

Eletoforese

Um método de separação baseado na diferença de velocidade de migração de espécies carregadas em uma solução tampão sob a influência de um campo elétrico.

Década 1930 – O químico sueco Arne Tiselius desenvolveu a eletroforese para o estudo de proteínas de soro sanguíneo.

Eletofórese

-Aplicada a vários problemas de separação de analitos difíceis: ânions e cátions inorgânicos, aminoácidos, catecolaminas, drogas, vitaminas, carboidratos, peptídeos, proteínas, ácidos nucléicos, nucleotídeos, polinucleotídeos e numerosas outras espécies.

-Habilidade única de separar macromoléculas carregadas de interesse da indústria biotecnológica e de pesquisas em biologia e bioquímica.

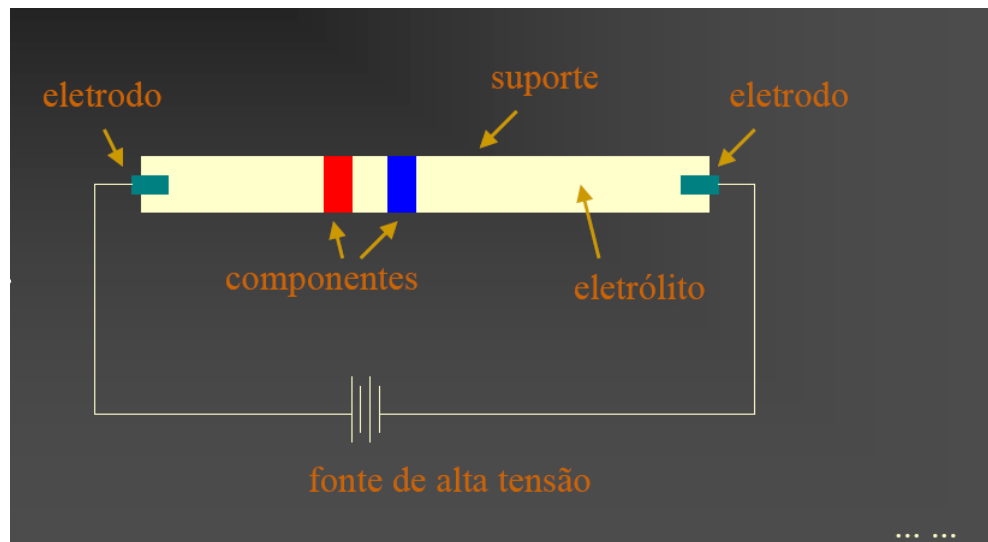
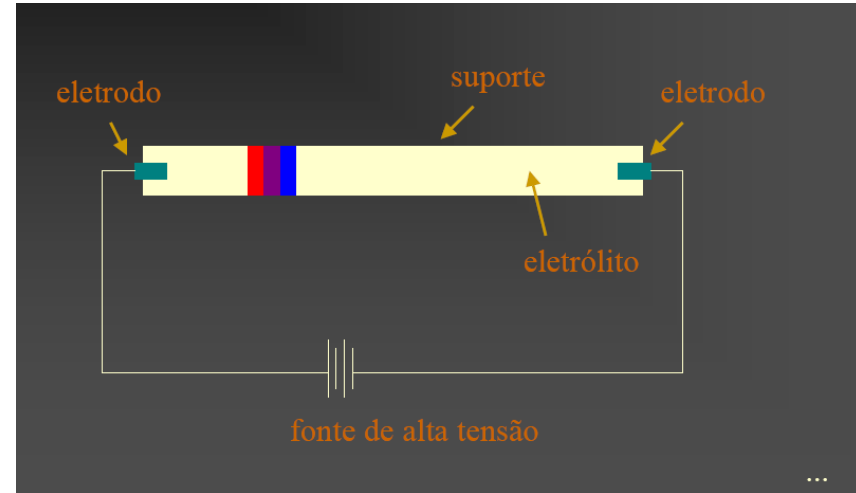
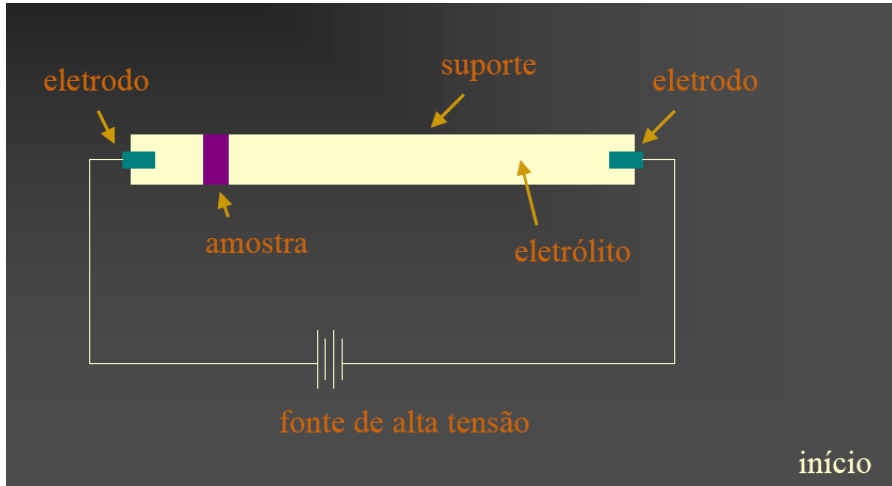
Eletoforese em placa

- Método clássico que foi usado por muitos anos para separar espécies complexas, de alta massa molecular e de interesse bioquímico e biológico.
- As separações são feitas sobre uma fina camada plana ou placa de gel poroso semi sólido que contém uma solução tampão aquosa nos seus poros.
- As amostras são introduzidas como manchas ou faixas sobre a placa e um potencial de corrente contínua é aplicado através da placa por um certo tempo.

Eletoforese capilar

- Faz separações com alta resolução e alta velocidade, em volumes de amostra excepcionalmente pequenos (0,1 a 10nL).
- Na saída do capilar, as espécies separadas são eluídas, de modo que detectores, como os de HPLC, podem ser usados, em vez da pouco eficiente técnica de manchas da eletroforese em placa.

