

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO MÉTODO DE PRÉ-
CONCENTRAÇÃO EM LINHA EM ELETROFORESE CAPILAR
ATRAVÉS DE GRADIENTES TÉRMICOS.**

Marcos Mandaji

Orientador: Prof Dr Tarso B. L. Kist

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Porto Alegre - RS

2005

As dificuldades da vida são superadas com equilíbrio, trabalho, suor e perseverança, mas só se consegue esses atributos se tiver apoio, carinho e amor. Nesse ponto minhas meninas, Márcia e Emília, foram fundamentais para o êxito deste trabalho e a elas eu o dedico.

Agradecimentos

Ao Professor Tarso B. L. Kist pela orientação e por me mostrar o mundo da eletroforese capilar, mas, sobretudo pela amizade, confiança, discussões e pela contribuição para minha formação acadêmica e como cidadão,

Ao Sandro Hillebrand pela amizade e discussões valiosas que contribuíram bastante na busca do conhecimento,

A turma do laboratório de métodos, Lílian, Liza e Yu, pela amizade e bom relacionamento,

Aos Professores e amigos Arthur e Janette pelo o apoio e ajuda nos momentos mais difíceis,

Aos colegas da Botânica Tatiana, Robson, Diego, Joseli, Ricardo, Vivian pela ajuda e momentos agradáveis,

A turma da física, Ricardo Rego, Hans Peter, Julio, Ismael, por me abrirem o laboratório e contribuírem com desenvolvimento deste trabalho,

Ao professor Giancarlo Pasquali do Laboratório de Biologia Molecular Vegetal e seus alunos pela utilização do seu laboratório,

Ao Professor Carlos Termignoni do Laboratório de Peptídeos e Enzimas Proteolíticas e seus alunos pelas discussões valiosas e utilização do seu laboratório,

A Professora Célia Regina Carlini do Laboratório de Proteínas Tóxicas e seu grupo pela utilização do seu laboratório,

Aos amigos do Centro de Biotecnologia Luciano, Sílvia e Grasiela pela simpatia e pronto auxílio em tudo que precisei,

Ao Professor Emanuel da USP de São Carlos pelas preciosas discussões e por me receber em seu laboratório,

A Professora Maria Goreti da Química Analítica pela ajuda e amizade,

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho,

Muito obrigado.

Sumário

I.	LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
II.	LISTA DE FIGURAS	9
III.	LISTA DE TABELAS	12
IV.	Resumo	13
V.	Abstract	15
1.	INTRODUÇÃO	17
1.1.	Eletroforese em papel e gel	18
1.2.	Eletroforese Capilar.....	21
2.	Revisão Bibliográfica	25
2.1.	Princípios de Separação em Eletroforese	28
2.2.	Métodos de Pré-Concentração de Amostra em Linha.....	31
2.2.1.	Concentração de Amostra com Campo Amplificado	31
2.2.2.	Compressão de Amostra em Grandes Volumes	34
2.2.3.	Concentração de Amostra Mediada pelo pH.....	36
2.2.4.	Isotacoforese.....	40
2.2.5.	Concentração de Amostra por Varredura.....	42
2.3.	Pré-Concentração em Linha Através de Gradientes Térmicos e Gradientes de pH	44
3.	Objetivos	49
3.1.	Objetivos Gerais.....	49

3.2.	Objetivos Específicos.....	49
4.	Materiais e Métodos.....	50
4.1.	Equipamento de Eletroforese Capilar.....	50
4.2.	Recobrimento Interno dos Capilares.....	54
4.3.	Analitos Utilizados e Reações de Marcação e Derivatização das Amostras.....	55
4.4.	Utilização de LEDs em Sistemas de Detecção por Fluorescência Induzida.....	57
4.5.	Pré-Concentração em Linha Através de Gradientes Térmicos.....	58
5.	Resultados e Discussões.....	62
5.1.	Utilização de Componentes Alternativos para Equipamentos de Eletroforese capilar.....	62
5.1.1.	Utilização de LEDs em Sistemas de Detecção por Fluorescência Induzida.....	62
5.1.2.	Usando uma Placa de Som para Aquisição de Dados e Lock-in Emulado por Software para Tratamento de Sinais.....	73
5.2.	Pré-Concentração em Linha Através de Gradientes Térmicos.....	83
5.2.1.	Tratamento teórico.....	84
5.2.2.	Tratamento experimental.....	88
6.	Conclusão.....	96
7.	Referencia Bibliográficas.....	98

I. LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

μ_e	Mobilidade eletroforética
μ_{feo}	Mobilidade do fluxo eletroosmótico
E	Campo elétrico
ΔH°	Variação da entalpia de ionização
ε	Permissividade elétrica do solvente
F_E	Força elétrica
F_F	Força de fricção
η	Viscosidade
κ	Espessura da dupla camada elétrica
v	Velocidade
q	Carga
r	Raio de giro de uma molécula
σ^*	Densidade de carga na parede do capilar
ψ_0	Potencial elétrico na parede do capilar
A/D	Conversor analógico para digital
BK	Bradicinina
CE	<i>Capillary electrophoresis</i> (Eletroforese capilar)
CTAB	<i>Cetyltrimethylammonium bromide</i>
CZE	<i>Capillary Zone Electrophoresis</i> (Eletroforese Capilar em Solução Livre)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxiribonucleico)
FASS	<i>Field-amplified sample stacking</i> (concentração de amostra em campo amplificado)
FEO	Fluxo eletroosmótico
FI-LED	Fluorescência induzida por LED
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> (Isotiocianato de fluoresceína)
LD	Limite de detecção
LED	<i>Light Emitting Diode</i> (Diodo emissor de luz)
LVSS	<i>Large-volume sample stacking</i> (Concentração de amostra em grande volume)
MEKC	<i>Micellar Electrokinetic Capillary</i> (Cromatografia Eletrocinética Miscelar)
NDA	<i>Naftaleno-2-3-dicarboxaldeido</i> (2-3-dicarboxaldeido de naftaleno)
PC	<i>Personal Computer</i> (Computador pessoal)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido Ribonucléico)

S/R	Razão do sinal pelo ruído
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Dodecil sulfato de sódio)
TFM	Tubo foto-multiplicador
UV	Ultravioleta

II. LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema dos componentes básicos de um equipamento de eletroforese capilar.	23
Figura 2 – Diagrama esquemático do modelo de concentração de amostra em campo amplificado.	32
Figura 3 – Diagrama esquemático do modelo de compressão de amostra em grandes volumes.	34
Figura 4 – Diagrama esquemático do método de pré-concentração de amostra mediada pelo pH.	37
Figura 5 – Diagrama esquemático do modelo de junção dinâmica de pH.	40
Figura 6 – Diagrama esquemático do método isotacoforese.	41
Figura 7 – Diagrama esquemático do método pré-concentração de amostra por varredura.	43
Figura 8 – Aparato de focalização isoelétrica e fracionamento em gradientes de pH termicamente gerado proposto por Luner e Colin em 1970. .	45
Figura 9 – Diagrama esquemático do equipamento de eletroforese capilar usado neste trabalho.	51
Figura 10 – Configuração dos dois sistemas de aquisição de dados e tratamento de sinal montado em paralelo.	53
Figura 11 – Reação fluorogênica de derivatização de amina por NDA e Fluorescamina e reação de uma amina primária com FITC.	57

