

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE FÍSICA

Eletroforese Capilar de Zona *

Tarso Benigno Ledur Kist

Dissertação realizada sob a orientação do Prof. Hans-Peter H. Grieneisen, apresentada ao Instituto de Física da UFRGS, em preenchimento parcial dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Física.

Porto Alegre

1993

*Trabalho parcialmente financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Hans-Peter pela orientação.
- Ao Prof. Dr. Carlos Termignoni do Centro de Biotecnologia pela coorientação.
- À Direção do Centro de Biotecnologia que propiciou e incentivou este trabalho interdisciplinar.
- Às Profas. Ruth Schneider e Adriana R. Pohlmann pela revisão de alguns capítulos e sugestões.
- Ao Ricardo Francke, Lisboa, Sílvio Cunha, Thomas Braun e demais Professores do Instituto pela dedicação na minha formação.
- Aos colegas Zé Carlos e David pelas estimulantes discussões.
- Aos colegas de sala e do laboratório pela afetuosa acolhida e pelas inúmeras vezes que me auxiliaram.
- Aos amigos e colegas da PPH.
- Aos amigos Flávio Costa e Rubens Carvalho que muito me incentivaram.
- À Zuleika Berto, chefe da biblioteca do Instituto de Física, pela revisão das referências.
- Aos funcionários do Instituto.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Hans-Peter pela orientação.
- Ao Prof. Dr. Carlos Termignoni do Centro de Biotecnologia pela coorientação.
- À Direção do Centro de Biotecnologia que propiciou e incentivou este trabalho interdisciplinar.
- Às Profas. Ruth Schneider e Adriana R. Pohlmann pela revisão de alguns capítulos e sugestões.
- Ao Ricardo Francke, Lisboa, Sílvio Cunha, Thomas Braun e demais Professores do Instituto pela dedicação na minha formação.
- Aos colegas Zé Carlos e David pelas estimulantes discussões.
- Aos colegas de sala e do laboratório pela afetuosa acolhida e pelas inúmeras vezes que me auxiliaram.
- Aos amigos e colegas da PPH.
- Aos amigos Flávio Costa e Rubens Carvalho que muito me incentivaram.
- À Zuleika Berto, chefe da biblioteca do Instituto de Física, pela revisão das referências.
- Aos funcionários do Instituto.

RESUMO

A aplicação de uma diferença de potencial entre os extremos de um capilar de material dielétrico, preenchido com solução aquosa, provoca um fluxo eletrosmótico através deste. As moléculas, de um pequeno volume de uma amostra injetada neste fluxo, se separam umas das outras devido a diferença entre suas mobilidades eletroforéticas. Este método de separação é conhecido como Eletroforese Capilar. Ele tem se mostrado muito eficiente na separação de moléculas orgânicas complexas e é um método complementar à Cromatografia Líquida. Os sistemas de detecção mais comumente utilizados são do tipo eletroquímico ou ópticos, estes últimos podem ser de absorção ou fluorimétricos. Alta sensibilidade tem sido obtida com sistemas de detecção com fluorescência induzida a laser, como o de Argônio, Hélio-Cádmio e de semiconductor. Neste trabalho testamos o desempenho de um laser ultravioleta pulsado, usando o mini-laser de N_2 (337 nm), para induzir a fluorescência em moléculas marcadas com marcadores moleculares fluorogênicos apropriados. Para aminoácidos obtivemos limites de detecção da ordem de alguns *attomóis* (10^{-18} mol). Em condições otimizadas a quantidade mínima detectável de melatonina e serotonina, usando o marcador molecular fluorogênico isotiocianato de fluoresceína, foi de 150 *attomóis*, que corresponde a um limite de detecção em concentração de 50 nM. Os peptídeos bradicinina, lisil-bradicinina e metionil-lisil-bradicinina foram separados entre si e detectados no limite de detecção em concentração de 1,2 *fmóis* quando marcados com fluorescamina e a 90 *attomóis* quando com *orto*-ftaldialdeído. Do nosso conhecimento, esta é a primeira vez que um laser pulsado (N_2) é usado num sistema de detecção de eletroforese capilar.

ABSTRACT

The application of an electrical potential difference between the ends of a dielectric capillary, filled with an aqueous solution, causes a constant electroosmotic flow through it. Molecules, within a small sample volume (n l) injected into this stream, undergo a spatial separation according to their different electrophoretic mobilities. This separation process is known as Capillary Electrophoresis. It has emerged as a powerful method to separate complex organic molecules and has become a complementary method to High Performance Liquid Chromatography. The detection systems are based either on electrochemical or optical methods, latter including absorption or fluorescence. The cw laser induced fluorescence detectors have been shown to achieve high sensitivity, such as Argon-ion, Helium-Cadmium and semiconductor lasers. In this work we tested the performance of an pulsed ultraviolet laser using a mini-N₂ laser (337 nm) to induce fluorescence in molecules derivatized with a suitable fluorogenic tag. Low detection limits for aminoacids in the range of a few *attomols* (10^{-18} mol) were obtained. Under optimized conditions the minimum detectable quantities of fluorescein isotiocyanate labeled melatonin and serotonin were 150 *attomols*, corresponding to a concentration detection limit of 50 nM. The peptides bradykinin, lysil-bradykinin and methionil-lysil-bradykinin have been separated and detected at a detection limit of about 1.2 *fmols* when labeled with fluorescamine and at 90 *attomols* when labeled with *ortho*-phthaldialdehyde. To our knowledge this is the first time that a pulsed laser (N₂) has been used in a fluorescence detector for capillary electrophoresis.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	8
2	DUPLA CAMADA ELÉTRICA	10
2.1	Equação de Poisson-Boltzmann	10
2.2	Eletrosmose	14
2.3	Potencial Zeta	18
3	DIFUSÃO E RESOLUÇÃO	21
3.1	Equação da Difusão	21
3.2	Difusão Molecular em um Capilar	24
3.3	Mobilidade Eletroforética, Número de Pratos Teóricos e Resolução	26
4	ELETROFORESE CAPILAR	28
4.1	Arranjo Experimental	28
4.1.1	Colunas Capilares	31
4.1.2	Detecção	34
4.1.3	Sistema de Aquisição e Tratamento de Dados	43
4.2	Procedimento Experimental	43

4.2.1	Marcadores Moleculares Fluorescentes	44
4.2.2	Introdução da Amostra	47
4.2.3	Condições Gerais de Operação	48
4.2.4	Calibração	49
5	APLICAÇÕES NA SEPARAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS	52
5.1	Aminoácidos	52
5.2	Peptídeos	58
5.3	Neurotransmissores	61
6	CONCLUSÃO	64
7	REFERÊNCIAS	66

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

A aplicação de uma diferença de potencial elétrico entre os extremos de um capilar de material dielétrico, preenchido com solução aquosa, ocasiona um fluxo eletrosmótico através deste. A eletrosmose em capilares finos apresenta, em certas condições, um escoamento laminar e um perfil de velocidades constante em praticamente toda sua secção transversal. O campo elétrico aplicado que promove a eletrosmose ocasiona também a eletroforese das moléculas introduzidas na coluna. Desta forma, várias zonas surgem separadas umas das outras e cuja separação da zona original depende principalmente da viscosidade do meio, das cargas médias das moléculas e do volume hidrodinâmico das mesmas. Este método de separação, conhecido como Eletroforese Capilar de Zona e introduzido em 1981 por Jorgenson e Lukacs [1] apresenta muito boa eficiência na separação de moléculas e macromoléculas, principalmente para as de origem biológica. A referência [2], que é o segundo artigo de revisão sobre o assunto, mostra a ampla gama de aplicações possíveis.

A principal motivação que nos levou a estudar a eletroforese capilar é que, além de ser um assunto relativamente novo, ela apresenta problemas muito interessantes sob o ponto de vista da física, alguns ainda não completamente elucidados. E já que somos o primeiro grupo [3] desenvolvendo um sistema de detecção com laser de N_2 para a mesma, elegemos os seguintes objetivos principais neste trabalho:

- Apresentar alguns modelos e também resultados experimentais concernentes à distribuição de íons na interface dielétrico-líquido e seu papel na eletrosmose.
- Efetuar o tratamento quantitativo da difusão molecular em um líquido que preenche um capilar fino levando em conta a segunda lei de Fick e seu papel na eficiência de separação e resolução.
- Construir um protótipo da técnica de Eletroforese Capilar de Zona e desenvolver um

sistema de detecção baseado na fluorescência induzida por um laser ultravioleta pulsado (N_2).

- Aplicar a técnica mediante interação interdisciplinar.

Para tanto, começamos por apresentar no capítulo 2 alguns modelos que pretendem descrever a distribuição de íons que ocorre nas interfaces dielétrico-líquidos e a eletroosmose, que é um efeito decorrente desse deslocamento de cargas. No capítulo 3 apresentamos a 1ª e 2ª lei de Fick, a função de Green para a equação da difusão e a evolução temporal do perfil de concentração para uma situação bem típica. Na última secção deste mesmo capítulo apresentamos também alguns conceitos e definições relacionados à difusão e aos métodos de separação. No capítulo 4 expomos a técnica em si e o procedimento experimental adotado. E finalmente, no capítulo 5 relatamos os resultados obtidos na separação e os limites de detecção para aminoácidos, peptídeos e neurotransmissores.

Capítulo 2

DUPLA CAMADA ELÉTRICA

2.1 Equação de Poisson-Boltzmann

É bem conhecido [4] que quando duas fases distintas são postas em contato geralmente surge uma diferença de potencial entre elas. Um exemplo particular é o de um dielétrico que, quando posto em contato com um líquido polar (por exemplo água), adquire uma carga superficial, ou melhor, uma densidade superficial de cargas na interface dielétrico-líquido polar. Exemplos de materiais dielétricos que em contato com água ou soluções aquosas sofrem este processo de deslocamento de cargas são: bolhas de ar e outros gases, muitos óleos, o quartzo, etc... A densidade superficial de cargas gerada na interface depende da natureza do dielétrico, da natureza da solução e da temperatura do sistema. Uma densidade superficial de cargas negativas é estabelecida quando, por exemplo, quartzo amorfo (sílica fundida) é posto em contato com uma solução aquosa qualquer, como mostra a figura 2.1. A camada de íons negativos se encontra bem localizada na interface, ao passo que os íons da solução, devido a mobilidade e a custa da energia térmica, se redistribuem e seguem uma distribuição que é dada pela lei de Boltzmann. Os principais mecanismos que contribuem neste deslocamento de cargas são a ionização, a adsorção de íons e a dissolução de íons. O nosso propósito aqui não é discutir estes mecanismos em si, mas apresentar o tratamento quantitativo da distribuição dos íons e do potencial elétrico no interior da solução aquosa e, finalmente, poder determinar a dependência da “mobilidade eletrosmótica” e do “potencial zeta” com algumas variáveis termodinâmicas.

As primeiras soluções analíticas para o potencial elétrico e a distribuição de cargas próximo à interface no líquido se deve a Smoluchowski [5], Gouy [6], Chapman [7] e Debye e Hückel [8]. Apresentamos aqui o modelo conhecido como modelo de Gouy-Chapman. Este modelo consiste no seguinte:

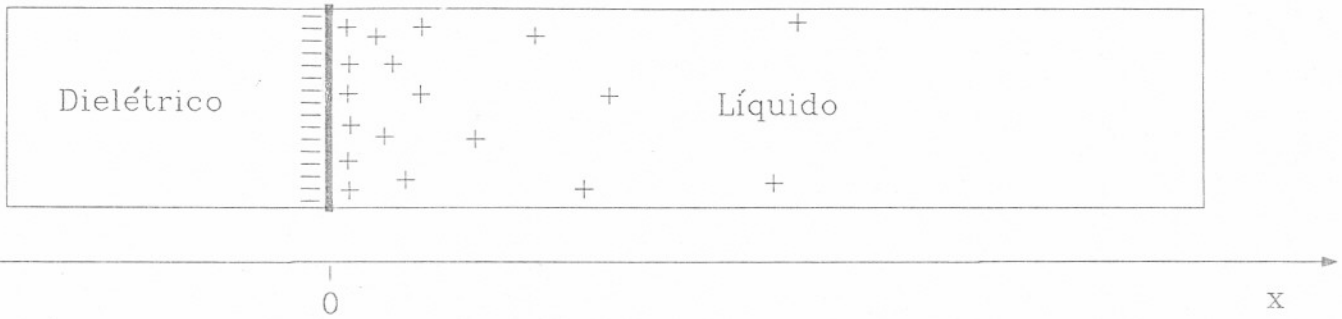


Figura 2.1: Uma representação bem esquemática da densidade volumétrica de cargas resultante nas imediações de uma interface quartzo amorfo-solução aquosa devido ao deslocamento de cargas.

- Considera-se os íons localizados no interior da solução aquosa como cargas pontiformes.
- A permissividade elétrica do líquido independe da posição, ou seja, possui o mesmo valor sobre todos os pontos do volume do líquido.
- A superfície de separação é considerada perfeitamente plana, de extensão infinita e uniformemente carregada.
- O único trabalho para trazer um íon de carga Ze de um ponto afastado da superfície onde o potencial é nulo até a posição x , onde o potencial é $\Psi = \Psi(x)$, é o trabalho elétrico $Ze\Psi(x)$.
- Os íons são simétricos, ou seja, o eletrólito é do tipo $M^{+z}X^{-z}$.
- A distribuição dos íons segue a lei de Boltzmann.

Se o potencial elétrico for Ψ_0 na superfície onde $x = 0$ e $\Psi(x)$ a uma distância x da superfície, então aplicando-se a lei de Boltzmann resulta

$$n_+ = n_o \exp\left(\frac{-Ze\Psi}{kT}\right)$$

$$n_- = n_o \exp\left(\frac{+Ze\Psi}{kT}\right)$$

onde $n_- = n_-(x)$ e $n_+ = n_+(x)$ são os respectivos números de íons negativos e positivos por unidade de volume e n_o é a concentração de cada tipo de íon nos pontos afastados da superfície, isto é, quando $x \rightarrow \infty$. T é a temperatura do sistema, k é a constante de

Boltzmann e e é a carga elementar ($1,6 \times 10^{-19}$ C). A densidade volumétrica de cargas será dada por

$$\rho = Ze(n_+ - n_-)$$

$$\rho = Zen_o \left[\exp\left(\frac{-Ze\Psi}{kT}\right) - \exp\left(\frac{+Ze\Psi}{kT}\right) \right]$$

$$\rho = -2Zen_o \sinh\left(\frac{Ze\Psi}{kT}\right). \quad (2.1)$$

Por outro lado, $\rho(x)$ está relacionado à $\Psi(x)$ mediante a equação de Poisson

$$\nabla^2\Psi = -\frac{\rho}{\epsilon}, \quad (2.2)$$

onde ϵ é a permissividade elétrica do meio em consideração.

Combinando as equações (2.1) e (2.2) e levando em conta ainda que o problema é unidimensional, obtém-se

$$\frac{d^2\Psi}{dx^2} = \frac{2Zen_o}{\epsilon} \sinh\left(\frac{Ze\Psi}{kT}\right). \quad (2.3)$$

Esta é a equação de Poisson-Boltzmann. A solução desta equação com as condições de contorno $\Psi(0) = \Psi_o$ e $\frac{d\Psi}{dx} = 0$ quando $x \rightarrow \infty$ é amplamente discutida na literatura [4] e [9-11], e tem a seguinte forma

$$\Psi(x) = \frac{2kT}{Ze} \ln\left(\frac{1 + \gamma \exp[-\kappa x]}{1 - \gamma \exp[-\kappa x]}\right), \quad (2.4)$$

onde

$$\gamma = \frac{\exp(Ze\Psi_o/2kT) - 1}{\exp(Ze\Psi_o/2kT) + 1} = \tanh\left(\frac{Ze\Psi_o}{4kT}\right)$$

e

$$\kappa = \sqrt{\left(\frac{2Z^2 e^2 n_o}{\epsilon k T}\right)} \quad (2.5)$$

são constantes. A constante κ é denominada de “inverso da espessura da dupla camada elétrica” porque a extensão física dos efeitos elétricos devido ao deslocamento de cargas é proporcional a magnitude do inverso desta constante. A forma das funções $\Psi(x)$, $n_+(x)$ e $n_-(x)$ é mostrada na figura 2.2.

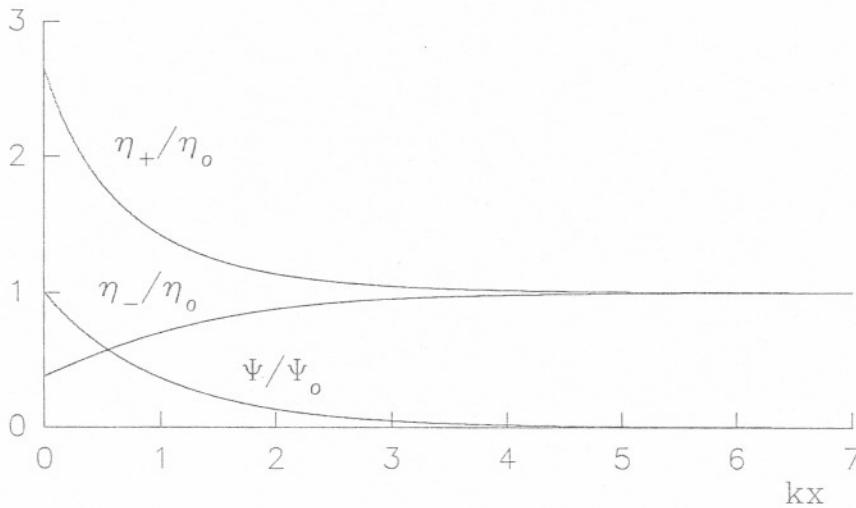


Figura 2.2: As curvas mostram a forma da função potencial elétrico no interior da solução bem como a concentração dos íons negativos e positivos a partir da superfície para uma situação bem típica: $Z = 1$ e $\Psi_o = -25$ mV.

Se $\frac{Ze\Psi_o}{2kT} \ll 1$, então pode-se fazer a aproximação

$$\exp\left(\frac{Ze\Psi_o}{2kT}\right) \simeq 1 + \frac{Ze\Psi_o}{2kT},$$

e a expressão (2.4), solução da equação de Poisson-Boltzmann (2.3), se simplifica

$$\Psi \simeq \Psi_o \exp(-\kappa x), \quad (2.6)$$

e mostra um decrescimento aproximadamente exponencial para o potencial elétrico a partir da superfície.

A densidade superficial de cargas σ_o deve ser compensada pela carga líquida da solução, isto é

$$\sigma_o = - \int_0^{\infty} \rho dx ,$$

o que resulta em

$$\sigma_o = \sqrt{8n_o \epsilon kT} \sinh \left(\frac{Ze\Psi_o}{2kT} \right) \quad (2.7)$$

ou

$$\sigma_o = \frac{4Zn_o e}{\kappa} \sinh \left(\frac{Ze\Psi_o}{2kT} \right) ,$$

e que a potenciais baixos se reduz a

$$\sigma_o = \epsilon \kappa \Psi_o \propto Z \sqrt{\frac{n_o}{T}} \Psi_o , \quad (2.8)$$

Estas equações fornecem a relação entre σ_o e Ψ_o .

2.2 Eletroosmose

O tratamento quantitativo dado acima para obter $\rho(x)$ e $\Psi(x)$ foi analiticamente exato, pois trata-se de um dielétrico plano e infinito. Para a situação de um dielétrico com uma cavidade cilíndrica de raio $r = a$ preenchido com líquido, pode-se reescrever a equação de Poisson (2.2) como

$$\frac{1}{r} \frac{d}{dr} \left(r \frac{d\Psi(r)}{dr} \right) = - \frac{\rho(r)}{\epsilon} , \quad (2.9)$$

onde r é a distância radial a partir do eixo de simetria. Neste sistema de coordenadas (cilíndricas) e devido a simetria, Ψ e ρ só dependem de r . A equação (2.1) fica inalterada

$$\rho(r) = -2Zen_o \sinh \left(\frac{Ze\Psi(r)}{kT} \right) , \quad (2.10)$$

com a ressalva de que agora $\rho = \rho(r)$ e $\Psi = \Psi(r)$. Se o argumento $\frac{Ze\Psi}{kT}$ for pequeno, então

$$\sinh \left(\frac{Ze\Psi}{kT} \right) \approx \frac{Ze\Psi}{kT} . \quad (2.11)$$

Quando $\Psi = 25 \text{ mV}$, $\frac{e\Psi}{kT} \approx 1$, de forma que a aproximação acima só é aplicável para valores menores. Neste caso a equação (2.9) simplifica assumindo a forma

$$\frac{1}{r} \frac{d}{dr} \left(r \frac{d\Psi}{dr} \right) = \kappa^2 \Psi, \quad (2.12)$$

onde κ é o definido em (2.5). Esta aproximação é conhecida como aproximação de Debye-Hückel. A solução de (2.12) deve ser finita em $r = 0$, logo

$$\Psi(r) = BI_o(\kappa r), \quad (2.13)$$

onde I_o é a função de Bessel modificada de primeira espécie de ordem zero [12]. Em $r = a$ a condição é $\Psi(a) = \Psi_o$, e portanto

$$\Psi(r) = \Psi_o \frac{I_o(\kappa r)}{I_o(\kappa a)}, \quad (2.14)$$

e a densidade volumétrica de cargas será

$$\rho(r) = -\epsilon \kappa^2 \Psi(r) = -\epsilon \kappa^2 \Psi_o \frac{I_o(\kappa r)}{I_o(\kappa a)}. \quad (2.15)$$

De posse das expressões de $\Psi(r)$ e de $\rho(r)$ vamos agora analisar a dinâmica de um fluido que preenche uma cavidade cilíndrica quando se aplica um gradiente de potencial elétrico ($\nabla\phi$) e um gradiente de pressão (∇P) axial, ou seja, paralelamente ao eixo de simetria da cavidade. Nestas condições

$$\nabla\phi = -\vec{E} = -E\vec{e}_z$$

e

$$\nabla P = \frac{dP}{dz} \vec{e}_z,$$

onde \vec{e}_z é um vetor unitário que aponta no sentido positivo da coordenada z . Consequentemente, espera-se que as linhas de corrente do fluido também sejam axiais, ou seja

$$\vec{v} = v_z(r)\vec{e}_z$$

com

$$v_r = v_\phi = 0.$$

A equação de movimento de um fluido viscoso isotrópico, na aproximação linear para os efeitos viscosos e com coeficientes de viscosidade (η e ξ) constantes, é

$$\rho \left[\frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + (\vec{v} \cdot \nabla) \vec{v} \right] = -\nabla P + \eta \nabla^2 \vec{v} + (\xi + \eta/3) \nabla(\nabla \cdot \vec{v}).$$

Se o fluido pode ser considerado incompressível então $\nabla \cdot \vec{v} = 0$. Adicionando-se ainda o termo de força por unidade de volume (\vec{F}) devido a ação do campo \vec{E} sobre a distribuição de cargas $\rho(r)$ resulta

$$\rho \left[\frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + (\vec{v} \cdot \nabla) \vec{v} \right] = -\nabla P + \eta \nabla^2 \vec{v} - \vec{F}. \quad (2.16)$$

Esta é a equação de Navier-Stokes com um termo de força externa. Estamos interessados no regime estacionário com $\frac{\partial \vec{v}}{\partial t} = 0$. Devido a simetria cilíndrica do problema o termo $(\vec{v} \cdot \nabla) \vec{v}$ também se anula, resultando

$$\frac{1}{r} \frac{d}{dr} \left(r \frac{dv_z}{dr} \right) = \frac{1}{\eta} \frac{dP}{dz} - \frac{F_z}{\eta}. \quad (2.17)$$

Usando $-\frac{dP}{dz} = P_z$, sendo P_z o gradiente de pressão aplicado uniformemente ao longo do cilindro e F_z a força resultante da ação do campo elétrico aplicado, E_z , sobre a distribuição de cargas $\rho(r)$. Reescrevendo a equação (2.17) e usando (2.15) resulta

$$\frac{d^2 v_z}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{dv_z}{dr} = -\frac{P_z}{\eta} + \frac{E_z \epsilon \kappa^2 \Psi_o}{\eta} \frac{I_o(\kappa r)}{I_o(\kappa a)}. \quad (2.18)$$

Usando a condição de que P e v_z devem ser finitos em todos os pontos e supondo que

$$v_z(a) = \left(\frac{dv_z}{dr} \right)_{r=0} = 0, \quad (2.19)$$

obtem-se como solução

$$v_z(r) = \frac{P_z}{4\eta} (a^2 - r^2) - \frac{E_z \epsilon \Psi_o}{\eta} \left[1 - \frac{I_o(\kappa r)}{I_o(\kappa a)} \right]. \quad (2.20)$$

Observa-se que v_z é a soma de dois termos: um termo de Poiseuille e um termo denominado eletrocinético. Este é o principal resultado desta seção. Na figura 2.3 é mostrado o perfil de velocidades no interior da coluna para as situações $P_z < 0$, $P_z = 0$ e $P_z > 0$.

