



IPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL
Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102017026033-0

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102017026033-0

(22) Data do Depósito: 04/12/2017

(43) Data da Publicação Nacional: 25/06/2019

(51) Classificação Internacional: G01N 27/00; G01N 30/00.

(52) Classificação CPC: G01N 27/00; G01N 30/00.

(54) Título: SISTEMA DE ELETROFORESE CAPILAR TOROIDAL E MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE SISTEMA DE ELETROFORESE CAPILAR TOROIDAL

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 92969856000198. Endereço: AV. PAULO GAMA Nº 110, 6º ANDAR, CENTRO, PORTO ALEGRE, RS, BRASIL, PORTO ALEGRE, RS, BRASIL(BR), 90040-060, Brasileira

(72) Inventor: TARSO BENIGNO LEDUR KIST.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 04/12/2017, observadas as condições legais

Expedida em: 16/05/2023

Assinado digitalmente por:

Alexandre Dantas Rodrigues

Diretor Substituto de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

15 de Novembro
REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
de 1889

Relatório Descritivo de Patente de Invenção

SISTEMA DE ELETROFORESE CAPILAR TOROIDAL E MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE SISTEMA DE ELETROFORESE CAPILAR TOROIDAL

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção descreve um sistema de eletroforese capilar toroidal e um método de fabricação de sistema de eletroforese capilar toroidal. A presente invenção se situa nos campos da química, bioquímica e biologia.

Antecedentes da Invenção

[0002] A eletroforese capilar, a partir deste ponto a sigla EC se refere a eletroforese capilar, é uma técnica instrumental inventada no início da década de 1980 e usada para separar íons, moléculas, macromoléculas, complexos, nanoestruturas, partículas virais, organelas, células, e também para determinar as suas concentrações nas mais diversas amostras. Exemplos de campos de aplicação são: na análise de fármacos, análises clínicas, análise de metabólitos, análises genéticas, imunoanálises, análise de contaminantes em alimentos, composição química nutricional de alimentos, análises de amostras ambientais, pesquisas de genomas, peptidomas e proteomas, pesquisas em geral em laboratórios de pesquisa e outros.

[0003] Até a presente data as análises feitas pela técnica de EC são executadas em um pedaço de microtubo flexível de quartzo fundido, também chamado de quartzo amorfo ou quartzo sintético ou simplesmente capilar, com comprimento variando de 30 cm até 100 cm.

[0004] Existe um parâmetro objetivo e de consenso usado para medir o desempenho de qualquer método de separação, ele denomina-se “Número de Pratos Teóricos” ou simplesmente “Números de Pratos” NP. No final da década de 1980 a EC superou todas as outras técnicas ao atingir mais de 500 mil NPs. Na década de 1990 ela passou de 1 milhão de NPs. No início dos anos 2000 demonstraram que ela pode atingir 34 milhões. Este é o recorde que se mantém

até a data atual.

[0005] Na instrumentação atual usa-se um pequeno volume de amostra, alguns nanolitros, que são injetados em uma das extremidades de um capilar, que possui um lúmen na faixa de 25 a 75 μm de diâmetro, e posto a correr pela aplicação de uma alta voltagem, tipicamente de 10 a 30 kV, entre as extremidades do microtubo que são posicionados em pequenos reservatórios contendo solução tampão aquoso ou solventes orgânicos e eletrodos. Durante a migração alguns componentes da amostra migram mais rapidamente e outros mais lentamente, formando bandas. Quando os componentes da amostra atinge a extremidade oposta eles são detectados, caracterizados como picos no eletroferograma. O fato é que muitas vezes as separações não são boas o suficiente em um segmento tão curto, tipicamente de 30 cm a 100 cm, e precisam ser repetidas com alteração dos parâmetros até atingir-se uma separação satisfatória. Além disto, para controlar o fluxo eletrosmótico, os usuários são obrigados a trabalhar em faixas de pH bem restritas e muitas vezes a utilizar aditivos na solução tampão que preenchem o microtubo. Mesmo assim ainda permanece uma grande quantidade de moléculas sem um método de análise, pois não conseguem ser separadas nem pela EC convencional, nem por cromatografia, nem por centrifugação, nem por espectrometria de massas ou outro método de separação. Em muitas situações a quantidade de picos que cabem no capilar também é limitada. O nome desta propriedade é Capacidade de Picos *Peak Capacity* e deve ser a maior possível, principalmente em análises de peptidomas, proteomas, metabolomas, carboidromas e genomas, pois estes envolvem uma quantidade muito grande de espécies iônicas e moleculares de interesse.

[0006] Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

[0007] Com isso, analisando o estado da técnica, é notado que há ainda uma

grande quantidade de moléculas sem um método de análise, pois não conseguem ser separadas nem pela EC convencional, nem por cromatografia, nem por espectrometria de massas ou outro método. Ademais, o número de pratos NP de uma eletroforese capilar toroidal pode ser bem maior do que o estado da técnica proporciona.

Sumário da Invenção

[0008] Dessa forma, a presente invenção tem por objetivo resolver os problemas constantes no estado da técnica a partir de um sistema de eletroforese capilar toroidal que usa um capilar toroidal real, como uma peça única.

[0009] A presente invenção é um sistema de eletroforese capilar toroidal, que justamente por sua configuração toroidal se destaca dos demais sistemas de EC contemplados pelo estado da técnica. O fato de ter tal configuração contínua confere à presente invenção melhorias em resultados processados pela técnica de EC, como um aumento significativo no parâmetro Número de Pratos, sendo este parâmetro usado para medir a performance de qualquer método de separação. Além disso, a presente invenção é capaz de operar com ou sem aditivos e pode analisar uma gama muito maior de compostos.

[0010] Em um primeiro objeto, a presente invenção revela um sistema de eletroforese capilar toroidal compreendendo um microtubo fundido toroidal (10), microburacos (12), reservatórios (14), eletrodos (16), um detector (18) e um injetor (20); em que,

- os microburacos (12) estão associados ao microtubo fundido toroidal (10);
- os reservatórios (14) estão associados aos microburacos (12);
- os eletrodos (16) estão associados aos reservatórios (14);
- o detector (18) está associado ao microtubo fundido toroidal (10), e é localizado entre dois microburacos (12);
- um detector (18) ou mais estão localizados exatamente em um ou mais microburacos (12), e

- o injetor (20) está associado a, ao menos, um microburaco (12).

[0011] Em um segundo objeto, a presente invenção revela um método de fabricação de sistema de eletroforese capilar toroidal compreendendo as seguintes etapas:

- a. definição de comprimento total de um microtubo toroidal (10);
- b. utilização de um capilar para formação do microtubo toroidal (10);
- c. marcação de perímetro no capilar de acordo com a definição de comprimento total do microtubo toroidal (10);
- d. clivagem no capilar na posição determinada pela marcação de perímetro;
- e. verificação de partículas;
- f. dobramento dos capilares em formato de toróide;
- g. fundição das extremidades do capilar resultando no microtubo toroidal (10);
- h. fabricação de microburaco (12) na parede do microtubo toroidal (10);
- i. associação de reservatório (14) ao redor do microburaco (12); e
- j. conexão de eletrodo (16) ao reservatório (14).