Figura 12 – Representação esquemática do capilar utilizado nos ensaios de gradientes térmicos.....	58
Figura 13 – Representação esquemática do controle de temperatura para aplicar o efeito de compressão de banda por gradientes térmicos. .	59
Figura 14 – Representação esquemática da válvula de comutação da temperatura nas regiões b e c do capilar.....	60
Figura 15– Separação de bradiginina e fragmentos de bradiginina marcados com FITC em solução livre.	65
Figura 16 – Separação do branco da reação com isotiocianato de fluoresceína. Demais condições idênticas à Figura 15.....	65
Figura 17 – Variação da razão do sinal de fluorescência pelo ruído no sinal da fluorescência.....	67
Figura 18 – Influência da concentração de fluoresceína na relação S/R na detecção por fluorescência indireta de ácido aspártico e ácido glutâmico em eletroforese capilar..	69
Figura 19 – Efeito da concentração do tampão eletrólito na relação S/R na detecção por fluorescência indireta de ácido aspártico e ácido glutâmico em eletroforese capilar..	70
Figura 20 – Detecção por fluorescência indireta de ácido aspártico (D) e ácido glutâmico (E) em eletroforese capilar..	71
Figura 21 – Detecção de NADP e NADPH por detecção por fluorescência indireta.	72
Figura 22 – Diagrama esquemático de um amplificador Lock-in.	75

Figura 23 – Diluição das amostras de alanina e tirosina até o limite de detecção..	77
Figura 24 – Razão do sinal pelo ruído da tirozina/NDA e alanina/NDA em função da concentração medida no sistema A e no sistema B.....	78
Figura 25 – Curva de calibração para fluoresceína para altura de pico e área de pico..	80
Figura 26 – Separação de padrões de bradicinina.	82
Figura 27 – Cinética de hidrólise da bradicinina..	82
Figura 28 – Mobilidade eletroforética da Lys/NDA em diferentes pH.....	89
Figura 29 – Mobilidade eletroforética da Lys/NDA na faixa de pH de 7,0 a 10,5 nas temperaturas de 2°C, 25°C e 60°C em tampões de baixo e alto coeficiente térmico.....	90
Figura 30 – Taxa de compressão de banda calculada pela Equação 20 para os tampões Tris e Borato.....	92
Figura 31 - Taxa de compressão de banda estimada pela razão das mobilidades eletroforéticas medidas a 60°C e 2°C utilizando os dados apresentados na Figura 29..	92
Figura 32 – Compressão térmica da banda da Lys/NDA.....	94

III. LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Sistemas de detecção utilizados em eletroforese capilar e seus limites de detecção.....	24
Tabela 2 –	Exemplos de diferentes compostos analisados utilizando FASS..	33
Tabela 3 –	Exemplos de diferentes compostos analisados utilizando compressão de amostra em grandes volumes.....	36
Tabela 4 –	Exemplos de moléculas analisadas utilizando o método de pré-concentração de amostras mediada pelo pH.	38
Tabela 5 –	Exemplos de moléculas analisadas utilizando o método isotacoforese.....	42
Tabela 6 –	Exemplos de moléculas analisadas utilizando o método concentração de amostra por varredura	44
Tabela 7 –	Relação de tampões típicos utilizados em eletroforese e seus respectivos pK e coeficientes térmicos.	47
Tabela 8 –	Entalpia de ionização dos grupos funcionais encontrados em proteínas.....	48
Tabela 9 –	Relação de tampões utilizados no estudo da mobilidade eletroforética da Lisina derivatizada com NDA.....	61
Tabela 10 –	Dados da regressão linear para quatro faixas de concentração de fluoresceína obtidas pelos dois sistemas.....	81

IV. Resumo

Nos últimos dez anos, milhares de trabalhos foram publicados somente no desenvolvimento da técnica de eletroforese capilar (CE) e suas aplicações em ciências biológicas, química e em outras áreas. Apesar disto, muitos tópicos de pesquisa básica da CE ainda continuam sendo desenvolvidos. Algumas vantagens da CE sobre as demais técnicas de separação são marcantes, tais como: possibilidade de automação, rapidez na obtenção dos resultados e alto poder de resolução. A pequena quantidade de amostra que é necessária para uma análise é uma característica muito interessante no estudo de sistemas biológicos, sendo que normalmente são injetados no capilar, volumes de 5 a 50 nl de amostra. Por outro lado, esta reduzida quantidade de amostra utilizada, a pequena janela de detecção e as baixas concentrações dos analitos nas amostras biológicas, são fatores que desafiam os pesquisadores nesta área. Para contornar este problema diversos métodos de pré-concentração de amostra foram desenvolvidos.

