

## 3 Eletroforese Capilar

### 3.1. Conceitos básicos

A eletrocromatografia capilar é uma técnica de separação relativamente nova que tem sido amplamente utilizada na última década para análise de amostras biológicas, farmacêuticas, clínicas e de alimentos (Liu *et al.*, 2010; Cancalon, 2003).

O processo de eletroforese pode ser definido como o movimento diferencial de espécies carregadas sob o efeito de um campo elétrico e que pode ser associada com diversos modos de detecção das espécies de interesse. Essa técnica foi introduzida em 1937 por Arne Tiselius, o qual separou misturas de proteínas em tubos contendo solução tampão sob efeito de um campo elétrico (Khaledi, 1998). No entanto, a eficiência de separação teve como fator limitante a pouca eficiência em dissipar o calor causado pelo efeito Joule (passagem de corrente por meio do meio condutor). Como a dissipação de calor, gerado no meio condutor, ocorria apenas pelas extremidades do tubo, a formação de gradientes de temperatura induziam gradientes de densidade que geravam fluxos convectivos causando o alargamento das bandas dos componentes, conseqüentemente prejudicando a separação (Tavares, 1996).

A solução para o problema causado pelo efeito Joule foi a utilização de tubos capilares, cuja forma (elevada área superficial interna relativa ao volume) favorece a dissipação de calor, minimizando a convecção, possibilitando então a aplicação de campos elétricos mais intensos. Deste modo foi possível obter separações de alta eficiência, com utilização de pequenos volumes de amostra e tempo de análise reduzido (Tavares, 1996).

A instrumentação necessária ao processo de eletroforese capilar é relativamente simples. Um eletrodo positivo (anodo) e um negativo (catodo) são colocados, cada um em solução contendo eletrólitos (em geral uma solução tampão), nas quais são imersas as extremidades do capilar, que é preenchido com a mesma solução tampão. A diferença de potencial aplicada entre as extremidades do capilar é responsável pela migração dos íons (cátions e

ânions), presentes na solução dentro do capilar, cujo diâmetro está entre 25 a 100  $\mu\text{m}$ , em direção aos eletrodos de carga oposta (Frazier *et al.*, 2000).

O potencial aplicado geralmente é alto, encontrando-se na faixa de 5 a 30 kV. A amostra é introduzida no capilar pela substituição temporária de um dos reservatórios contendo a solução tampão por um contendo a solução da amostra. Em seguida repõe-se o reservatório contendo a solução tampão e aplica-se a diferença de potencial. A detecção pode ser realizada diretamente através da parede do capilar (Frazier *et al.*, 2000).

A separação por eletroforese baseia-se nas diferentes velocidades de migração de íons e solutos, e pode ser expressa pela Equação 1.

$$v = \mu_e E \quad (1)$$

onde  $v$  é a velocidade de migração de cada íon ( $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ),  $\mu_e$  é a mobilidade iônica de cada uma das espécies ( $\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) e  $E$  é a intensidade do campo elétrico ( $\text{V}\cdot\text{m}^{-1}$ ). Sendo a intensidade do campo elétrico expressa pela diferença de potencial aplicada dividida pelo comprimento total do capilar ( $L$ ) (Equação 2).

$$E = V/L \quad (2)$$

A mobilidade eletroforética ( $\mu_e$ ) indica quão rápido um dado íon pode mover-se em um dado meio (como uma solução tampão, por exemplo). Ela implica num balanço de forças que agem em cada íon individualmente; a força elétrica age a favor do movimento e a força de atrito contra o movimento. A mobilidade eletroforética ( $\mu_e$ ) tem um valor constante para um dado íon sob determinadas condições e pode ser expressa como indicado na Equação 3.

$$\mu_e = q/6\pi\eta r \quad (3)$$

onde  $q$  é a carga do íon,  $\eta$  é a viscosidade da solução e  $r$  é o raio do íon. O valor de  $q$  é fixo para íons totalmente dissociados tais como ácidos fortes ou íons pequenos, porém pode ser afetado por mudanças no pH no caso de espécies com caráter ácido ou básico. O raio iônico da espécie química pode ser afetado pela presença de contra-íon ou pela utilização de agentes complexantes. Logo, as diferenças de mobilidade eletroforética se dão devido a diferenças na razão carga/raio dos íons do analito. A mobilidade será alta quando da existência de carga elevada e íons de pequeno tamanho, enquanto que uma carga pequena e raio iônico grande irão conferir baixa mobilidade ao íon.

A mobilidade eletroforética é uma característica própria para uma determinada espécie química, logo íons e solutos diferentes têm mobilidades eletroforéticas diferentes, exibindo diferentes velocidades de migração sob ação

de um campo elétrico, o que permite a separação de misturas de diferentes íons e solutos pelo uso da eletroforese (Frazier *et al.*, 2000).

### 3.1.1 Fluxo eletrosmótico

O fluxo eletrosmótico (EOF - *Electro-Osmotic Flow*) é uma característica importante nas operações de EC (*Capillary Electrophoresis*). EOF é o fluxo em massa de líquido que atravessa o capilar em consequência da carga superficial no interior da parede do capilar. O EOF resulta da aplicação de campo elétrico na solução que contém uma dupla camada elétrica na parede do capilar (Frazier *et al.*, 2000; Heiger, 2000).

Os capilares de sílica fundida, os mais utilizados em EC, possuem na sua superfície interna vários grupos silanol ( $\text{SiOH}$ ) ionizáveis, que em contato com o meio aquoso rapidamente se dissociam conferindo à parede do capilar uma carga negativa ( $\text{SiO}^-$ ). A superfície do capilar negativamente carregada atrai íons positivamente carregados da solução tampão levando à formação de uma dupla camada elétrica e uma diferença de potencial (potencial zeta) na camada de solução próxima à superfície como indicado na Figura 3 (Frazier *et al.*, 2000; Heiger, 2000; Colombara *et al.*, 1997).