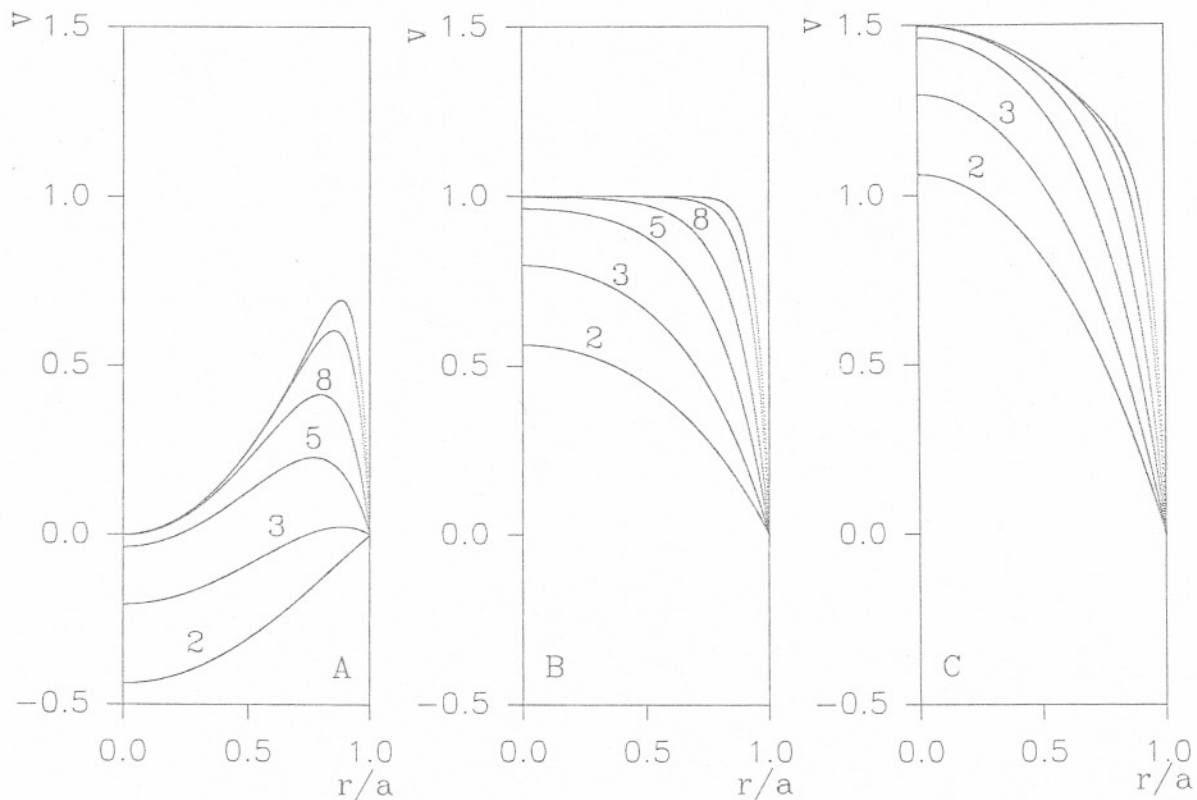


Figura 2.3: Estes gráficos mostram o perfil de velocidade do fluido calculado para as mais variadas situações. Os números sobre as curvas indicam o valor de κa correspondente, a é o raio da cavidade e κ é definido como o inverso da espessura da dupla camada elétrica. Em todos $v = v_z(r)/(E_z \epsilon \Psi_0 / \eta)$ e $E_z = -\eta / \epsilon \Psi_0$. Na figura (A) $P_z = -4\eta/a^2 < 0$, em (B) $P_z = 0$ e em (C) $P_z = 2\eta/a^2 > 0$.

Os números sobre as curvas indicam o valor de κa correspondente. A constante κ é dada por (2.5) e a equação (2.6) mostra que o potencial elétrico decai exponencialmente com κx no interior da solução. Para um capilar de raio interno igual a $a = 25 \mu\text{m}$ e colocando $Z = 2$, $\epsilon = 80\epsilon_0$, $n_0 = 10^{23}$ e $T = 298 \text{ K}$, resulta $\kappa a = 2096$.

Quando $P_z = 0$ e $\kappa a \gg 1$ o perfil de velocidades é constante em praticamente todos os

pontos da coluna, exceto nos pontos extremamente próximos à parede. Esta velocidade, constante em quase todos os pontos da secção transversal da coluna de líquido, é igual à velocidade no centro da coluna (v_{eo}) chamada “velocidade eletrosmótica” e que é dada por:

$$v_{eo} \equiv v_z(0) \simeq \frac{E_z \epsilon \Psi_o}{\eta} .$$

A “mobilidade eletrosmótica” (μ_{eo}) é definida como

$$\mu_{eo} \equiv \frac{v_{eo}}{E_z} \simeq \frac{\epsilon \Psi_o}{\eta} .$$

O objetivo desta secção foi mostrar que um escoamento laminar de líquido e com a mesma velocidade em toda secção transversal de um capilar é possível em determinadas situações ($P_z = 0$ e $\kappa a \gg 1$). Uma garantia para o regime de escoamento não turbulento é quando a constante de Reynolds (R), para um fluido se deslocando em um cilindro, for menor que 10. Na situação em que se tem água se deslocando na velocidade de $v = 0,001$ m/s no interior de um capilar com diâmetro interno de $d=50 \mu\text{m}$ resulta

$$R = \frac{\rho_m v d}{\eta} = 0,05 \ll 10 ,$$

onde ρ_m é a massa específica e η é a viscosidade. A viscosidade específica da água a 20°C vale $\frac{\eta}{\rho_m} = 10^{-6}$. Nestas condições [13] qualquer turbulência que iniciar rapidamente se extinguirá com o tempo. Nos capítulos 4 e 5 veremos que este regime de escoamento é fundamental na aplicação da técnica na separação de moléculas.

2.3 Potencial Zeta

Os resultados da secção anterior foram obtidos usando-se a aproximação (2.11)

$$\sinh\left(\frac{Ze\Psi}{kT}\right) \simeq \frac{Ze\Psi}{kT} .$$

Mas além desta, uma outra sutil suposição foi feita na condição de contorno (2.19) e que experimentalmente não é verdadeira. A suposição foi

$$v_z(a) = 0 .$$

Os resultados experimentais, referências [4] e [14], indicam que o plano de cisalhamento se dá em um ponto situado a alguns nanômetros da superfície do dielétrico. Neste ponto o potencial não é mais Ψ_o , mas ζ . Um modelo um pouco mais realista introduzido por Stern [15], e que Hunter [4] refere como o modelo de Gouy-Chapman-Stern, supõe que, devido a forças de natureza eletrostática entre os íons e forças de Van der Waals, forma-se uma camada imóvel de espessura δ composta por íons e moléculas da solução aderidos à superfície do dielétrico. Desta forma, a equação de Poisson-Boltzmann (2.3) será satisfeita para $x > \delta$, mas não necessariamente no intervalo $0 < x < \delta$, pois neste último a microscopia da descrição deve ser outra.

Não vamos nos ater ao estudo desta camada de íons e moléculas imóveis e nem na forma da função potencial elétrico $\Psi(x)$ no intervalo $0 < x < \delta$, mas vamos determinar, agora exatamente, uma expressão para a velocidade eletrosmótica $v_z(0)$. Veremos mais adiante que a velocidade total das zonas é soma da velocidade eletrosmótica mais a velocidade eletroforética.

Partindo da equação (2.17) com $P_z = 0$, temos:

$$\frac{1}{r} \frac{d}{dr} \left(r \frac{dv_z}{dr} \right) = -\frac{F_z}{\eta} , \quad (2.21)$$

onde, novamente, F_z é a força resultante da ação do campo E_z sobre a distribuição de cargas $\rho(r)$, ou seja

$$\frac{1}{r} \frac{d}{dr} \left(r \frac{dv_z}{dr} \right) = -\frac{E_z}{\eta} \rho(r) . \quad (2.22)$$

Mas da equação de Poisson-Boltzmann (2.9) temos que

$$\rho(r) = -\epsilon \frac{1}{r} \frac{d}{dr} \left(r \frac{d\Psi}{dr} \right) . \quad (2.23)$$

Assim,

$$\frac{d}{dr} \left(r \frac{dv_z}{dr} \right) = \frac{\epsilon E_z}{\eta} \frac{d}{dr} \left(r \frac{d\Psi(r)}{dr} \right) . \quad (2.24)$$

Esta equação pode ser integrada duas vezes de $r = 0$, onde $\Psi(0) = 0$ e $v_z(0) = v_{eo}$, até o plano de cisalhamento onde $\Psi(a - \delta) = \zeta$ e $v_z(a - \delta) = 0$. Usando para a primeira integração o fato de que $\left[\frac{d\Psi}{dr}\right]_{r=0}$ e $\left[\frac{dv_z}{dr}\right]_{r=0}$ são nulos, resulta

$$v_{eo} = -\frac{\epsilon\zeta E_z}{\eta} \quad (2.25)$$

ou

$$\zeta = -\frac{\eta v_{eo}}{\epsilon E_z} \quad (2.26)$$

e

$$\mu_{eo} = -\frac{\epsilon\zeta}{\eta} \quad (2.27)$$

As variáveis η , v_{eo} , ϵ e E_z são experimentalmente mensuráveis, portanto o potencial ζ pode ser determinado. A equação (2.27) é conhecida como equação de Smoluchowski.

O potencial ζ é amplamente citado na literatura especializada na Físico-Química das interfaces [4], pois os efeitos “eletrocínéticos” dependem diretamente do potencial ζ .

No capítulo 4 vamos nos referir às expressões (2.8), (2.25), (2.26) e (2.27) deste capítulo para compará-las com os resultados experimentais.

E para concluir este capítulo cabe a observação de que não tivemos a pretensão de exaurir o assunto e certamente muitos trabalhos importantes nem sequer foram citados. Apresentamos os principais conceitos relacionados às duplas camadas elétricas interfaciais e os modelos de “Gouy-Chapman” e “Gouy-Chapman-Stern”. Demos especial enfoque na determinação de uma expressão para a mobilidade eletroosmótica na situação em que o gradiente de pressão ao longo da coluna é nulo.

No capítulo seguinte, vamos considerar a difusão molecular, que é um outro processo físico muito importante na eletroforese capilar.

Capítulo 3

DIFUSÃO E RESOLUÇÃO

3.1 Equação da Difusão

Neste capítulo efetuaremos alguns tratamentos quantitativos da difusão de átomos e moléculas em um líquido estacionário. Por líquido estacionário entendemos o seguinte: mesmo que o líquido se mova em relação a um referencial qualquer o seu escoamento é laminar e com a mesma velocidade em praticamente todos os pontos, como mostra a figura 2.3, na situação em que $P_z = 0$ e $\kappa a \gg 1$. Vamos considerar também que a espécie difundente se encontra bastante diluída, desta forma as propriedades físicas do meio se mantêm inalteradas. Assim, o mecanismo de difusão predominante é o devido ao movimento Browniano e não à convecção ou outros processos. Esta forma de difusão é também denominada auto-difusão [16].

Para uma apresentação inicial da difusão vamos tomar como exemplo átomos ou moléculas que se encontram dissolvidos em um meio. A distribuição de massa ou molar destes em um determinado instante de tempo t é dada por $c(\vec{r}, t)$, sendo que as unidades de c podem ser [massa/volume] ou [móis/volume]. A concentração ou densidade volumétrica de massa c no ponto \vec{r} e no tempo t é determinada fazendo-se a razão entre o número de móis n existentes no volume v_p (no tempo t e centrado em \vec{r}) dividido por v_p . Uma observação: o volume v_p deve ser suficientemente grande de forma a evitar as flutuações estatísticas da concentração promovidas pela energia térmica do meio e deve ser pequeno de forma que $v_p \ll V_G$, onde V_G é o volume total do sistema.

Se não houver forças externas atuando sobre as espécies difundentes então, devido a aleatoriedade do movimento e puramente devido a um efeito de média estatística, veremos que as regiões com concentrações mais altas ficam menos concentradas à medida que o tempo passa, enquanto que as com concentrações mais baixas tornam-se mais concen-

tradas. Após um tempo suficientemente longo a concentração tenderá assintoticamente a um valor que será constante sobre todo o volume do meio. Esta tendência é chamada também de maximização da entropia.

Definiremos a densidade de corrente de moléculas (J_1) como sendo o número médio de moléculas que cruzam uma unidade de área de um plano por unidade de tempo. Se c é constante sobre todos os pontos de um volume digamos v_p , espera-se que $J_1 = 0$. Mas se c não é constante então, numa boa aproximação, J_1 deve ser proporcional ao gradiente de concentração na direção (x_1) ortogonal ao plano, ou seja

$$J_1 \propto -\frac{\partial c}{\partial x_1}.$$

A expressão acima pode ser deduzida para a difusão de um gás ideal "A" num meio formado por um gás ideal "B" usando-se a teoria cinética dos gases [17]. Em três dimensões teremos

$$\vec{J}(\vec{r}, t) = -\vec{a} \cdot \vec{\nabla} c(\vec{r}, t). \quad (3.1)$$

Esta é a primeira lei de Fick [18], onde \vec{a} é o tensor de ordem dois de difusão e depende das características físicas do meio. Se levarmos em conta ainda que a espécie difundente é estável e que não existem fontes e nem sumidouros da mesma então c satisfaz a equação da continuidade

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -\vec{\nabla} \cdot \vec{J}. \quad (3.2)$$

Combinando as equações (3.1) e (3.2) resulta

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \vec{\nabla} \cdot (\vec{a} \cdot \vec{\nabla} c). \quad (3.3)$$

Se o meio for isotrópico então $a_{ij} = \delta_{ij}D$ e se D não depender da posição e nem do tempo então

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D\nabla^2 c, \quad (3.4)$$

onde D é uma constante chamada coeficiente de difusão. Esta é a segunda lei de Fick [18]. Esta equação é idêntica à equação da difusão do calor, basta fazer a substituição (D) \rightarrow ($K/\rho_m c_h$), onde K é a condutividade térmica, ρ_m é a densidade de massa do meio e c_h é o calor específico do meio. A maioria dos fenômenos de difusão seguem, em boa aproximação, esta relação linear. Outros exemplos, além da difusão do calor e da difusão de átomos, moléculas ou partículas em meios como gases, líquidos ou sólidos, são a difusão de neutrons na matéria e a difusão de fótons em um meio não absorvedor.

Em se tratando de difusão, normalmente tem-se a função distribuição $c(\vec{r}, t)$ inicial em um tempo t , e deseja-se saber o estado do sistema, ou seja, a distribuição em um tempo t' posterior, $t' > t$.

Uma forma muito conveniente de tratar o problema é mediante a função de Green, a que Butkov [19] se refere como "função de Green para as condições iniciais", e que nas aplicações em mecânica quântica [20-21] é denominada "função de Green retardada" ou simplesmente "propagador".

A seguir vamos expor sucintamente o método e aplicá-lo a um problema ao qual vamos nos referir muitas vezes nos capítulos 4 e 5.

Se a equação diferencial é linear e de primeira ordem no tempo, como é o caso da equação (3.4), então faz sentido supor que exista uma função G , tal que

$$c(\vec{r}', t') = \int G(\vec{r}', t'; \vec{r}, t) c(\vec{r}, t) d^3r, \quad (3.5)$$

onde $G(\vec{r}', t'; \vec{r}, t)$ é a função de Green. Estamos interessados nas situações físicas em que $t' > t$, portanto a equação (3.5) pode ser reescrita em termos da componente da função de Green (G^+) que propaga $c(\vec{r}, t)$ no sentido positivo do tempo.

$$\theta(t' - t) c(\vec{r}', t') = \int G^+(\vec{r}', t'; \vec{r}, t) c(\vec{r}, t) d^3r, \quad (3.6)$$

onde $\theta(t' - t)$ é a função salto unitário ou função de Heaviside, t é um parâmetro e $G^+(\vec{r}', t'; \vec{r}, t)$ é o propagador da equação da difusão (3.4). Como $c(\vec{r}, t)$ e $c(\vec{r}', t')$ devem satisfazer a equação (3.4), então aplicando-se o operador $(\frac{\partial}{\partial t'} - D\nabla'^2)$ à equação (3.6) resulta:

$$\left(\frac{\partial}{\partial t'} - D\nabla'^2 \right) G^+(\vec{r}', t'; \vec{r}, t) = \delta^3(\vec{r}' - \vec{r}) \delta(t' - t), \quad (3.7)$$

onde $\delta(x)$ é a função (distribuição) delta de Dirac. A equação (3.7) acima é a conhecida equação diferencial satisfeita pela função de Green. Supondo a invariância das propriedades físicas do meio frente as translações no espaço e no tempo então $G^+(\vec{r}', t'; \vec{r}, t) = G^+(\vec{r}' - \vec{r}, t' - t)$. Fazendo uso das propriedades da Transformada de Fourier obtém-se G_F^+ . Tomando-se a transformada inversa desta obtém-se a forma explícita da $G^+(\vec{r}', t'; \vec{r}, t)$, que é a seguinte:

$$G^+(\vec{r}', t'; \vec{r}, t) = \left(\frac{1}{4\pi D(t' - t)} \right)^{3/2} \left\{ \exp \left[\frac{-|\vec{r}' - \vec{r}|^2}{4D(t' - t)} \right] \right\} \theta(t' - t). \quad (3.8)$$

Este é o propagador para a equação diferencial da difusão (3.4). A expressão (3.8) é muito parecida com o propagador livre para a equação de Schrödinger, fazendo-se a

substituição $(t', t) \rightarrow (-it', -it)$ e $(D) \rightarrow (\hbar/2m)$ em (3.8) resulta no propagador para a equação de Schrödinger de uma partícula livre. Esta mesma substituição transforma a equação da difusão na equação de Schrödinger para uma partícula livre.

Doravante, todo trabalho que nos resta é efetuar a integração (3.6) usando a expressão (3.8) acima.

3.2 Difusão Molecular em um Capilar

Em eletroforese capilar usam-se capilares com comprimento da ordem de 0,5 m e raio interno da ordem de $25 \mu\text{m}$ preenchidos normalmente com uma solução aquosa. Em temperatura ambiente, conforme apresentado na secção 2.2, o número de Reynolds é muito menor do que dez, $R \ll 10$. Isto nos assegura que o alargamento das distribuições será devido basicamente ao processo de auto-difusão. Existem trabalhos [22-23] onde outros prováveis processos de alargamento das distribuições são relatados.

A amostra contendo as moléculas a serem separadas é introduzida em uma das extremidades por gravidade, (veja secção 4.2.2 para ter maiores detalhes do método de injeção) resultando em um tampão cilíndrico formado pela solução da amostra (plug) no interior da coluna situado próximo a uma das extremidades. Portanto, no tempo t , que pode ser $t = 0$, tem-se um perfil de concentração das moléculas ao longo da coluna que é $c(\vec{r}, 0) = f(x)$, como mostra a figura 3.1.

Observe que a concentração é constante ao longo das direções y e z e conseqüentemente o problema será unidimensional, pois o gradiente de concentração também será nulo nestas duas direções. Portanto, nos interessa é conhecer o perfil de concentração ao longo da coluna em tempos (t') posteriores, $t' > 0$.

As formas mais comuns da função distribuição inicial $f(x)$ são a função pulso retan-

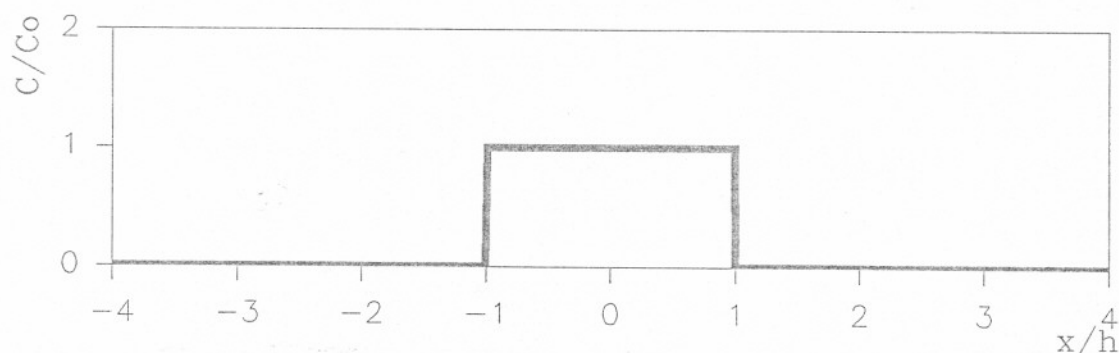


Figura 3.1: Perfil de concentração ao longo da coluna no tempo $t = 0$.

gular, gaussiana, trapezoidal e outras. No restante desta secção vamos nos ater à função pulso retangular, a qual vamos nos referir nos capítulos 4 e 5.