[0012] O conceito inventivo comum a todos os contextos de proteção reivindicados é um sistema de eletroforese capilar toroidal. Tal sistema necessariamente deve ter o formato de toróide feito pela dobra de microtubo na forma triangular, retangular, quadrado, pentágono ou qualquer poliedro preferencialmente com os cantos arredondados, ou ainda elíptica, circular (neste caso chamado toro) ou qualquer forma fechada (plana ou não). Deve compreender microburacos criados na parede do toróide capazes de efetuar a comunicação elétrica e hidrodinâmica entre o interior do toróide, o lúmen, e o exterior. Onde o exterior compreende soluções tampão, amostras e eletrodos nos reservatórios.

[0013] Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Breve Descrição das Figuras

[0014] Com o intuito de melhor definir e esclarecer o conteúdo do presente pedido de patente, são apresentadas as presentes figuras:

[0015] A figura 1 mostra uma vista superior esquemática do leiaute toroidal de uma das possíveis configurações do sistema de eletroforese capilar toroidal. A figura demonstra um caso particular do conceito geral proposto pela presente invenção, portanto, esta figura não visa limitar o escopo da presente invenção.

[0016] A figura 2 mostra um segmento de um microtubo toroidal (10), há o destaque para marcações do diâmetro externo (od) e do diâmetro interno (id).

[0017] A figura 3 mostra um exemplo de um microburaco (12) escavado na parede de um microtubo fundido toroidal (10). Em (30), há a indicação do tamanho da medida, sendo de 10 µm do recobrimento amarelo de poliimida. Em (32) há uma representação do quartzo no microburaco (12).

[0018] A figura 4 mostra como exemplo três emendas feitas para a confecção da configuração toroidal em um microtubo fundido toroidal (10).

[0019] A figura 5 mostra um leiaute de oito microtubos fundido toroidais (10) operando em paralelo. Nesta concretização, os toróides são dobrados em formas elípticas.

Descrição Detalhada da Invenção

[0020] As descrições que se seguem são apresentadas a título de exemplo e não limitativas ao escopo da invenção e farão compreender de forma mais clara o objeto do presente pedido de patente.

[0021] Em um primeiro objeto, a presente invenção revela um sistema de eletroforese capilar toroidal compreendendo um microtubo fundido toroidal (10), microburacos (12), reservatórios (14), eletrodos (16), um detector (18) e um injetor (20); em que;

- os microburacos (12) estão associados ao microtubo fundido toroidal (10);
- os reservatórios (14) estão associados aos microburacos (12);

- os eletrodos (16) estão associados aos reservatórios (14);
- o detector (18) está associado ao microtubo fundido toroidal (10), e é localizado entre dois microburacos (12);
- um detector (18) ou mais estão localizados exatamente em um ou mais microburacos (12), e
- o injetor (20) está associado a, ao menos, um microburaco (12).

[0022] O microtubo fundido toroidal (10), cujo lumen pode compreender um formato cilíndrico, uma elipse, um poliedro, ou qualquer forma geométrica fechada. Esta parte interna pode ser simétrica ao longo da direção axial ou não, ou seja, apresentar variações. A parte externa do microtubo fundido toroidal (10) pode também compreender a forma cilíndrica, elíptica, poliédrica ou qualquer forma geométrica fechada e simétrica ao longo da direção axial ou não. Em uma concretização, o microtubo fundido toroidal (10) é uma peça única em formato de toróide cilíndrico, com diâmetro interno (id) e diâmetro externo (od). O microtubo fundido toroidal (10) pode ser composto de um material isolante elétrico, como quartzo, sílica, vidro, porcelana, óxido refratário ou plástico. Em uma concretização o microtubo fundido toroidal (10) é de sílica fundida e flexível. Ao longo do perímetro do microtubo fundido toroidal (10) estão presentes os microburacos (12). A função do microtubo fundido toroidal (10) é propiciar o caminho a ser seguido por uma amostra. A amostra se refere a qualquer tipo de composto, como genomas, peptidomas, proteomas, fármacos, contaminantes ou qualquer outro tipo de composto que seja suscetível a uma separação de íons, moléculas e que se deseja saber a concentração.

[0023] Em uma concretização o injetor (20) é um equipamento que dispõe da função de injetar no lúmen do microtubo fundido toroidal (10) a amostra. Em uma concretização, esta injeção é feita através de um microburaco (12) qualquer do sistema. Em uma concretização, o microtubo fundido toroidal (10) é o responsável por permitir a passagem da amostra dentro do cilindro.

[0024] Em uma concretização, os microburacos (12) são cavidades, buracos feitos com o intuito de realizar a conexão do lúmen interior do toróide e o

ambiente externo, em que ambiente externo se refere à solução que possa estar presente no reservatório (14). Em uma concretização, o reservatório (14) é alocado ao microburaco (12) com o intuito de envolver sua cavidade. Em uma concretização, a solução pode ser uma solução tampão. Por intermédio dos microburacos (12) se dá a associação de o microtubo fundido toroidal (10) com os reservatórios (14).

[0025] Em uma concretização, os reservatórios (14) são estruturas tridimensionais alocadas de forma a envolver os microburacos. Em uma concretização, os reservatórios (14) são preenchidos com uma solução, que em uma concretização, é uma solução tampão. Em uma concretização, há o fluxo de solução entre os reservatórios (14) e os microburacos (12).

[0026] Em uma concretização, os eletrodos (16) são objetos em contato físico com a solução que preenche os reservatórios (14). Em uma concretização, nos eletrodos (16) são aplicadas diferenças de potencial elétrico, ddp, tipo corrente contínua ou corrente alternada e a partir desta há a indução de movimento dos cátions e ânions presentes na amostra, devido ao campo elétrico criado pela aplicação da ddp.

[0027] Em uma concretização, o detector (18) é responsável por detectar a presença dos constituintes da amostra em forma de bandas ou picos que estão sendo analisados, de acordo com a sua posição dentro do sistema. Em uma concretização, o detector (18) compreende meios de receber esta informação de presença da amostra, e selecionar em qual ou quais dos eletrodos (16) devem ser aplicadas as ddps para que a movimentação dos cátions e ânions continue. A ddp nos eletrodos (16) ocorre de forma a manter a movimentação dos componentes da amostra, feita de cátions, ânions ou moléculas neutras sendo carregadas por micelas carregadas. Assim, quando a amostra está localizada em uma região do microtubo fundido toroidal (10) e se aproximando de um microburaco (12) em reservatório (14) onde o eletrodo está com ddp aplicada, então a ddp deve ser automaticamente alterada para que o próximo eletrodo (16), localizado no reservatório (14) com o microburaco (12) seguinte receba a

ddp, e faça com que ela esteja suscetível ao campo elétrico ao longo de todo o percurso o tempo todo. Logo, pode haver uma comutação constante entre os eletrodos (16) que devem receber a ddp. Em uma concretização, esta movimentação dos constituintes da amostra é feita também com a atuação concomitante do fluxo eletrosmótico.