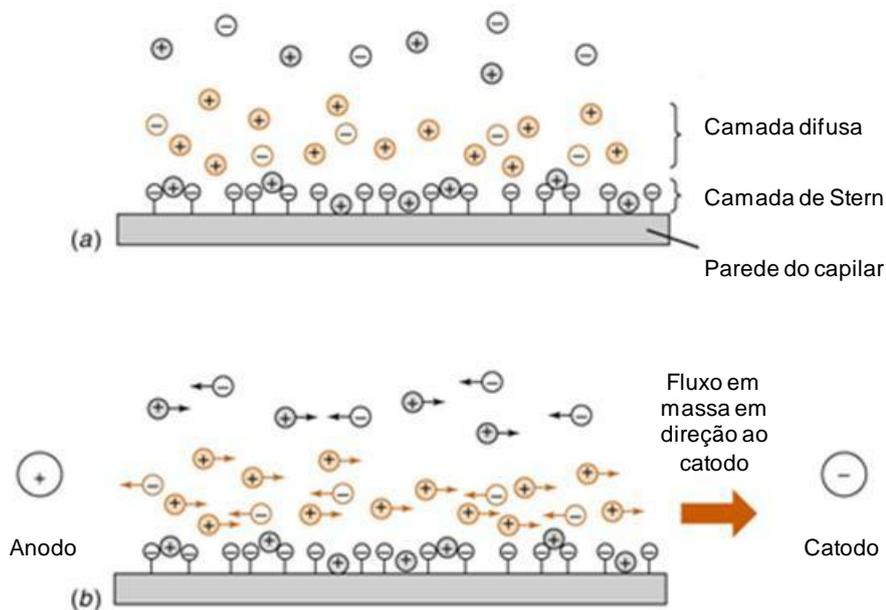


Figura 3: (a) Dupla camada elétrica formada pelas cargas negativas à superfície da sílica e por cátions adsorvidos. (b) A predominância de cátions na zona difusa da dupla camada produz um fluxo eletrosmótico global no sentido do cátodo, quando se aplica um campo elétrico.

O modelo de Stern's para a dupla camada inclui uma camada rígida de íons adsorvidos e uma camada difusa, na qual pode ocorrer difusão de íons através de movimento térmico. O potencial zeta é criado na presença de contra-íons (cátions na maioria das vezes) que se estabelecem próximo à superfície carregada negativamente, de modo a manter o balanço de cargas, na formação da dupla camada. Esse potencial diminui exponencialmente com o aumento da distância da superfície da parede do capilar (Frazier *et al.*, 2000).

Quando uma diferença de potencial é aplicada através do capilar os cátions da camada difusa migram em direção ao catodo (eletrodo negativo), induzindo um fluxo de solução, que é o fluxo eletroosmótico (Frazier *et al.*, 2000; Tavares, 1996). O EOF pode ser expresso em termos de velocidade ( $v$ ) ou mobilidade ( $\mu$ ). A Equação 4 indica os parâmetros que influenciam a velocidade do EOF.

$$v_{\text{EOF}} = (\epsilon_0 \epsilon Z / 4 \pi \eta) E \text{ ou } \mu = (\epsilon_0 \epsilon Z / 4 \pi \eta) \quad (4)$$

onde  $\epsilon_0$  é a constante dielétrica do vácuo,  $\epsilon$  é a constante dielétrica do eletrólito de corrida,  $Z$  é o potencial zeta,  $\eta$  é a viscosidade do eletrólito de corrida e  $E$  é a intensidade do campo elétrico aplicado.

As principais variáveis que afetam a mobilidade do EOF são a constante dielétrica e a viscosidade do eletrólito de corrida, além do potencial zeta.

O valor do potencial zeta é dependente do pH e é proporcional à densidade de carga na parede do capilar. Em soluções de pH alto (maior que 9) a mobilidade do EOF é maior que em soluções de pH abaixo de 4, pois os grupos silanóis estão completamente ionizados, já em pH ácido a ionização destes é baixa. A magnitude do potencial zeta também depende da força iônica do eletrólito de corrida, pois na medida em que a força iônica aumenta, a dupla camada se torna mais compacta, resultando em uma diminuição do potencial zeta e reduzindo assim a mobilidade do EOF (Heiger, 2000; Frazier *et al.*, 2000).

Em pH básico (acima de 7 a 25 °C e força iônica 1 mol.L<sup>-1</sup>) a mobilidade do EOF promove a migração de íons em direção ao catodo, independentemente de suas cargas, logo observa-se que a velocidade de migração do soluto está relacionada tanto com a mobilidade eletroforética como com a mobilidade do EOF. Assim, é possível a análise simultânea de amostras contendo tanto solutos catiônicos, neutros e aniônicos, embora não seja possível discriminar temporalmente os diferentes solutos neutros. Em valores de pH muito elevados pode ocorrer a eluição do soluto antes mesmo da separação devido a altos valores de EOF. No entanto, o fluxo eletroosmótico pode ser controlado por meio

de alteração das propriedades físico-químicas da solução como (i) alterações de pH, (ii) concentração e força iônica do eletrólito de corrida, (iii) tipo e concentração de um eletrólito inerte ou aditivo orgânico, (iv) alteração na viscosidade do solvente, (v) constante dielétrica do meio e (vi) temperatura. A inibição ou alteração do fluxo eletrosmótico também pode ser realizada através da modificação da composição química do material do capilar e, portanto da densidade de carga superficial (Tavares, 1996; Frazier *et al.*, 2000; Heiger, 2000).

A alta eficiência da técnica está, em parte, relacionada ao perfil radial da velocidade eletrosmótica, pois sendo o mesmo linear o mesmo componente de velocidade é adicionado a todos os solutos, independentemente da sua posição radial. Esta característica distingue a eletroforese capilar dos métodos cromatográficos em fase líquida em coluna, os quais apresentam um perfil de velocidade parabólico, característico do fluxo induzido por pressão (Tavares, 1996).

### **3.2. Instrumentação**

A instrumentação utilizada em EC é bastante simples e consiste basicamente dos seguintes componentes principais (Figura 4):

- dois reservatórios para eletrólitos (preenchidos geralmente por uma solução tamponada);
- tubo capilar que constitui o canal por onde ocorre a migração (geralmente de sílica fundida);
- eletrodos (geralmente platina);
- fonte de alta tensão;
- sistema de detecção apropriado, posicionado em linha.