A função pulso retangular é definida como

$$c(x, 0) = \begin{cases} c_0 & \text{se } -h \leq x \leq h \\ 0 & \text{se } x > h \text{ ou } x < -h. \end{cases} \quad (3.9)$$

Para esta condição inicial a solução da equação da difusão (3.4) será dada por

$$c(x', t') = \int_{-\infty}^{\infty} G^+(x', t'; x, 0) c(x, 0) dx, \quad (3.10)$$

cujo resultado é

$$c(x', t') = \frac{c_0}{2} \left\{ \operatorname{erf} \left(\frac{h - x'}{2\sqrt{Dt'}} \right) + \operatorname{erf} \left(\frac{h + x'}{2\sqrt{Dt'}} \right) \right\}. \quad (3.11)$$

A função erro é definida [24] como

$$\operatorname{erf}(z) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^z e^{-u^2} du.$$

A solução (3.11) é válida para qualquer $t' > 0$. Expandindo-se a função (3.11) em série de Mc-Laurin em $H = \frac{h}{2\sqrt{Dt'}}$ e colocando (x, t) em lugar de (x', t') doravante, resulta

$$c(x, t) \simeq \frac{hc_0}{\sqrt{\pi Dt}} e^{-\frac{x^2}{4Dt}}. \quad (3.12)$$

Esta aproximação é muito boa se $t \gg 0$, ou seja, $H = \frac{h}{2\sqrt{Dt}} \ll 1$, pois o termo linear em H (e todos os ímpares) é nulo. Portanto, a distribuição retangular em $t = 0$ tende a uma gaussiana em x para tempos grandes. Na equação (3.12) fica bem explícito também a relação de Einstein,

$$\sigma^2 = \overline{x^2} = 2Dt, \quad (3.13)$$

de que o quadrado da variância aumenta linearmente com o tempo. Portanto, a função (3.12), que dá a distribuição das moléculas no interior do capilar, se alarga com o passar do tempo.

Na verdade a função distribuição medida pelo sistema de detecção é um sinal de fluorescência proporcional à convolução da função (3.12) com uma função "filtragem espacial"

$g(x)$, pois o sistema de detecção mede a fluorescência oriunda de uma extensão finita do capilar. Este comprimento vamos denominar $2a$. A função $g(x)$ será discutida na secção 4.1.2 do capítulo 4. Portanto, experimentalmente se obtém não a $c(x, t)$, mas uma $C(x, t)$ que é dada por

$$C(x, t) = \frac{hc_o}{\sqrt{\pi Dt}} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-\frac{(x-\xi)^2}{4Dt}} g(\xi) d\xi. \quad (3.14)$$

Veremos que a $g(x)$ é uma função par, positiva e não nula somente no intervalo $-a < x < a$. Se $a \ll \sigma = \sqrt{2Dt}$, então pode-se mostrar que a integral de convolução acima deixa $C(x, t) \simeq c(x, t)$.

E, por fim, deve ser observado também que um grupo de moléculas migrando pelo capilar leva um certo tempo ($\approx 5s$) para passar completamente pela região de detecção. Assim, a dispersão na primeira metade medida é menor do que na última, ou seja, por conta do processo de difusão durante a passagem da "zona" pela região de observação, obtém-se uma distribuição assimétrica. Em suma, pontos diferentes da distribuição são medidos em tempos diferentes. A expressão, levando-se em conta este efeito adicional, deve ser em boa aproximação dada por

$$C(x, t) = \frac{hc_o}{\sqrt{\pi D}} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{1}{\sqrt{t - \frac{x-\xi}{v}}} \exp \left[-\frac{(x-\xi)^2}{4D(t - \frac{x-\xi}{v})} \right] g(\xi) d\xi, \quad (3.15)$$

onde $v = |\vec{v}_e + \vec{v}_{eo}|$. Sendo \vec{v}_{eo} a velocidade eletrosmótica (2.25) e \vec{v}_e a velocidade eletroforética que será definida na secção 3.3 a seguir.

3.3 Mobilidade Eletroforética, Número de Pratos Teóricos e Resolução

Apresentaremos nesta secção os conceitos e as definições mais usuais relacionados à difusão e às técnicas de separação [25]. Vamos começar definindo "mobilidade eletroforética". Quando se aplica um campo elétrico a uma solução contendo moléculas dissolvidas, observa-se que as moléculas adquirem uma velocidade média \vec{v}_e em relação ao meio, este efeito é chamado eletroforese e esta velocidade de velocidade eletroforética. A velocidade \vec{v}_e é proporcional ao campo aplicado e depende principalmente da carga média das moléculas, do seu volume hidrodinâmico e da viscosidade do meio. Esta constante de proporcionalidade é a mobilidade eletroforética,

$$\vec{v}_e = \mu_e \vec{E}. \quad (3.16)$$

Portanto, a velocidade total v de uma molécula no interior de um capilar será

$$v = |\vec{v}_e + \vec{v}_{eo}| = (\mu_e + \mu_{eo}) |\vec{E}| = (\mu_e + \mu_{eo}) \frac{V}{L}, \quad (3.17)$$

onde V é a diferença de potencial aplicada entre os extremos da coluna de comprimento L e μ_{eo} é a velocidade eletrosmótica (conforme dado pela equação 2.27).

É de uso geral em cromatografia definir o "número de pratos teóricos". Este é dado por

$$N \equiv \frac{l^2}{\sigma^2},$$

onde l é a distância entre o ponto de injeção e o de medida e σ a variância do pico. Se o mecanismo de alargamento das zonas é predominantemente devido a autodifusão, então N será dado por

$$N = \frac{(\mu_e + \mu_{eo})Vl}{2DL}. \quad (3.18)$$

O último termo foi obtido utilizando $l = vt$ e $\sigma^2 = 2Dt$, onde l é a distância do início do capilar até o ponto de detecção. É interessante observar que o fator tempo não aparece mais na equação (3.18), sendo que os parâmetros externos que afetam N são a tensão aplicada (V), os comprimentos (L e l) e, como veremos abaixo, a temperatura (T).

A título de exemplo, o número de pratos teóricos calculado a partir do eletroferograma da figura 5.7 é da ordem de $N=520000$.

A resolução entre dois picos é definida [25] como a distância que separa os dois, Δx , dividido por $4\bar{\sigma}$, onde $\bar{\sigma}$ é a média entre σ_1 e σ_2 . Pode-se mostrar que a resolução (R) é dada por

$$R = \frac{1}{4}\sqrt{N} \left(\frac{\Delta\mu}{\bar{\mu}} \right), \quad (3.19)$$

onde $\Delta\mu$ é a diferença entre as mobilidades e $\bar{\mu}$ é a mobilidade média. Dois picos são ditos resolvidos se $R \geq 1$. Portanto, se deseja-se incrementar ao máximo o poder de resolução do método, então conforme nos indicam as equações (3.18) e (3.19), deve-se usar a maior diferença de potencial (V) possível, l deve ser próximo de L e os marcadores fluorogênicos devem ser tais que tornem a relação $\left(\frac{\Delta\mu}{\bar{\mu}}\right)$ o maior possível. Cabe ainda a observação de que para líquidos foi experimentalmente mostrado [26] que a relação $\frac{\mu_e}{D}$, que ocorre na equação (3.18), segue aproximadamente (com um erro $\sim 10\%$) a relação de Einstein [27] válida para os gases ideais:

$$\frac{\mu_e}{D} = \frac{Ze}{kT}, \quad (3.20)$$

onde Ze é a carga média da molécula. Disto se conclui que N não é proporcional à mobilidade eletroforética, mas à Ze/T .

Capítulo 4

ELETROFORESE CAPILAR

4.1 Arranjo Experimental

A eletroforese capilar é um método de separação de moléculas introduzido em 1981 por Jorgenson e Lukacs [1]. Ultimamente um número crescente de trabalhos tem sido publicado, relatando sempre novos desenvolvimentos e novas aplicações. O primeiro artigo de revisão sobre o assunto é o de W.G.Kuhr (1990) e o segundo e mais recente artigo de revisão é o de W.G.Kuhr e C.A.Monnig (1992) [2]. A causa principal desta empolgação se deve às características que a técnica apresenta, como: pouco volume de amostra necessário, alta sensibilidade e alta resolução de separação. Atualmente já existem algumas variantes, que possuem em comum o fato de o fenômeno da eletroforese estar presente em todas, além de todas serem efetuadas em capilares finos de 10 a 200 μm de diâmetro interno, daí o nome eletroforese capilar.

Porém eletroforese capilar ainda é a denominação genérica para o conjunto de variantes cujas denominações em língua portuguesa ainda não estão consagradas, mas que seriam: eletroforese capilar em gel de poli(acrilamida) (Polyacrylamide Capillary Gel Electrophoresis - PAGE), eletroforese capilar em gel com campo pulsado (Pulsed Field Capillary Gel Electrophoresis - PFGE), cromatografia capilar eletrocínética com micelas (Miscellar Electrokinetic Capillary Chromatography - MECC), eletroforese capilar de zona (Capillary Zone Electrophoresis - CZE) e separação isoelétrica em capilar (Capillary Isoelectric Focusing - CIEF). Em todas se aplica uma diferença de potencial da ordem de 10 a 30 kV entre os extremos de uma coluna capilar que possui de 10 a 200 μm de diâmetro interno, comprimento da ordem de 0.5 m e preenchimento com solução tampão, como mostra a figura 4.1. O que muda basicamente entre uma variante e outra é o preenchimento da coluna e a solução tampão empregada. Solução tampão é uma solução normalmente de água e mais um par ácido-base, e que possui a propriedade

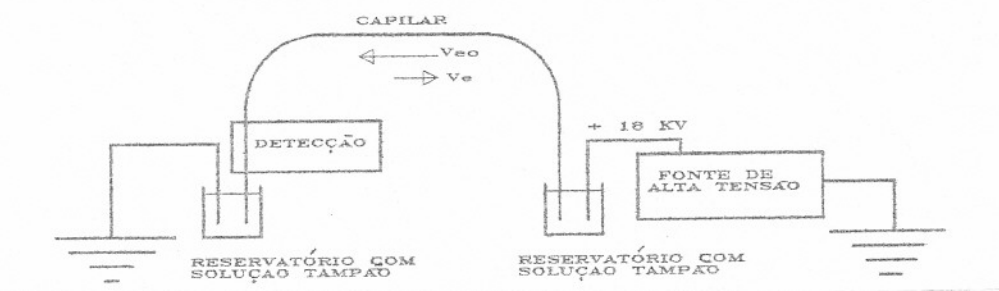


Figura 4.1: Esquema da montagem experimental utilizada na eletroforese capilar

de manter o pH (potencial hidrogeniônico) fixo em um determinado valor. O potencial hidrogeniônico (pH) é definido como o cologaritmo da concentração molar de íons H^+ . A maioria das medidas deste trabalho, por exemplo, foram feitas em solução tampão de tetraborato de sódio 20 mM em água e metanol 15% (V/V). Este tampão possui pH 9,3, ou seja, a concentração de íons H^+ nesta solução é de $10^{-9,3}$ móis/litro.

Vamos expor resumidamente, a seguir, o que caracteriza cada uma das variantes. A mais simples de todas é a eletroforese capilar de zona, na qual se emprega simplesmente uma solução tampão aquosa no preenchimento da coluna. Ou seja, por pressão, enche-se a coluna de líquido e imerge-se as extremidades nos reservatórios. Quando se aplica uma diferença de potencial entre os reservatórios, se estabelece um campo elétrico ao longo da coluna que promove simultaneamente a eletroosmose (2.25) do líquido e a eletroforese (3.16) das moléculas. A separação espacial das moléculas é ocasionada pela diferença entre as velocidades eletroforéticas. Já a velocidade eletroosmótica, que é muito maior em módulo do que a velocidade eletroforética, faz com que as zonas, separadas entre si, passem pela região de detecção. O resultado que se obtém é um espectro como o da figura 4.2, este espectro recebe o nome de eletroferograma. A abcissa contém o tempo necessário para um grupo de moléculas de mesma natureza (pico) migrar de uma extremidade até o ponto de detecção que se situa próximo a outra extremidade da coluna. A ordenada é um sinal proporcional ao número de moléculas presentes em um campo, geralmente minúsculo, da coluna; em nosso caso este sinal é devido a fluorescência, mas pode ser de absorção, condutividade, índice de refração, etc...

A variante denominada cromatografia eletrocinética micelar é muito parecida com a anterior, a diferença está na solução empregada. Nesta a solução contém micelas e a separação se deve às diferenças nas mobilidades eletroforéticas e também devido às diferenças nos coeficientes de partição solução/micela. Micelas são gotículas, normalmente microscópicas, de uma fase distinta suspensa na solução tampão. Especial atenção tem sido dada recentemente [29-30] a este tipo de sistema.

Já na eletroforese capilar em gel de poliacrilamida a solução tampão pode

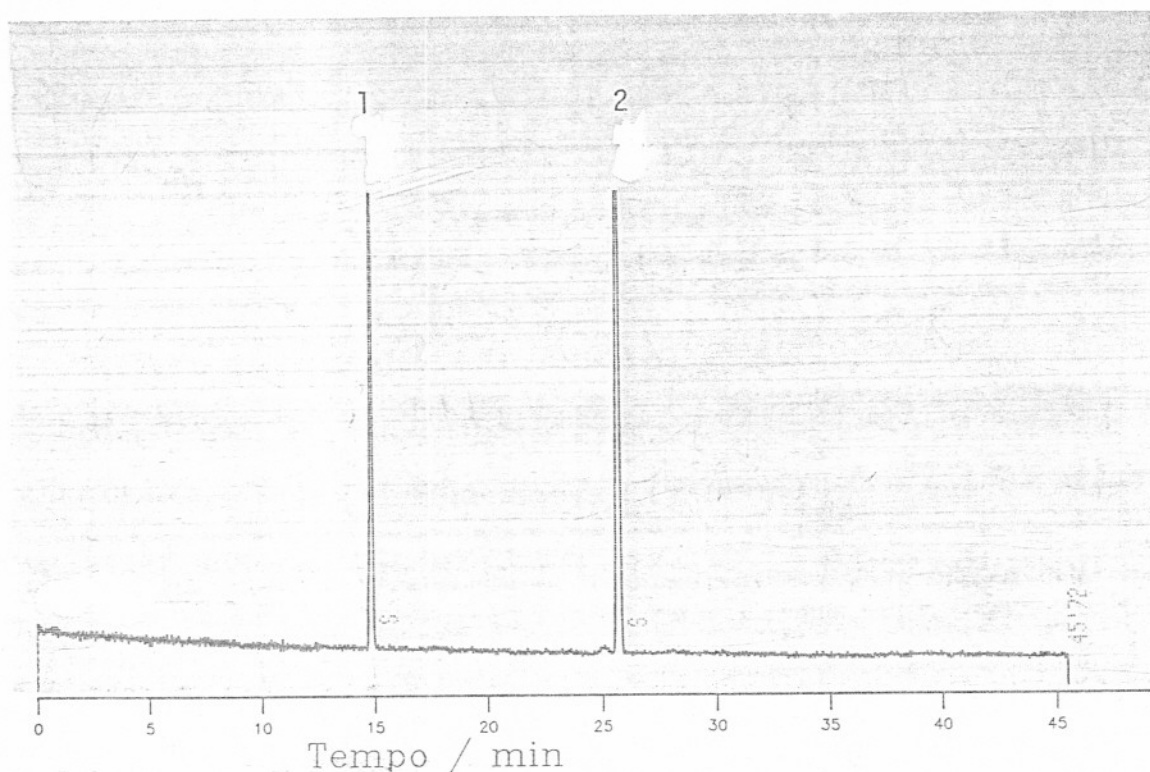


Figura 4.2: Exemplo de um eletroferograma de uma mistura de dois aminoácidos (1=arginina, 2=metionina) que foram marcados fluorogenicamente com fluorescamina e se encontram na concentração de $100 \mu\text{M}$.

ou não conter micelas, mas o mais importante é que existe fixo no interior do capilar um gel de poliacrilamida. Esta técnica é muito aplicada na separação de biopolímeros, principalmente fragmentos de DNA (polinucleotídeos). Aqui os mecanismos responsáveis pela separação são os citados anteriormente e também outros processos, para os quais ainda não existem modelos satisfatórios, mas sabe-se estarem relacionados com o tamanho, conformação e movimentos das moléculas. Muitos trabalhos interessantes [31-37] têm sido publicados a respeito. A referência [37] é um trabalho de revisão sobre o assunto.

A campo constante é impossível separar fitas de DNA de peso molecular muito elevado (muito compridas) pela técnica acima, pois a dimensão dos poros do gel não permite o deslocamento dos mesmos. Mas a campo pulsado, mesmo moléculas muito grandes (como fragmentos de DNA com até 2 milhões de pares de bases) [38] entram em regime de migração. Portanto, na eletroforese capilar em gel e campo pulsado o campo elétrico aplicado não é constante, mas geralmente na forma de pulsos retangulares. Recentemente M.O.de la Cruz et al. [39] efetuaram uma simulação muito interessante cujo resultado nos sugere que o campo pulsado muda a conformação das macromoléculas para estados que tornam a migração possível.

E por fim, na separação isoelétrica em capilar a solução tampão empregada não possui micelas e normalmente o gel não é utilizado, mas o preenchimento da coluna é feito

de tal maneira a criar um gradiente de pH ao longo desta. Assim, as moléculas migrarão até o ponto onde o pH da solução for igual ao pH do ponto isoeletrico (pI) da mesma. O pI de uma molécula é o valor de pH em que a carga média (temporal) desta é zero. A separação espacial das moléculas, neste caso, é proporcional às diferenças nos valores do pI das mesmas.

As referências [37] e [40] dão uma revisão da ampla gama de aplicações das variantes acima mencionadas.

No restante desta secção vamos discutir mais detalhadamente as partes que compõem a técnica, que são: a coluna, detecção e a aquisição e tratamento de dados. Vamos nos ater à variante mais simples, que é a eletroforese capilar de zona (EC).

4.1.1 Colunas Capilares

Antes de falar sobre a escolha e o preparo da coluna capilar, vamos discutir a razão de se usar colunas capilares, já que estas são de difícil manipulação, além do que, requerem sistemas de detecção muito sensíveis pois os volumes de amostras envolvidos normalmente são muito pequenos, geralmente da ordem de alguns nanolitros (nl).

O emprego de capilares, isto é, colunas com diâmetro interno muito pequeno, se dá por vários motivos. O mais importante deles é que quanto mais fino o diâmetro interno do capilar, tanto maior será a relação *área/volume*. E quanto maior esta relação mais eficiente é o resfriamento da coluna, pois a corrente de íons e o fluxo eletrosmótico ocasionados pela elevada tensão aplicada aquecem demasiadamente o líquido da coluna. E o emprego de tensões elevadas é importante porque está diretamente relacionado com a alta resolução do método (3.19).

O segundo benefício proporcionado pelo emprego de colunas capilares, como mostrado na secção 2.2, é o fato de que neste ambiente o principal mecanismo responsável pelo alargamento das distribuições é a auto-difusão. Se o diâmetro do capilar for muito grande, além de um superaquecimento, teremos turbulência no escoamento do fluido e o conseqüente alargamento das zonas por convecção, além da já inevitável auto-difusão; então no denominador da eq. (3.18) teríamos σ^2 somado com outros termos.

Normalmente os capilares empregados são cilíndricos e feitos de sílica fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ), mas também podem ser de politetrafluoretileno (teflon), vidro ou outro dielétrico qualquer. Os capilares de sílica fundida (quartzo amorfo) normalmente possuem uma boa qualidade óptica, mas são comercializados com um recobrimento externo de polímero, que normalmente é de poliimida, a título de proteção mecânica. Esta camada de polímero deve ser removida em um pequeno trecho de forma que se possa in-

cidir a energia de um laser sobre a solução, bem como medir a fluorescência resultante. Existem procedimentos mecânicos [41] de remoção desta camada, mas o mais fácil é mediante queima com uma chama branda. O tempo de exposição do capilar à chama deve ser o mais breve possível a fim de evitar a deformação do mesmo. Uma exposição prolongada também escurece o capilar, comprometendo a sua qualidade óptica.

Falamos até agora do tratamento da superfície externa da coluna. Mas o mais importante é o cuidado e a consciência dos processos físico-químicos que ocorrem na superfície interna que está em contato com a solução. Para tanto seremos parcialmente ajudados com o que foi exposto no capítulo 2, se bem que ainda não exista uma compreensão total dos fenômenos que podem ocorrer. Por exemplo, foi relatado [42] que o histórico do pH das soluções empregadas tem um efeito de histerese sobre as propriedades eletrocinéticas da coluna. Mas o mais importante a ser considerado sobre este ponto é que a velocidade eletroosmótica, que depende do potencial zeta (2.25), pode ser controlada mediante a adição de substâncias ao tampão (ex.: polímeros hidrofílicos)[43] ou mediante a aplicação de campos elétricos radiais [44-45]. Estes procedimentos muito úteis, na verdade, mudam o potencial zeta. Um procedimento alternativo utilizado para este fim é fazer um recobrimento da parede interna com uma fina camada de material polimerizado "in situ" [46-47]. Os tratamentos acima citados também são efetuados para evitar a adsorção das macromoléculas à parede. Na separação de proteínas esta questão é particularmente problemática [48-49].

Uma última questão a ser abordada aqui é a questão do controle da temperatura. Da equação (2.25) pode-se ver que um aumento de temperatura provavelmente aumenta o potencial ζ e, com certeza, diminui a viscosidade η , conseqüentemente teremos um aumento na velocidade eletroosmótica. Isto está de acordo com os resultados experimentais que obtivemos e que estão na figura 4.3. Os resultados mostram também que a velocidade eletroosmótica aumenta em módulo com a temperatura, na faixa de interesse entre 20 e 45°C. O objetivo destas medidas foi simplesmente constatar estas tendências na faixa de trabalho e não nos limites de temperatura muito baixa (0°C) ou muito alta (100°C). O gráfico mostra também a dependência da corrente com a temperatura.

Com isto se conclui que o controle de temperatura, como em cromatografia, é fundamental para a boa repetibilidade dos tempos de retenção e demais medidas. Tempo de retenção é o tempo necessário para uma molécula migrar do início da coluna até o ponto de detecção e é um dos parâmetros de identificação da mesma. O tempo de retenção é também por vezes chamado de tempo de eluição ou tempo de migração.

Os métodos de controle de temperatura mais usuais são: circulação natural do ar ambiente, circulação forçada de ar ou N₂ e por circulação de um líquido. O melhor controle é obtido pelo último. Y.Kurosu et al. [50] mediram a influência do controle da temperatura sobre a repetibilidade dos tempos de retenção e das áreas dos picos.