Sistema básico



Velocidade de migração

- A velocidade de migração de uma dada espécie depende da sua carga e também do seu **tamanho**.
- As separações são, então, baseadas nas diferenças da **relação carga-tamanho** dos vários analitos em uma amostra.
- Quanto** maior esta razão mais rápido um íon migra no campo elétrico.

$$v = \mu_e E$$

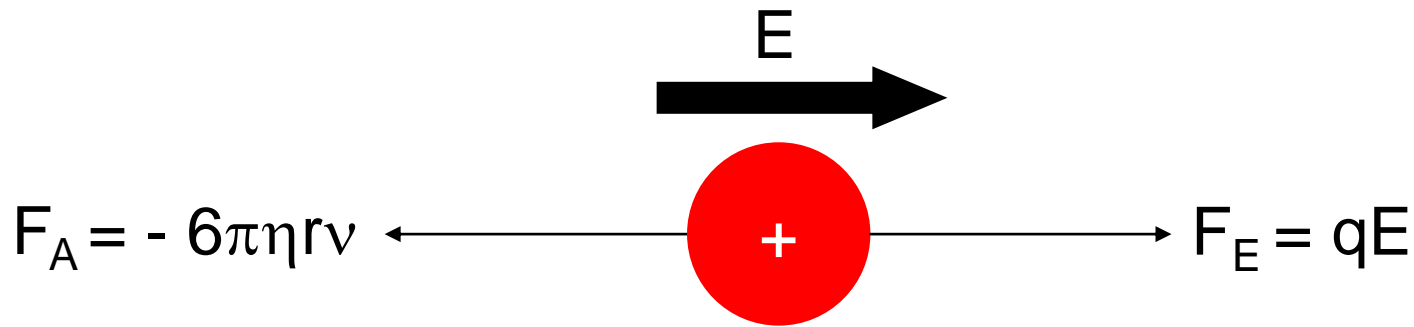
v - velocidade de migração (cm s^{-1})

μ_e - mobilidade eletroforética ($\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$)

E - intensidade do campo (V cm^{-1})

A mobilidade é característica da espécie e do meio.

Mobilidade iônica



F_A - força de atrito

η - viscosidade

r - raio iônico hidratado do íon

v - velocidade do íon

F_E - força elétrica

q - carga elétrica do íon

E - campo elétrico

Estado estacionário:

$$F_A + F_E = 0$$

$$v = \frac{qE}{6\pi\eta r}$$

$$v = \mu E$$

$$\mu = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

Mobilidade iônica

$$\mu = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad \rightarrow \quad \mu = \frac{ze}{6\pi\eta r}$$

z – carga do íon

e – carga elementar

CARACTERÍSTICA
DO MEIO

$$\mu = \frac{e}{6\pi} \cdot \frac{1}{\eta} \cdot \frac{z}{r}$$

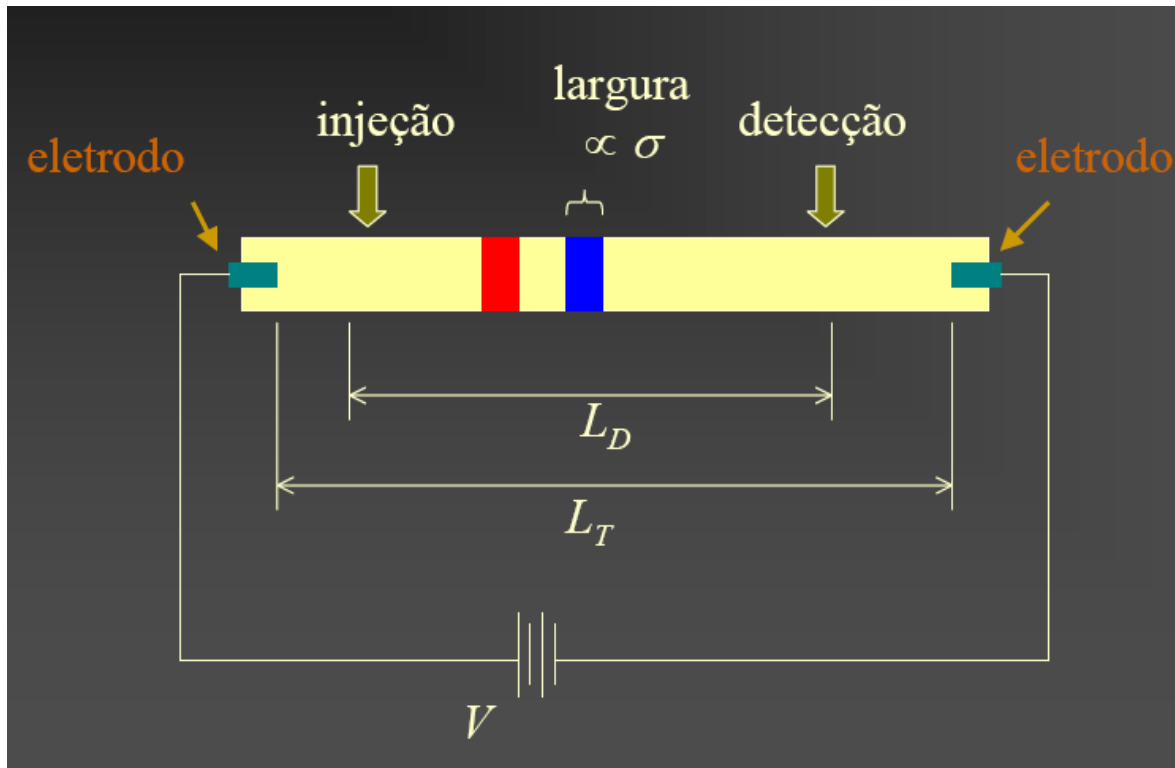
CARACTERÍSTICA
DO ÍON

CONSTANTE

Eficiência

L_T = comprimento do capilar

L_D = distância da injeção até o detector



V = voltagem aplicada

t_m = tempo de migração

N = número de pratos

$$E = \frac{V}{L_T}$$

$$v = \mu E$$

$$N = \frac{L_D^2}{\sigma^2}$$

$$t_m = \frac{L_D}{v}$$

Número de pratos

$$E = \frac{V}{L_T} \quad v = \mu E \quad N = \frac{L_D^2}{\sigma^2} \quad t_m = \frac{L_D}{v}$$

Considerando que a difusão longitudinal é a única causa de alargamento da banda

➔ $\sigma = \sqrt{2Dt_m}$

$$N = \frac{L_D^2}{2Dt_m} = \frac{L_D v}{2D} = \frac{L_D \mu E}{2D} = \frac{L_D \mu V}{2DL_T}$$

Efeito Joule

Quanto maior o potencial de corrida, maior a velocidade do íon:

- Menor tempo de análise
- Menor dispersão da banda (maior eficiência)
- Maior calor gerado

EFEITO JOULE – gradientes de temperatura → induzem gradientes de densidade → podem causar convecção → podem misturar bandas já separadas.

Como reduzir o efeito Joule?