A fonte de alta tensão utilizada é de corrente contínua regulável, que é usada para estabelecer um campo elétrico ao longo do capilar. Geralmente, tais fontes são operadas em voltagem constante e/ou corrente constante, nas faixas de operação entre 0 e 50 kV ou 0 e 200  $\mu$ A. O contato entre a fonte de alta tensão e os reservatórios é feito através de eletrodos de platina. Para completar o contato elétrico, as extremidades do tubo capilar de sílica fundida, preenchido com eletrólito de corrida, são imersas no reservatório da solução. No sistema, deve ser utilizado um dispositivo para controle e manutenção de temperatura

constante, de modo a minimizar efeitos térmicos sobre o capilar (Tavares, 1996; Santos *et al.*, 2000).

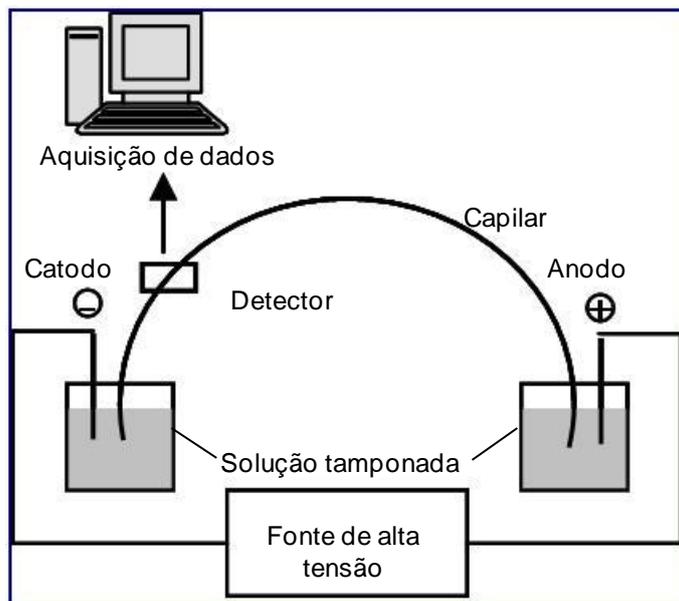


Figura 4: Instrumentação para eletroforese capilar (adaptado de Frazier *et al.*, 2000).

### 3.3. Injeção hidrodinâmica de amostra

A injeção da amostra na eletroforese capilar pode ser feita de duas formas: métodos eletrocinéticos ou hidrodinâmicos. O método de injeção influencia na reprodutibilidade dos tempos de migração, na resolução do pico, com implicação direta na análise quantitativa. Na injeção eletrocinética, a injeção da amostra é realizada através de um gradiente de potencial estabelecido ao longo do capilar, por um período de tempo conhecido, já na injeção hidrodinâmica a amostra é introduzida no capilar através da utilização de um gradiente de pressão por um período de tempo determinado. Sendo que, o gradiente de pressão pode ser estabelecido por diferentes mecanismos: pressurização ou vácuo em um dos reservatórios de solução, ou por gravidade, onde um dos reservatórios é elevado em relação ao outro e a introdução da amostra é feita por sifonagem (Santos *et al.*, 2000; Frazier *et al.*, 2000).

No tipo de injeção hidrodinâmica, modo utilizado no presente trabalho, uma pequena alíquota (representativa da composição do soluto na amostra) é introduzida no capilar. O volume de injeção deve ser menor que 1 a 2% do comprimento total do capilar, de modo a evitar sobrecarga de amostra. Em termos de volume isso representa geralmente entre 1 a 50 nL dependendo das dimensões do capilar, do tempo de injeção, da viscosidade da solução tampão e

da diferença de pressão estabelecida. A quantidade ótima de volume consiste no maior volume que pode ser injetado sem que haja perda de resolução. Por ser baseada exclusivamente na transferência de volume, a injeção hidrodinâmica é usualmente mais precisa que a eletrocinética. No entanto, um alargamento significativo da zona, pode ocorrer como resultado do perfil de velocidade parabólico, característico do fluxo induzido por pressão. Este tipo de injeção é preferido em aplicações de eletroforese de zona em solução livre e micelar, especialmente quando se tem a concentração da amostra dentro dos limites de sensibilidade do detector (Frazier *et al.*, 2000; Tavares, 1996).

### **3.4. Concentração da amostra no capilar**

A utilização de pequenos volumes de amostra e colunas de separação com dimensões reduzidas compromete a sensibilidade da análise por EC. Existem várias formas para melhora da sensibilidade desta técnica, que variam desde o aumento do caminho óptico percorrido pela luz no momento da detecção (uso de cela de detecção em formato Z, uso de capilares de caminho óptico estendido) ao acúmulo de analito na zona (concentração em linha) obtido por técnicas de empilhamento (*stacking*) e varredura (*sweeping*), além do uso de métodos de pré-concentração de amostra em linha (Mandaji, 2005; Khaledi, 1998).

O modo mais simples de aumentar a sensibilidade da análise por EC é através do uso da técnica de empilhamento, a qual consiste na concentração da amostra no capilar durante ou imediatamente após a injeção da amostra e baseia-se na diferença de intensidade do campo elétrico entre a zona de amostra e o eletrólito de corrida (Khaledi, 1998; Moraes *et al.*, 2009).

Várias técnicas para realizar o empilhamento têm sido discutidas na literatura. As mesmas podem ser agrupadas em dois grupos de acordo com o movimento da zona de amostra no eletrólito de corrida: empilhamento por fronteira móvel, onde toda a zona da amostra migra com a mesma velocidade e empilhamento por fronteira estacionária, na qual a fronteira entre uma amostra preparada em eletrólito de baixa concentração (baixa condutividade) e o eletrólito de corrida de maior concentração (alta condutividade) permanece estável durante o processo de eletroforese (Khaledi, 1998).

