sup>-</sup>

15 mmol.L<sup>-1</sup> fosfato de sódio (pH 8,0) + 0,5 mmol.L<sup>-1</sup> CTAC  
 + 60% (v/v) MeOH  
 - 15 kV (polaridade invertida)  
 Injeção: 0,5 psi / 2 s  
 Detecção: UV - 214 nm

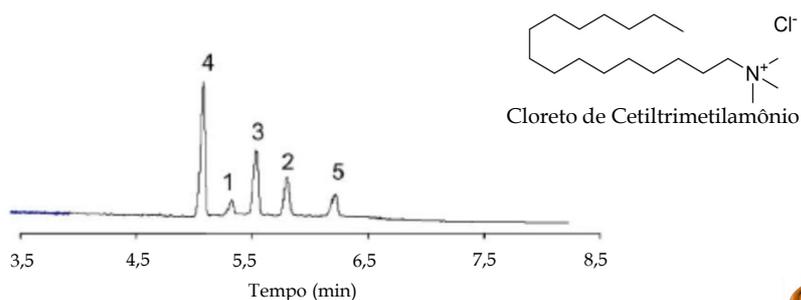


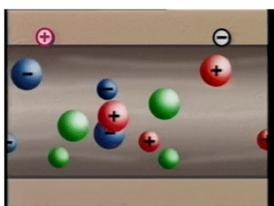
Figura adaptada de: DIRESS, Abebaw G.; LUCY, Charles A. Electroosmotic flow reversal for the determination of inorganic anions by capillary electrophoresis with methanol-water buffers. *Journal of Chromatography A*, v. 1027, n. 1-2, p. 185-191, 2004.



27

## Eletroforese Capilar em Solução Livre (FSCE)

- Técnica de Eletromigração em Capilar mais empregada
  - Permite a análise de solutos catiônicos e aniônicos em uma mesma corrida
- Possível a inversão do fluxo eletrosmótico para análise de ânions rápidos
  - **Seleção e Composição** do eletrólito são fundamentais para o sucesso da separação e detecção dos compostos



28

## Eletroforese Capilar em Solução Livre (FSCE) Sistemas tampão comumente usados

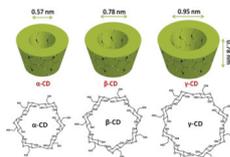
Tampão	pK <sub>a</sub>	Tampão	pK <sub>a</sub>
Fosfato	2,12	HEPES	7,55
Citrato	3,06	TRICINA	8,25
Acetato	4,75	TRIS	8,30
MES	6,15	Borato	9,24
Imidazol	7,00	CAPS	10,40
Fosfato	7,21		

MES: ácido 2-[N-morfolino] etanossulfônico; HEPES: ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N-2-etanossulfônico; TRICINA: N-[2-hidroximetil]etil]-glicina; TRIS: Tris(hidroxi metil)amino metano; CAPS: ácido 3-[ciclohexilamino]-1-propanossulfônico



29

## Uso de Aditivos



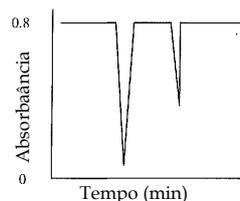
Aditivo	Uso
Ciclodextrinas	Separações quirais e como complexantes auxiliares na separação de compostos neutros.
Éter coroa	Separações quirais e como complexantes auxiliares na separação de cátions metálicos
Sais inorgânicos	Reduzem o fluxo eletrosmótico, alteram a conformação de proteínas e previnem a adsorção soluto-capilar.
Solventes orgânicos	Aumentam a solubilidade de solutos orgânicos. Reduzem interação soluto-capilar. Agentes modificadores do fluxo eletrosmótico.
Tensoativos catiônicos	Revertem o fluxo eletrosmótico
Ureia	Aumenta a solubilidade de proteínas



30

## Eletroforese Capilar em Solução Livre (FSCE) Detecção Indireta

- Analitos que não absorvem ou apresentam baixa absorção no UV-Vis



- Uso de um eletrólito cromóforo

- Principais analitos em que a detecção indireta é empregada:

**Cátions e alguns ânions inorgânicos**  
**Ácidos carboxílicos**  
**Aminoácidos**  
**Aminas de cadeia curta**



31

## Eletroforese Capilar em Solução Livre (FSCE) Detecção Indireta de Cátions Metálicos

Na<sup>+</sup>  
K<sup>+</sup>  
Ca<sup>2+</sup>  
Mg<sup>2+</sup>  
Pb<sup>2+</sup>  
NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

15 mmol.L<sup>-1</sup> imidazol (4,35) + 2 mmol.L<sup>-1</sup> éter  
18-coroa-6 + 8 mmol.L<sup>-1</sup> ác. malônico +  
10% (v/v) MeOH  
+ 25 kV (polaridade normal)  
Injeção eletrocinética : 5 kV / 5s  
**Detecção Indireta: UV - 214 nm**

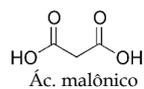
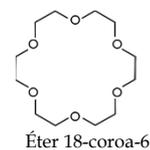
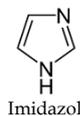
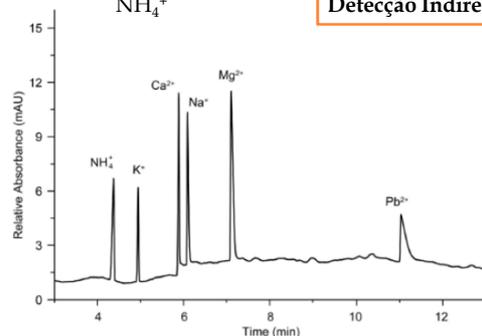


Figura adaptada de: VARDEN, Lara; BOU-ABDALLAH, Fadi. Detection and separation of inorganic cations in natural, potable, and wastewater samples using capillary zone electrophoresis with indirect UV detection. *American journal of analytical chemistry*, v. 8, n. 1, p. 81, 2017.

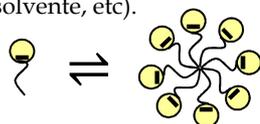
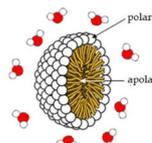


32

## Cromatografia Eletrocinética Micelar (MEKC)

Eletroforese Capilar em Solução Livre (FSCE) não separa solutos neutros 😞

- Inclusão no eletrólito de tensoativos em concentrações **acima da CMC** (Concentração Micelar Crítica)
- Sistema de 2 fases:
  - Fase primária: solução do eletrólito
  - Fase secundária (pseudo-estacionária): micelas
- Partição relativa entre as duas fases é responsável pela seletividade da separação
- A formação das micelas dependem de condições experimentais (temperatura, tipo de solvente, etc).



## Cromatografia Eletrocinética Micelar (MEKC)

Agente Tensoativo	CMC (mmol.L <sup>-1</sup> )	N
<b>Aniônico</b>		
SDS (Dodecil sulfato de sódio)	8,1	62
SOS (Octil sulfato de sódio)	136	20
<b>Catiônico</b>		
CTAC (Cloreto de hexadecil-trimetil-amônio)	1,3	78
DTAB (Brometo de dodecil-trimetil-amônio)	15	50
<b>Anfotérico</b>		
N-dodecil sultaina	1,2	-
<b>Não-iônico</b>		
Triton X-100 (Polioxietileno-t-octilfenol)	0,2	143
<b>Bile</b>		
Deoxicolato de sódio (NADC)	6,4	14



*Eletroforese Capilar*

## Cromatografia Eletrocinética Micelar (MEKC)

Cada soluto interage com uma região da micela

Eletrólito: 20 mmol.L<sup>-1</sup> Tetraborato de sódio (pH 9,2) + 20 mmol.L<sup>-1</sup> SDS