Neste trabalho, foi desenvolvido um método inédito de pré-concentração de amostras através de gradientes térmicos em CE. O princípio do método é concentrar o analito quando ele passa de uma zona de alta temperatura para uma zona de baixa temperatura. Um modelo teórico foi desenvolvido para auxiliar o planejamento experimental no que diz respeito à determinação das condições em que a corrida deve ser realizada (pH, tipo de tampão, temperatura) para aplicar a compressão térmica em um analito. Foi utilizado L-Lisina derivatizada com naftaleno 2,3-dicarboxialdeído (Lys/NDA) como analito modelo. Uma diferença de

temperatura de 58 °C entre as duas zonas térmicas foi suficiente para comprimir em 2,5 vezes a banda da Lys/NDA em um tampão de baixo coeficiente térmico com o pH ajustado para 8,7.

O método de compressão de banda por gradientes térmicos proposto neste trabalho é uma nova opção para aumentar a sensibilidade e a resolução em CE. Ao contrário dos métodos clássicos de pré-concentração, esse novo método pode ser aplicado em amostras tanto com alta ou baixa condutividade iônica, comprimir bandas de analitos aniônicos ou catiônicos e ser aplicado em corridas em solução livre ou não. Além disso, considerando que o controle de temperatura seja realizado de maneira automatizada, pode apresentar altas taxas de reprodutibilidade, além de ser de simples e de fácil aplicação, podendo ser empregado em análises de rotina.

Diferentes LEDs (*Light Emitting Diode*) foram testado em detector por fluorescência induzida por LED. Além disso, um novo sistema de aquisição de dados e tratamento de sinal utilizando a placa de som de um PC (*Personal Computer*) e um amplificador Lock-in emulado por software foi montado e comparado com um sistema de aquisição de dados convencional. O equipamento de CE utilizado neste trabalho com esses componentes, apresentou uma elevada sensibilidade, na faixa de 0,5 à 1 *fmol* para os peptídeos e aminoácidos testados e foi superior ao sistema convencional em vários aspectos como: sensibilidade de detecção, faixa linear de detecção em concentração do analito, facilidade de operação e custo do sistema.

V. Abstract

In the last ten years thousands of papers dealing with the development of capillary electrophoresis (CE) techniques and its applications in biological science, chemistry and other areas have been published. Despite that many basic research topics of CE are still in development. Some advantages of CE over other separation techniques are remarkable, such as the possibility of automation, high throughput, and high resolution power. The small volumes of samples necessary for analysis (5 to 50 nl) are very attractive in studies of biological systems. However this reduced amount of sample, the small detection window, and the usually low analyte concentration, is a great challenge for researches in this area. To solve this problem several sample preconcentration methods have been developed.

A new preconcentration system of samples through thermal gradients in CE was developed. The principle of the method is to concentrate the analyte when it passes from a high temperature zone to a low temperature zone. A theoretic model was developed to help in planing the experimental conditions that had to be used, e.g., pH, buffer and temperature. L-Lysine derivatized with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (Lys/NDA) was used as model analyte. A difference of 58 °C between the two thermal zones was enough to compress 2.5 times the Lys/NDA band in a low thermal coefficient buffer with the pH adjusted to 8.7.

The band compression method based on thermal gradients proposed in this work showed to be a new option to enhance the sensitivity and resolution in

CE. Unlike the classical methods of preconcentration this new method can be applied to low or high ionic conductivity samples and to free solution or not, and to compress bands of anionic and cationic analytes. Moreover, considering that the temperature control is realized in an automated way, the system can present high reproducibility, in addition of being simple and of easy application, which enables it to be used in routine analysis.