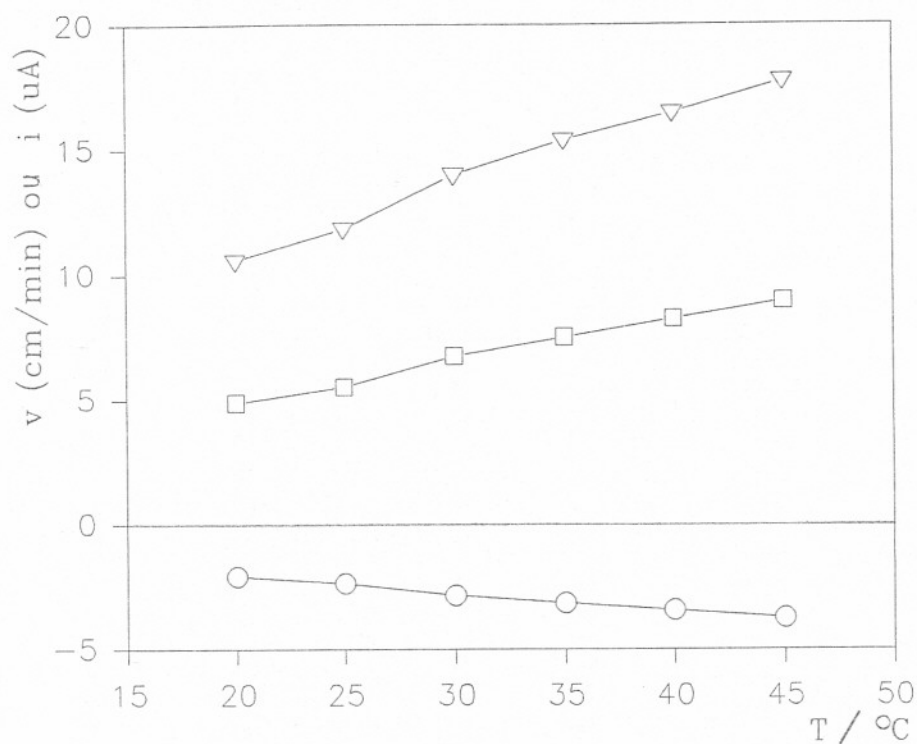


Figura 4.3: Estes gráficos mostram a dependência da velocidade eletroosmótica (□), da velocidade eletroforética (○) e da corrente elétrica através do capilar (▽) com a temperatura. A velocidade eletroforética medida é do aminoácido serina marcado com orto-ftaldialdeído. Solução tampão de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 20 mM em água e metanol 15% (V/V) e pH 9,3. Capilar de sílica fundida com 50 μm de d.i. e 62,3 cm (57,1 até detector) de comprimento. Tensão aplicada de 18 kV.

Certamente a temperatura não é constante no interior do capilar, ela deve ser um pouco maior no centro e se aproxima à temperatura de controle na superfície externa do mesmo. Existem trabalhos propondo [51] que os perfis de velocidades mostrados na figura 2.3 não sejam bem verdadeiros nesta situação. Esta distorção no perfil de velocidades causado por efeito térmico pode ser um mecanismo adicional de alargamento das distribuições (3.15).

E por último, grádientes de pH ao longo dos capilares são possíveis de se obter pelo menos por duas maneiras. Numa isto é feito simplesmente mediante o controle da temperatura [52]; é que existem tampões cujo pH é dependente da temperatura: O reagente tri(hidroximetil)aminometano (Tris) é um exemplo. O outro método de controle de pH consiste em controlar o pH durante o enchimento da coluna e durante a análise [53].

4.1.2 Detecção

Antes de descrever o sistema de detecção que desenvolvemos em nosso trabalho, vamos dar uma visão geral dos sistemas de detecção mais utilizados em EC.

O que normalmente se espera de um sistema de detecção é que ele seja ao mesmo tempo sensível, universal ou específico e confiável. Um detector com boa sensibilidade fornece um sinal elevado para um pequeno número de moléculas. Em certas situações deseja-se um detector universal, ou seja, sensível à qualquer espécie molecular; ou o contrário, um detector específico que seja sensível somente à uma categoria de moléculas.

Os detectores de absorção molecular são os mais empregados devido a sua aplicabilidade mais abrangente. A absorção em capilares, porém, pode requerer a medida de uma variação pequena num sinal grande, o que limita a sensibilidade do detector. Assim, outros métodos foram progressivamente adaptados ou desenvolvidos para esta técnica, como os de quimioluminescência [54], absorção em célula de múltipla reflexão [55], eletroquímicos [56], termo-ópticos [57], mistura de quatro ondas degenerada [28] e, principalmente, os de fluorescência. M. Albin et al. [58] testaram várias fontes de excitação para um sistema de detecção fluorimétrico, e observaram que os sistemas de detecção com fluorescência induzida a laser apresentam uma sensibilidade de pelo menos duas ordens de grandeza maior em relação aos demais sistemas.

Os sistemas laser mais comumente empregados são o de Argônio [58], o de Hélio-Cádmio [59] e de semicondutor [60]. Todos são laser contínuos.

Estudos de fluorescência induzida a laser com resolução temporal estão sendo feitos [61] com marcadores fluorogênicos usados no seqüenciamento de DNA. Este procedimento permite ao mesmo tempo detectar e identificar as espécies moleculares. O nosso trabalho foi o de implementar um sistema de detecção com laser de N_2 . Este laser, diferente dos citados acima, é pulsado. A figura 4.4 nos mostra os componentes principais do sistema de detecção e nos permite ter uma idéia geral do mesmo.

Na figura 4.4 estão detalhados todos os componentes que fazem parte do sistema de detecção. Um filtro espacial de abertura circular situado no foco de duas lentes elimina praticamente toda a fluorescência do próprio N_2 do tubo de descarga. As lentes são de quartzo com distâncias focais de 15 cm. Para colher a fluorescência uma objetiva de microscópio com magnificação de 20 vezes e abertura numérica 0.5 é utilizada (Hacker 20/0.50). Outro filtro espacial de abertura retangular, situado em frente a fotomultiplicadora (PMT), faz com que somente a imagem do centro do capilar incida sobre a superfície fotosensível da PMT. Desta forma, a radiação devido ao espalhamento Raman na parede do capilar é em grande parte eliminada. Esta mesma fenda limita também a extensão do capilar observada, que geralmente é da ordem de 50 μm . A função filtragem espacial

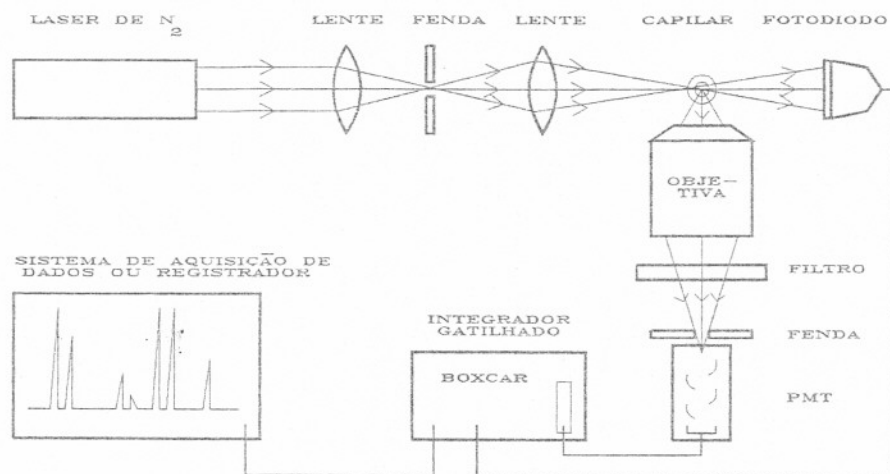


Figura 4.4: Esquema geral do sistema de detecção desenvolvido para um laser de N_2 .

$(g(x))$ é resultante da ação deste filtro mais a distribuição espacial da energia do laser que incide sobre o capilar.

Com o sistema de detecção assim construído obtivemos eletroferogramas como o mostrado na figura 4.5. A figura 4.6-A é a ampliação de uma porção, assinalado com um retângulo, da figura 4.5. E a figura 4.6-B, por sua vez, é uma ampliação do pico 4. Os pontos são das medidas experimentais e a linha contínua que aparece na figura 4.6-B é do ajuste de uma gaussiana pelo método dos mínimos quadrados. Esta figura mostra, qualitativamente, a forma gaussiana dos picos. Isto está de acordo com os resultados teóricos obtidos no capítulo 3 e expresso na equação (3.12). Os efeitos adicionais de alargamento das zonas, quantitativamente expressos nas equações (3.14) e (3.15), não são muito pronunciados, pelo menos nestas condições de operação.

Maiores detalhes do sistema de detecção e do próprio laser de N_2 estão detalhadamente descritos no trabalho a seguir que foi apresentado como "palestra convidada" no V SIMPÓSIO ESTADUAL DE LASERS E APLICAÇÕES, de 26 a 28/10/92, IPEN, São Paulo, SP.

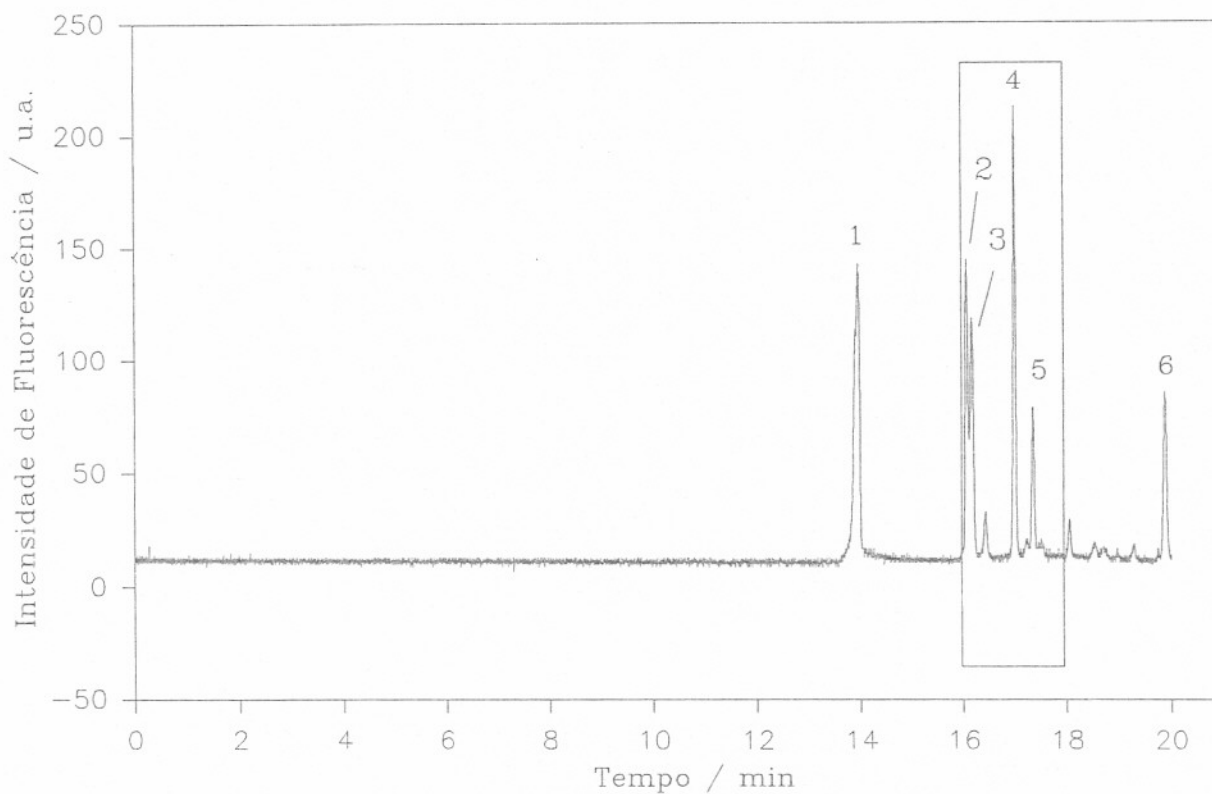


Figura 4.5: Eletroferograma de uma mistura de peptídeos (1=bradicinina, 2=metionil-lisil-bradicinina, 3=lisil-bradicinina, 4=bradicinina 1-8 e 5=bradicinina 2-9) e um aminoácido (6=arginina) usado como padrão interno. Todos foram marcados com fluorescamina. A concentração é de $75 \mu\text{M}$, com excessão dos componentes 5 e 6 que estão a $150 \mu\text{M}$. Tensão aplicada de 18 kV. Coluna de sílica fundida com $50 \mu\text{m}$ de diâmetro interno e 65,0 cm de comprimento. Solução tampão de tetraborato de sódio 20 mM em água e metanol 15% (V/V) e $\text{pH}=9,3$.

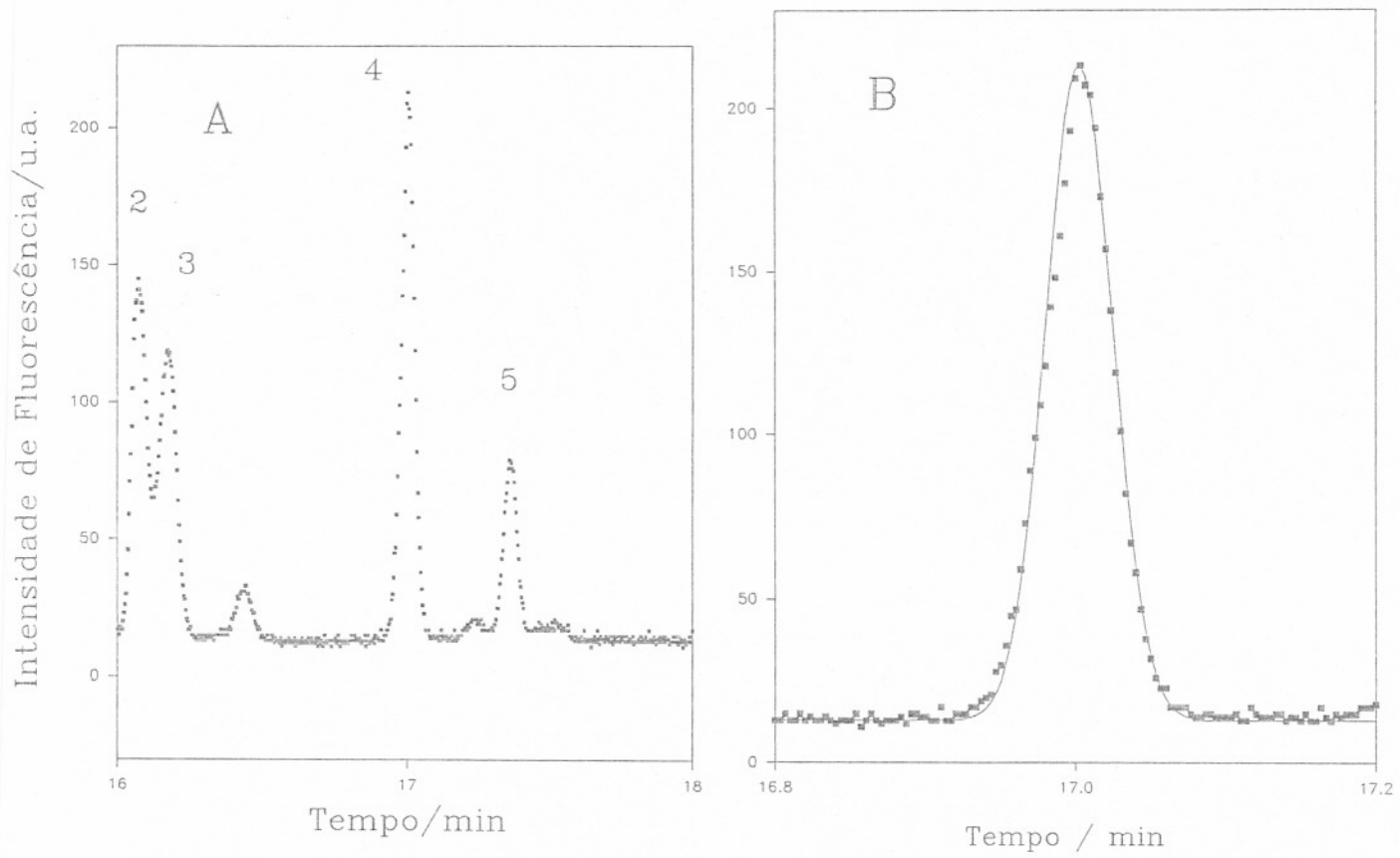


Figura 4.6: Ampliações de partes do eletroferograma da figura 4.5 para mostrar qualitativamente a forma gaussiana dos picos.

V SIMPÓSIO ESTADUAL DE LASERS E APLICAÇÕES

26 a 28 de Outubro de 1992



Anais



ipen

São Paulo - SP

O MINILASER N_2 E SUA APLICAÇÃO EM ELETROFORESE CAPILAR

T.B.L. Kist, R.E. Francke, C. Termignoni* e H.P. Grieneisen
Instituto de Física, UFRGS, C.P. 15051, 91501-970 Porto Alegre, RS
*Centro de Biotecnologia, UFRGS, C.P. 15005, 91501-970 Porto Alegre, RS

O laser de nitrogênio, pulsado com emissão em 337 nm e de baixa potência média < 1 mW, goza de propriedades que tornam seu uso vantajoso em medidas analíticas e microscópicas. Apresentamos parâmetros de um laser N_2 com pequenas dimensões físicas. Em particular, descrevemos sua aplicação em Eletroforese Capilar para a qual desenvolvemos e testamos um detector fluorescente baseado no laser N_2 . Apresentamos os resultados para aminoácidos e peptídeos com bons limites de detecção permitindo atingir sensibilidade na ordem de um attomol para aminoácidos derivatizados com OPA.

INTRODUÇÃO

O laser de nitrogênio [1] com emissão de curtos pulsos de luz (3-10 ns) na região ultravioleta próxima em 337 nm tem sido, por muitos anos, de grande utilidade em pesquisa, principalmente em espectroscopia por ser o laser uma fonte ideal no bombeamento óptico do laser de corante [2]. Porém, com o desenvolvimento tecnológico de novos lasers com maior energia por pulso, o laser- N_2 foi substituído pelo laser excímero do tipo XeCl ou XeF com emissão em 308 nm e 351 nm respectivamente, ou então pelo laser Nd:Yag cuja saída após triplicação da frequência ocorre em 357 nm. Tanto o laser de excímero quanto o de Nd:Yag geram pulsos de luz na faixa de centenas de mJoules, enquanto o laser N_2 é limitado em torno de poucos mJoules. Tentativas de aumentar significativamente o desempenho de laser N_2 resultam em dispositivos pouco práticos e certamente inadequados para consideração de seu uso em equipamentos comerciais ou industriais [3,4]. Por outro lado, a tecnologia do laser excímero, especialmente o que se refere à manutenção e ao consumo de gás, implica em altos custos de operação, o que deixa este tipo de laser sem real perspectiva de utilização em larga escala, como por exemplo, em instrumentação de medidas ópticas para controle de qualidade ou em sensores ópticos, baseados em fibras ópticas para sensoreamento remoto.

A propriedade vantajosa do laser- N_2 consiste na possibilidade de operação em regime selado sem necessitar reposição do gás. Além disto, se a aplicação permitir taxas de repetição dos pulsos inferior a 50 pps, o tubo laser não necessita de recirculação forçada de gás nem refrigeração com trocador de calor como é comum em laser de grande porte. Isto torna possível acomodar o laser- N_2 junto com a fonte de alta tensão dentro de um espaço bastante limitado, semelhante a de um laser He-Ne e sem a necessidade de fazer alguma manutenção.

Neste trabalho destacamos algumas das características deste tipo de laser N_2 com energia entre 100 e 200 μ Joule/pulso e com potência média de alguns mWatt. A duração do pulso é tipicamente entre 3 até 4 ns. Em particular, reportamos nossos recentes resultados de utilizar o laser N_2 na excitação de fluorescência em eletroforese capilar (EC).

CONSTRUÇÃO DO LASER- N_2

O laser- N_2 requer cuidado especial no desenho do tubo de plasma, do circuito elétrico de excitação e do chaveamento da

corrente de descarga elétrica e na escolha do resonador óptico.

Quanto ao tubo de plasma usamos um tubo de cerâmica com comprimento de 100 mm e 19 mm de diâmetro. Nas extremidades são colados, de um lado, uma janela de quartzo coberto em ambos os lados por um filme de antirreflexão e, do outro lado, um refletor plano de alumínio com uma camada dielétrica protetora reforçando a reflexão em 337 ($R > 95\%$). Os eletrodos são de níquel medindo 60 mm de comprimento com uma seção transversal de forma semicilíndrica e com raio de curvatura de 2.5 mm. A forma exata do eletrodo não é crítica para a pressão de 120 torr de N_2 , a qual foi otimizada para a configuração do circuito utilizado e tensão aplicada de 15 até 18 kV. Os eletrodos são paralelos entre si e com relação ao eixo óptico do tubo, mantendo um espaçamento entre si de 6 mm. Os eletrodos são imobilizados por meio de dois passadores de corrente para cada eletrodo que atravessam o tubo lateralmente. Para operação selada é necessário que os passadores sejam vedados por junta metal-cerâmica. O uso de adesivos para esta finalidade funciona com sucesso limitado devido à cumulativa contaminação do gás que ocorre com o uso do adesivo. Sob a ação de campos elétricos intensos e na presença de luz ultravioleta (corona), o adesivo degrada paulatinamente, contaminando assim o gás. Porém, pode-se operar com tubos colados por alguns dias necessitando, então, providenciar a troca do gás de maneira simples.

O circuito de descarga, usando-se capacitadores discretos de cerâmica, é de preferência do tipo de transferência de carga e não o de Blumlein [1], muitas vezes utilizado em desenhos de pressão atmosférica como mostra o esquema da figura 1. A energia é armazenada no ciclo de carga em $C_S = 1.6nF$ e é transferida para $C_P = .8nF$, logo após o disparo do centelhador. A tensão aplicada varia entre 15 e 18 kV e obtém-se, para uma energia armazenada de 0.3 Joule, uma energia de pulso do laser de 180 μ Joule, com um espelho plano e de 20% de refletividade. Como fonte de alta tensão é utilizado um conversor DC-DC de 12 para 18 kV, com potência de saída de 10 Watts. Tal fonte, é uma fonte chaveada que comercialmente é produzida para o uso com tubos CRT. Existe maior dificuldade para a obtenção de bom centelhador. Em nosso caso usamos uma construção própria de dimensões com 30 mm de altura e 34 mm de diâmetro. Centelhadores sob as condições descritas são capazes de chavear 100 milhões de pulsos sucessivos, graças ao lento desgaste dos eletrodos que é proporcional à quantidade de carga chaveada. O uso de tiratrons também é possível e, apesar de apresentar uma redução de energia/pulso insignificante, seu uso é acompanhado de um

diamento constitui um método químico bem estabelecido, já que poucas moléculas apresentam fluorescência nativa ou geralmente não possuem eficiência quântica apreciável. Outro pré-requisito é que o laser tenha uma emissão coincidente com a faixa de absorção do marcador.

O laser N₂ com 337 cai na faixa espectral conveniente e apresenta uma diferença essencial por ser um laser pulsado com duração de somente poucos nanossegundos. O objetivo do presente trabalho foi testar o desempenho do laser N₂ para aplicação em CE e identificar quais os níveis de energia de pulso que seriam necessários ou toleráveis para esta finalidade.

Pode-se esperar outra vantagem no uso do laser N₂ pulsado comparado ao laser contínuo. No caso pulsado a fluorescência induzida, essencialmente, acompanha temporalmente o pulso do laser e, portanto, o sinal medido apresenta uma amplitude de algumas ordens de grandeza maior do que seria obtido se o sinal fosse gerado por um laser CW com a mesma potência média. Desta maneira o detector pulsado torna-se praticamente insensível a um ruído óptico de fundo (background), conseqüentemente incrementa a razão sinal/ruído.