A concentração da amostra com campo amplificado (FASS- *Field Amplified Sample Stacking*) é a técnica mais simples de concentração de amostra em linha

utilizada em EC, sendo também denominada modo de empilhamento normal (NSM- *Normal Stacking Mode*). O princípio teórico do NMS foi apresentado pela primeira vez, em 1979, por Mikkers *et al.*, porém o mesmo só foi usado na prática em 1991 por Burgi e Chien. Em NMS, um grande volume de amostra preparada em solução tampão de baixa condutividade é injetado hidrodinamicamente no capilar, o qual contém eletrólito de corrida de alta condutividade (Figura 5A). Uma alta diferença de potencial é então aplicada através do capilar de modo que ocorra o processo de eletroforese. Devido à diferença de condutividade entre os meios (eletrólito de corrida e solução de amostra) dentro do capilar, a intensidade do campo elétrico será maior na solução da amostra que no restante do capilar. Os íons presentes na região de baixa condutividade experimentarão uma intensa força do campo elétrico, movendo-se mais rápido que os íons inseridos na região de alta condutividade (Figura 5B). Ao atingir a região de baixo campo elétrico (eletrólito de corrida), os íons presentes na amostra têm sua velocidade diminuída, ocorrendo então o empilhamento destes no eletrólito de corrida (Figura 5C). Este modo de pré-concentração é simples, porém apresenta algumas desvantagens como o fato de não poder ser aplicado a ânions e cátions simultaneamente, e ao limite de volume de amostra que pode ser injetado no capilar sem perder a eficiência de separação. O limite de detecção é reduzido em pelo menos uma ordem de grandeza com a utilização deste modo de pré-concentração (Khaledi, 1998; Moraes *et al.*, 2009).

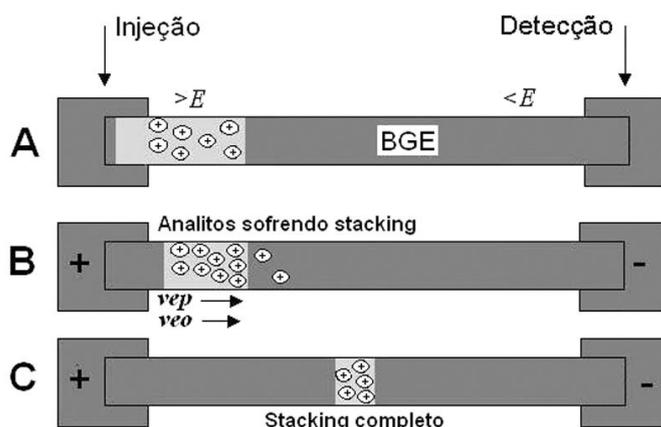


Figura 5: Esquema representativo do empilhamento da amostra (*stacking*).  $E$  = campo elétrico,  $v_{ep}$  = velocidade eletroforética,  $v_{eo}$  = velocidade eletroosmótica, BGE = eletrólito de corrida.

O modo de pré-concentração por empilhamento (NSM) é válido apenas para analitos que possuem cargas, já que analitos neutros não possuem mobilidade eletroforética. Logo, para espécies químicas neutras, a realização do empilhamento requer a adição de micelas aniônicas, as quais interagem com moléculas neutras formando um complexo com carga, podendo assim sofrer o processo de pré-concentração no capilar (Turiel & Fernández, 2000).

Em trabalho realizado por Marques (2009), utilizou-se a cela de caminho óptico alongado em conjunto com a técnica NSM (*Normal Stacking Mode*) de empilhamento com intuito de ampliar a área dos picos de um grupo de fármacos (topotecana, camptotecina e irinotecana). Os resultados obtidos indicaram vantagens em relação ao uso do alinhador normal, possibilitando um aumento de até 76 vezes na área do analito.

### **3.5. Sistemas de detecção**

O processo de detecção em EC é desafiador por causa das reduzidas dimensões do capilar que implicam em caminhos ópticos curtos e espaço pequeno para uso de eletrodos. Em geral empregam-se os mesmos tipos de detectores utilizados em HPLC, porém com algumas modificações de modo a adaptar às dimensões do capilar.

Os detectores podem ser classificados em dois tipos: os universais e os específicos. Os detectores universais medem a diferença entre alguma propriedade do soluto em relação à solução. Deste modo, o sinal não depende das propriedades do soluto e sim da diferença entre as propriedades do soluto e solução. Nesta classe incluem-se os detectores de índice de refração e condutividade, entre outros que empregam métodos indiretos. Os detectores específicos medem uma propriedade específica do soluto, que não é semelhante em todas as espécies, logo se limitam aos solutos que possuem a referida propriedade. Nesta classe estão incluídos os fotodetectores (baseados na absorção na região do UV/vis, na fluorescência, ou no espalhamento Raman), os espectrômetros de massas, os detectores amperométricos e os radiométricos. Os detectores específicos são mais sensíveis que os detectores universais e fornecem intervalos mais amplos de faixa linear de resposta (Tavares, 1996).

Em EC, assim como em HPLC, o sistema de detecção mais utilizado é a absorção na região do UV-vis. Detecção em comprimentos de onda abaixo de 200 nm pode ser alcançada, através do uso de capilares de sílica fundida. A

detecção é feita diretamente no capilar, já que a janela óptica é feita diretamente no mesmo. Em EC a detecção das espécies ocorre no momento da passagem das mesmas pela janela de detecção (Heiger, 2000).

Como definido pela Lei de Beer-Lambert, a absorvância na região do UV-vis é diretamente proporcional à concentração da espécie química absorvente, sendo:  $A = \epsilon bc$ , onde "A" é absorvância, " $\epsilon$ " é a absorvidade molar da espécie absorvente, "b" é comprimento do caminho óptico que a luz percorre na amostra e "c" é a concentração da espécie absorvente (em geral, o analito). Logo no caso da sensibilidade, a dimensão do capilar na lei de Beer-Lambert impõe um fator limitante à detectabilidade, já que em EC o parâmetro "b" é pequeno, o que deteriora os valores dos limites de detecção alcançados. Essa limitação pode ser em parte compensada com o uso de capilares com diâmetros maiores na zona de detecção ou com uso de celas especiais para aumento do caminho óptico. Para analitos fluorescentes, a detecção por fluorescência pode ser uma opção. Para uma molécula absorver radiação ela deve possuir grupos cromóforos. A maioria dos detectores na região UV-vis operam na faixa de 190 a 800 nm. Fatores como o pH, a composição do eletrólito de corrida e o grau de ionização do analito podem ocasionar mudanças nos valores da absorvidade molar e deslocamento no comprimento de onda máximo. Valores típicos para limites de detecção com EC com detecção fotométrica na região do UV-vis são da ordem de  $10^{-5}$  a  $10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup> (Frazier *et al.*, 2000; Khaledi, 1998).

### **3.6. Modos de separação em eletroforese capilar**

Em EC, as espécies químicas podem ser separadas de vários modos, que possuem mecanismos peculiares e seletividade característica. Esses diferentes modos de separação geram abordagens diferentes da técnica tais como: fronteira móvel, zona, isotacoforese, focalização isoelétrica e eletrocromatografia micelar (Tavares, 1996).