35

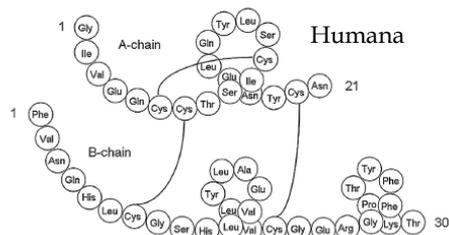
*Eletroforese Capilar*

## Cromatografia Eletrocinética Micelar (MEKC)

Vantagens	Limitações
Instrumentação igual à FSCE.	Geralmente, não pode ser usada para compostos com caráter fortemente apolar.
Pode ser usada para melhorar a separação de compostos iônicos.	Velocidade e volume efetivo da micela dependem das condições experimentais, o que pode causar baixa reprodutibilidade do tempo de migração.
Maior eficiência em comparação com técnicas cromatográficas similares	O uso é limitado a misturas pouco complexas.

36

## Cromatografia Eletrocinética Micelar (MEKC)



Insulina formada por 2 cadeias peptídicas ligadas por pontes de dissulfeto

Análogos da insulina diferem apenas por 1 ou 3 aminoácidos

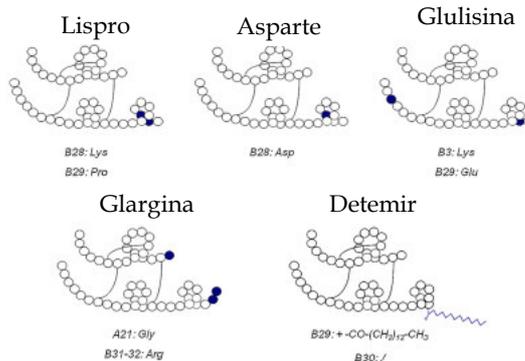
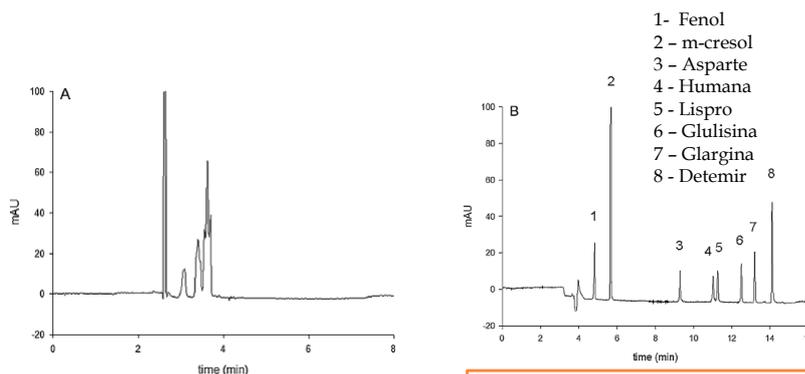


Figura adaptada de: LAMALLE, Caroline et al. Simultaneous determination of insulin and its analogues in pharmaceutical formulations by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 111, p. 344-350, 2015.



37

## Cromatografia Eletrocinética Micelar (MEKC)



50 mmol.L<sup>-1</sup> acetato de amônio (9,0)  
+ 20 kV (polaridade normal)  
Injeção : 50 mbar / 5s  
Detecção: UV - 200 nm

50 mmol.L<sup>-1</sup> acetato de amônio (9,0) +  
50 mmol.L<sup>-1</sup> SDS + 15 % (v/v) ACN  
+ 20 kV (polaridade normal)  
Injeção : 50 mbar / 5s  
Detecção: UV - 200 nm

Figura adaptada de: LAMALLE, Caroline et al. Simultaneous determination of insulin and its analogues in pharmaceutical formulations by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 111, p. 344-350, 2015.



38

## Técnicas de Eletromigração em Capilar



### Vantagens

- ✓ Alta frequência analítica
- ✓ Versatilidade
- ✓ **Diversidade de compostos (íons inorgânicos a biomoléculas)**
- ✓ Baixo consumo de amostras, reagentes e solventes
- ✓ Excelentes separações e resoluções
- ✓ Detecção *on line*

### Limitações

- ✓ Não se aplica a todos os compostos
- ✓ Compostos voláteis e fortemente apolares - mais adequados para Cromatografia Gasosa
- ✓ Limites de detecção e quantificação maiores comparados às outras técnicas de separação
- ✓ A instrumentação requer conhecimento e cuidado