Finalmente, notamos que se existisse um marcador fluorogênico apresentando um decaimento radiativo maior do que o pulso do laser 3 ns, este possibilitaria uma detecção gatilhada com atraso temporal tal que a fluorescência de fundo seria eliminada eletronicamente. Tal procedimento poderia mostrar-se de utilidade, especialmente em amostras biológicas, nas quais a fluorescência de fundo é geralmente forte.

O aparelho EC é bastante simples, como indicado na figura 3. Consiste de um capilar de quartzo com 65,4 cm de comprimento e de 50 μm diâmetro interno. O tubo é enchido com solução tampão de pH conveniente. As extremidades do capilar estão imersas em reservatórios separados. Nestes são introduzidos eletrodos de platina os quais são ligados a uma fonte de alta tensão de 18 KV DC.

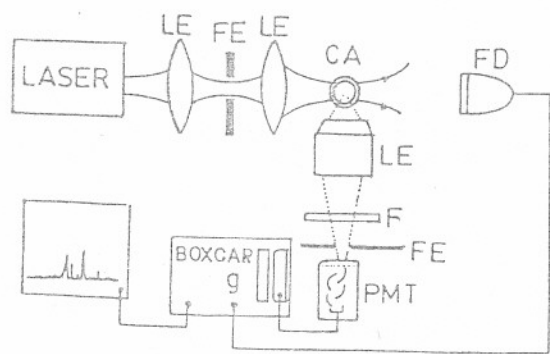


Figura 3. Esquema do detector para EC baseado no laser-N₂ pulsado. CA - Tubo capilar; LE - lente; FE - filtro espacial; F - filtro espectral ou monocromador; PMT - tubo fotomultiplicador; FD - fotodiodo para gerar pulso do gatilho do Integrador "BOXCAR", modelo PAR 162/164.

A amostra é introduzida hidrostáticamente no ânodo com volumes típicos de um até poucos nanolitros. A interação eletrocinética determina a migração e o desdobramento da zona injetada em zonas separadas. O efeito é composto pelo fluxo eletrosmótico da solução tampão, como um todo, em direção ao cátodo e a qual está superposta a velocidade de migração diferenciada devido à ação eletroforética dos constituintes do soluto de acordo com carga elétrica e raio molecular efetivo.

O detector fluorescente está situado perto do cátodo a uma distância de 59,5 cm do ânodo.

O laser incide lateralmente sobre a parede do capilar sendo a fluorescência colhida a noventa graus. Os componentes e o arranjo dos mesmos estão mostrados na figura 3. A luz espalhada é rejeitada pelo filtro ou monocromador intercalado entre o capilar e o detector. O detector é um tubo fotomultiplicador. A luz proveniente da descarga do laser é eliminada por meio de um filtro espacial situado entre o laser e o capilar. Este também rejeita a parte angular do feixe que não atravessaria o centro do capilar. Desta forma estimamos que somente ~ 20 μJoule da energia total do laser efetivamente atingem o capilar. Esta energia mostrou-se suficiente para obter sinais de boa amplitude com a fotomultiplicadora trabalhando com tensão aplicada entre 600 e 800 Volts. O sinal fotoelétrico é processado com um integrador gatilhado e a saída DC em função do tempo fornece o eletroferograma. Por conveniência das medidas temporais dos picos substituímos o traçador gráfico por um integrador modelo HP3390A da Hewlett Packard, que permite análise do eletroferograma fornecendo os dados de tempo de eluição, altura e largura dos picos.

RESULTADOS EXPERIMENTAIS

Na figura 4 mostramos um eletroferograma de alta sensibilidade para uma mistura de aminoácidos com quantidade de solução injetada de somente 5 nl e concentração de 20 nM (nanomolar).

Observamos que a sensibilidade de detecção é definida com sinal/ruído, S/N = 3, neste caso aproxima-se do valor de um attomol. Este resultado é bastante promissor tendo em vista possíveis melhoras no sistema, incluindo uma taxa de repetição do laser mais alta e a adição de um canal de referência para compensar flutuações na intensidade do laser.

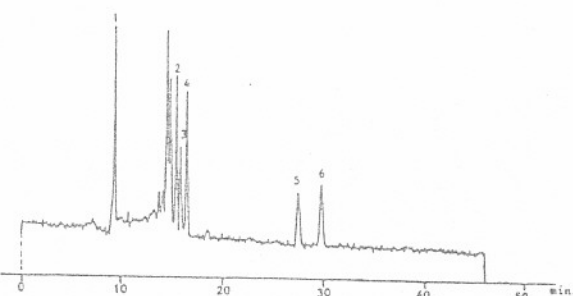


Figura 4. Eletroferograma de uma mistura de aminoácidos na concentração de 20 nM (nanomolar). Derivatização pré-capilar com orto-ftaldialdeído, injeção de 5 nl. Solução tampão de tetraborato de sódio 20 mM com 15% de metanol. 1- Etanolamina; 2- Serina; 3- Alanina; 4- Glutamina; 5- Ác. Glutâmico; 6- Ác. Aspártico.

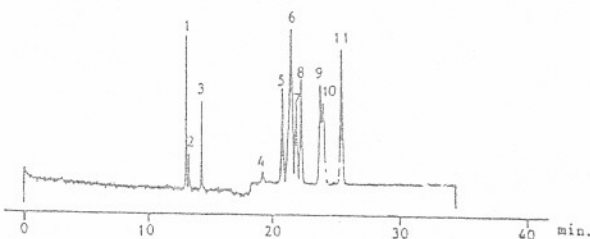


Figura 5. Mistura de 13 aminoácidos na concentração de 50 μM e derivatizados com fluorescamina. 1- Arginina; 2- Lisina; 3- Etanolamina; 4- Triptofana; 5- Tirosina; 6- Leucina + Glutamina + Fenilalanina; 7- Valina; 8- Treonina; 9- Lisina; 10- Serina; 11- Glicina.

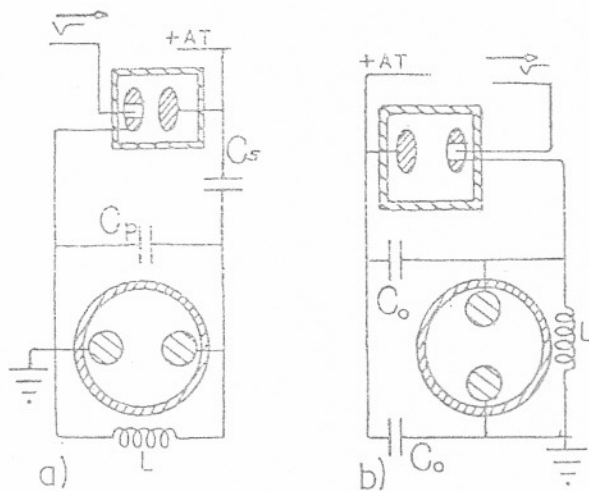


Figura 1. Circuito elétrico básico do laser-N₂: a) circuito de transferência de carga usado neste trabalho; b) circuito de Blumlein, geralmente usado para laser-N₂ de pressão atmosférica e com capacitores, C_o, formados por linhas de transmissão.

aumento considerável no tamanho do laser e com dissipação adicional do filamento, portanto, necessita de refrigeração forçada com ar.

O laser N₂ descrito, opera satisfatoriamente até 30 pulsos por segundo com praticamente a mesma energia de pulso. Taxas de repetição mais alta são possíveis desde que o volume de descarga seja bem menor, como foi verificado em vários desenhos com descarga longitudinal [1].

Presentemente experimentamos ressonadores instáveis a fim de reduzir a divergência angular. Isto permite obter melhor habilidade para focar o feixe em dimensões micrométricas, o que na aplicação em eletroforese capilar implica na possibilidade de reduzir a energia do pulso do laser e aumentar a taxa de repetição. Desenhos destas modificações serão publicadas oportunamente.

Notamos que o laser-N₂, aqui descrito, permite uma eficiência de conversão de 10 a 20% em luz visível, quando usado como fonte de excitação de um laser de corante [2]. Desta forma, obtém-se um laser sintonizável cobrindo todo o espectro visível com energia de pulso entre 10 e 20 μ Joule. Tais lasers são amplamente utilizados em conjunto com microscópios epifluorescentes em pesquisas biológicas para excitar fluorescência em tecidos ou criar danos localizados dentro de uma célula ou então para produzir microperfurações na membrana ocular.

ELETROFORESE CAPILAR COM DETECÇÃO FLUORESCENTE INDUZIDA POR LASER N₂

A eletroforese capilar (EC) surgiu nos últimos anos como uma das inovações mais fascinantes na área analítica de separação de moléculas orgânicas, com importância primordial em biociências e com grande potencial de aplicação em biotecnologia e no setor farmacêutico.

Desde os trabalhos originais de Jorgenson e Lukacs [8,9], no início da década passada, foram publicados inúmeros outros relatos. Destes citamos alguns mais recentes [10,11].

O método de separação molecular por EC possibilita analisar amostras orgânicas complexas e separar moléculas tanto de baixo como de alto peso molecular, como por exemplo, aminoácidos, peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos e muitos outros.

Em EC somente quantidades mínimas de amostra são necessárias e o manejo de apenas micro ou picogramas de amostra constitui um avanço significativo. Também o tempo de análise é reduzido quando comparado com outros métodos alternativos como cromatografia líquida, HPLC ou eletroforese em gel.

EC baseia-se no fenômeno de migração diferenciada de uma molécula com carga elétrica não nula num solvente e sob a ação de um campo elétrico aplicado. O mecanismo separador baseia-se na mobilidade eletroforética que é uma característica de cada tipo de molécula. Em princípio ela é diferente para moléculas quimicamente semelhantes mas de conformação distinta.

Na prática, em EC, usa-se geralmente capilares de quartzo fundido. O diâmetro do capilar varia normalmente entre 20 e 100 microns e o seu comprimento entre 10 e 100 cm. Pequena quantidade de amostra, na ordem de nl, é introduzida no capilar, constituindo a assim chamada zona. Quando um potencial elétrico, tipicamente entre 10 e 30 kVolt, é aplicado entre as extremidades do capilar, as zonas de cada soluto constituinte migram com velocidades diferentes de acordo com a mobilidade eletroforética, possibilitando a separação das zonas. A figura 2 mostra o esquema básico da EC.

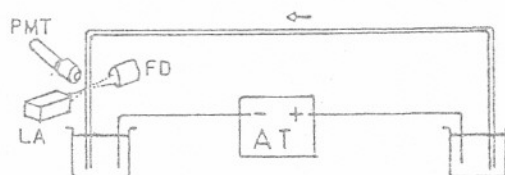


Figura 2. Esquema básico de Aparelho Eletroforese Capilar mostrando o capilar imerso nos reservatórios com a solução lamp, a fonte de alta tensão AT e o arranjo do detector fluorescente. A flecha indica a direção do fluxo eletrosmótico.

Entre os detectores ópticos empregados em EC os mais usados são aqueles que se baseiam em absorção de luz ultravioleta, usando-se lâmpadas com emissão entre 200 e 400 nm. Porém, devido ao caminho óptico curto ditado pelo diâmetro do capilar e/ou ao baixo coeficiente de absorção da amostra, a sensibilidade destes detectores compromete o limite da concentração mínima detectável. Mesmo assim, em casos favoráveis, a detecção não ultrapassa a ordem de femtomol (10^{-15}) de amostra.

Por outro lado, o método da fluorescência induzida apresenta limites de detecção bem menores, atingindo fatores de três ou mais ordens de grandeza se comparado com o da absorção. Além disto, o emprego de um laser para a excitação de fluorescência apresenta outra vantagem. O feixe pode ser focalizado com precisão e de maneira eficiente sobre o capilar, interceptando somente o volume da zona separada contendo o soluto que ocupa um volume de poucos nanolitros, de dimensões submilimétricas. O uso do laser, portanto, garante boa resolução espacial.

A primeira aplicação de laser para CE foi um laser He-Cd emitindo em 325 nm para detecção de dansil-aminoácidos [12]. Seguiram outras aplicações usando laser de argônio em 488 nm [13] com o uso de marcadores fluorescentes com absorção para o visível.

O uso do laser em instrumentação CE ainda está no início, porque o detector quase sempre deve ser desenhado para uma aplicação específica. Detectores fluorescentes para CE ou também para HPLC requerem que, em geral, a amostra seja derivatizada, isto é, que as moléculas de interesse recebam um marcador fluorogênico que as tornem fluorescentes. Este proce-

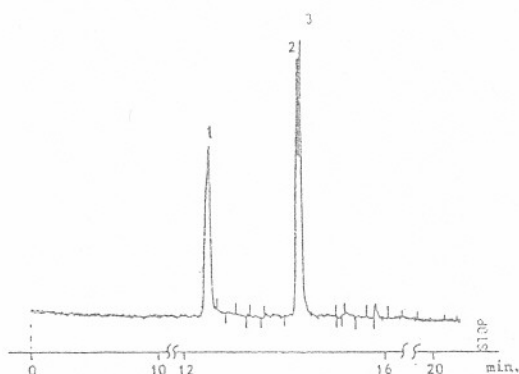


Figura 6. Mistura de peptídeos derivatizados com fluorescamina.

1- Bradicinina; 2- Metionil-lisil-bradicinina; 3- Lisil-bradicinina.

Quanto aos reagentes fluorogênicos usados, os resultados da figura 4 foram obtidos com orto-ftaldialdeído, enquanto os da figura 5 com fluorescamina. Em ambos os casos usamos técnica de derivatização pré-capilar. O eletroferograma da figura 6 mostra que os peptídeos com atividade biológica bradicinina, metionil-lisil-bradicinina e lisil-bradicinina foram resolvidos. Detalhes destes resultados junto com os resultados obtidos com plasma animal será objetivo de um trabalho em separado a ser publicado oportunamente [14].

CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos demonstramos a utilidade de um minilaser- N_2 pulsado na aplicação em Eletroforese Capilar. A boa sensibilidade obtida, para amostras altamente diluídas, compara-se satisfatoriamente com outras técnicas que usam o laser contínuo. Quanto à otimização da presente técnica, concluímos que os resultados presentes poderão ser superados com o uso de um laser- N_2 de menor energia de pulso, menor divergência angular e com uma taxa de repetição mais alta do que o utilizado neste trabalho. Esforços neste sentido já foram iniciados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem pelo suporte deste trabalho aos agentes financeiros: CNPq, FAPERGS e FINEP.

REFERÊNCIAS

- [1] "Nitrogen Lasers"; R.S. Kunabenchi, M.R. Gorbai and M.I. Savadatti; Prog. Quant. Electr. 9 (1984) 259, (Artigo de revisão).
- [2] "Dye Laser"; F.P. Schäfer ed. Topics in Appl. Phys., vol. 1, 3rd Ed., Springer Verlag (1990).
- [3] U. Rebhan, J. Hildebrandt and G. Skopp; Appl. Phys. 23 (1980) 341.
- [4] F. Encinas Sanz and J.M. Guerra Perez; Appl. Phys. B52 (1991) 42.
- [5] V. Hasson and H.M. von Bergmann; Rev. Sci. Instr. 50 (1979) 59.
- [6] H.M. von Bergmann; J. Phys. E: Sci. Instrum. 15 (1982) 807.
- [7] J.W. Chen, V. Nassisi and M.R. Perrone; Opt. Quantum Electron. 23 (1991) 35.
- [8] J.W. Jorgenson and K.D. Lukacs; Anal. Chem. 53 (1981) 1298.
- [9] J.W. Jorgenson and K.D. Lukacs; Science 222 (1983) 266.
- [10] A.G. Ewing, R.A. Wallingford and T.M. Olefitowicz; Anal.

Chem. 61 (1989) 292A.

[11] W.G. Kuhr; Anal. Chem. 62 (1990) 403R.

[12] P. Gozel, E. Gassmann, H. Michelson and R.N. Zare; Anal. Chem. 59 (1987) 44.

[13] M. Albin, R. Weinberger, E. Sapp and S. Moring; Anal. Chem. 63 (1991) 417.

[14] T.B.L. Kist, C. Termignoni and H.P. Grieneisen (em preparação).

ABSTRACT

The pulsed nitrogen laser with emission at 337 nm and low average power < 1 mW has properties which make its use favourable for analytical and microscopical measurements. We describe a N_2 laser of small physical dimensions. For the application of this laser in Capillary Electrophoresis we built and tested a fluorescence detector. We show results for aminoacids and peptides with good detection limits achieving a sensitivity in the attomole range for aminoacids when derivatized with OPA.

4.1.3 Sistema de Aquisição e Tratamento de Dados

Vamos relatar brevemente alguns pontos no que tange a aquisição e o tratamento dos dados. Em nosso trabalho o sinal de saída do integrador BOXCAR, que é proporcional à fluorescência e, conseqüentemente, proporcional ao número de moléculas presentes em uma região minúscula do capilar, foi coletado em um registrador linear, num integrador HP modelo 3390 A ou por um microcomputador PC mediante uma placa ADC.

Em nosso caso o eletroferograma consiste num sinal de intensidade de fluorescência (ordenada) versus tempo (abscissa). Os dados mais importantes são o tempo de retenção, a área dos picos, a altura, a variância e a forma dos mesmos. O tempo de retenção, como relatado anteriormente, é o parâmetro de identificação das moléculas. A área e a altura de um pico são proporcionais ao número correspondente de moléculas introduzidas no capilar. A variância dos picos é proporcional ao coeficiente de auto-difusão, isto se não houver outros mecanismos contribuindo para o alargamento dos mesmos. A forma dos picos deve ser simétrica pois o contrário indica sérios problemas, tais como: degradação molecular, perfil de velocidade não laminar, contaminação do capilar, super-aquecimento do líquido, adsorção na superfície interna do capilar e outros.

Neste sentido, a aquisição dos dados com o microcomputador mantém a maioria das informações. Com o registrador linear disponível se torna difícil determinar o tempo de retenção, a área, a altura e a variância dos picos com precisão adequada à sensibilidade e resolução do método.

O eletroferograma assim obtido de primeira mão contém a fluorescência versus tempo. Contudo, muitas vezes estamos interessados em saber o perfil de concentração ao longo do capilar. Para tanto, uma transformação sobre a coordenada temporal deve ser feita, o que resulta num perfil de concentração igual ao discutido na secção 2 do capítulo 3. A transformação que deve ser feita é a seguinte:

$$x = v(t_m - t), \quad (4.1)$$

onde x tem unidades de comprimento, $v = |\vec{v}_e + \vec{v}_{eo}|$, t é o tempo da coordenada abscissa do eletroferograma e t_m é o tempo de retenção do pico de interesse.

4.2 Procedimento Experimental

A par do que foi exposto, vamos relatar nesta secção como se realiza uma separação. Primeiramente vamos falar sobre marcação molecular fluorogênica, em seguida sobre introdução da amostra, depois sobre as condições gerais de operação e, por fim, sobre calibração.

4.2.1 Marcadores Moleculares Fluorescentes

A maioria das moléculas não apresentam uma eficiência quântica para fluorescência elevada quando expostas à radiação ultravioleta (337 nm) do laser de N₂. Então o que se fez foi utilizar marcadores moleculares fluorogênicos. Este procedimento consiste em prender, mediante uma reação química, uma estrutura molecular, que seja altamente fluorescente, à primeira molécula, de forma a torná-la perceptível ao sistema de detecção. Isto é também chamado derivação. Os métodos mais usuais são mostrados nas figuras abaixo. Existem trabalhos [58] onde os autores comparam vários métodos entre si, enquanto que noutros [62] novos métodos são desenvolvidos e testados. As reações de obtenção de derivados se dividem em dois grupos: aquelas que são efetuadas antes da introdução da amostra no capilar e aquelas que a reação é efetuada no interior do capilar um pouco antes das zonas entrarem no sistema de detecção. Tanto para um como para outro caso, as moléculas resultantes da reação são mostradas abaixo.

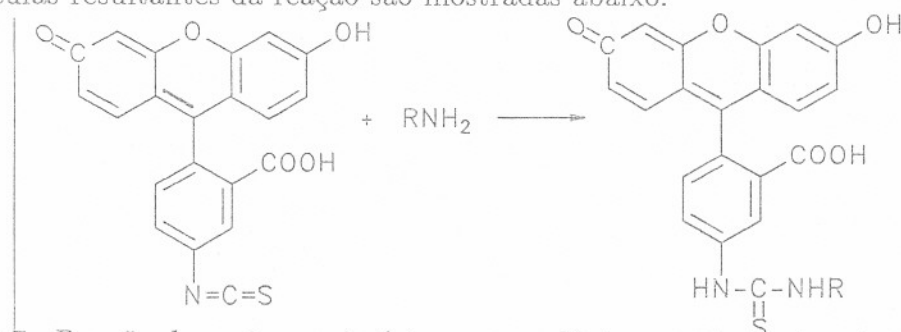


Figura 4.7: Reação de aminas primárias e secundárias com isotiocianato de fluoresceína. Em solução aquosa e pH 9,3 o máximo de absorção (λ_{ma}) do produto ocorre no entorno de 490 nm e o máximo da emissão (λ_{me}) se dá em torno de 560 nm. Estes máximos de absorção e emissão dependem principalmente da natureza e pH da solução.

Esta reação, figura 4.7, é um pouco lenta e requer de 4 a 24 hs. Piridina na mesma concentração dos reagentes é utilizada como catalizador para aumentar a velocidade da reação [58]. No nosso trabalho empregamos isotiocianato de fluoresceína e piridina juntas em concentração de 1 mM cada em acetona. Quando este método é empregado deve-se evitar o excesso de reagente, pois o reagente remanescente não reagido também fluoresce originando picos imensos no eletroferograma. Sob a ação do laser de N₂ este derivado apresenta uma eficiência quântica para fluorescência comparável a do *orto*-ftaldialdeído (OPA).

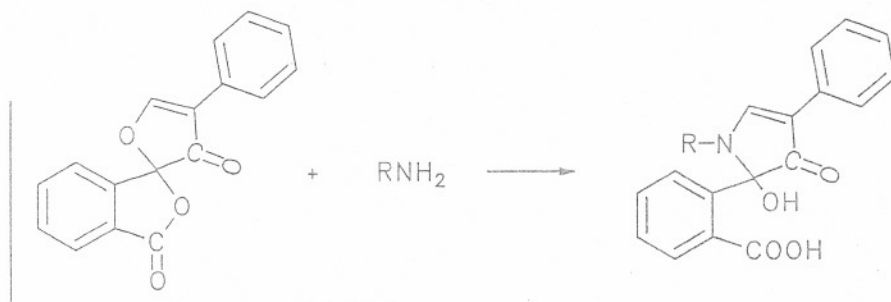


Figura 4.8: Reação da fluorescamina com aminas primárias. Este produto apresenta $\lambda_{ma}=390\text{ nm}$ e $\lambda_{me}=500\text{ nm}$

Este método, figura 4.8, é muito conveniente, pois o reagente excedente é rapidamente hidrolizado pela água e os produtos da hidrólise não são fluorescentes [63]. Com isto evita-se os picos do reagente no eletroferograma. A reação é feita simplesmente misturando um volume apropriado da solução de reagente (10 mM em metanol) com um volume de amostra em pH alcalino (9,3) [58]. O tempo de reação é de alguns minutos.