→ Diminuir o potencial

-redução da eficiência e da resolução

→ Diminuir o raio capilar

-redução da sensibilidade (detecção)

-eventual aumento da adsorção

→ Diminuir concentração do eletrólito de corrida

-eventual aumento da adsorção

→ Troca de eletrólito de corrida

-interações indesejadas com os analitos

Tubo capilar

Sílica (SiO_2) – transparente no UV e visível
(sem sustentação)



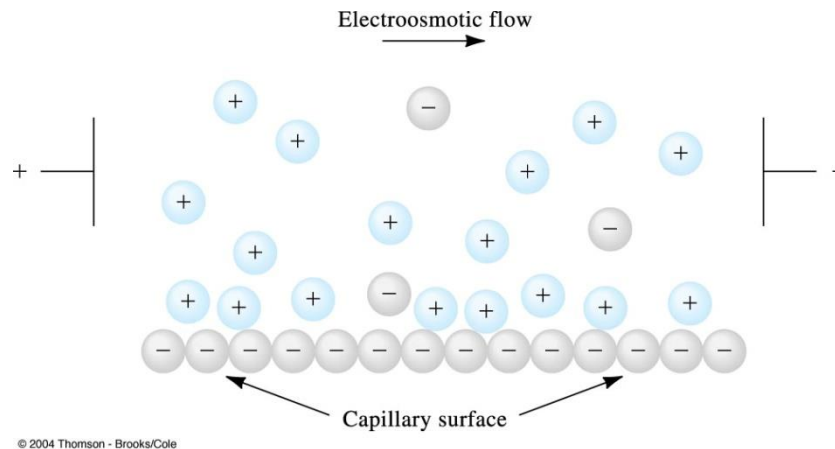
Revestimento de poliimida para aumentar a resistência mecânica – transparente, mas avermelhado (tem menor condutividade térmica do que a sílica)

Fluxo eletroosmótico (EOF)

Quando um potencial alto é aplicado através de um tubo capilar contendo uma solução tampão, usualmente ocorre um fluxo eletroosmótico, no qual o solvente migra em direção ao cátodo ou ao ânodo.

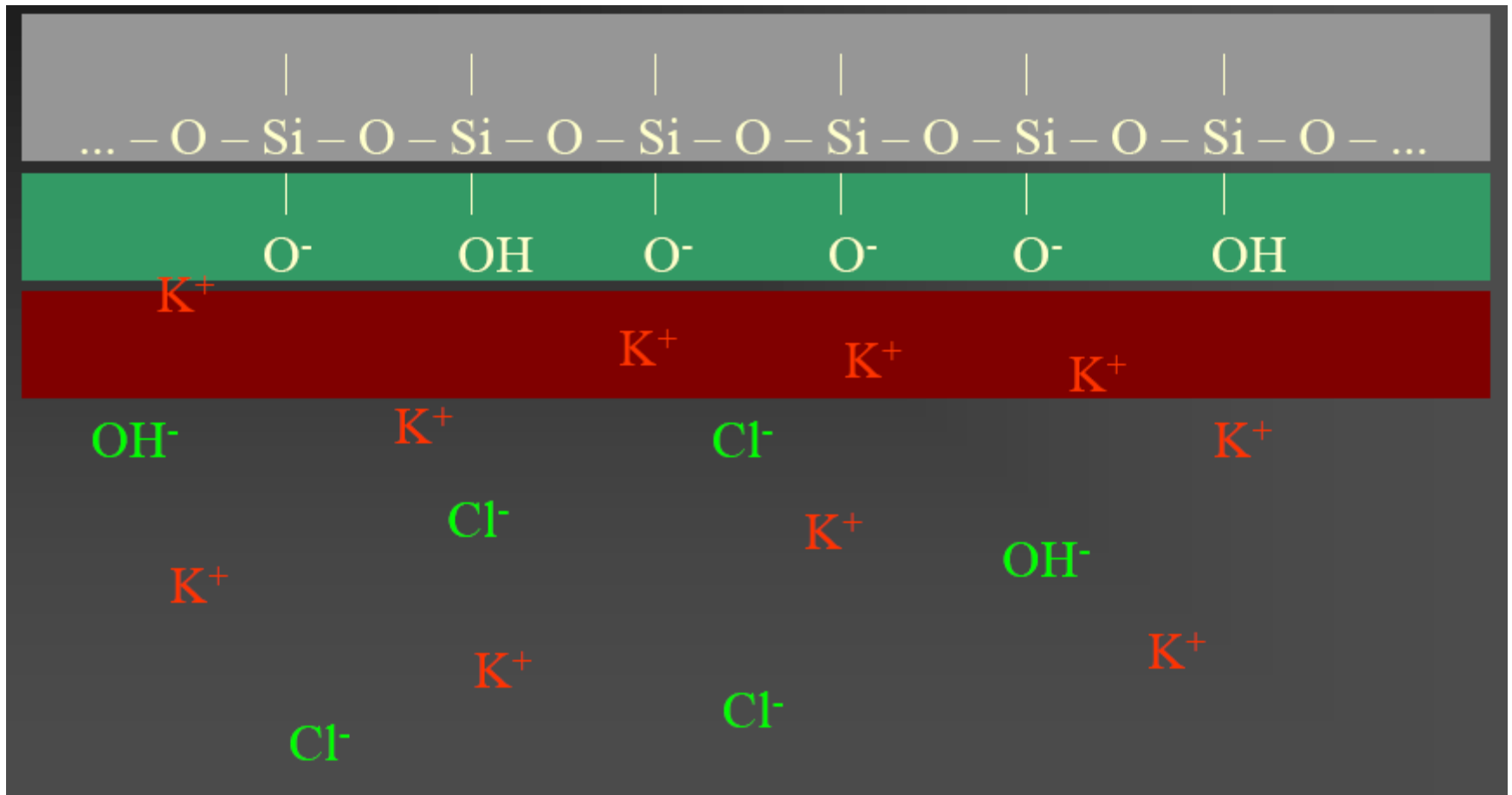
CAUSA:

Dupla camada elétrica – interface sílica solução

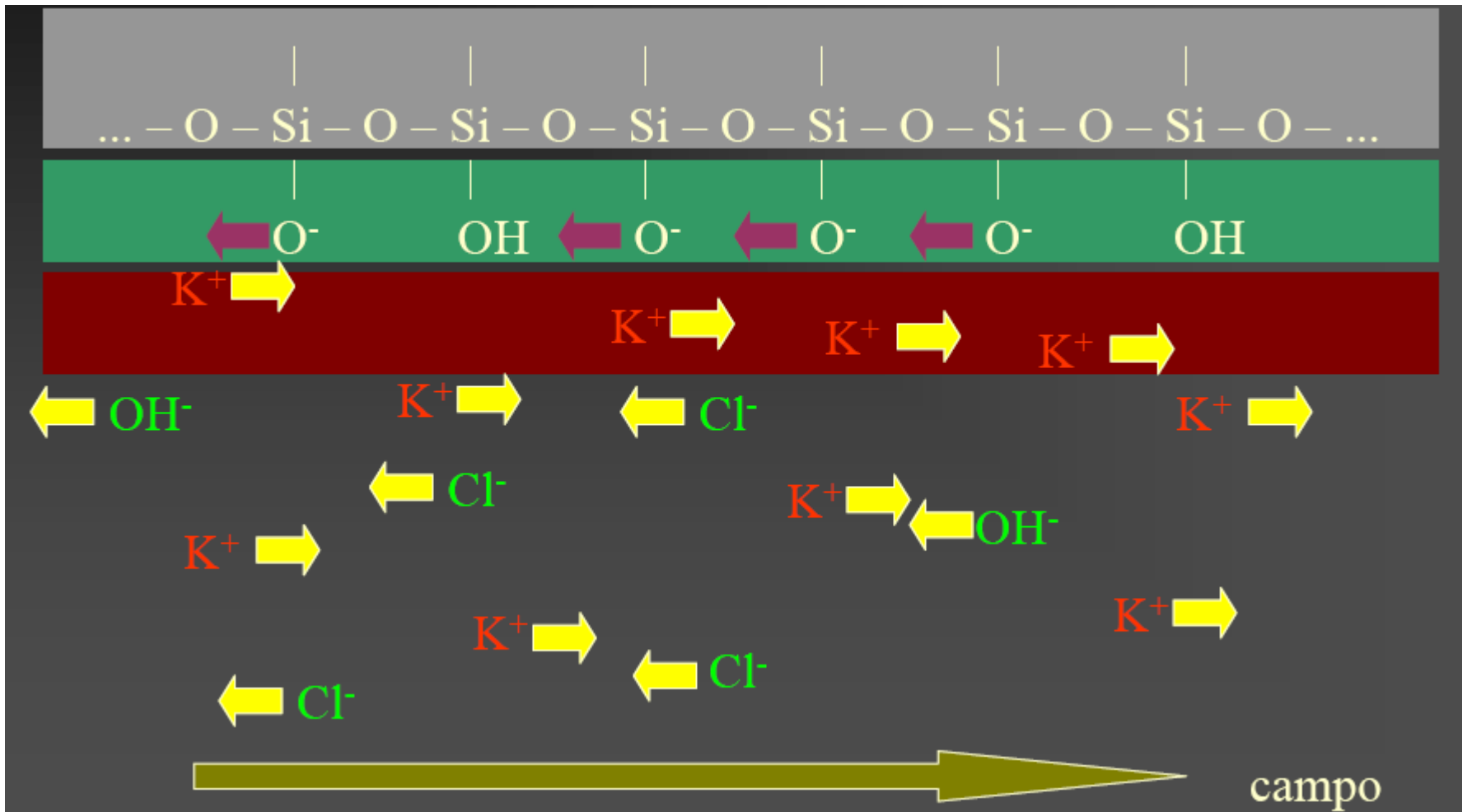


Em $\text{pH} > 3$, a parede interna do capilar de sílica fica carregada negativamente devido à ionização de grupos silanóis superficiais (Si-OH).

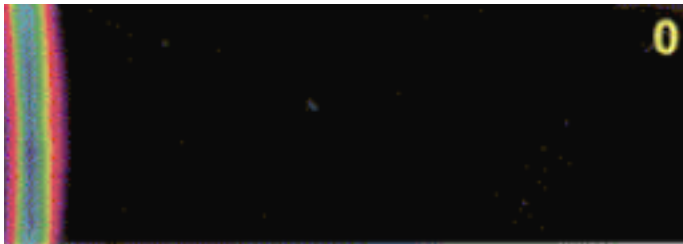
Fluxo eletroosmótico



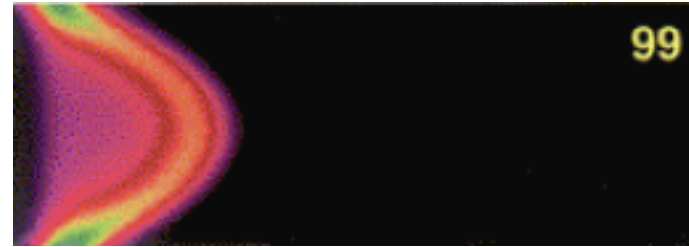
Fluxo eletroosmótico



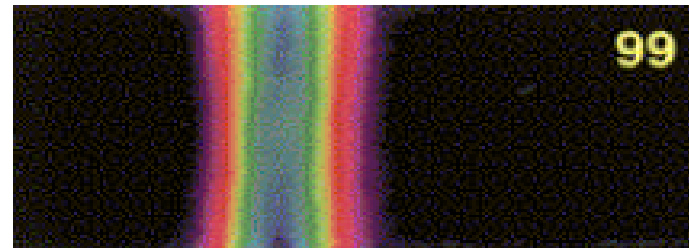
Fluxo eletroosmótico x fluxo laminar



Início



Fluxo laminar



Fluxo eletroosmótico

Fluxo eletroosmótico

A velocidade do fluxo eletroosmótico depende de:

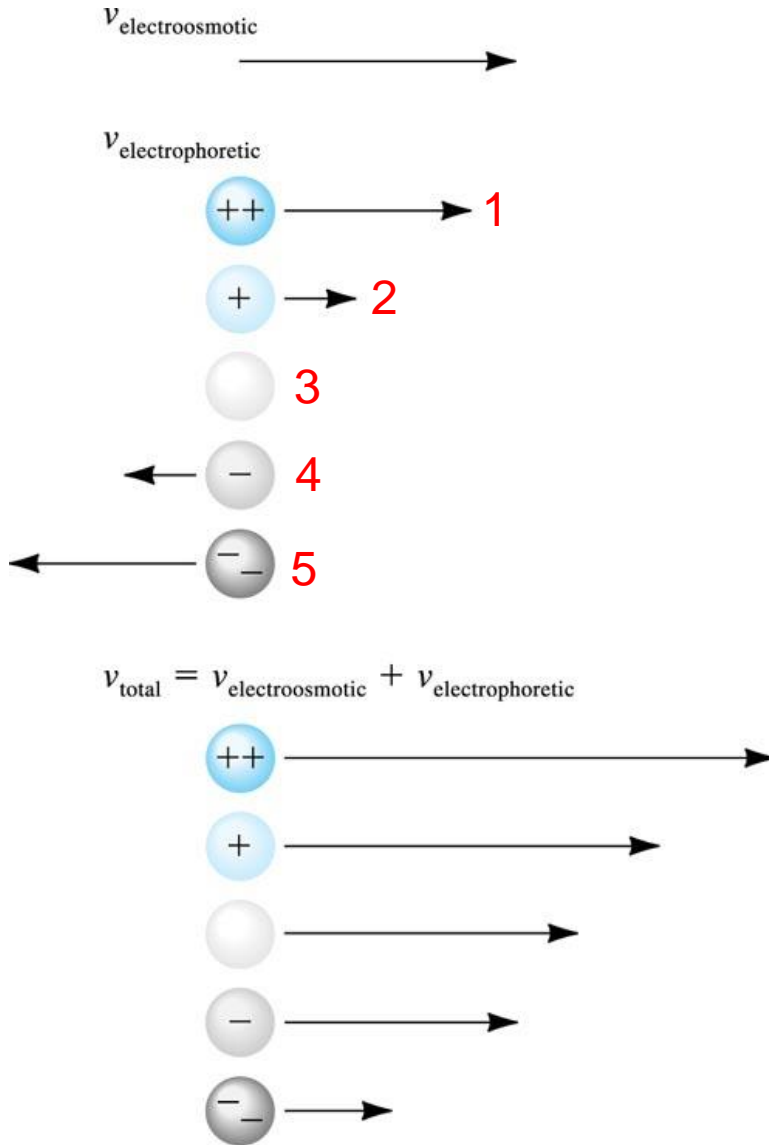
- densidade de carga na superfície interna do capilar (pH e espécies adsorvidas)
- espessura da dupla camada elétrica
- viscosidade da região da dupla camada elétrica (solvente, aditivos, temperatura)
- campo elétrico