A eletroforese de zona em princípio é caracterizada pela introdução da amostra no capilar em um meio contendo o eletrólito de corrida de modo a se ter uma zona de amostra com espessura pequena. Quando aplica-se o potencial elétrico, cada analito migra independentemente numa zona específica, com velocidade constante, mas diferenciada, característica de sua própria mobilidade. As modalidades da eletroforese em solução livre, gel e micelar pertencem a essa categoria (Tavares, 1996).

Em isotacoforese, a amostra é inserida entre duas soluções, o eletrólito “líder” e o eletrólito “terminador”. Tanto cátions como ânions, podem ser separados por este modo, desde que estejam em misturas distintas. Na separação de uma mistura de cátions, por exemplo, o eletrólito líder deve conter um cátion cuja mobilidade seja maior que a mobilidade de qualquer componente catiônico na amostra, e o eletrólito terminador deve conter o cátion de menor mobilidade. Quando o campo elétrico é estabelecido, um gradiente de potencial se estabelece ao longo do capilar, de tal modo que todos os cátions migrem com velocidade constante e única. Em regiões onde cátions de menor mobilidade estão presentes, o campo elétrico é mais intenso. Estes solutos, entretanto, movem-se com a mesma velocidade que os solutos de maior mobilidade, estes últimos submetidos a campos elétricos mais fracos. Portanto as velocidades das bandas individuais são auto-normalizadas (Tavares, 1996).

A focalização isoelétrica envolve a separação de solutos anfotéricos em um gradiente de pH. Sob a influência do campo elétrico, um soluto negativamente carregado migra em direção ao anodo. Durante sua migração, o soluto experimenta regiões de pH progressivamente menor. Assim, uma fração cada vez maior do soluto torna-se protonada, e desta forma, a carga efetiva é alterada durante a migração. Cada componente da amostra migra para uma região de pH igual ao seu ponto isoelétrico, e permanecerá nesta posição enquanto o campo elétrico for operante (Tavares, 1996).

Na abordagem por eletrocromatografia micelar ou cromatografia eletrocinética capilar micelar a separação de espécies neutras ou com razão massa/carga elevada é feita com auxílio de tensoativos (ou surfactantes iônicos). Considerando o fato de que no presente trabalho utilizou-se a cromatografia eletrocinética capilar micelar para a separação das vitaminas K, a mesma é apresentada em maior detalhe a seguir.

### **3.6.1. Cromatografia eletrocinética capilar micelar**

Na cromatografia eletrocinética micelar (MEKC - *Micellar electrokinetic chromatography*), também chamada de cromatografia eletrocinética capilar micelar (MECC), agentes tensoativos iônicos, em condições apropriadas à formação de micelas, são adicionados ao eletrólito de corrida (Figura 6), proporcionando assim um sistema cromatográfico de duas fases. O eletrólito representa a fase primária, a qual é transportada eletroosmoticamente sob ação

do campo elétrico, enquanto que as micelas representam a fase secundária, ou pseudo-estacionária, a qual é transportada por uma combinação de eletroforese e eletroosmose. A partição diferenciada de solutos neutros entre essas duas fases é responsável pela seletividade da separação. No entanto, esta técnica também pode ser utilizada na separação de espécies iônicas (Tavares, 1997; Khaledi, 1998).

Em MEKC existe um limite de eluição, chamado janela de eluição. Logo todos os solutos neutros devem ser separados entre o tempo de eluição do EOF ( $t_{eo}$ ) e o tempo de migração das micelas ( $t_{mc}$ ). MEKC pode ser visto como híbrido da cromatografia líquida de fase reversa e da eletroforese capilar de zona (CZE), com um processo de separação que incorpora interações hidrofóbicas e polares, mecanismo de partição e eletromigração. Essa abordagem oferece uma combinação de fatores como a alta eficiência, curto tempo de análise, pequeno volume de amostra, consumo muito reduzido de solvente e versatilidade ao incorporar a seletividade química no processo de separação (Tavares, 1997; Khaledi, 1998).

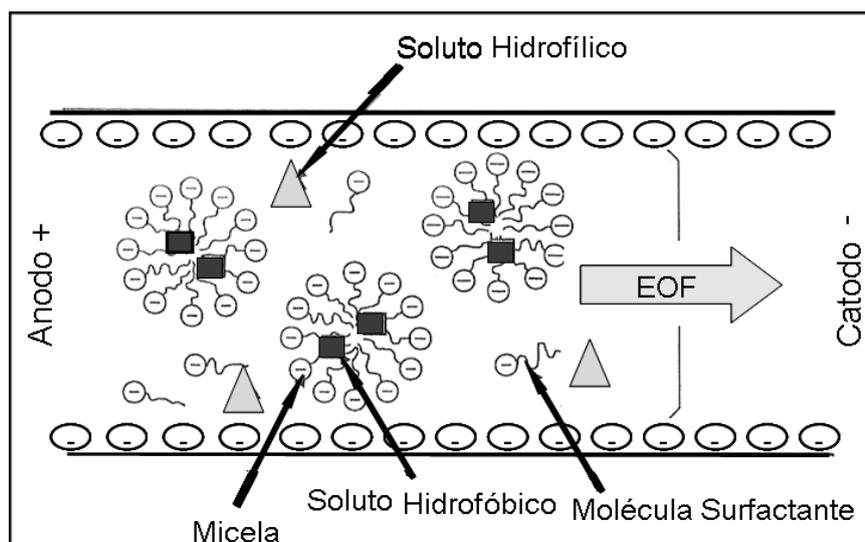


Figura 6: Representação esquemática da separação por MEKC usando micelas aniônicas (adaptado de Frazier *et al.*, 2000).

### 3.6.1.1. Micelas

As micelas são agregados organizados, de forma esférica possuindo ambas as regiões estruturais (hidrofílica e hidrofóbica), que se associam espontaneamente em solução aquosa formando estruturas de dimensões coloidais em equilíbrio dinâmico com os monômeros. O número de monômeros

na forma agregada e o tamanho das micelas variam de acordo com o tipo de surfactante e com as condições do meio (Tavares, 1997; Khaledi, 1998).