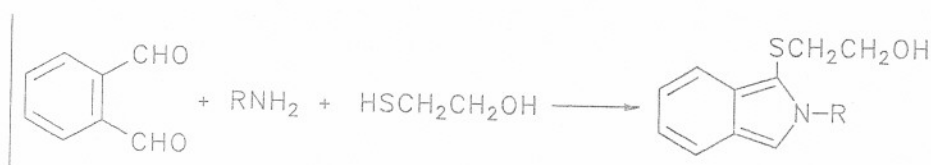


Figura 4.9: Reação do orto-ftaldialdeído (OPA) com aminas primárias e mercaptoetanol. $\lambda_{ma}=340\text{ nm}$ e $\lambda_{me}=455\text{ nm}$.

Já o método de marcação molecular fluorogênica mostrado na figura 4.9 apresentou os melhores resultados nos nossos testes com o laser de N_2 . Mas constatamos a instabilidade do produto. Existem trabalhos na literatura [64] alertando sobre este inconveniente. A reação é feita usando-se uma solução 10 mM de OPA e mercaptoetanol em metanol. A reação ocorre em poucos segundos. Um método de derivação com OPA cujo produto é mais estável é o mostrado na figura 4.10.

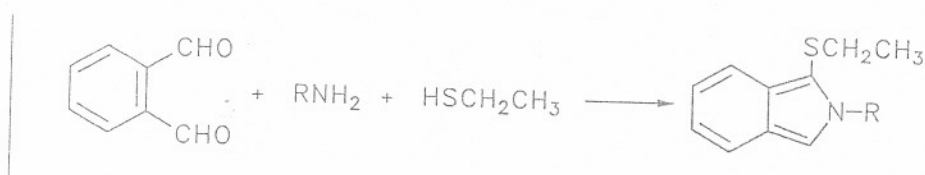


Figura 4.10: Reação do OPA com aminas primárias. A única diferença deste método em relação ao anterior é o emprego do etanotiol ao invés de mercaptoetanol. Os produtos desta derivação são mais estáveis [62].

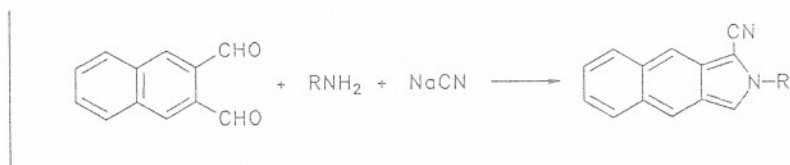


Figura 4.11: Reação do NDA (naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde) com aminas primárias resultando no produto denominado CBI (*N*-substituted 1-cyanobenz[*f*]isoindole). $\lambda_{ma}=430$ nm e $\lambda_{me}=500$ nm.

A vantagem do procedimento mostrado na figura 4.11 é que, além de estável, o produto possui o máximo da absorção no visível (azul) e uma eficiência quântica para fluorescência elevada [62]. Nesta faixa do espectro existem mais sistemas laser à disposição para serem empregados como fontes de excitação.

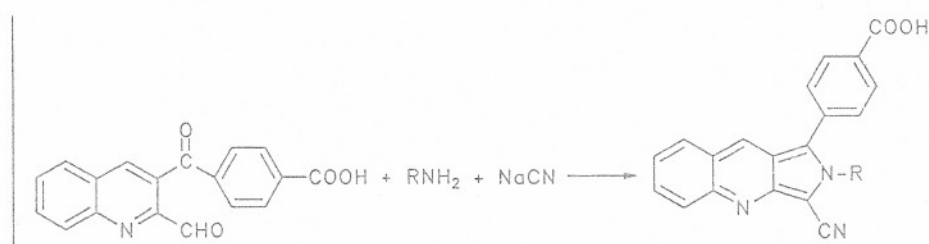


Figura 4.12: Reação de CBQCA (3-4-carboxybenzoyl-2-quinolinecarboxaldehyde) com aminas primárias. O produto apresenta $\lambda_{ma}=450$ nm e $\lambda_{me}=550$ nm.

O sistema laser para promover a excitação do produto da figura 4.12 pode ser o laser de Argônio ou o de Hélio-Cadmio [65].

Observe que todos os produtos das derivações acima apresentam o grupo isoindole, cuja estrutura é formada por um anel de quatro átomos de Carbono e mais um de Nitrogênio. O que muda basicamente entre um e outro são as vizinhanças deste grupo, ou seja, a magnitude do efeito eletroindutivo sobre as ligações π do anel. Esta estrutura é a responsável pela absorção e fluorescências nos comprimentos de onda acima citadas.

Para o método mostrado na figura 4.13 usa-se o reagente preparado em acetona. Após a reação com as aminas o excesso de reagente é facilmente extraído com pentano [58].

Estes são os métodos de marcação molecular fluorogênica mais usuais em EC. Na subsecção seguinte vamos relatar os procedimentos mais usuais de introdução da amostra.

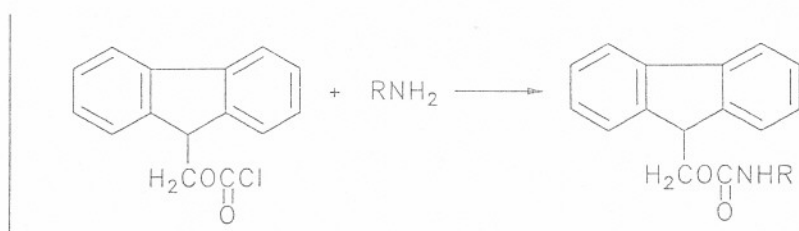


Figura 4.13: Reação do cloroformato de 9-fluorenilmetila com aminas primárias e secundárias. $\lambda_{ma}=260 \text{ nm}$ e $\lambda_{me}=305 \text{ nm}$.

4.2.2 Introdução da Amostra

Os métodos de introdução de amostra mais usados são o hidrodinâmico e o eletrocinético. Também foram testados os do tipo “divisão de Fluxo” [66] e um denominado “on-column sample gating” [67]. Neste último, a amostra é introduzida continuamente e um laser potente é focado sobre a coluna bem na extremidade inicial da mesma. O laser continuamente “fotolisa” (degrada) as espécies moleculares fluorogenicamente marcadas, exceto durante um pequeno intervalo de tempo Δt , este intervalo se constitui no da amostragem.

O método tipo “divisor de fluxo” requer um bloco de injeção com pelo menos três vias e uma microseringa de alguns microlitros (μl). Numa das vias entra continuamente a solução tampão para o bloco sendo que a amostra é injetada neste fluxo. Uma pequena fração deste fluxo entra na segunda via na qual está conectado o capilar, e o restante é purgado por uma terceira via. Desta forma a fração da amostra coletada é igual a razão entre o fluxo do capilar pelo fluxo de entrada.

No método tipo eletrocinético [68], simplesmente retira-se o capilar do reservatório e introduz-se no recipiente da amostra juntamente com um eletrodo. Entre este eletrodo e o do reservatório oposto se aplica uma diferença de potencial geralmente pequena, tipo 1000 V. A quantidade (Q) de amostra introduzida no capilar é dada por

$$Q = \pi r^2 c x = \frac{(\mu_e + \mu_{eo}) V_i \pi r^2 t_i c}{L}, \quad (4.2)$$

onde Q é a quantidade (móis) injetada, r é o raio do capilar, V_i é a diferença de potencial de injeção, t_i é o tempo de injeção, c é a concentração e L o comprimento total do capilar. Normalmente $\mu_e \ll \mu_{eo}$, mas mesmo assim, quantidades diferentes são injetadas para moléculas diferentes de uma mesma amostra.

O método hidrodinâmico consiste em aplicar uma diferença de pressão (ΔP) entre os extremos do capilar ou deslocar os recipientes de forma a ter-se uma diferença de altura

(Δh) entre os níveis das soluções. Este último procedimento é também denominado gravimétrico. Usando a equação de Poiseuille pode-se determinar a quantidade de amostra injetada, que será

$$Q = \frac{\pi r^4 \Delta P t_i c}{8 \eta L} \quad (4.3)$$

quando uma diferença de altura (Δh) é usada, então ΔP deve ser substituído pela pressão da coluna de líquido correspondente, resultando

$$Q = \frac{\pi r^4 \rho g \Delta h t_i c}{8 \eta L}, \quad (4.4)$$

onde g é a aceleração da gravidade, t_i o tempo de injeção, η a viscosidade do líquido que preenche a coluna e L o comprimento total da coluna.

Em todo trabalho utilizamos o método hidrodinâmico e por gravidade. Geralmente utilizamos de 5 a 20 cm de diferença de altura durante um tempo variável, dependente do volume de injeção desejado, mas geralmente da ordem de 10 a 60 segundos. Na sub-seção calibração relatamos um procedimento muito preciso de medir o volume injetado.

4.2.3 Condições Gerais de Operação

O volume de amostra injetado normalmente foi 3, 5 ou 7 nl.

Na eletroforese uma diferença de potencial de 18000 V dc foi aplicada.

A tensão aplicada na fotomultiplicadora foi de 400 a 600 Volts.

Cuidado especial deve ser tomado no ajuste do BOXCAR. Pois o tempo de integração não deve ser longo demais para não alterar o eletroferograma, e nem curto demais a ponto de comprometer a relação sinal ruído. Para o *BOXCAR AVERAGER Princeton Applied Research Model 162/164* utilizamos os seguintes parâmetros: *Integrator time constant* = 1 μ s, *aperture delay range* = 1 μ s (10%), *aperture duration* = 0.5 μ s, *output time constant* = 0.1 s e *averaging mode* = exponencial.

A diluição da amostra, quando necessária, foi feita com a própria solução tampão empregada no preenchimento do capilar e dos reservatórios mostrados na figura 4.1 e que em nosso trabalho foi de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 20 mM em H_2O e Metanol 15% (V/V). Tivemos o cuidado também de sempre filtrar esta solução em filtro de nylon 0.22 μ m (MSI-Westboro, MA, USA) antes do uso.

Todos os reagentes empregados são do tipo "grau analítico" e a água usada na preparação do tampão é destilada.

No início de cada dia o capilar foi lavado com um fluxo de solução 0,5 M de hidróxido de potássio por 5 minutos sob pressão de 2 kg/cm² (~30 Lbs) de N₂, seguido por uma lavagem com a própria solução tampão.

As reações de derivação foram sempre efetuadas em meio alcalino, formado pela solução tampão e mais as alíquotas de amostra e reagente. Sempre que possível, no final da reação, o pH desta solução foi conferido com papel indicador (o pH deve ser 9,3).

4.2.4 Calibração

Calibração consiste em efetuar medidas de amostras padrões de concentração conhecida, posteriormente faz-se a medida em condições iguais de uma amostra de concentração desconhecida, e então, por comparação pode-se inferir a concentração de um ou mais componentes nesta última. Este procedimento é denominado de calibração com padrão externo. Mas como é muito difícil manter a exata repetibilidade de condições, então usa-se um método mais preciso denominado método do padrão interno.

No nosso trabalho de calibração utilizamos este último, que consiste no seguinte: Antes da medida dos padrões acima, adiciona-se um terceiro componente com tempo de retenção próximo dos demais mas separado destes, de forma que o pico de referência tenha um valor de área ou altura intermediário ao dos padrões. O mesmo procedimento é feito na amostra cuja concentração dos componentes desejamos saber. A curva de calibração é feita colocando-se na abscissa a concentração de cada padrão e na ordenada a relação *área componente/área referência*. Este procedimento elimina o erro devido as flutuações do sistema de detecção pois ele afetará a área ou altura do pico de referência na mesma proporção. Por flutuações do sistema de detecção queremos dizer: Variações na potência de saída do laser que é a fonte de excitação; variações no ganho da fotomultiplicadora; variações no alinhamento óptico tanto do feixe de excitação quanto da fluorescência. Este método elimina também o erro devido as variações na velocidade eletrosmótica e o erro de injeção, pois a relação *área componente/área referência* independe do volume introduzido no capilar. A figura 4.15 é um exemplo de uma curva de calibração.

Por fim, queremos relatar um procedimento que permite verificar se a resposta do sistema é linear e, ao mesmo tempo, medir exatamente o volume injetado em função de t ; e Δh , como mostrado na equação (4.4). O procedimento é o seguinte: Injeta-se a amostra contendo um componente neutro por 20 segundos a uma altura Δh . Após injeta-se solução tampão por um tempo t (digamos 4 minutos e 30 segundos) na mesma altura e, por fim, injeta-se novamente amostra mas em volume dobrado, isto é, por 40 segundos na mesma altura. O eletroferograma terá dois picos como mostra a figura 4.14, e se o último tiver o dobro da área ou altura então estamos no regime linear. Observe também que o tempo

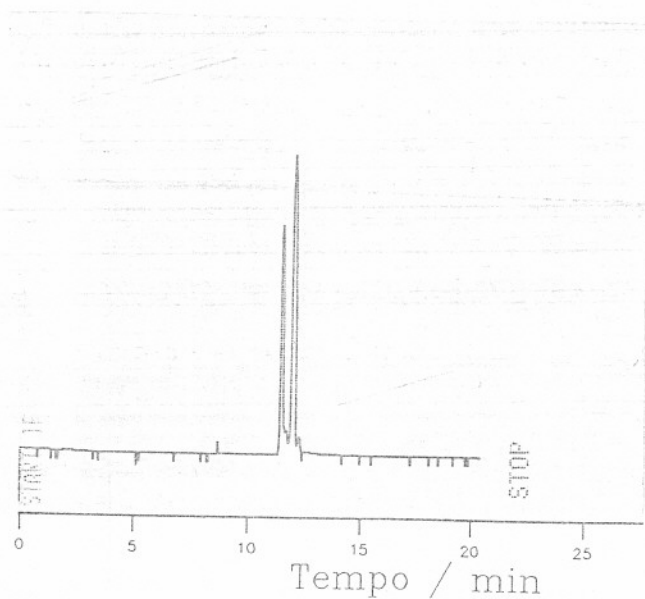


Figura 4.14: Eletroferograma resultante de duas injeções sucessivas da mesma amostra. A segunda injeção possui o dobro de volume da primeira. Amostra de Etanolamina $50 \mu\text{M}$ com o marcador fluorogênico OPA.

que separa o centro da primeira injeção do da última, são exatamente $5 \text{ min} = 300 \text{ s}$. De posse deste dado e mais do tempo de retenção de cada pico (t_1 e t_2) podemos calcular o comprimento ($2h$) da injeção

$$2h = v\Delta t = \frac{l(t_2 - t_1)}{t_2}, \quad (4.5)$$

onde $2h$ é o mesmo das equações (3.9) e (3.15) do capítulo 3 e l é a distância do início do capilar até o ponto de detecção. O volume de amostra injetado por unidade de tempo e unidade de altura (V_{am}) será

$$V_{am} = \frac{\pi r^2 l (t_2 - t_1)}{t_2 t \Delta h}, \quad (4.6)$$

onde r é o raio do capilar e, no nosso caso, o tempo de injeção de tampão foi $t=300 \text{ s}$.

Curva de Calibracao da BK

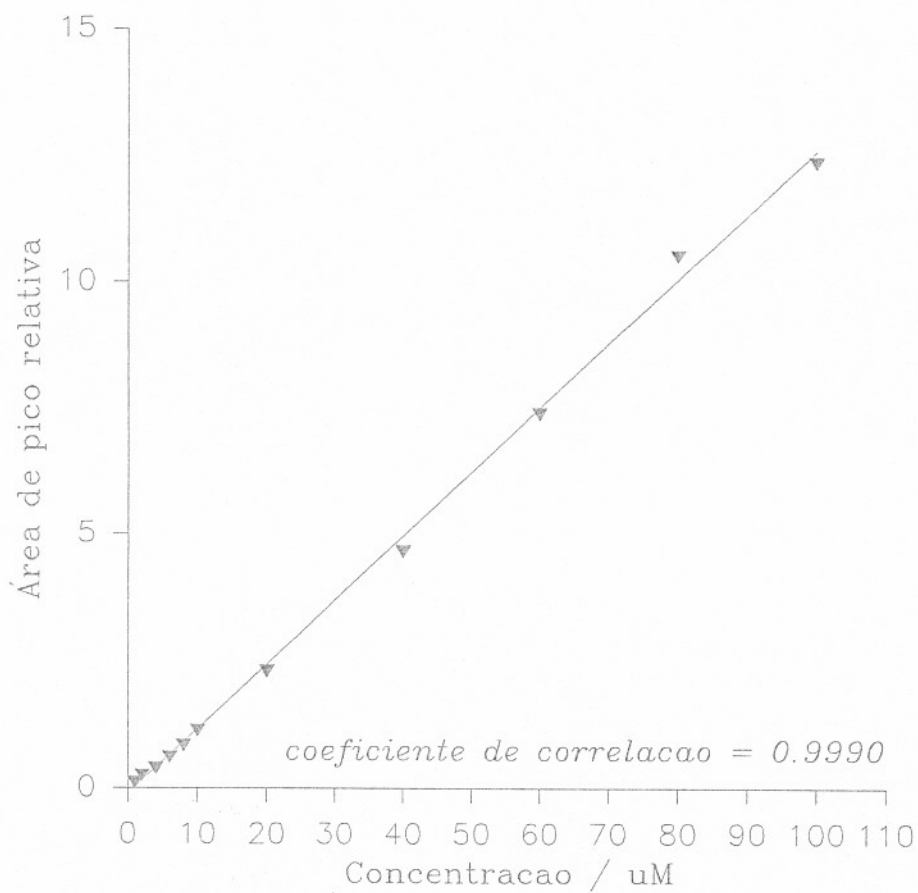


Figura 4.15: Curva de calibração da bradicinina no intervalo de concentração de 1 a 100 μM usando-se o aminoácido arginina como padrão interno.

Capítulo 5

APLICAÇÕES NA SEPARAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

Neste capítulo relataremos as aplicações da EC com sistema de detecção por fluorescência induzida a laser na separação de biomoléculas como L- α -aminoácidos, peptídeos e neurotransmissores. Encontra-se na literatura uma gama muito mais ampla de aplicações da EC. J.Liu et al. [69] separaram peptídeos usando mais de uma variante de EC e com três marcadores fluorogênicos diferentes; M.V.Novotny et al. relataram os últimos avanços na determinação de aminoácidos, peptídeos e proteínas [70]; foram determinados neurotransmissores presentes em uma única célula [71]. Uma aplicação muito interessante é no seqüenciamento de DNA [72-73] e íons metálicos também podem ser determinados mediante o uso de agentes complexantes fluorescentes [74].

5.1 Aminoácidos

São denominados aminoácidos as moléculas providas ao mesmo tempo do radical aminado ($-\text{NH}_2$) e do radical carboxila ($-\text{COOH}$). Existem pelo menos 23 L- α - aminoácidos de importância biológica. Uma das principais aplicações potenciais da EC é justamente na separação de aminoácidos.

Em solução aquosa e numa faixa ampla de pH o grupo funcional amina é o responsável pela carga positiva da molécula e o grupo carboxila pela carga negativa. No processo de derivação os marcadores moleculares fluorogênicos normalmente se ligam à amina, portanto, sob a ação do campo elétrico a maioria dos derivados de aminoácidos migram para o ânodo. Neste ponto a figura 5.1 é muito elucidativa, pois o pico da esquerda é de uma molécula neutra (etanolamina), o do centro é de uma molécula com um grupamento carboxílico (serina) e o da direita possui dois grupamentos carboxílicos (ácido glutâmico).

Todos derivados foram obtidos com *orto*-ftaldialdeído (OPA). Observe que o componente do primeiro pico (etanolamina) possui velocidade eletroforética nula. Portanto, a velocidade deste componente é igual a velocidade eletrosmótica, o que nos permite calcular a mobilidade eletrosmótica, ver página 18, e o potencial zeta da superfície interna do capilar (2.26).

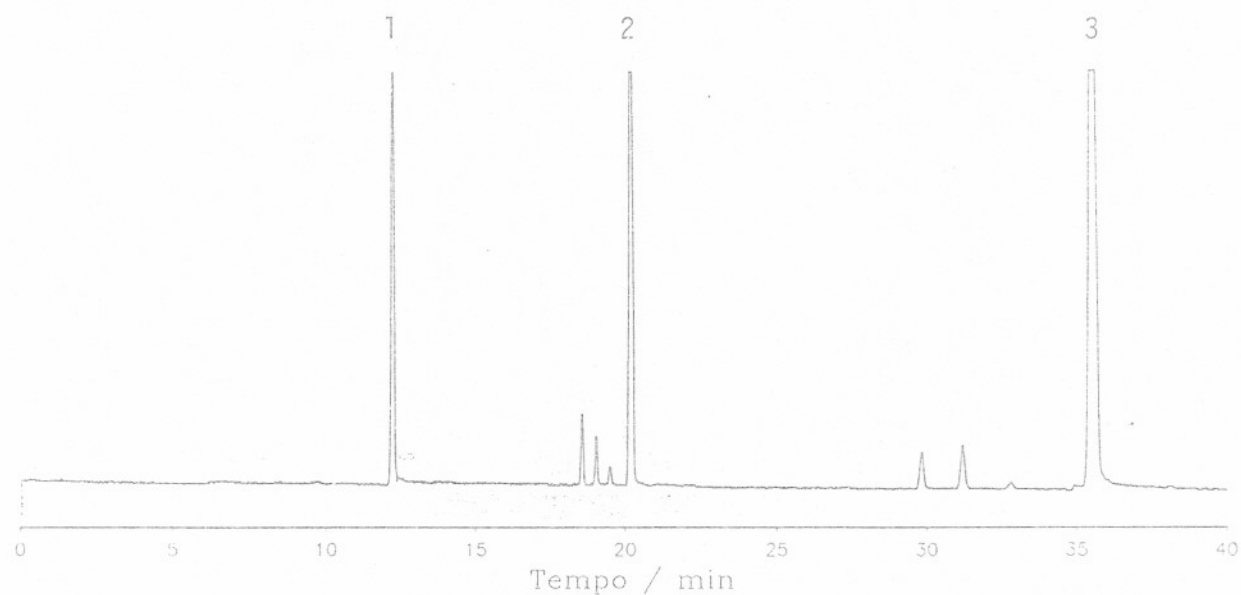


Figura 5.1: Eletroferograma de uma mistura padrão de derivados de aminoácidos (1=etanolamina, 2=serina e 3=ácido glutâmico) na concentração de $300 \mu\text{M}$ obtidos pela reação com *orto*-ftaldialdeído. O sinal destes três componentes está saturado e os outros seis picos que aparecem são contaminantes. Tensão de 18 kV, capilar de $50 \mu\text{m}$ d.i. \times 64,7 cm (59,5 até detector) de comprimento. Solução tampão de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 20 mM em água e metanol 15% (V/V) e pH 9,3. A corrente através do capilar foi $10,3 \mu\text{A}$.

Como se observa nas figuras 5.2 a 5.5 os aminoácidos não são todos resolvidos (separados) entre si. Contudo, como nos indicam as equações (3.18) e (3.19), uma resolução maior seria possível empregando-se uma tensão mais elevada.

Todos derivados foram obtidos com *orto*-ftaldialdeído (OPA). Observe que o componente do primeiro pico (etanolamina) possui velocidade eletroforética nula. Portanto, a velocidade deste componente é igual a velocidade eletrosmótica, o que nos permite calcular a mobilidade eletrosmótica, ver página 18, e o potencial zeta da superfície interna do capilar (2.26).