Velocidade do fluxo eletroosmótico

$$v = \mu_{eo} E$$

Velocidade total

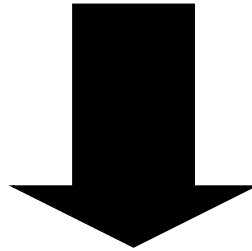
$$v = (\mu_e + \mu_{eo})E$$



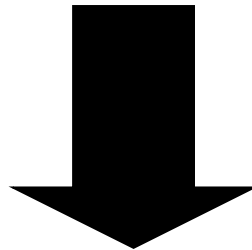
A ordem de eluição em uma separação eletroforética típica é: em primeiro lugar, o **cátion mais rápido (1)**, seguido sucessivamente pelos **cátions mais lentos (2)**; em seguida, **todas as espécies neutras (3)** em uma única zona e finalmente, o **ânion mais lento (4)** seguido sucessivamente pelos **ânions mais rápidos (5)**.

Controle do EOF

- ❖ Ligação Covalente através de reações de silanização
- ❖ Adição de surfactante catiônico ao tampão

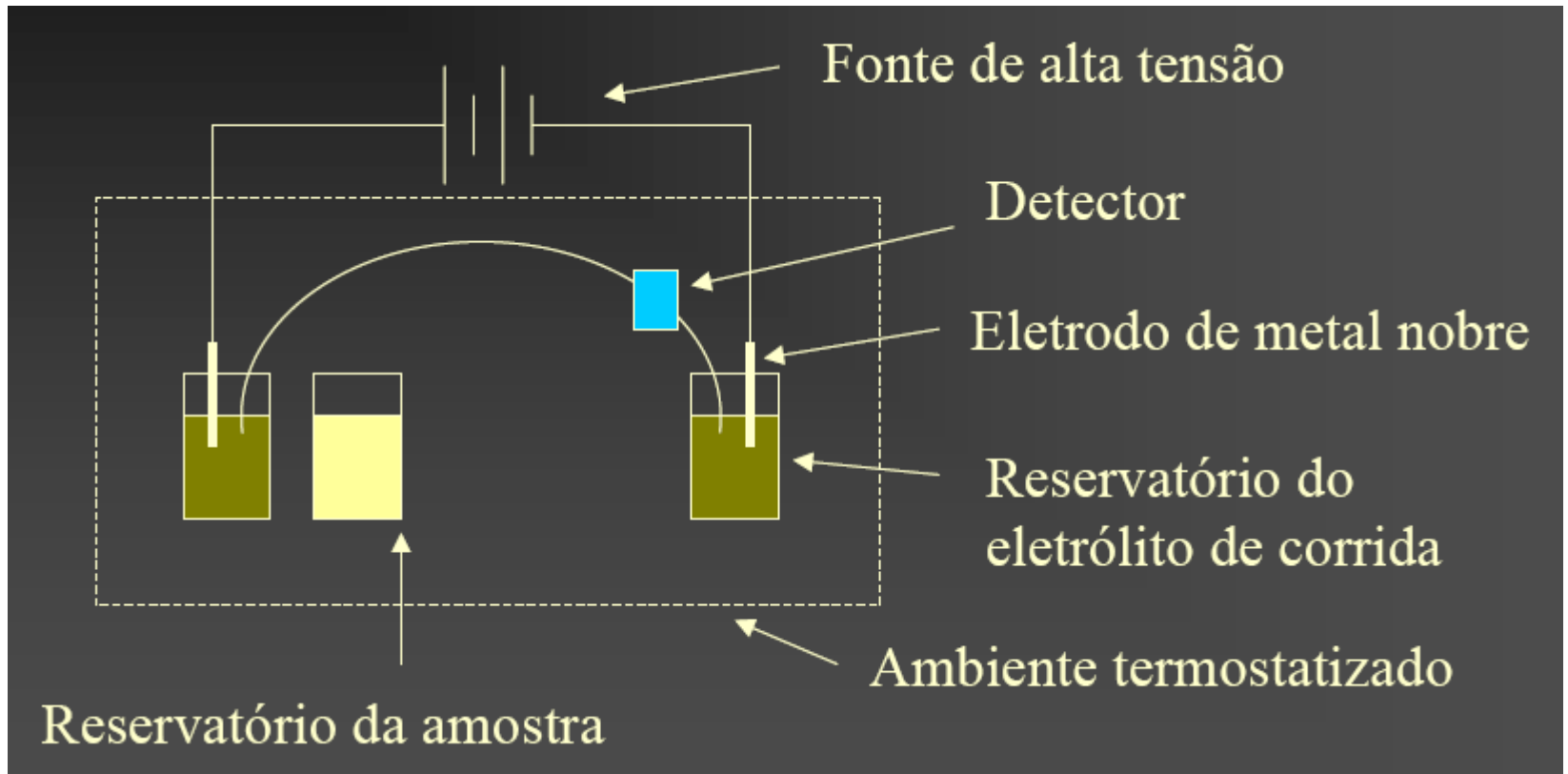


Parede do capilar fica carregada positivamente



Inversão da direção do fluxo

Equipamento básico



Introdução da amostra

- O segmento da amostra não deve ocupar mais que 10% do comprimento do capilar.
- Devido às dimensões do capilar, válvulas injetoras são proibidas.
- Estratégias mais empregadas:
 - Injeção por pressão
 - Injeção eletrocínética