[0028] Para o entendimento do funcionamento do sistema em relação à movimentação da amostra, devido à ddp aplicada aos eletrodos faz-se recomendável o acompanhamento da figura 1. Em uma concretização específica, supondo um sistema com quatro eletrodos, em uma análise dos cátions, e que não haja fluxo eletrosmótico. Supondo uma injeção de amostra, pelo injetor (20) através do microburaco (12), deve ser aplicada uma diferença de potencial entre os eletrodos (V2) e (V4), este par de eletrodos é considerado como um par de eletrodos opostos. Enquanto os eletrodos (V3) e (V1) permanecem flutuando no modo passivo de operação, a diferença de potencial aplicada entre (V2) e (V4) deve ser tal, que a tensão de (V4) deve ser maior que a de (V2), para que os cátions sejam guiados ao menor potencial, isto é, ao eletrodo (V2). Uma vez os cátions sendo atraídos por (V2), quando se locomovem e chegam a uma região próxima ao ponto médio entre o (V1) e (V2), o par de eletrodos opostos (V2) e (V4) comuta e, passa a ficar flutuando no modo passivo. Concomitantemente, a ddp é aplicada no outro par de eletrodos opostos, (V3) e (V1), fazendo, portanto, com que em (V1) tenha um potencial maior em relação à (V3), e como consequência desta comutação os cátions tendem a se mover constantemente. Portanto, entre dois ou mais eletrodos (16) são aplicadas ddps que comutam de forma cíclica, mantendo os demais eletrodos (16) com tensão flutuando, isto é, sem aplicar tensão nenhuma e nem mesmo aterrados.

[0029] Em uma concretização, o sistema de eletroforese capilar toroidal compreende impedimento de vazamento de banda. Ou seja, é aplicada uma pequena voltagem, corrente ou fluxo através do microburaco (12) no momento da passagem das bandas ou picos das amostras na posição deste microburaco

(12), no modo ativo de operação que previne as bandas de vazarem do lúmen do capilar para o reservatório (14) através dos microburacos (12).

[0030] Em uma concretização, o detector (18) é localizado entre dois microburacos (12), interceptando o microtubo fundido toroidal (10). Em uma concretização, o detector (18) é posicionado de maneira que fique mais próximo de um dos dois microburacos (12). Em uma concretização, o detector (18) fica mais próximo do microburaco (12) que recebe a amostra primeiro, em relação ao outro microburaco (12). Em uma concretização, o detector (18) é localizado mais próximo do microburaco (12) associado ao injetor (20), que recebe deste a amostra. Em uma concretização, a partir da figura 1, o detector (18) fica a uma distância menor (x), em relação a distância (y), do microburaco (12) que recebe a injeção da amostra. Em uma concretização, a presente invenção compreende empilhamento da amostra, *stacking*, que ocorre no início de uma corrida, e ainda pode ocorrer um ou mais empilhamentos de forma cíclica a cada volta que a amostra executa no toróide.

[0031] Em uma concretização, a quantidade de microburacos (12) é igual à quantidade de reservatórios (14) e também igual à quantidade de eletrodos (16). Um módulo é definido como o agrupamento de um eletrodo (16), um reservatório (14) e um microburaco (12) em uma determinada localização no perímetro do microtubo fundido toroidal (10). Em uma concretização, pode haver mais de um módulo presente em um perímetro de um microtubo fundido toroidal (10). A melhor concretização da invenção, que não visa estabelecer limites para outras configurações, adere à quantidade de quatro módulos dispostos ao redor do perímetro do microtubo fundido toroidal (10), de forma que a distância entre os módulos seja uniforme. Mas é ressaltado que a presente invenção não se limita a apenas um número par de módulos para sua concretização, uma vez que é possível a concretização da presente invenção com um número ímpar de módulos.

[0032] Em uma concretização, o sistema de eletroforese capilar toroidal compreende mais de uma volta, quer dizer, antes de ter suas extremidades

permanentemente unidas por fusão, o microtubo fundido toroidal (10) pode realizar mais de uma volta. Em uma concretização, os microburacos (12) ao longo desta volta, ou laço de microtubo fundido toroidal (10) são escavados pulando-se, ou alternando-se entre um ou mais reservatórios (14) de forma a permitir uma capacidade de picos muito maior.

[0033] Uma geometria alternativa é apresentada a fim de tornar o sistema de eletroforese capilar toroidal capaz de analisar simultaneamente um número natural qualquer de amostras. Em uma concretização, a geometria alternativa compreende microtubos fundido toroidais (10) dispostos paralelamente, e dobrados em formato elíptico. Em uma concretização, estes microtubos fundidos toroidais (10) paralelos possuem a localização dos seus respectivos microburacos (12) alinhados, e os microtubos fundido toroidais (10) são colocados juntos sobre uma superfície plana, fazendo coincidir o microburaco (12) dos microtubos fundidos toroidais (10). Há a presença de cada reservatório (14) para cada microtubo fundidos toroidal (10). Em uma concretização, há um detector (18) que tem a capacidade de detectar a amostra de todos os possíveis microtubos fundidos toroidais (10). Em uma concretização, uma configuração otimizada da geometria alternativa é vista na figura 5, havendo, portanto, oito microtubos fundidos toroidais (10), havendo para cada um deles quatro microburacos (12) e um detector (18). Os microtubos fundidos toroidais (10) dispostos para operação paralela propiciam a análise simultânea de várias amostras.

[0034] O sistema de eletroforese capilar toroidal da presente invenção pode ser realizado na modalidade de eletroforese em solução livre, eletroforese em gradiente de pH, focalização isoelétrica, isotacoforese, eletroforese em solução de polímeros, eletroforese em gel ou cromatografia eletrocinética micelar.

[0035] Em um segundo objeto, a presente invenção revela um método de fabricação de sistema de eletroforese capilar toroidal compreendendo as seguintes etapas:

- a. definição de comprimento total de um microtubo toroidal (10);

- b. utilização de um capilar para formação do microtubo toroidal (10);
- c. marcação de perímetro no capilar de acordo com a definição de comprimento total do microtubo toroidal (10);
- d. clivagem no capilar na posição determinada pela marcação de perímetro;
- e. verificação de partículas;
- f. dobramento dos capilares em formato de toróide;
- g. fundição das extremidades do capilar resultando no microtubo toroidal (10);
- h. fabricação de microburaco (12) na parede do microtubo toroidal (10);
- i. associação de reservatório (14) ao redor do microburaco (12); e
- j. conexão de eletrodo (16) ao reservatório (14).