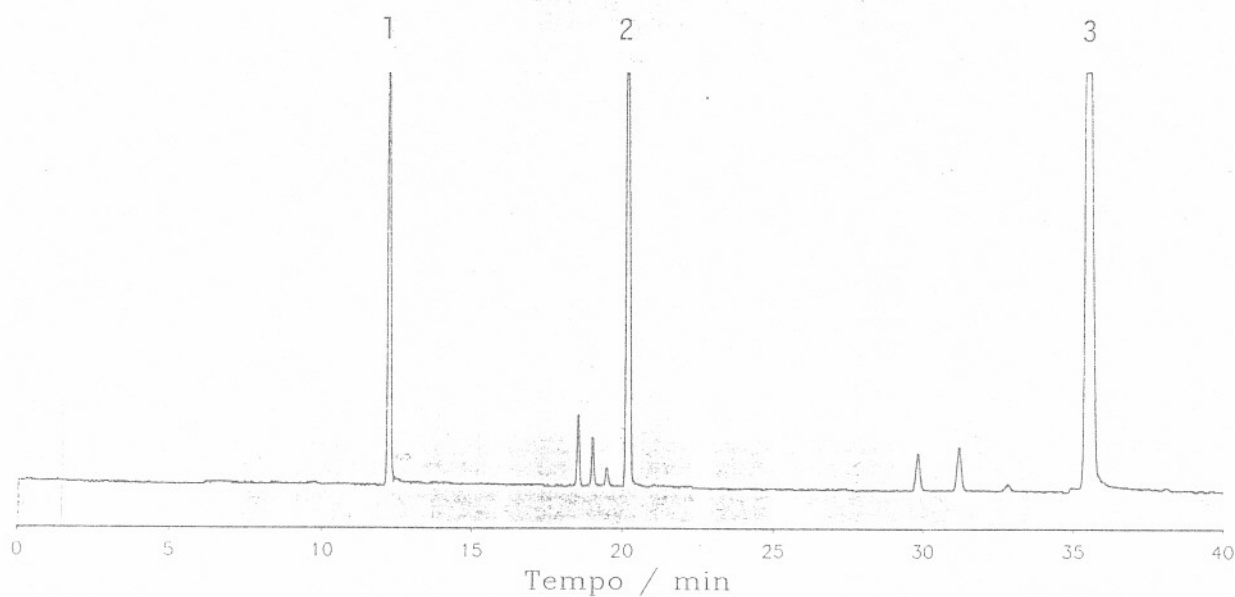


Figura 5.1: *Eletroferograma de uma mistura padrão de derivados de aminoácidos (1=etanolamina, 2=serina e 3=ácido glutâmico) na concentração de 300 μ M obtidos pela reação com orto-ftaldialdeído. O sinal destes três componentes está saturado e os outros seis picos que aparecem são contaminantes. Tensão de 18 kV, capilar de 50 μ m d.i. x 64,7 cm (59,5 até detector) de comprimento. Solução tampão de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 20 mM em água e metanol 15% (V/V) e pH 9,3. A corrente através do capilar foi 10,3 μ A.*

Como se observa nas figuras 5.2 a 5.5 os aminoácidos não são todos resolvidos (separados) entre si. Contudo, como nos indicam as equações (3.18) e (3.19), uma resolução maior seria possível empregando-se uma tensão mais elevada.

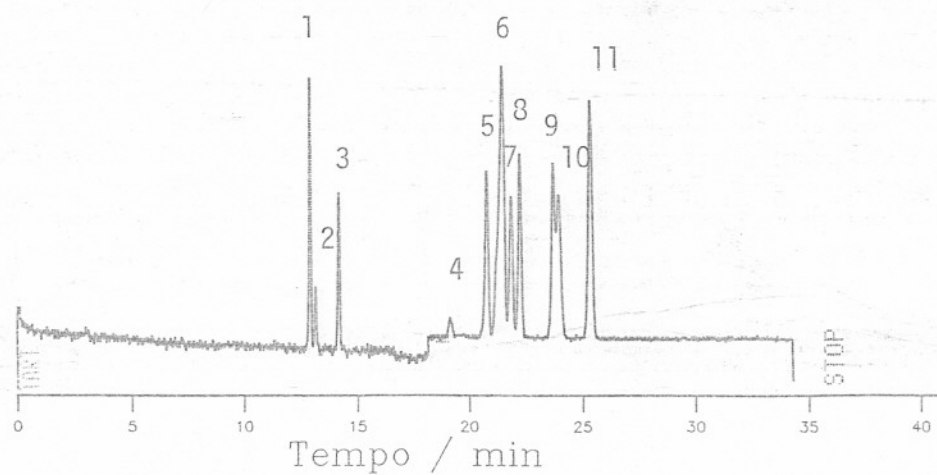


Figura 5.2: Eletroferograma de uma mistura padrão de etanolamina e mais onze *L*- α -aminoácidos (1=arginina, 2=lisina 3=etanolamina, 4=triptofana, 5=tirosina, 6=leucina+glutamina+fenilalanina, 7=valina, 8=treonina, 9=lisina, 10=serina, 11=glicina). Todos estão na concentração de $20 \mu\text{M}$ e a derivação foi com fluorescamina. Demais condições conforme descrito na figura 5.1.

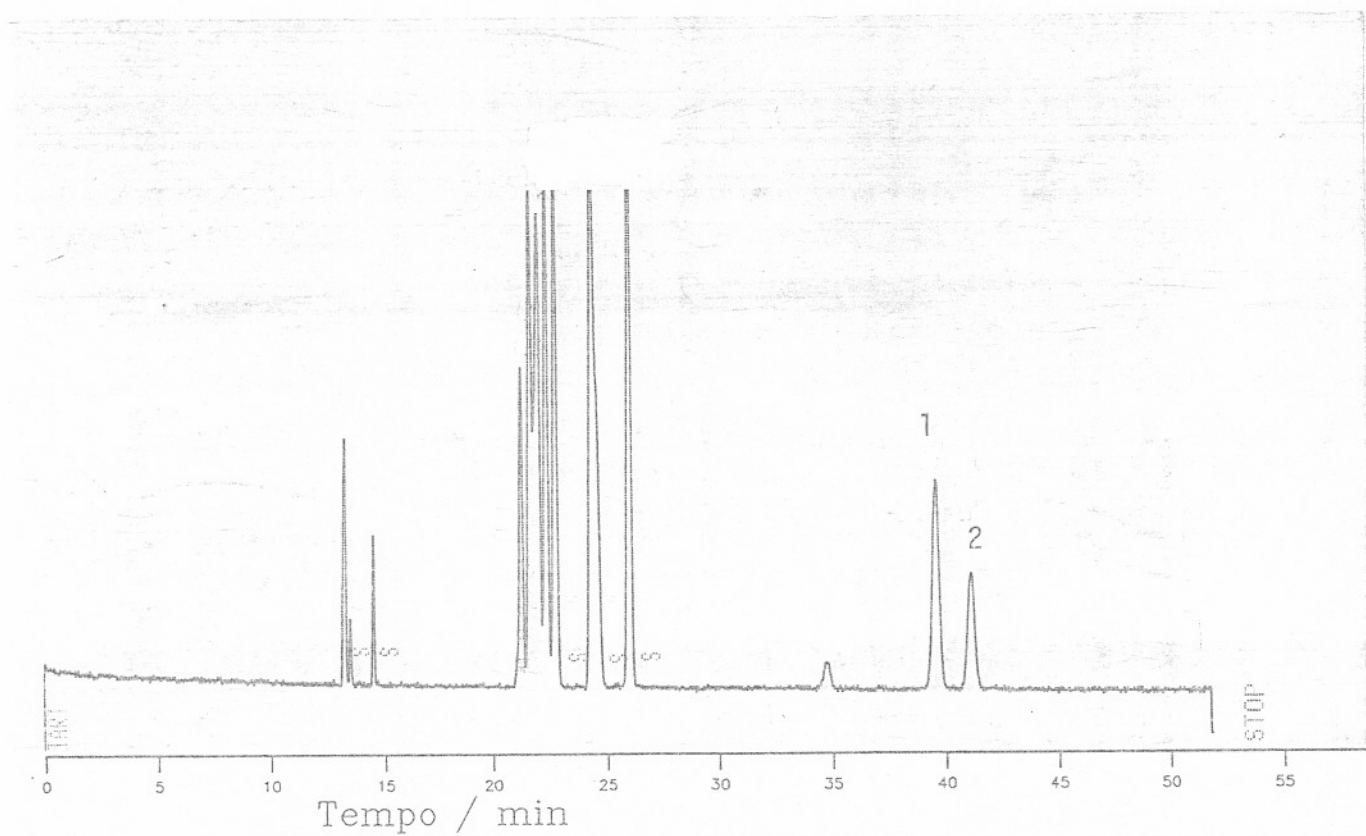


Figura 5.3: Condições idênticas a anterior, porém esta amostra contém dezenove aminoácidos (1=ác. glutâmico, 2=ác. aspártico).

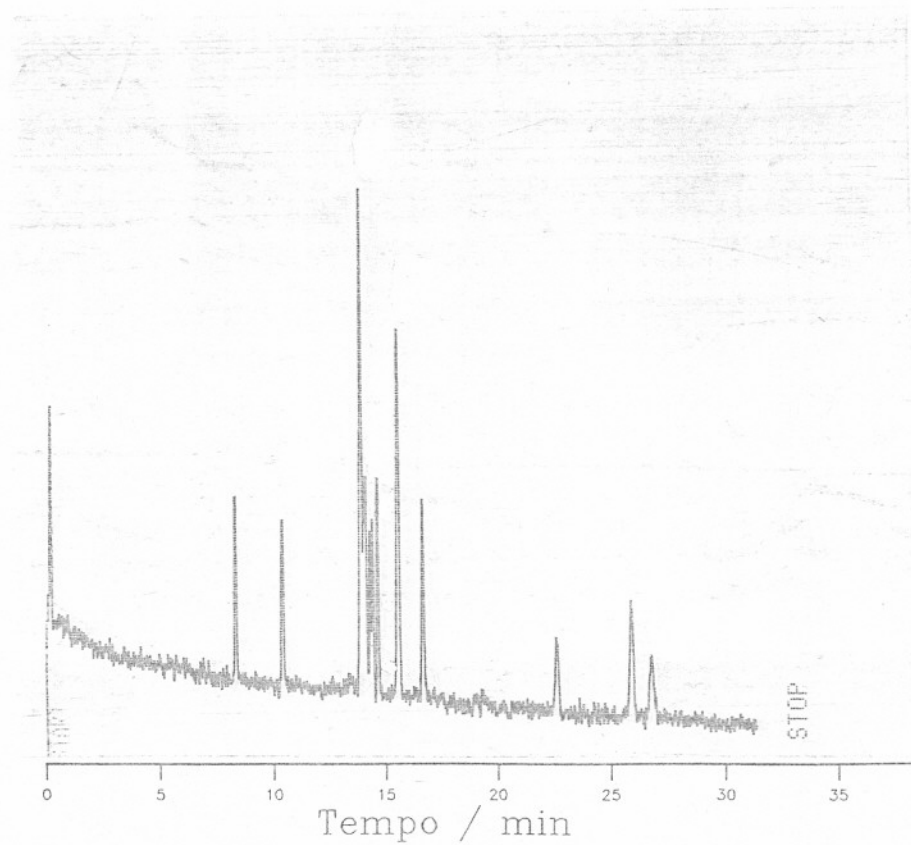


Figura 5.4: Uma mistura de derivados de etanolamina e de dezenove aminoácidos na concentração de $50 \mu\text{M}$ obtidos pela reação com fluorescamina. Solução tampão como descrito anteriormente, porém sem metanol e em $\text{pH}=11$. Demais condições conforme descrito na figura 5.1.

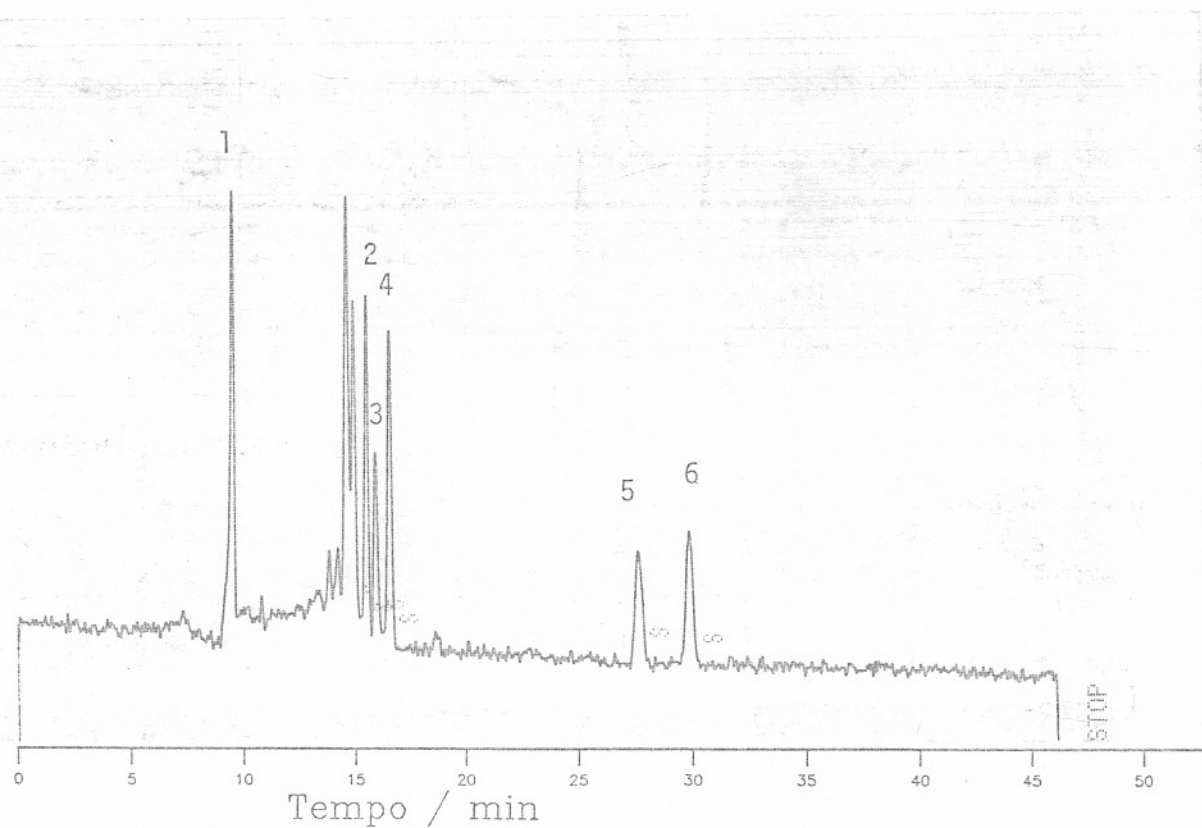


Figura 5.5: Eletroferograma de uma mistura padrão de etanolamina e mais onze aminoácidos (1=etanolamina, 2=serina, 3=alanina, 4=glutamina, 5=ác. glutâmico, 6=ác. aspártico). Todos na concentração de 20 nM e derivados com OPA. Demais condições conforme descrito na figura 5.1.

5.2 Peptídeos

Peptídeos são compostos formados por dois ou mais aminoácidos em que o grupo α -carboxila de um liga-se ao grupo α -amino do outro, com a eliminação de uma molécula de água, formando, assim, uma ligação peptídica, (-CO-NH-). Os peptídeos bradicinina, lisil-bradicinina e metionil-lisil-bradicinina possuem 9, 10 e 11 aminoácidos respectivamente. A fórmula estrutural deste último é dado pela figura 5.6.

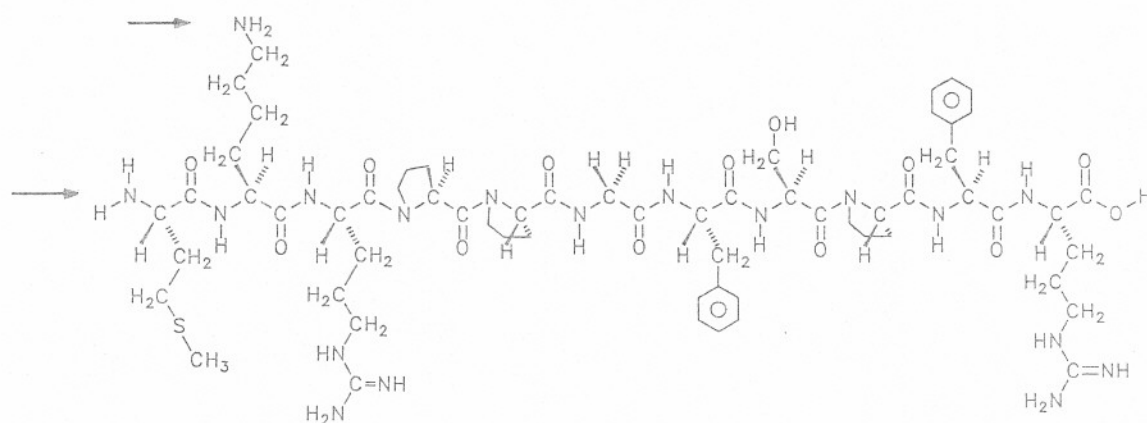


Figura 5.6: Representação da molécula metionil-lisil-bradicinina. Pode-se observar a seqüência dos aminoácidos na cadeia deste peptídeo. Os grupos amins primárias que reagem com OPA e fluorescamina estão assinalados com uma seta.

A figura 5.7 é um eletroferograma da eletroforese capilar de zona de cinco peptídeos mais um aminoácido usado como padrão interno.

TABELA 5.1

REPETIBILIDADE DOS TEMPOS DE RETENCAO.

	Retencao Relativa(n=13)			Tempo Retencao(n=13)		
	Media	D.P.	D.P.R.(%)	Media	D.P.	D.P.R.(%)
BK	0.701	0.002	0.30	12.7	0.2	1.6
MLBK	0.807	0.002	0.23	14.7	0.2	1.4
LBK	0.812	0.002	0.24	14.8	0.2	1.4
Arg*	1.000	0.000	0.00	18.2	0.3	1.6

* Amino-ácido arginina usado como padrao interno.

A tabela acima nos mostra a repetibilidade dos tempos de retenção com o uso de

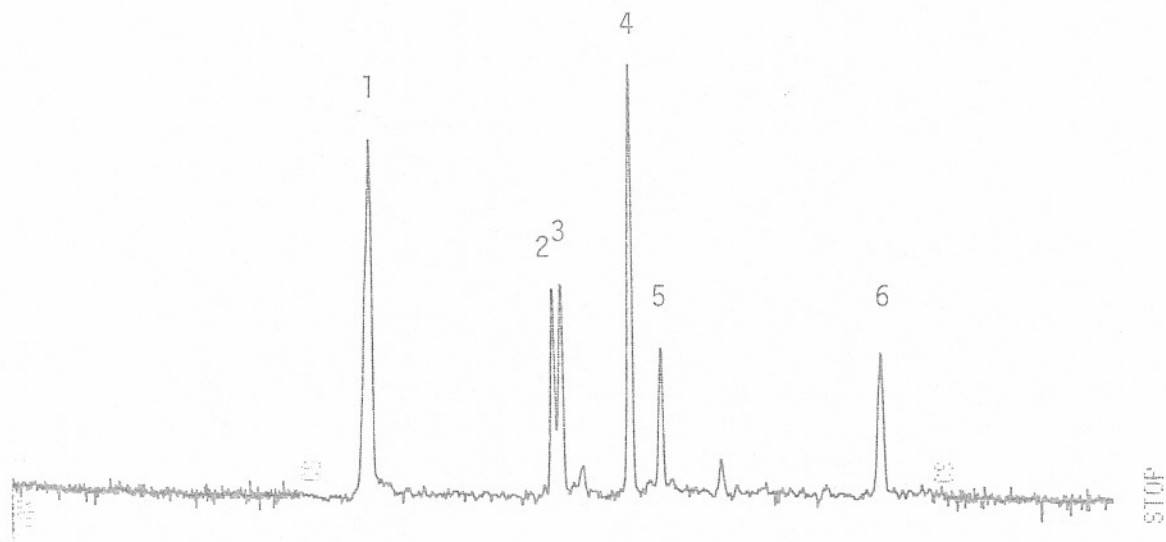


Figura 5.7: Eletroferograma de uma amostra contendo cinco peptídeos (1=bradicinina, 2=lisil-bradicinina, 3=metionil-lisil-bradicinina, 4=bradicinina 1-8, 5=bradicinina 2-9) e mais um aminoácido (6=arginina) usado como padrão interno. Demais condições exatamente como descrito na figura 4.5.

padrão interno (arginina) e sem padrão interno. Observe que com o uso de padrão interno o desvio padrão relativo percentual (D.P.R.(%)) é muito menor. Isto se deve ao fato dos tempos de retenção do pico de referência e dos demais serem afetados na mesma proporção pelas variações na velocidade eletrosmótica. A velocidade eletrosmótica varia principalmente devido a variação da temperatura, do potencial zeta e do campo aplicado, como mostra a equação (2.25).

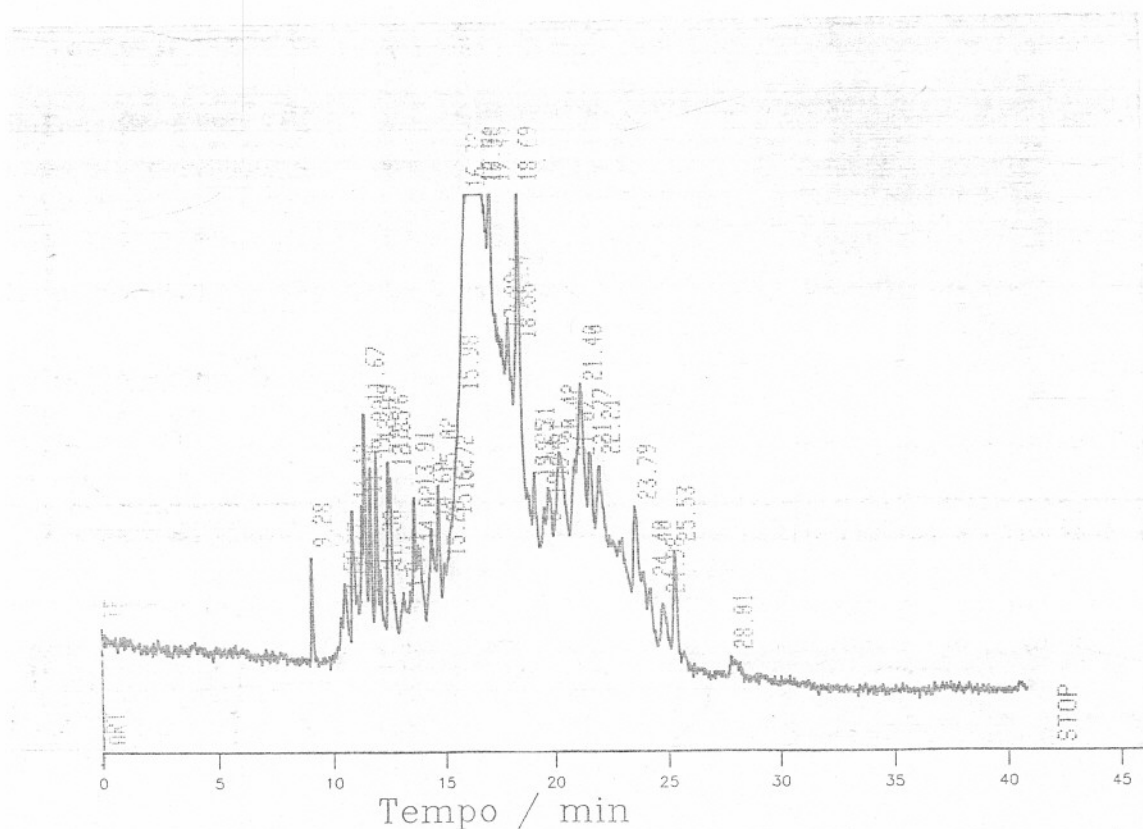


Figura 5.8: *Eletroferograma de soro bovino. Observa-se uma grande quantidade de picos, obviamente devido a grande quantidade de espécies moleculares que compõem este tipo de amostra biológica.*

5.3 Neurotransmissores

A separação e detecção de neurotransmissores em amostras com baixos níveis de concentração é muitas vezes desejado, principalmente em trabalhos de investigações em neurofisiologia.