Introdução da amostra

Injeção eletrocinética:

- introdução de amostra no capilar sob ação de campo elétrico (combinação de migração iônica e fluxo eletroosmótico)
- discrimina a injeção de quantidades maiores de íons com maior mobilidade em relação a íons mais lentos

Injeção por pressão:

- diferença de pressão (aplicação de vácuo na extremidade do detector, por pressurização da amostra ou elevando a sua extremidade)

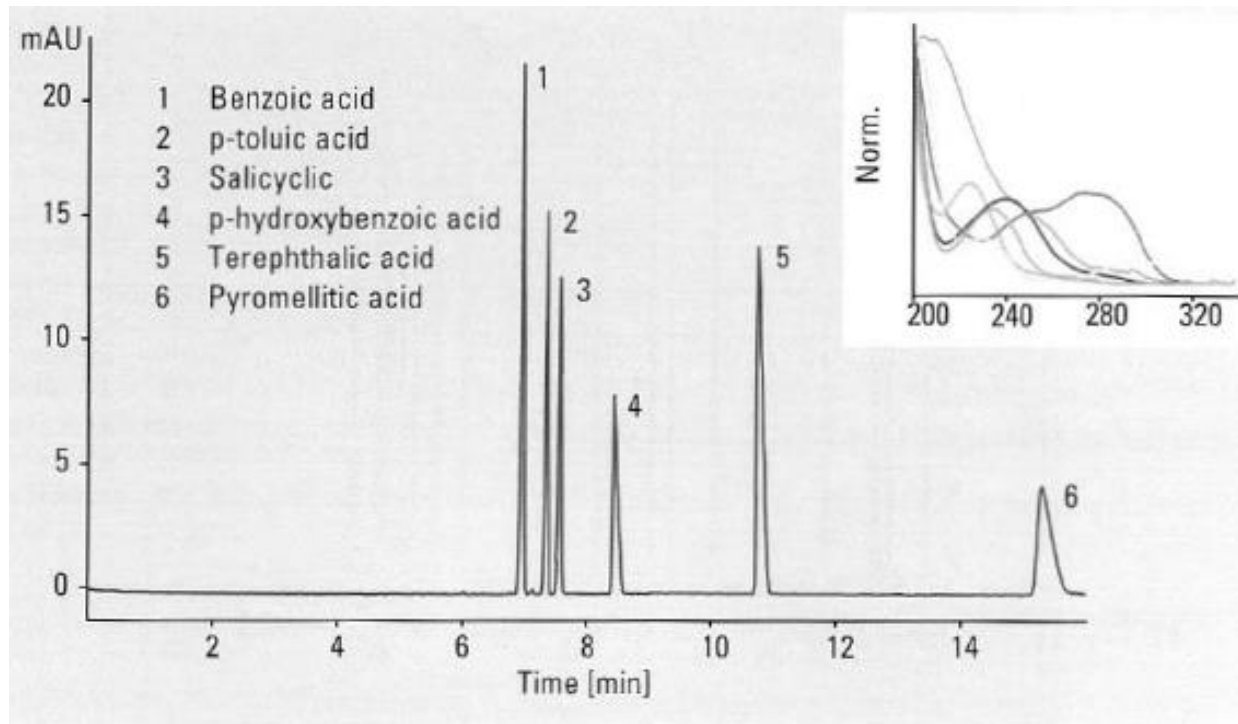
Detecção

- São utilizadas técnicas já conhecidas adaptadas às condições de eletroforese capilar
- Muitos foram “herdados” de HPLC
- Exemplos: métodos de absorvância, de fluorescência, eletroquímicos, espectrometria de massas entre outros
- **Principal problema:**
dimensões reduzidas → dificuldades mecânicas e baixa sensibilidade ou relação sinal/ruído

Detecção espectrofotométrica

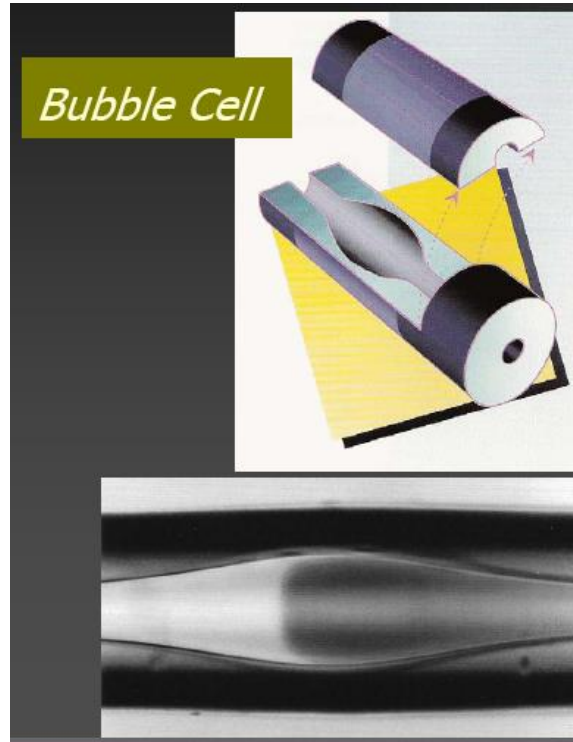
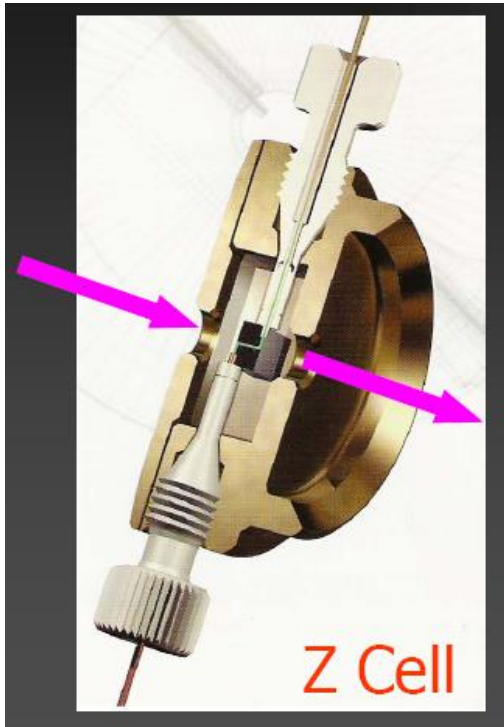
- ✓ Detecção feita na coluna
- ✓ Sílica é transparente
- ✓ A camada de poliimida absorve na região do UV-Vis → remoção por aquecimento, raspagem ou dissolução