[0036] A etapa de definição de comprimento total de um microtubo toroidal (10) é feita para que seja pré-determinada a dimensão física do microtubo toroidal (10). Já a etapa de utilização de um capilar para formação do microtubo toroidal (10), é feita para caracterizar aspectos físicos de como deve ser o microtubo toroidal (10). A palavra capilar assume o significado de ser qualquer tubo extremamente fino, por onde possa passar alguma amostra. Em uma concretização o capilar pode ser sílica revestida de poliimida.

[0037] Em uma concretização, a etapa de marcação de perímetro no capilar de acordo com a definição de comprimento total do microtubo toroidal (10) é feita a partir da marcação dos capilares por uma caneta de ponta suave, para a definição do comprimento total do toróide, a partir da dimensão já definida na etapa de definição de comprimento total de um microtubo toroidal (10). Em uma concretização, o material utilizado para a confecção do microtubo fundido toroidal (10) é sílica revestida de poliimida. Nas marcações efetuadas é retirada a poliimida a partir do uso de ácido sulfúrico a quente. Após, ocorre a lavagem e secagem dos capilares, e com o objetivo de maior precisão pode ser feita mais uma marcação.

[0038] Em uma concretização, a etapa de clivagem no capilar na posição

determinada pela marcação de perímetro ocorre após a etapa de marcação de perímetro, já que é necessário que se tenha as marcações para a realização da clivagem. Na clivagem ocorre o corte na posição exata marcada na etapa de marcação de perímetro. Em uma concretização, para a clivagem é utilizado um clivador de fibra óptica. Em uma concretização, as extremidades são cortadas uniformemente, garantindo superfícies, cortes ortogonais e planos em ambas às extremidades.

[0039] Em uma concretização, na etapa de verificação de partículas é feita uma verificação se devido às etapas precedentes há restos de partículas, água ou outros líquidos remanescentes no capilar.

[0040] Em uma concretização, a etapa de dobramento dos capilares em formato de toróide, é feita a partir da união das extremidades do capilar, com o intuito de se ter o aspecto toroidal a partir do dobramento.

[0041] Em uma concretização, a etapa de fundição tem como objetivo unir os capilares cortados após a etapa da clivagem e já dobrados pela etapa de dobramento dos capilares em formato de toróide. Em uma concretização, para esta etapa é utilizada a técnica de plasma de arco.

[0042] A etapa de fabricação de um microburaco (12) dentro do microtubo toroidal (10) é a etapa que dá continuidade à etapa de fabricação do microtubo fundido toroidal (10), e é composta da etapa de escavação da parede do capilar. Em uma concretização, o capilar é feito de sílica fundida. A escavação é feita por um dispositivo de corte. A etapa de fabricação de um microburaco (12) tem como objetivo formar microburacos (12) ao longo do microtubo fundido toroidal (10).

[0043] Em uma concretização, sobre o microtubo fundido toroidal (10) criado, juntamente com seus respectivos microburacos (12), é feita a associação de reservatório (14) ao redor do microburaco (12) fabricado. Nesta etapa, um reservatório é alocado imediatamente em volta do microburaco (12), e a partir de então é possível realizar a conexão do lúmen interior do toróide e o ambiente externo, em que ambiente externo se refere à solução que possa estar presente no reservatório (14). Após esta etapa ocorre a conexão de eletrodo (16) ao

reservatório (14), fazendo com que o reservatório possa ser polarizado. Ao término da etapa de conexão de eletrodo (16) ao reservatório (14) é tido como resultado um sistema de eletroforese capilar toroidal.

[0044] Com o microtubo disposto em forma de toroide pode-se trabalhar com qualquer pH, qualquer aditivo ou sem aditivo algum, pois a amostra permanece no interior do toróide, até que a separação esteja satisfatória. Isto permite realizar uma quantidade muito maior de estudos que antes não eram possíveis. E mais: pela primeira vez o poder de separação de um instrumento analítico consegue passar a faixa de um bilhão de Número de Pratos, sendo que o limite máximo atingido foi de 34 milhões há cerca de quinze anos atrás. Com a presente invenção já foi demonstrado teoricamente que, com o formato toroidal, pode-se chegar a 1 bilhão de NPs, e com uma perspectiva ter-se um número ilimitado de NP.

[0045] Este novo formato inventado, estudado e prototipado, permite analisar uma gama muito maior de compostos, muitos deles sem nenhum método para a sua análise até o momento. Entre eles podemos citar: compostos do tipo estereoisômeros que possuem três, quatro, cinco, seis ou mais carbonos assimétricos, isotopômeros, peptidomas, proteomas, nanopartículas, estereoisômeros de complexos de coordenação e estudar alguns fenômenos novos, tais como a solvatação de íons em soluções aquosas.

Exemplo 1. Realização Preferencial

[0046] Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

[0047] O modo Eletroforese Capilar Toroidal TCE aqui apresentado usa um capilar toroidal real, como uma peça única, em vez de segmentos de microcanais escavados sobre superfícies planas ou segmentos de capilares com as extremidades posicionadas opostas entre si. Portanto, não é de natureza cíclica porque não há transferência de banda de um capilar para outro e porque a fonte

de alimentação de alta tensão programável desta proposta mantém as bandas em um modo de migração *quasi*-contínua ao longo da direção axial do toróide durante todo o tempo. Isso é importante porque a difusão molecular difunde continuamente as bandas. Os microcanais na parede do toróide, já fabricado e demonstrado no laboratório, também desempenham um papel fundamental nesta proposta. Eles são responsáveis pela conexão elétrica e hidrodinâmica entre o lúmen interno do toróide e o ambiente externo, isto é, os reservatórios (14).

[0048] É proposto microtubo fundido toroidal (10) de sílica flexível no formato de um toróide cilíndrico, ou toro, com diâmetro interno (id), diâmetro externo (od) e comprimento total de $L_t = 4b$, como mostrado na Figura 1. Tal toróide pode ser produzido juntando as extremidades de um capilar de sílica fundida normal usando máquinas de fusão. Um número total de m microburacos, $m = 4$ na Figura 1, são feitos para estabelecer uma conexão entre o lúmen interior do toróide e o ambiente externo, soluções tampão nos reservatórios. No caso de $m = 4$, os reservatórios são numerados 1, 2, 3 e 4, na direção da corrida. Outras geometrias possíveis podem usar três, cinco ou mais reservatórios. A distância entre os centros de cada microburacos vizinhos será denotada por b , de modo que o comprimento total L_t do toróide será $L_t = mb$. O detector (18) é posicionado à distância $x = L_d$ da microburaco 1, no sentido horário, onde as amostras são injetadas. A injeção pode ser realizada de forma simples, colocando a amostra no fundo cônico do reservatório 1 e elevando este reservatório por alguns segundos. Depois disso, a amostra é removida; o reservatório (14) é então lavado com tampão e preenchido novamente com tampão.