Os surfactantes são moléculas anfifílicas que contêm grupamentos com caráter hidrofóbico (cauda apolar) e hidrofílico (“cabeça” polar ou iônica). Eles podem ser reconhecidos pela carga ou não da porção hidrofílica, como surfactantes aniônicos, catiônicos, anfóteros ou neutros; ou pelas variações da porção hidrofóbica. Estes têm a propriedade de formar sistemas organizados como micelas e outros tipos de agregados quando presentes no meio acima de uma determinada concentração denominada concentração micelar crítica (CMC) (Tavares, 1997; Khaledi, 1998).

Os surfactantes que apresentam valores elevados para a CMC não são adequados para utilização em MEKC, pois as micelas formadas coexistem com grandes quantidades de monômero livre, o que representa uma sobrecarga térmica para o sistema (aumento de calor a ser dissipado pelo capilar) (Tavares, 1997).

No presente trabalho, conforme descrito no Capítulo 5, utilizou-se o surfactante catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). Este é utilizado em um grande número de aplicações, como na separação de hidrocarbonetos aromáticos, constituintes de ácidos nucleicos entre outras (Khaledi, 1998).

### **3.6.1.2. Migração em MEKC**

Micelas aniônicas migram em direção oposta ao fluxo eletroosmótico em um capilar de sílica. Em capilares de sílica fundida e em pH maior que 6, a  $v_{EOF}$  é tipicamente maior que a velocidade eletroforética das micelas aniônicas, desse modo estas são carregadas em direção ao catodo. No entanto, quando são utilizadas micelas catiônicas a parede do capilar é recoberta com surfactante positivamente carregado o que leva a inversão da direção do EOF, sendo necessário que a polaridade dos eletrodos seja invertida para assegurar a eluição das micelas dentro da janela de eluição (Khaledi, 1998).

Existem dois extremos que definem uma janela de eluição em MEKC, os quais estão diretamente relacionados ao coeficiente de partição dos solutos ( $P_{mw}$ ), que pode ser definido como sendo a razão entre as concentrações que se estabelecem nas condições de equilíbrio de uma substância química, quando dissolvida em sistema constituído por uma fase orgânica e uma fase aquosa. O extremo  $t_{e0}$  é marcado por analitos que não interagem com as micelas ( $P_{mw} \sim 0$ )

e que passam todo o tempo de migração na fase aquosa, migrando com mobilidade eletroosmótica. O outro extremo  $t_{mc}$  é definido pela eluição de analitos que interagem fortemente com as micelas ( $P_{mw} \sim \infty$ ), esses compostos são muito hidrofóbicos e seus tempos de migração coincidem com o tempo de migração das micelas ( $t_{mc}$ ). A existência da janela de eluição limita o número máximo de analitos separados numa única corrida (capacidade de pico) em MEKC já que todos os analitos neutros devem ser separados entre os tempos  $t_{eo}$  e  $t_{mc}$ . O tamanho da janela de eluição pode ser alterado pela adição de modificadores orgânicos, misturas de micelas ou pela modificação da parede do capilar (Khaledi, 1998).

A Figura 7 ilustra um esquema típico de migração para analitos neutros em MEKC usando surfactantes catiônicos e aniônicos em um capilar de sílica fundida (Khaledi, 1998).

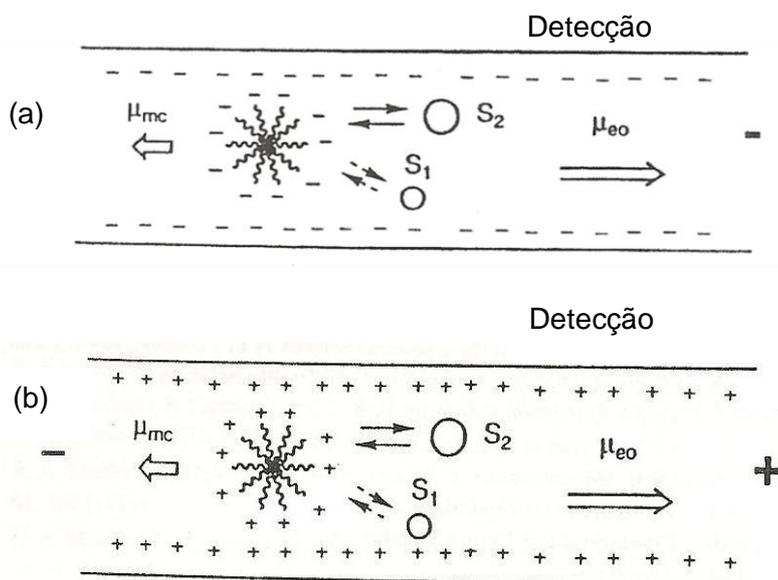


Figura 7: Migração de analitos neutros (S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub>) em MEKC usando como fase pseudo-estacionária: (a) surfactante aniônico e (b) surfactante catiônico, onde  $\mu_{eo}$  é a mobilidade do fluxo eletroosmótico e  $\mu_{mc}$ , a mobilidade da micela (Fonte: Khaledi, 1998).

O fator de retenção em MEKC ( $k'$ ) pode ser definido como a razão entre a quantidade de soluto, em mol, na fase pseudo-estacionária micelar,  $n_{mc}$ , e a quantidade de soluto, em mol, na fase aquosa,  $n_{aq}$  (Equação 5).

$$k' = \frac{n_{mc}}{n_{aq}} \quad (5)$$

O fator de retenção em MEKC para analitos neutros pode ser determinado pelo tempo de migração através da expressão indicada na Equação 6, sendo  $t_r$  o tempo de migração do analito.

$$k' = \frac{t_r - t_{eo}}{t_{eo} \left[ 1 - \left( \frac{t_r}{t_{mc}} \right) \right]} \quad (6)$$

Esta expressão é similar à equação para o fator de retenção em cromatografia convencional, com a exceção do termo adicional  $[1 - (t_r/t_{mc})]$  no denominador. Este termo indica a existência de uma janela de eluição, pois a fase “estacionária” em MEKC é na realidade móvel. Se  $t_{mc}$  tender ao infinito (micela estacionária), o termo extra no denominador é omitido e a equação para o fator de retenção é a mesma da cromatografia convencional (Khaledi, 1998).