Como um exemplo de aplicação da EC nesta área, separamos serotonina e melatonina entre si. No que concerne a detecção destes componentes deve-se observar que a melatonina possui somente o grupo funcional amina secundária. Portanto, a marcação fluorogênica com isotiocianato de fluoresceína (FITC) se faz necessária, já que os principais marcadores moleculares descritos no secção 4.2.1 reagem somente com as aminas primárias.

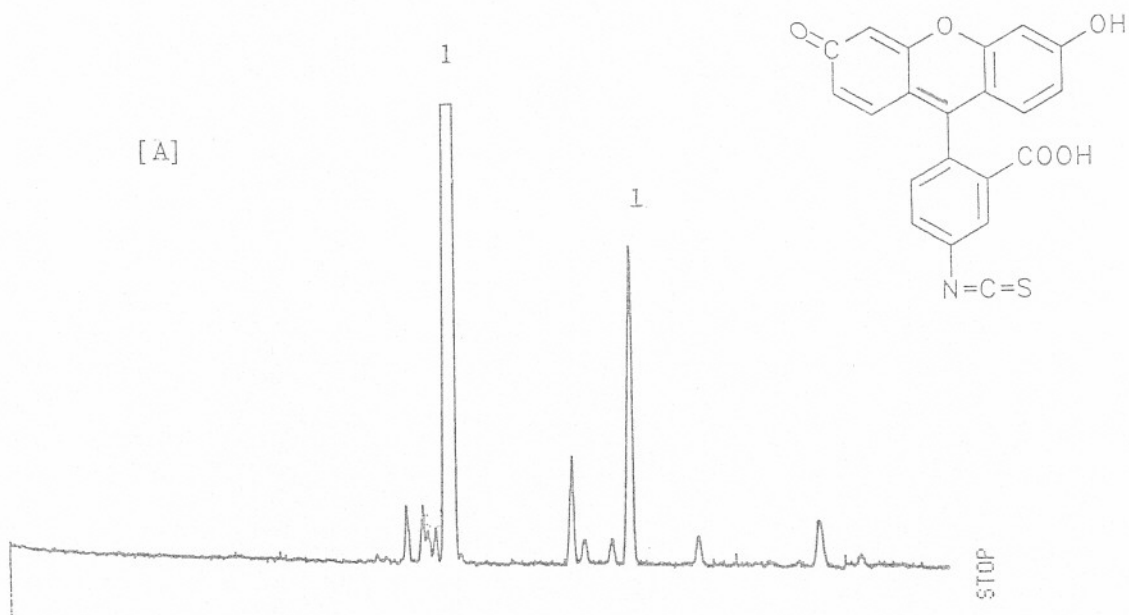


Figura 5.9: Eletroferograma [A] do isotiocianato de fluoresceína (FITC) isolado (1). Este composto é usado como marcador molecular fluorogênico.

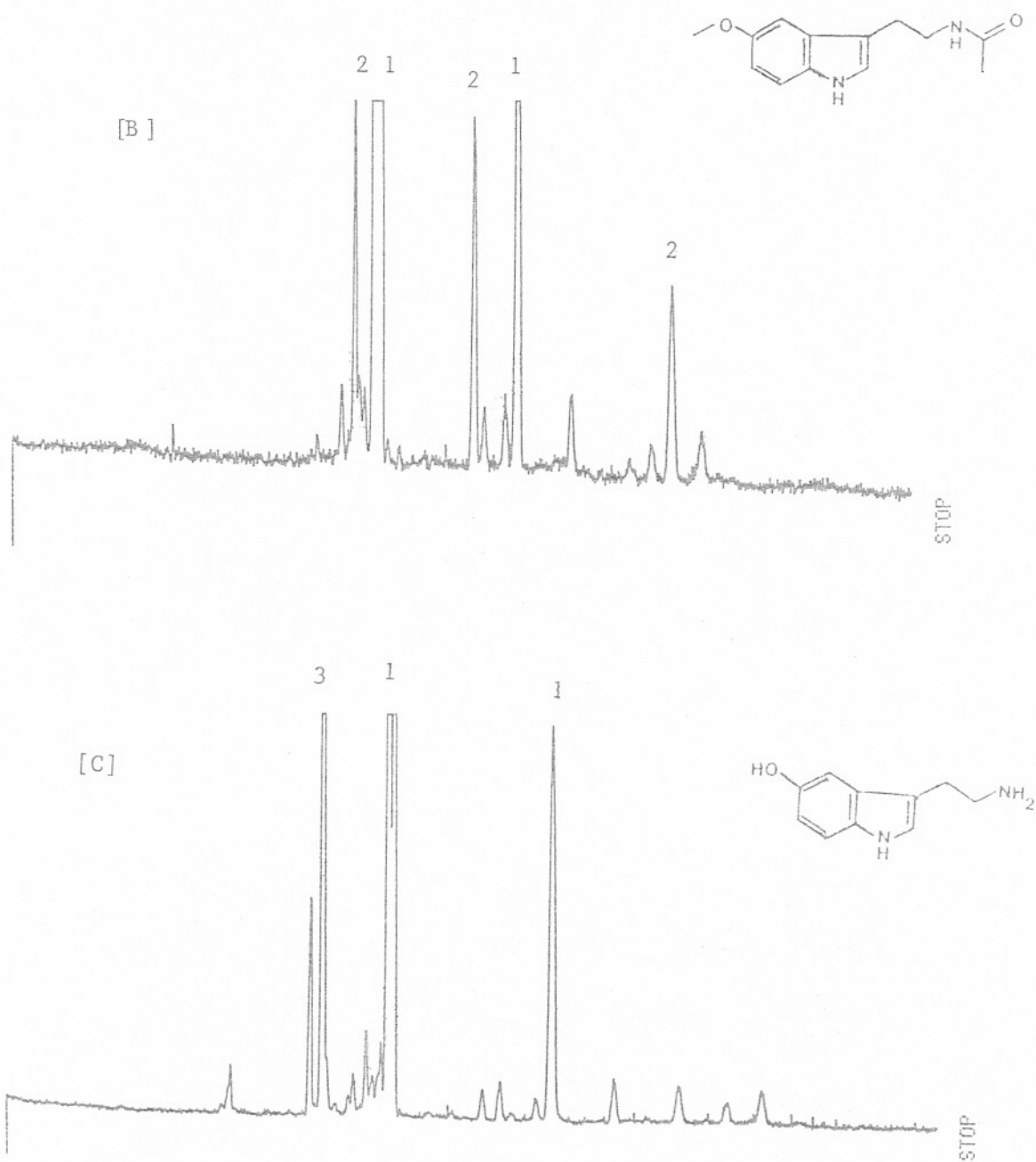


Figura 5.10: Eletroferograma [B] dos produtos da reação da melatonina (2) na concentração de $100 \mu\text{M}$ com excesso de FITC. Eletroferograma [C] dos produtos da reação da serotonina (3) na concentração de $100 \mu\text{M}$ com excesso de FITC. Observe que as reações foram incompletas. Demais condições como descrito na figura 5.1.

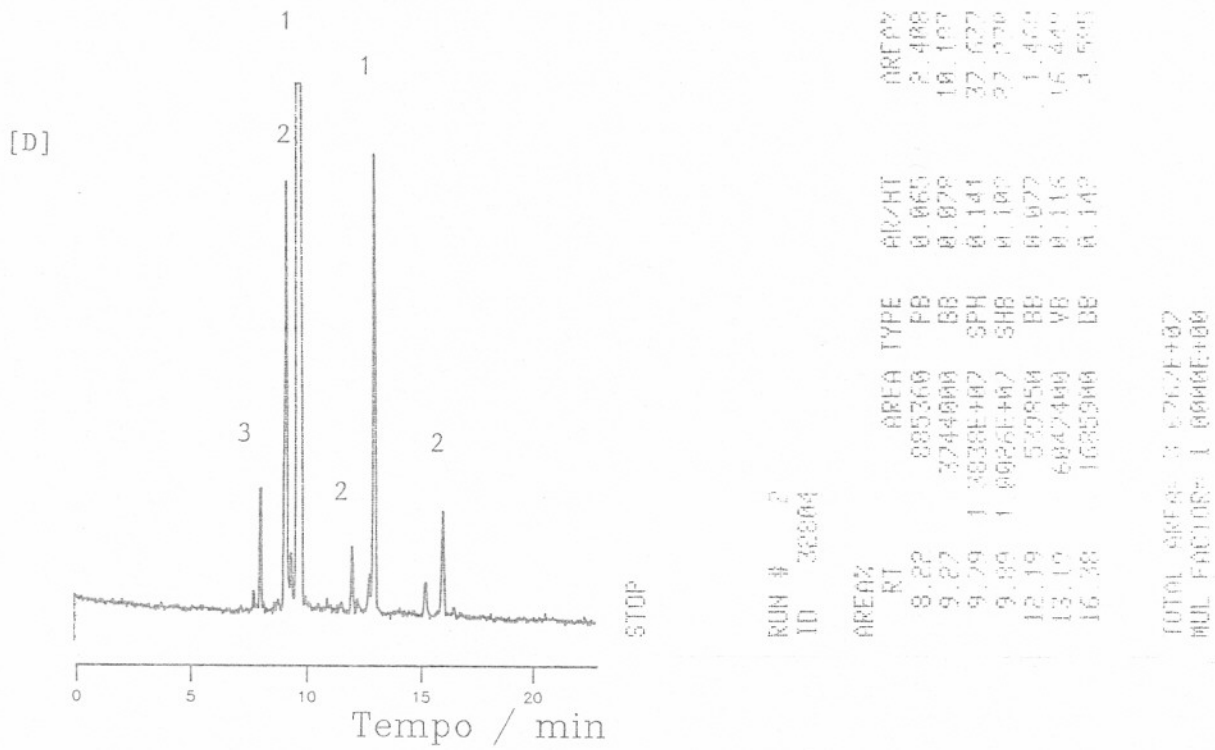


Figura 5.11: Eletroferograma [D] dos produtos da reação da melatonina (2) e serotonina (3) com FITC. A concentração é de 30 μ M cada. Demais condições como na fig. 5.1.

Capítulo 6

CONCLUSÃO

Limites de detecção em concentração na faixa de nM foram obtidos o que, para injeções de volumes de nL , corresponde a limites de detecção da ordem de aM óis (atômóis). Portanto, o desempenho deste sistema de detecção para EC é comparável aos obtidos recentemente [58] com outros sistemas de detecção a laser. Isto se deve ao fato do comprimento de onda do laser de N_2 se situar no ultravioleta próximo (337 nm). Este comprimento de onda não é tão curto ao ponto de promover um sinal de fundo, por fluorescência ou espalhamento Raman, muito grande no líquido que preenche o capilar ou na parede do mesmo. Contudo, os marcadores moleculares utilizados apresentam uma eficiência quântica de fluorescência elevada para este comprimento de onda, principalmente o *orto*-ftaldialdeído, a fluorescamina e o isotiocianato de fluoresceína.

A separação dos peptídeos BK, LBK, MLBK, BK 1-8 e BK 2-9 entre si foi satisfatória. Foi obtida uma curva de calibração para o peptídeo bradicinina num intervalo de duas ordens de grandeza em concentração (1 a $100\ \mu M$), o que não deixa de ser um resultado relevante.

Quanto as separações em si, tivemos resultados satisfatórios também com aminoácidos e neurotransmissores. Resultados ainda melhores podem ser obtidos aplicando-se uma tensão mais elevada entre os extremos da coluna capilar. No nosso trabalho aplicamos uma tensão constante de $+18000$ Volts, a qual teve um aproveitamento otimizado pois minimizamos a distância que separa o ponto de detecção da extremidade final da coluna.

Não é fácil provar que o único mecanismo de alargamento das zonas é a auto-difusão. Mas temos vários indícios que nos sugerem que realmente é isto o que acontece. O mais importante é o fato dos picos dos eletroferogramas serem simétricos e gaussianos. Um outro dado muito importante é o fato da variância dos picos aumentar linearmente com o tempo, como realmente deve ser se somente a auto-difusão estiver presente.

Portanto, pode-se afirmar que os modelos apresentados nos capítulos 2 e 3 descrevem satisfatoriamente estes resultados experimentais e que são mostrados nos capítulos 4 e 5.

Quanto a instrumentação e a aplicabilidade do laser pulsado, neste estágio do desenvolvimento, podemos concluir que o laser N_2 forneceu resultados promissores para trabalhos de refinamento do presente protótipo. O laser N_2 particularmente é interessante por ser um laser de baixo custo, aspecto importante em instrumentação.

REFERÊNCIAS

- [1] J.W.Jorgenson and K.D.Lukacs, *Anal. Chem.*, **53**, 1298, 1981.
- [2] W.G.Kuhr and C.A.Monig, *Anal. Chem.*, **64**, 389R, 1992.
- [3] T.B.L.Kist, C.Termignoni, and H.P.H.Grieneisen, *Braz. J. Med. and Biol. Research.* (submetido).
- [4] R.J.Hunter, *Zeta Potential in Colloid Science, Principles and Applications.* London: Academic Press, 1981.
- [5] M.Smoluchowski, *Krak.Anz.*, **182**, 1903; *Handbuch der Electricität und des Magnetismus.* Leipzig: Barth, 1921. p. 336.
- [6] G.Gouy, *J. Phys. Chem.*, **9**, 457, 1910.
- [7] D.L.Chapman, *Phil. Mag.*, **25**, 475, 1913.
- [8] P.Debye and E.Hückel, *Physik. Z.*, **24**, 185, 305, 1923.
- [9] G.A.H.Elton, *Proc. Roy. Soc.*, **198**, 581, 1950.
- [10] D.Burgreen and F.R.Nakache, *J. Phys. Chem.*, **68**, 1084, 1964.
- [11] C.L.Rice and R.Whitehead, *J. Phys. Chem.*, **69**, 4017, 1965.
- [12] I.S.Gradshteyn and I.M.Ryzhik, *Table of Integrals, Series and Products.* New York: Academic Press, 1965. p. 951.
- [13] L.D.Landau and E.M.Lifshitz, *Fluid Mechanics.* London: Pergamon Press, 1959. p. 62 e 103.
- [14] C.Schwer and E.Kenndler, *Anal. Chem.*, **63**, 1801, 1991.

- [15] O.Stern, *Z. Elektrochem.*, 30, 508, 1924.
- [16] P.G.Shewmon, *Diffusion in Solids*. New York: McGraw-Hill, 1963. p. 95.
- [17] F.Reif, *Fundamentals of Statistical and Thermal Physics*. Tokyo: McGraw-Hill, 1965. p. 485.
- [18] P.G.Shewmon, *Diffusion in Solids*. New York: McGraw-Hill, 1963. p. 2 e 5.
- [19] E.Butkov, *Física Matemática*. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1978. p. 522.
- [20] L.I.Schiff, *Quantum Mechanics*. Tokyo: McGraw-Hill, 1968. Capítulo 9.
- [21] J.D.Bjorken and S.D.Drell, *Relativistic Quantum Mechanics*. New York: McGraw Hill, 1964. Capítulo 6.
- [22] X.Huang, W.F.Coleman, and R.N.Zare, *J. Chromatogr.*, 480, 95, 1989.
- [23] G.O.Roberts, P.H.Rhodes, and R.S.Snyder, *J. Chromatogr.*, 480, 35, 1989.
- [24] M.Abramowitz and I.A.Stegun, *Handbook of Mathematical Functions: With Formulas, Graphs, and Mathematical Tables*. Washington: National Bureau of Standards, 1964. p. 297.
- [25] J.C.Giddings, *Separation Science*, 4(3), 181, 1969.
- [26] E.Kenndler and C.Schwer, *Anal. Chem.*, 63, 2499, 1991.
- [27] F.Reif, *Fundamentals of Statistical and Thermal Physics*. Tokyo: McGraw-Hill, 1965. p. 567.
- [28] Z.Wu and W.G.Tong, *Anal. Chem.*, 65, 112, 1993.
- [29] X.H.Guo and S.H.Chen, *Chem. Phys.*, 149, 129, 1990.
- [30] A.S.Kord, J.K.Strasters, and M.G.Khaledi, *Anal. Chim. Acta*, 246, 131, 1991.
- [31] J.L.Viovy, T.Duke, and F.Caron, *Contemp. Phys.*, 33, 25, 1992.
- [32] H.A.Lim, G.W.Slater, and J.Noolandi, *J. Chem. Phys.*, 92(1), 709, 1990.
- [33] E.Arvanitidou and D.Hoagland, *Phys. Rev. Lett.*, 67, 1464, 1991.
- [34] P.Déjardin, *Phys. Rev. A*, 40, 4752, 1989.

- [35] X.H.Guo and S.H.Chen, *Phys. Rev. Lett.*, **64**, 2579, 1990.
- [36] Z.Wang and B.Chu, *Phys. Rev. Lett.*, **63**, 2528, 1989.
- [37] B.Nordén, C.Elvingson, M.Jonsson, and B.Akerman, *Q. Rev. Biophys.*, **24**, 103, 1991.
- [38] K.J.Platt and G.Holzwarth, *Phys. Rev. A*, **40**, 7292, 1989.
- [39] M.O.de la Cruz, D.Gersappe, and E.O.Shaffer, *Phys. Rev. Lett.*, **64**, 2324, 1990.
- [40] B.L.Karger, A.S.Cohen, and A.Guttman, *J. Chromatogr.*, **492**, 585, 1989.
- [41] R.M.McCormick and R.J.Zagursky, *Anal. Chem.*, **63**, 750, 1991.
- [42] W.J.Lambert and D.L.Middleton, *Anal. Chem.*, **62**, 1585, 1990.
- [43] D.Belder and G.Schomburg, *J. High Res. Chromatogr.*, **15**, 686, 1992.
- [44] C.S.Lee, D.McManigill, C.T.Wu, and B.Patel, *Anal. Chem.*, **63**, 1519, 1991.
- [45] M.A.Hayes and A.G.Ewing, *Anal. Chem.*, **64**, 512, 1992.
- [46] Y.F.Maa, K.J.Hyver, and S.A.Swedberg, *J. High Res. Chromatogr.*, **14**, 65, 1991.
- [47] S.A.Swedberg, *Anal. Biochem.*, **185**, 51, 1990.
- [48] M.J.Gordon, K-J.Lee, A.A.Arias, and R.N.Zare, *Anal. Chem.*, **63**, 69, 1991.
- [49] M.M.Bushey and J.W.Jorgenson, *J. Chromatogr.*, **480**, 301, 1989.
- [50] Y.Kurosu, K.Hibi, T.Sasaki, and M.Saito, *J. High Res. Chromatogr.*, **14**, 200, 1991.
- [51] W.A.Gobie and C.F.Ivory, *J. Chromatogr.*, **516**, 191, 1990.
- [52] C.W.Whang and E.S.Yeung, *Anal. Chem.*, **64**, 502, 1992.
- [53] T.Tsuda, *Anal. Chem.*, **64**, 386, 1992.
- [54] R.Dadoo, L.A.Colón, and R.N.Zare, *J. High Res. Chromatogr.*, **15**, 133, 1992.
- [55] T.Wang, J.H.Aiken, C.W.Huie, and R.A.Hartwick, *Anal. Chem.*, **63**, 1372, 1991.
- [56] X.Huang, R.N.Zare, S.Sloss, and A.G.Ewing, *Anal. Chem.*, **63**, 189, 1991.

- [57] A.E.Bruno, A.Paulus, and D.J.Bornhop, *Appl. Spectrosc.*, **45**, 462, 1991.
- [58] M.Albin, R.Weinberger, E.Sapp, and S.Moring, *Anal. Chem.*, **63**, 417, 1991.
- [59] B.Nickerson and J.W.Jorgenson, *J. Chromatogr.*, **480**, 157, 1989.
- [60] T.Higashijima, T.Fuchigami, T.Imasaka, and N.Ishibashi, *Anal. Chem.*, **64**, 711, 1992.
- [61] K.Chang and R.K.Forcé, *Appl. Spectrosc.*, **47**, 24, 1993.
- [62] B.K.Matuszewski, R.S.Givens, K.Srinivasachar, R.G.Carlson, and T.Higuchi, *Anal. Chem.*, **59**, 1102, 1987.
- [63] S.Udenfriend, S.Stein, P.Böhlen, W.Dairman, W.Leimgruber, and M.Weigele, *Science*, **178**, 871, 1972.
- [64] M.E.May and L.L.Brown, *Anal. Biochem.*, **181**, 135, 1989.
- [65] J.Liu, O.Shirota, D.Wiesler, and M.Novotny, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 2302, 1991.
- [66] J.Tehrani, R.Macomber, and L.Day, *J. High Res. Chromatogr.*, **14**, 10, 1991.
- [67] C.A.Monnig and J.W.Jorgenson, *Anal. Chem.*, **63**, 802, 1991.
- [68] H.F.Yin, S.R.Motsch, J.A.Lux, and G.Schomburg, *J. High Res. Chromatogr.*, **14**, 282, 1991.
- [69] J.Liu, K.A.Cobb, and M.Novotny, *J. Chromatogr.*, **519**, 189, 1990.
- [70] M.V.Novotny, K.A.Cobb, and J.Liu, *Electrophoresis*, **11**, 735, 1990.
- [71] T.M.Olefirowicz and A.G.Ewing, *J. Neurosc. Methods*, **34**, 11, 1990.
- [72] A.E.Karger, J.M.Harris, and R.F.Gesteland, *Nucleic Acids Research*, **19**, 4955, 1991.
- [73] H.Swerdlow, J.Z.Zhang, D.Y.Chen, H.R.Harke, R.Grey, S.Wu, and N.J.Dovich, *Anal. Chem.*, **63**, 2835, 1991.
- [74] D.F.Swaile and M.J.Sepaniak, *Anal. Chem.*, **63**, 179, 1991.