[0049] Um distribuidor de alta tensão programável aplica uma alta tensão contínua $-V$ a um eletrodo e V ao eletrodo oposto. Enquanto no "modo passivo" os outros dois, eletrodos intermediários, são deixados flutuando em relação ao potencial de aterramento do laboratório, isto é, não aterrado ou com qualquer tensão ou corrente aplicada.

[0050] Por outro lado, no "modo ativo", uma pequena corrente é aplicada

através deles quando as bandas estão passando nos respectivos reservatórios (14) de forma a garantir que não haja vazamento das bandas através desses microburacos (12) para os reservatórios (14), especialmente quando microburacos grandes são usados. Deve-se notar que uma grande variedade de módulos de alimentação de alta tensão estão atualmente disponíveis, alguns deles com controle de corrente elétrica e até inversão de polaridade. Por simplicidade, suponha-se que os cátions estão sendo analisados e que o fluxo eletrosmótico EOF é zero, a parede interna do toróide de sílica fundida é modificada para suprimir EOF. A amostra é então injetada no lúmen através do microburaco 1 no reservatório 1, denotado por $x = 0$, e as altas tensões $-V$ e V são imediatamente aplicadas nos reservatórios 2 e 4, respectivamente, $V_2 = -V$ e $V_4 = V$. Este será o início da corrida, $t = 0$ no eletroferograma, e os cátions mover-se-ão na direção do reservatório 2. Chama-se $t = \tau$ o tempo em que o centro das bandas dos analitos de interesse atravessa o ponto de detecção pela primeira vez na posição em $x = L_d$. Então, no instante $t = b\tau / (2L_d)$, eles devem cruzar o ponto médio entre os reservatórios 1 e 2. Este é o momento certo para girar o distribuidor de alta tensão. Esta rotação deve levar ~ 1 segundo ou menos para ser concluída; no entanto, o campo elétrico experimentado pelos analitos permanece constante devido à ação dos capacitores entre os eletrodos anteriores durante este curto intervalo de tempo. Depois disso, os eletrodos nos reservatórios 2 e 4 são deixados flutuando em relação ao solo enquanto o reservatório 1 é mantido em V e o reservatório 3 em $-V$, logo $V_1 = V$ e $V_3 = -V$. A partir deste ponto, a alta tensão é girada em cada intervalo de tempo dado por $b\tau / L_d$, que é o tempo necessário para o centro do grupo de bandas migrar de um ponto médio ao próximo.

[0051] Também é conveniente colocar o ponto de detecção mais próximo do microburaco do reservatório 1, $x = 0$, do que para $x = b / 2$. Isto é para dar tempo para o operador calcular o intervalo de tempo $\Delta t = b\tau / L_d$ que precisa ser inserido na programação do distribuidor de alta tensão antes que o grupo de bandas atinja o ponto médio em $x = b / 2$, que é o instante da primeira rotação. A análise

simultânea de cátions e ânions é muito desejável em muitas aplicações. A injeção eletrocinética simultânea de uma amostra nos reservatórios 1 e 3 permite a análise simultânea de cátions e ânions no esquema da Figura 1, uma vez que ambos migram na mesma direção (sentido horário).

[0052] Fabricação dos Microburacos

[0053] Os microburacos (14) exercem papel crucial no presente desenvolvimento e eles são necessários, pois não existe outro meio de comunicação entre o lúmen dos toróides e o ambiente externo. Para tanto foram avaliadas todas as opções comerciais e também testados vários procedimentos desenvolvidos no Laboratório de Métodos. O melhor de todos resultados está ilustrado na Figura 3, onde o microburaco é tão fino que não pode ser visto, mas a sua presença é confirmada tanto pela passagem de corrente elétrica, de fato iônica, e bem como de fluxo aquoso e ar, quando injetados com pressão.

[0054] A Figura 3 mostra um exemplo do microburaco (12) escavado na parede de um capilar de sílica fundida usando um dispositivo de corte desenvolvido no Laboratório de Métodos. O capilar utilizado foi de 75 μm id e 360 μm od, o que dá uma espessura de parede de $\sim 142,5$ μm . A Figura ilustra as imagens dessas micro-escavações.

[0055] Fabricação de Toroids por “Fusion Splicing” – Fusão

[0056] Para a fusão, produção dos toroides, os capilares foram marcados com uma caneta de ponta suave para definir o comprimento total e a poliimida foi removida nessas posições utilizando ácido sulfúrico a quente, fumegante. Após a remoção da poliimida, os capilares foram lavados, secos e marcados de novo para identificar as posições exatas para a clivagem e em seguida fundidos na máquina de emenda por fusão. Antes, as extremidades foram examinadas para verificar se há restos de partículas, água ou outros líquidos remanescentes.

[0057] Existem muitas técnicas utilizadas para unir as extremidades das fibras ópticas na indústria de telecomunicações. A técnica de plasma de arco foi escolhida porque é mais amplamente utilizada e já é uma tecnologia madura. Os microtubos de sílica fundida flexível comercialmente disponíveis com 150 μm ou

375 μm de (od) e 30 μm , 50 μm ou 75 μm (id) foram preparados como descrito acima e cortados em diferentes comprimentos, variando de 20 cm a 100 cm. As extremidades foram cortadas uniformemente usando um clivador de fibra óptica, modelo Sumitomo FC-6S, para garantir superfícies cortes ortogonais e planos em ambas as extremidades. Estes microtubos foram dobrados e as extremidades foram inseridas no equipamento de fusão, onde foram unidas para produzir os toroides.

[0058] A Figura 4 mostra as fotografias das juntas de três toroides, vistas sob um estereomicroscópio. Eles foram fabricados usando o equipamento de fusão Orientek modelo T-40 operado com as seguintes condições: tempo prefixado = 5, tempo de fusão = 7, potência prefixada = 30, potência do fusível = 15, sobreposição = 7, ângulo final = 2.0 e espaço = 4. Estas condições de operação são diferentes das usualmente usadas para unir as extremidades das fibras ópticas. Menos potência e menos tempo são necessários porque há menos material, sílica fundida, em um capilar oco em comparação com fibras ópticas normais com o mesmo (od). A maioria dos equipamentos de fusão disponíveis são projetados para trabalhar com fibras ópticas com diâmetros (od) na faixa de 80 μm a 150 μm . Portanto, "máquinas para fusão de fibras de diâmetro de grande diâmetro", *Large diameter Fusion Splicer*, são necessários para juntar as extremidades dos capilares com (od) maior do que 150 μm .

[0059] Na Figura 4 são vistas três emendas que mostram a reprodutibilidade do processo de fabricação de toroides usando capilares com 50 μm id e 150 μm (od). A fusão causou um pequeno encolhimento do lúmen interno na união. Felizmente, essa variação suave do (id) ao longo da direção axial tem um efeito insignificante no alargamento das bandas em comparação com a difusão. Ou seja, ela não compromete em nada as análises.