Exemplo

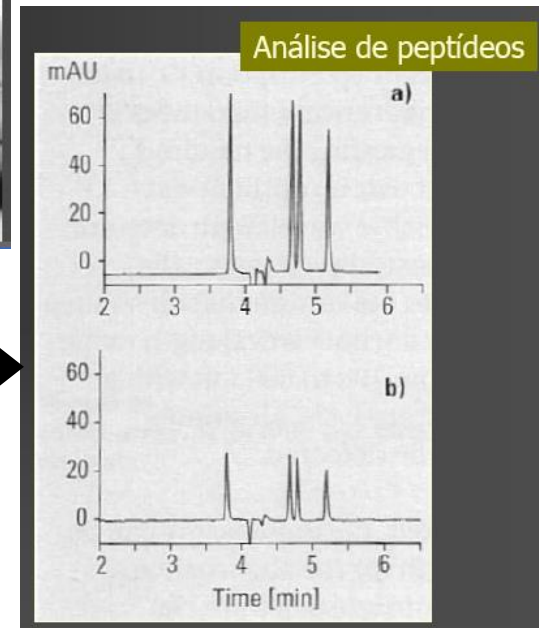
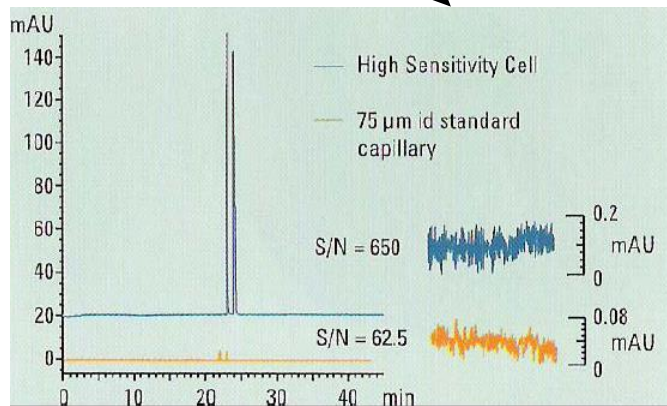


Buffer	20 mM borate, pH 9.55
Sample	acids: 25 ppm each
Capillary	I 56 cm L 64.5 cm id 75 μ m
Injection	50 mbar-s
Temperature	15 $^{\circ}$ C
Voltage	20 kV, 0-30 mbar pressure applied between 4 and 15 min
Detection	200 nm

Tipos de células



(a) 150 μ m
(b) 50 μ m

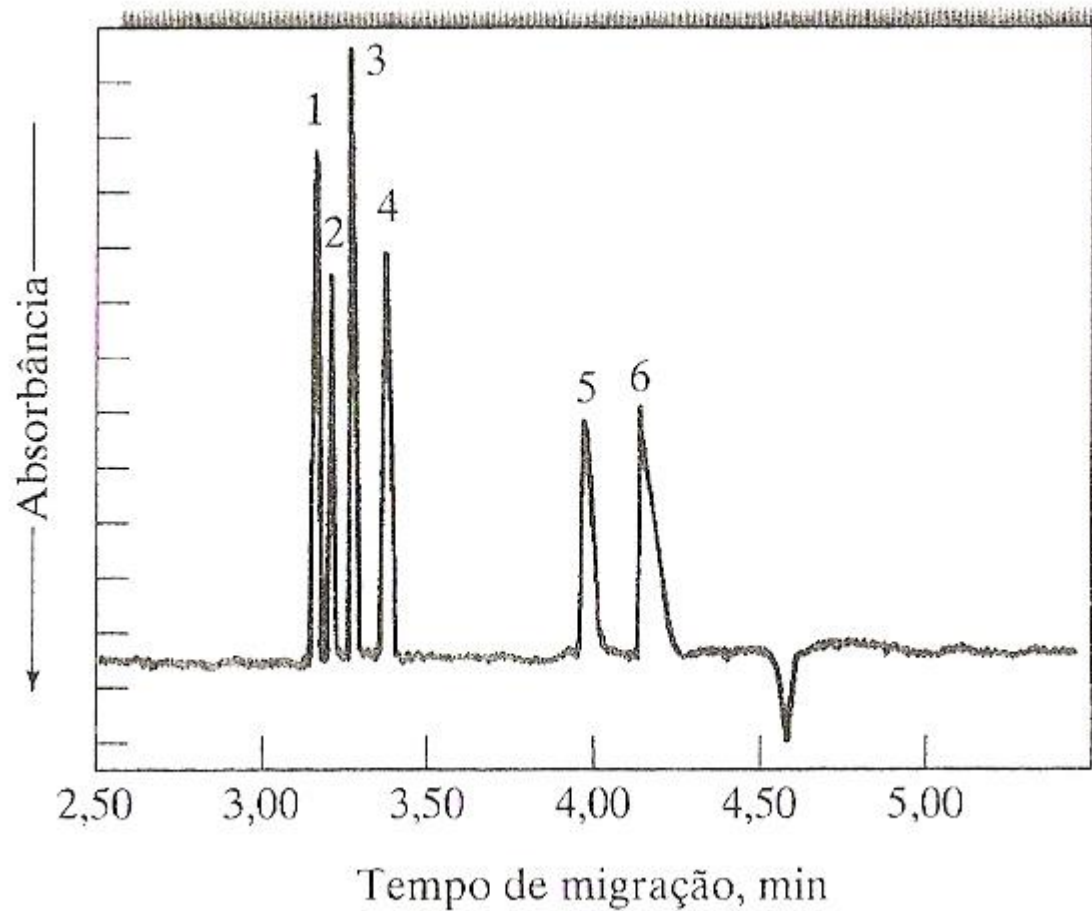


Caminho
óptico: 3 mm

Detecção indireta

- Um cromóforo iônico é colocado no tampão da eletroforese
- O detector recebe um sinal constante devido à presença dessa substância
- O analito desloca alguns desses íons, de modo que o sinal do detector diminui durante a passagem de uma banda de analito pelo detector
- O analito é, então, determinado pelo decréscimo de absorbância