### 3.6.1.3.

#### Resolução: eficiência, seletividade e fator de retenção

A equação fundamental para o cálculo da resolução em MEKC para analitos neutros tem o mesmo formato da utilizada em cromatografia convencional (Equação 7). Sendo a resolução dependente de três termos relacionados à eficiência, seletividade e retenção e um termo exclusivo da MEKC, representado pela existência da janela de eluição (Tavares, 1997; Khaledi, 1998).

$$R_s = \left( \frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k'_2}{1 + k'_2} \right) \left[ \frac{1 - (t_{eo}/t_{mc})}{1 + (t_{eo}/t_{mc})k'_1} \right] \quad (7)$$

sendo  $N$  o número de pratos teóricos,  $k'_1$  e  $k'_2$  os fatores de retenção dos analitos 1 e 2, respectivamente e  $\alpha$  o fator de seletividade definido por  $k'_1/k'_2$ .

Na equação 7, se o tempo de migração das micelas ( $t_{mc}$ ) tender ao infinito, o último termo da expressão se aproxima da unidade e a equação se torna idêntica à utilizada em cromatografia convencional. Assim, a resolução aumenta com o aumento do fator de retenção. Em MEKC a relação entre  $R_s$  e  $k'$  não é intuitiva, já que o último termo da equação diminui com o aumento de  $k'$ . A resolução passa por um máximo, para valores de  $k'$  entre 1 e 5. Sendo o valor ótimo dependente do intervalo de eluição. Quando a velocidade de migração da micela e a velocidade eletroosmótica têm magnitudes aproximadas, mas direções opostas, o intervalo de eluição pode ser estendido e o valor ótimo de  $k'$

aumentado. No entanto, sob estas condições, pode haver o comprometimento da reprodutibilidade dos tempos de eluição. Em geral, torna-se necessário a redução dos valores de  $k'$  dos últimos componentes da mistura de modo a melhorar a resolução. Um aumento de  $t_{mc}$  relativo à  $t_r$  é suficiente para diminuir o valor de  $k'$ . O tempo de eluição da fase micelar é determinado pela velocidade aparente da micela,  $v_M$ , que por sua vez, é a soma vetorial das velocidades eletrosmótica ( $v_{osm}$ ) e eletroforética da micela ( $v_{em}$ ). Em condições de rotina (micela aniônica,  $pH > 5$ ), a  $v_{osm}$  é maior que  $v_{em}$ . Dessa forma, uma diminuição do potencial zeta do capilar irá reduzir tanto  $v_{osm}$  quanto  $v_{em}$ , produzindo o efeito desejado de aumento de  $t_{mc}$  relativo a  $t_r$ . Além disso, com a redução do fator  $t_{eo}/t_{mc}$ , o valor de resolução ótima aumenta, deslocando-se para valores maiores de  $k'$  (Tavares, 1997; Khaledi, 1998).

O fator de retenção (Equação 8) de um soluto pode ser definido como o produto do coeficiente de partição,  $K$ , e a razão entre as fases,  $\beta$  (razão entre os volumes da fase estacionária e fase móvel):

$$k' = \beta K \quad (8)$$

Em MEKC, tanto o coeficiente de partição ( $K$ ) quanto a razão entre as fases ( $\beta$ ) são afetados pela adição de solventes orgânicos. Estes alteram também a CMC e, conseqüentemente, o volume micelar. Além disso, a adição de solventes orgânicos altera a viscosidade e a constante dielétrica da fase móvel e, portanto, o potencial zeta do capilar, resultando na variação da velocidade eletrosmótica. Entre os solventes utilizados na ampliação do intervalo de tempos de eluição encontram-se metanol, isopropanol e acetonitrila. Em geral, a redução do fator de retenção dos solutos que eluem por último é conseguida à custa de longos tempos de análise (Tavares, 1997).

A capacidade de pico ( $n$ ) em MEKC pode ser aumentada com o aumento da janela de eluição, sendo dada pela Equação 9.

$$n = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \ln \frac{t_{mc}}{t_{eo}} \quad (9)$$

Caso nenhum procedimento seja utilizado de modo a estender o intervalo de eluição e assumindo-se:  $t_{eo}/t_{mc} = 0,3$  e  $N = 10^5$ , o número máximo de solutos que poderiam ser separados em uma única corrida é menor que o separado com técnicas correlatas que não exibem limitação do intervalo de eluição (Tavares, 1997).

A eficiência em MEKC está relacionada ao perfil do fluxo eletroosmótico gerado durante a aplicação do campo elétrico, pois devido ao movimento uniforme deste fluxo através do capilar todas as moléculas numa mesma zona migram com a mesma velocidade e apenas a difusão longitudinal fica responsável pela dispersão da banda. Deste modo a eficiência pode ser definida como a média de alargamento da zona que ocorre durante a separação, sendo representada em termos de número de pratos teóricos. Os termos em eletromigração capilar são os mesmos definidos para a cromatografia. A altura equivalente de um prato teórico ( $H$ ) corresponde à variância do pico (em unidades de comprimento) dividida pela distância de migração. O número de pratos  $N$  corresponde à distância migrada dividida por  $H$ . Em MEKC, com parâmetros experimentais padrões, o número típico de pratos teóricos varia de  $2 \times 10^5$  a  $3 \times 10^5$  onde valores mais elevados de  $N$  implicam em maior eficiência e melhor separação (Heiger, 2000; Pyell, 2006).

Existem algumas particularidades que contribuem para a dispersão das zonas. A variância da zona do soluto resultante de difusão longitudinal é proporcional ao coeficiente de difusão do soluto e ao tempo de migração, sendo que o soluto tem a difusão na fase móvel e a difusão na fase micelar. Além disso, solutos com altos valores de  $k'$  permanecem muito tempo no interior da micela, que por sua vez migra lentamente. Esses solutos levam mais tempo para eluir do capilar e as suas zonas são mais vulneráveis ao alargamento gerado por difusão. A polidispersão, que consiste na variação de tamanho da micela com o tempo em decorrência do equilíbrio de troca entre o monômero e a micela, é outro fator que pode produzir o alargamento das zonas. A mobilidade eletroforética da micela é determinada por fatores como tamanho e forma, os quais dependem do número de agregação. Surfactantes que geram micelas em um amplo intervalo de tamanhos e formas podem não ser adequados para MEKC, pois solutos que interagem com micelas de diferentes tamanhos exibem um amplo intervalo de velocidades de migração e, por consequência, produzem zonas largas. Um aumento da concentração do surfactante, assim como um aumento da temperatura podem contribuir para acelerar o processo de troca entre micela e monômero, melhorando a eficiência da separação (Tavares, 1997).