[0060] O Número mais Adequado de Microburacos e Reservatórios

[0061] Do ponto de vista operacional, seria possível fazer funcionar um sistema TCE com apenas três microburacos (12) e três reservatórios (14), mas este layout apresenta algumas dificuldades. Por exemplo, não seria possível operar

com um campo elétrico constante ao longo de todo o lúmen do toro. O campo elétrico seria $E = 2V / b$ em um segmento, e $E = V / b$ ao longo dos outros dois segmentos, o que pode superaquecer a solução tampão no segmento com campo mais forte. Além disso, o tempo de lavagem aumentaria porque não é possível liberar todos os braços simultaneamente, aplicando apenas pressão ou vácuo em um ou dois reservatórios (14), essa dificuldade é confrontada com todos os layouts com um número ímpar de braços. Por outro lado, um layout com mais de quatro microburacos (12) e reservatórios (14) aumentaria excessivamente o tamanho do instrumento. Isso pode complicar o projeto e o funcionamento do distribuidor de alta tensão programável, uma vez que um número maior de saídas seria necessário. Portanto, quatro reservatórios (14) parecem ser a configuração mais adequada para alcançar o maior Número de Pratos.

[0062] Comprimentos ideais de segmentos "b"

[0063] Quando são utilizados segmentos b curtos, distância entre dois microburacos adjacentes, digamos 5 cm ou menos, então pode-se esperar algumas dificuldades. Em primeiro lugar, é bem sabido que a flexão e o enrolamento do capilar têm um efeito prejudicial na resolução e no Número de Pratos, porque o campo elétrico aplicado é mais forte em uma parede do lúmen se comparado à parede oposta. Além disso, o comprimento do percurso também é mais curto na parede onde o campo elétrico aplicado é mais forte e, portanto, um efeito significativo de alargamento das bandas é previsto quando os capilares normais, com 50 μm ou 75 μm (id), são dobrados excessivamente. Em segundo lugar, segmentos curtos limitam o número de sistemas de detecção que podem ser usados, devido ao menor espaço disponível. Em terceiro lugar, com segmentos curtos, aumenta o número de passagens das bandas através dos reservatórios (14) e microburacos (12). Conseqüentemente, no modo passivo, o risco de vazamento parcial da banda aumenta. Além disso, a banda será exposta mais vezes ao volume morto representado pelas linhas de campo elétrico distorcidas nas posições dos microburacos (12), especialmente para os maiores.

No modo ativo, quando uma pequena corrente, ou fluxo de solução tampão, é aplicada através do microburaco, para evitar que as bandas vazem. Devido ao excessivo número de vezes que elas atravessam os microburacos, pode-se resultar em um pequeno alargamento da banda. O mesmo acontece com as estratégias gravimétricas e hidrodinâmicas, que consistem em aplicar fluxo de solução tampão por gravidade e pressão, respectivamente. Por conseguinte, são recomendados segmentos b com pelo menos 10 cm de comprimento para criar um toróide em forma de anel, ou toro, com comprimento total de 40 cm.

[0064] Por outro lado, segmentos b muito longos, por exemplo com 50 cm ou mais, trariam outras dificuldades. Em primeiro lugar, o equipamento seria muito grande. Um anel com um perímetro de $L_t = 4 \times 50$ cm resulta num equipamento tão grande quanto ~ 63 cm de diâmetro. Em segundo lugar, fontes de alta tensão de -100 kV e + 100 kV seriam necessárias nestes casos para alcançar intensidades de campo de até 2000 V / cm, pois existem tampões projetados para tais intensidades de campo elétrico. Tudo isso mostra que os segmentos b maiores que ~ 30 cm não são recomendados. Como conclusão, um TCE com quatro reservatórios e quatro microburacos, $m = 4$, devem ter segmentos b na faixa de 10 cm a 30 cm de comprimento, resultando em toróides de 40 a 120 cm de comprimento L_t .

[0065] Sistemas de detecção

[0066] A fluorescência induzida por LASER (LIF), os detectores de absorção UV-Vis e o Detector de Condutividade sem Contato, ou C4D, são todos compatíveis com um sistema TCE otimizado. Quando são utilizados campos elétricos fortes, os tubos analíticos com diâmetros interno (id) menores, 50 μm ou menor, devem ser usados para minimizar o superaquecimento da solução tampão. Neste caso, o detector LIF seria o sistema de detecção mais recomendado, pois será difícil para um detector de absorção UV-Vis ou C4D funcionar corretamente com um (id) pequeno. Para as análises de íons monoatômicos, o sistema "Detector LIF indireto" também é um dos mais recomendados. A detecção da espectrometria de massa também pode ser

usada, mas somente durante a última volta depois de dirigir eletricamente as bandas para fora através de um dos microburacos e depois para o espectrômetro de massa. Isto é possível ao posicionar a ponta de entrada do microtubo do espectrômetro de massas em um dos microburacos cônicos do toróide.

[0067] Fluxo eletroosmótico

[0068] O fluxo eletroosmótico EOF é sempre uma causa de preocupação na EC normal, porque o NP é altamente dependente disso. Isso é usado para alcançar resoluções muito altas, mas na maioria das vezes a um preço elevado: i) em muitas situações restringe-se a faixa de pH que pode ser usada na solução tampão; ii) às vezes requer aditivos cuidadosamente selecionados para conseguir o fino ajuste do EOF ou da inversão deste; iii) em muitas situações práticas, esses aditivos devem ser usados mesmo quando exibem interações indesejadas com os analitos; iv) para a grande maioria dos cátions monoatômicos da tabela periódica, a magnitude da inversão EOF não é suficiente para alcançar a separação isotópica, por exemplo.

[0069] No modo TCE proposto aqui, o EOF é irrelevante e não precisa ser controlado. Uma opção é cobrir a parede interna do toróide com um revestimento hidrofílico, por exemplo, poliacrilamida ou polivinilalcool, ela elimina as cargas da interface e ainda imita a permissividade relativa e o ambiente de ligações de hidrogênio da solução tampão que preenche o lúmen interno do capilar. Existem muitas estratégias para suprimir o EOF em EC, e são recomendadas também para aplicações como análises de proteínas e medidas de mobilidade eletroforética de alta precisão em uma ampla gama de temperaturas, pH e composições e concentrações do tampão.