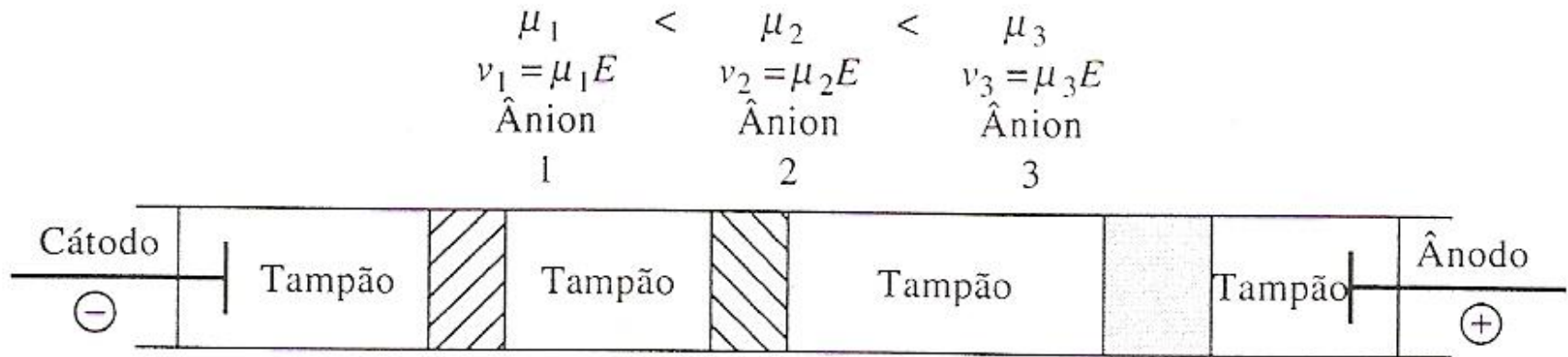
Exemplo



Modalidades de eletroforese capilar

- ❖ Eletroforese capilar por zona (CZE)
- ❖ Eletroforese capilar em gel (CGE)
- ❖ Isotacoforese capilar (CITP)
- ❖ Focalização isoelétrica capilar (CIEF)
- ❖ Eletrocromatografia capilar (CEC)
- ❖ Cromatografia eletrocinética micelar (MECC)

Eletofórese capilar por zona

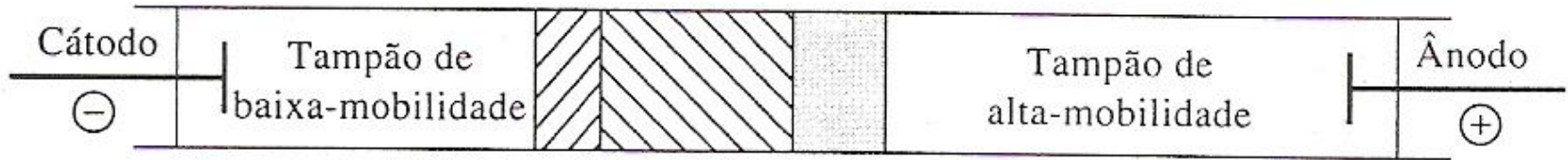


- A composição do tampão é constante ao longo da região de separação.
- O campo aplicado faz com que cada um dos diferentes componentes iônicos da mistura migre de acordo com a sua mobilidade e se separe em zonas.
- A mais popular das técnicas.

Eletoforese capilar em gel

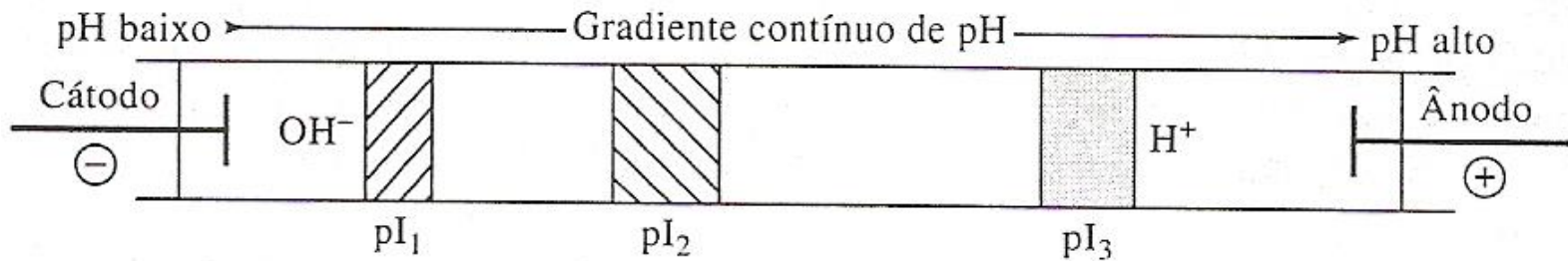
- A solução aquosa é substituída por gel.
- Mecanismo: peneiramento em gel, isto é, moléculas menores têm maior mobilidade.
- Exemplos: agarose, poliacrilamida

Isotacoforese capilar



- Todas as bandas de analito migram na mesma velocidade.
- A amostra é injetada entre 2 soluções tampão.
 - componentes da amostra se separam em zonas (de acordo com a sua mobilidade)
 - todas essas zonas se movem com a mesma velocidade
 - na quantificação se mede os comprimentos das zonas

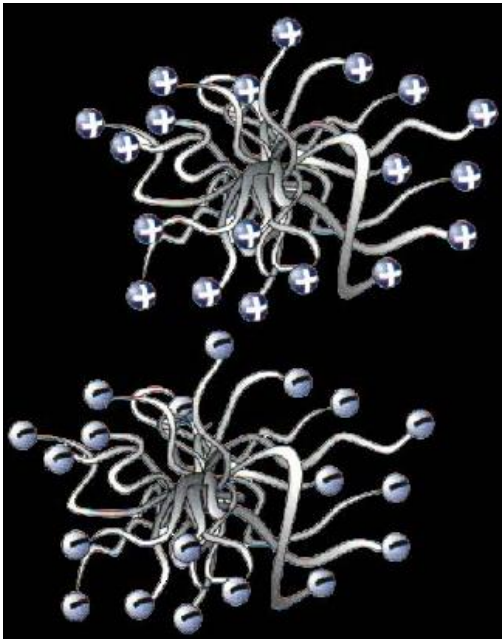
Focalização isoeletrica capilar



- Empregada para separação de espécies anfipróticas, como aminoácidos e proteínas que contêm um grupo carboxílico fraco e um grupo amina, que é uma base fraca.
- Um composto anfiprótico é uma espécie que, em solução, é capaz de doar e receber prótons.

Cromatografia eletrocinética micelar

- Técnica baseada na utilização de meio micelar.
- Micelas iônicas possuem mobilidade diferente de zero.



- Uma espécie neutra na solução caminha em direção ao pólo negativo.
- Retida em uma micela negativa, ela caminha em direção ao pólo positivo.

Vantagens e desvantagens

VANTAGENS:

- Elevada frequência analítica (rapidez)
- Versatilidade
- Baixo custo - Baixo consumo de amostras, reagentes e solventes
- Desempenho analítico satisfatório
- Excelentes separações e resoluções
- Possibilidade de detecção on line

DESVANTAGENS:

- Não se aplica a todos os tipos de compostos, como: Voláteis, apolares e/ou de baixa massa molar (adequados para CG)
- Polímeros iônicos de massa molar alta