Outro efeito adverso relacionado com a resistência à transferência de massa entre a fase pseudo-estacionária e fase móvel também pode ocorrer em MEKC. Em geral, baixos valores de diferença de potencial e altos coeficientes de difusão do soluto (analito) minimizam este efeito. No entanto, devido à natureza

das forças envolvidas, o processo de partição entre solutos polares ou iônicos e a micela pode apresentar uma cinética lenta, e causar o alargamento das zonas. A resistência na transferência de massa na fase móvel envolve dois processos distintos: difusão intermicelar e intracoluna. O efeito intermicelar ocorre porque a difusão do soluto entre as micelas é um processo lento. Mesmo em concentrações moderadas de surfactantes, a distância entre as micelas é extremamente pequena, dificultando a passagem do soluto. As micelas constituem uma fase secundária mais uniforme e homogeneamente dispersa (devido à repulsão de cargas entre as micelas) e têm dimensões menores que as partículas usadas nas colunas empacotadas. Devido à quase perfeita distribuição de micelas no meio e sua natureza fluídica, diferenças de percurso na migração dos solutos são praticamente eliminadas, explicando-se, assim, a excelente eficiência obtida nas separações por MEKC. A transferência de massa intracoluna é lenta e contribui para o alargamento das zonas somente se existir um gradiente de velocidade radial no capilar. Tais gradientes podem ser originados apenas por efeitos térmicos, já que a natureza do fluxo eletroosmótico, com a constância do perfil radial da velocidade, minimiza esta fonte de dispersão (Tavares, 1997).

#### **3.6.1.4.**

#### **Parâmetros experimentais para otimização da resolução**

A resolução em MEKC é influenciada por vários fatores, entre os quais pode-se citar: o tipo de surfactante, concentração do tampão, pH, temperatura ou uso de modificadores químicos. O surfactante e o modificador químico adicionado ao eletrólito de corrida são os parâmetros que mais contribuem para o aumento da resolução (Khaledi, 1998). A seguir são destacados alguns parâmetros experimentais considerados para o desenvolvimento do presente trabalho.

Os surfactantes empregados em MEKC devem atender alguns critérios tais como: (i) possuir solubilidade suficiente a fim de formar micelas na solução tampão; (ii) a solução micelar formada deve ser homogênea e transparente ao UV e (iii) a solução micelar deve possuir baixa viscosidade.

Os surfactantes mais utilizados são os iônicos, sendo estes fundamentais para a separação de analitos neutros. Os grupos hidrofóbicos e hidrofílicos presentes na molécula dos surfactantes têm influência direta na seletividade em MEKC (Khaledi, 1998).

A concentração e o pH do eletrólito de corrida são parâmetros que exercem menor influência na separação por MEKC quando comparado com CZE. No entanto, alguns fatores devem ser levados em conta ao escolher o tipo e a concentração do tampão utilizado. Diferentes tipos de tampão influenciam a seletividade em MEKC, pois os diferentes íons interagem de modo diferente com a parede do capilar levando a alterações no EOF. Outro fator que interfere na simetria dos picos formados é a concentração de tampão. Esta deve ser aproximadamente 100 vezes maior que a concentração do analito injetado, de modo a assegurar uma melhor resolução e formato dos picos (Frazier *et al.*, 2000).

Em amostras contendo apenas analitos neutros, o pH do tampão exerce pouca influência sobre a seletividade. O primeiro fator a ser considerado é selecionar um valor de pH no qual as micelas de surfactantes estejam ionizadas (permitindo assim sua migração a uma taxa diferente do EOF) e que permita que o EOF seja relevante. Já no caso de analitos ionizáveis o pH do tampão é um importante fator na manipulação da resolução. Um analito ionizado com a mesma carga da micela poderá ser incorporado dentro da micela de forma menos efetiva do que um analito não ionizado. O fator de retenção de um ácido é a média dada pelo fator de retenção de sua forma não dissociada com o fator de retenção de sua forma dissociada. Assim, o coeficiente de distribuição, tempo de migração e resolução podem ser alterados por mudanças no pH para analitos ionizáveis. Um importante efeito do pH é sua influência no tempo de migração das micelas, este deve ser otimizado de modo a permitir uma adequada separação de analitos neutros, os quais terão seu tempo de migração dependente da força de interação com a solução micelar (Frazier *et al.*, 2000).

Além do propósito de manter a temperatura constante no capilar, evitando o efeito Joule, o ajuste da temperatura pode ser utilizado para a otimização da separação em MEKC. A variação da temperatura provoca alterações na viscosidade do tampão, EOF e, portanto, no tempo de análise. O coeficiente de partição dos solutos também é influenciado pela temperatura. Temperaturas elevadas provocam redução da viscosidade do tampão, aumentam o EOF e diminuem o tempo de análise, no entanto podem provocar a degradação do tampão ou analito e aumento da zona. Logo, a temperatura ideal deve ser aquela na qual seja possível obter um máximo de resolução sem comprometer outros fatores, tais como a estabilidade dos analitos e do eletrólito de corrida, que devem ser estáveis durante as análises de modo a obter reprodutibilidade dos resultados (Heiger, 2000; Frazier *et al.*, 2000).

A adição de modificadores químicos de fase móvel possibilita alterar a mobilidade do soluto, modificar o fluxo eletroosmótico, solubilizar os analitos e reduzir a interação de certos solutos com a parede do capilar. Os aditivos mais utilizados são solventes orgânicos, ciclodextrinas (CDs), uréia, entre outros. Em MEKC, os solventes orgânicos miscíveis em água como metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) podem ser utilizados para alterar a retenção do analito pela fase micelar. Quando esses solventes são adicionados na solução do eletrólito de corrida, alteram a polaridade da fase aquosa móvel causando um aumento na atração do analito para essa fase, redução do fator de retenção e alteração da seletividade da separação. Altas concentrações de solvente orgânico podem dividir a estrutura da micela, sendo usados, em geral, volumes que não ultrapassem 30% da composição do meio. A adição de solvente orgânico na solução micelar reduz a  $v_{EOF}$ , o que provoca aumento na resolução devido à extensão da janela de migração (Tavares, 1997; Frazier *et al.*, 2000).