[0070] Possibilidades de Operação Paralela

[0071] Existem muitas geometrias que permitem que o sistema seja paralelizado de forma que muitas amostras possam ser analisadas simultaneamente. Um deles é mostrado na Figura 5, onde oito toróides são dobrados em formato elíptica e colocados sobre uma superfície plana, com quatro suportes, cada um contendo oito reservatórios (14). Os microburacos (12)

estão posicionados dentro desses reservatórios (14). No máximo oito detectores (18) são necessários, mas apenas um distribuidor de alta tensão programável é suficiente para operar todo o conjunto. Na Figura 5 é visto um leiaute de um sistema de eletroforese capilar toroidal com oito capilares operando em paralelo. Os toroides, feitos de capilares de sílica fundida, são dobrados em formas elípticas para dar o mesmo comprimento entre os microburacos. Podem ser necessários até oito detectores, no entanto, apenas uma unidade de alta tensão será necessária para operar todo o conjunto de capilares em paralelo.

[0072] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

1. Sistema de eletroforese capilar toroidal **caracterizado** por compreender ao menos um microtubo fundido toroidal (10), microburacos (12), reservatórios (14), eletrodos (16), um detector (18) e um injetor (20); em que,
 - os microburacos (12) estão associados ao microtubo fundido toroidal (10);
 - os reservatórios (14) estão associados aos microburacos (12);
 - os eletrodos (16) estão associados aos reservatórios (14);
 - o detector (18) está associado ao microtubo fundido toroidal (10), e é localizado entre dois microburacos (12);
 - um detector (18) ou mais estão localizados exatamente em um ou mais microburacos (12), e
 - o injetor (20) está associado a, ao menos, um microburaco (12).
2. Sistema de eletroforese capilar toroidal, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de o microtubo fundido toroidal (10) compreender:
 - parte interna compreendendo um formato cilíndrico, uma elipse, um poliedro, ou qualquer forma geométrica fechada, ao longo de uma direção axial, sendo simétrico ou não; e
 - parte externa compreendendo um formato cilíndrico, uma elipse, um poliedro, ou qualquer forma geométrica fechada, ao longo de uma direção axial, sendo simétrico ou não.
3. Sistema de eletroforese capilar toroidal, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, **caracterizado** pelo fato de:
 - a. a quantidade de microburacos (12) ser igual à quantidade de reservatórios (14) e ser igual à quantidade de eletrodos (16);
 - b. os microburacos (12), os reservatórios (14) e os eletrodos (16) formarem um módulo;
 - c. o módulo é associado ao longo do perímetro do microtubo fundido toroidal (10);
 - d. a distância entre os módulos ao longo do perímetro do microtubo

fundido toroidal (10) é uniforme; e

e. os eletrodos (16) compreenderem aplicação de ddp e comutação cíclica constante.

4. Sistema de eletroforese capilar toroidal, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de compreender impedimento de vazamento de banda.

5. Sistema de eletroforese capilar toroidal, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de compreender ao menos um módulo.

6. Sistema de eletroforese capilar toroidal, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** pelo fato do microtubo fundido toroidal (10) compreender mais de uma volta compreendendo alternância do microburaco (12).

7. Sistema de eletroforese capilar toroidal, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de um ou mais detectores (18) estarem localizados entre dois módulos, ou no interior dos reservatórios (14) ou na posição exata dos microburacos (12).

8. Sistema de eletroforese capilar toroidal, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** por compreender microtubos fundidos toroidais (10) dispostos paralelamente.

9. Sistema de eletroforese capilar toroidal, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **caracterizado** pelo fato do microtubo fundido toroidal (10) compreender material isolante elétrico, como quartzo, sílica, vidro, porcelana, óxido refratário ou plástico.

10. Sistema de eletroforese capilar toroidal, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizado** pelo fato da eletroforese realizada ser na modalidade de eletroforese em solução livre, eletroforese em gradiente de pH, focalização isoelétrica, isotacoforese, eletroforese em solução de polímeros, eletroforese em gel ou cromatografia eletrocínética micelar.

11. Sistema de eletroforese capilar toroidal, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 a 10, **caracterizado** pelo fato de compreender o uso do empilhamento cíclico da amostra.

12. Método de fabricação de sistema de eletroforese capilar toroidal **caracterizado** pelo fato de compreender as seguintes etapas:

- a. definição de comprimento total de um microtubo toroidal (10);
- b. utilização de um capilar para formação do microtubo toroidal (10);
- c. marcação de perímetro no capilar de acordo com a definição de comprimento total do microtubo toroidal (10);
- d. clivagem no capilar na posição determinada pela marcação de perímetro;
- e. verificação de partículas;
- f. dobramento dos capilares em formato de toróide;
- g. fundição das extremidades do capilar resultando no microtubo toroidal (10);
- h. fabricação de microburaco (12) na parede do microtubo toroidal (10);
- i. associação de reservatório (14) ao redor do microburaco (12); e
- j. conexão de eletrodo (16) ao reservatório (14).

13. Método de fabricação de sistema de eletroforese capilar toroidal, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de a etapa de fabricação do microburaco (12) compreender a etapa de escavação da parede.

FIGURAS

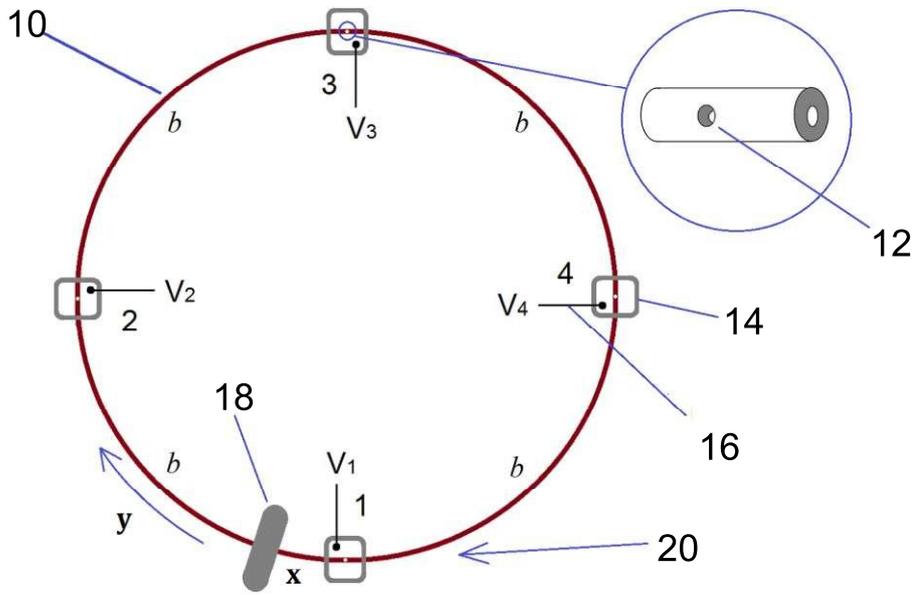


Figura 1

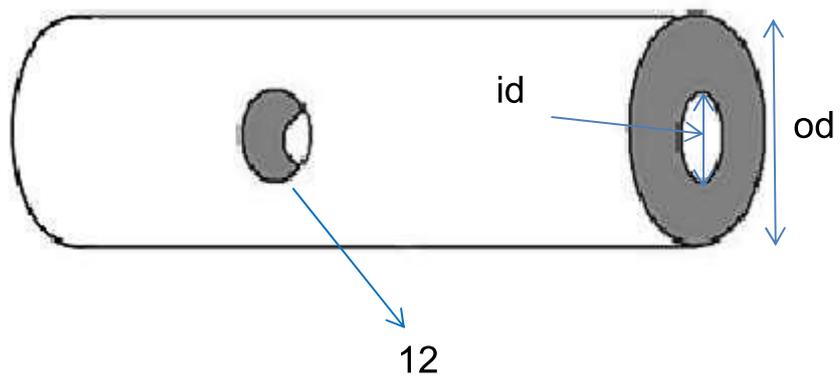


Figura 2

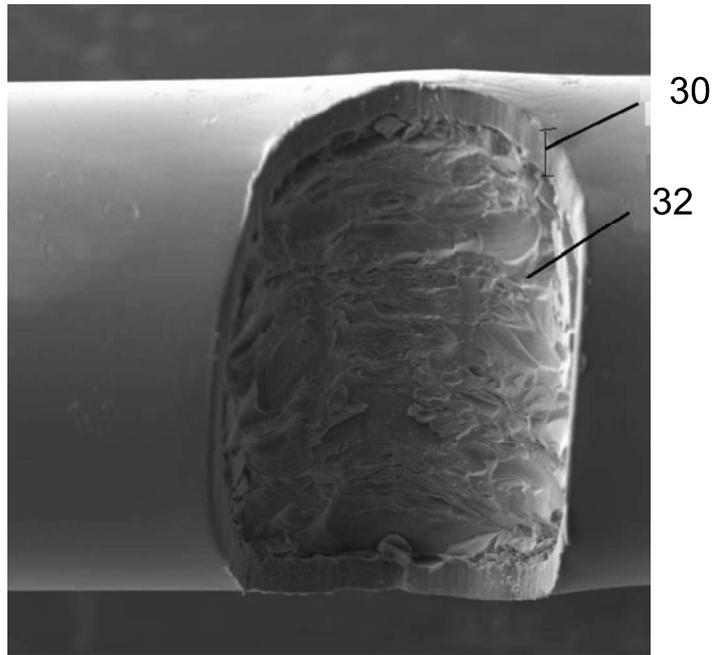


Figura 3

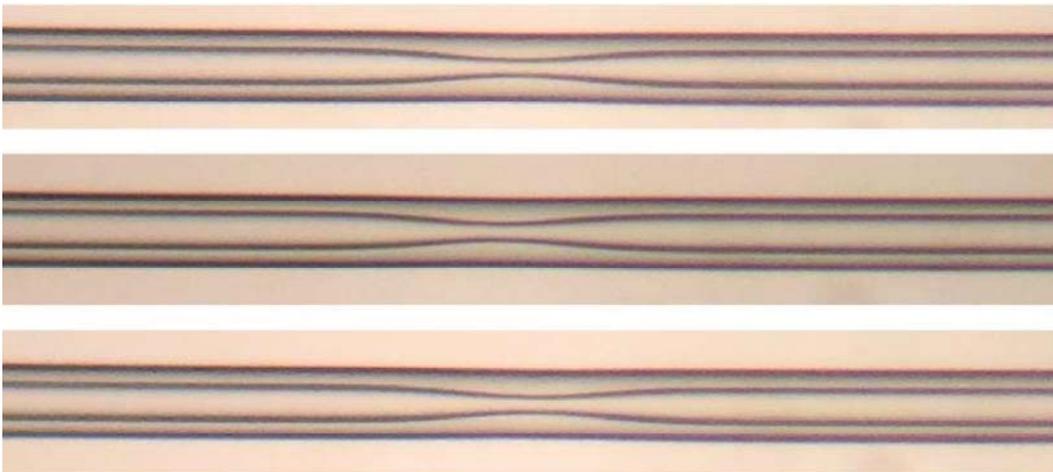


Figura 4

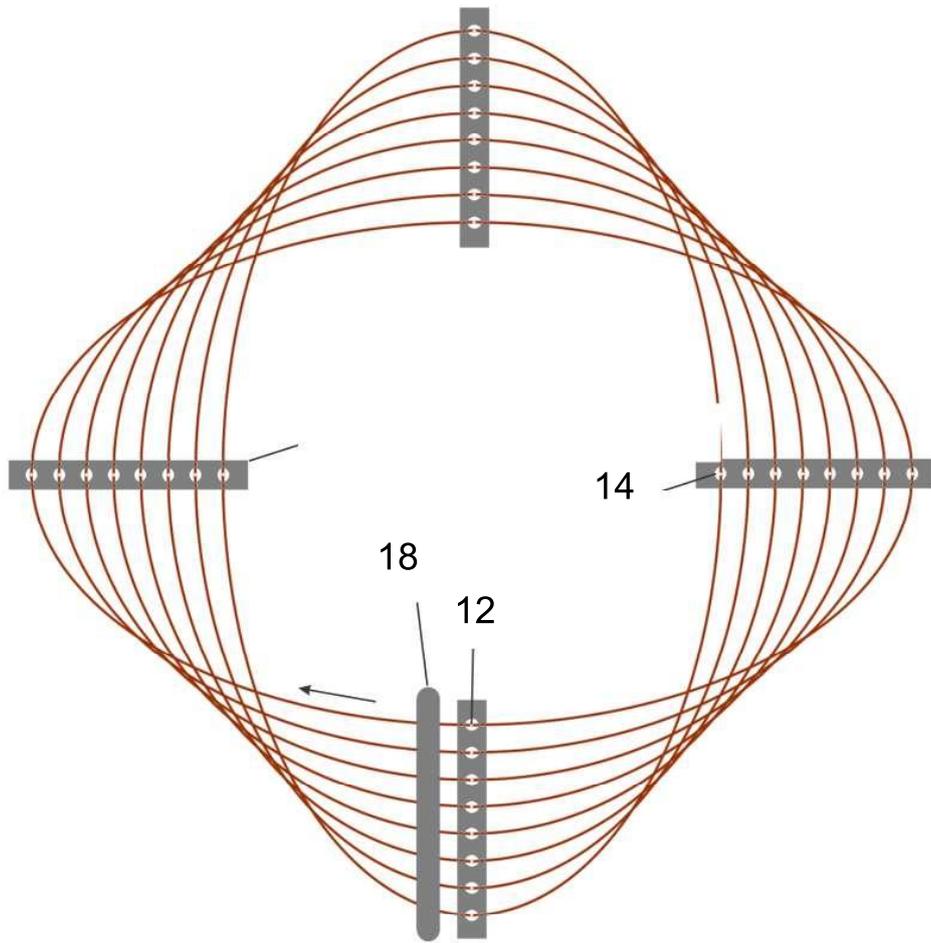


Figura 5