In this work the use of different LEDs in a LED induced fluorescence detector was also investigated. Moreover, a new data acquisition and signal treatment system based on a PC sound card and Lock-in amplifier emulated by software was built and its performance was compared with a conventional acquisition system. The CE equipment with these components used in this work presented high sensitivity, a limit of detection ranging from 0.5 to 1 *fmol* for the peptides and amino acids studied, and was superior to conventional systems in several aspects such as: sensitivity, concentration linear working range, ease of operation and cost.

1. INTRODUÇÃO

Em 1833 e 1834 Michael Faraday estudou quantitativamente um número de reações de eletrólise. Ele resumiu suas descobertas formulando as suas Leis da Eletrólise. Estas permaneceram consideravelmente ativas nos anos restantes do século XIX, quando Hittorf, Helmholtz, Kohlrausch e outros realizaram experimentos na área de eletroforese de pequenos íons inorgânicos. Eles formularam teorias para os mecanismos da eletroforese, descobriram o fenômeno da eletroosmose e estudaram a mobilidade de íons em um campo elétrico para determinar parâmetros físicos tais como o raio iônico e número de transporte.

Tiselius foi primeiro a publicar um trabalho com experimentos de eletroforese com proteínas. Sua tese intitulada "The Moving Boundary Method to Study the Electrophoresis of Proteins" foi publicada em 1930. Ele utilizou a carga elétrica contida nestas macromoléculas para conseguir uma separação pioneira de proteínas de plasma sanguíneo em solução livre. Ele desenvolveu um método de "movimento de fronteiras" pelo qual conseguiu separar albumina de α , β e γ -globulina. A detecção destas proteínas foi feita medindo a mudança do índice de refração de suas fronteiras e suas características de absorção de radiação ultravioleta (UV) em um filme fotográfico. Tiselius também demonstrou que a mobilidade eletroforética das proteínas pode ser relacionada com seu peso molecular. Em reconhecimento ao seu trabalho pioneiro em eletroforese, Tiselius ganhou o Premio Nobel de Química em 1948.

Um dos problemas encontrados na eletroforese em solução livre é o alargamento das bandas ocasionado pelo aquecimento da solução devido ao efeito Joule. Esse problema foi contornado por Tiselius utilizando um eficiente sistema de refrigeração da célula eletroforética pela circulação rápida de um fluxo de água a 4 °C. Esse problema foi contornado posteriormente pela utilização de meios de suporte do tampão tais como papel, acetato de celulose, goma, agarose e poliacrilamida. Estes meios não somente agem restringindo a difusão das bandas mais também como peneira molecular, especialmente no caso do gel de agarose e poliacrilamida.

Eletroforese capilar (CE) é uma técnica recentemente introduzida na qual, diferentemente da eletroforese convencional, o uso de um meio de suporte não se faz necessário e a análise pode ser realizada em solução livre, exceto quando os analitos a serem separados possuem uma razão direta e linear da carga e raio de giro. CE pode ser usada para a separação de uma grande variedade de analitos de diferentes tamanhos e cargas: moléculas simples, íons orgânicos e inorgânicos, peptídeos, proteínas, metabólitos, fármacos, toxinas, carboidratos e ácidos nucleicos.

1.1. *Eletroforese em papel e gel*

Nos anos 40 a eletroforese em papel de filtro começou a ser utilizada para análise de compostos de baixo peso molecular tais como aminoácidos, lipídios, nucleotídeos e carboidratos. Nesse modo de eletroforese, a mistura dos analitos é aplicada no centro de uma fita de papel de filtro cujas extremidades são

colocadas em contato com as soluções contendo os eletrodos ânodo e cátodo. O campo elétrico tipicamente aplicado era de 100 V/cm. A velocidade eletroforética desses íons orgânicos depende do seu tamanho e do campo elétrico aplicado, onde a direção da migração demonstrava a natureza da carga que essas moléculas (negativa ou positiva) possuem em um pH particular do meio tamponante. Apesar da eletroforese em papel não ser uma técnica recente, ainda é muito utilizada nas mais diversas aplicações como determinação do ponto isoelétrico (pI) de antocianinas¹, análise de hormônios², análise de opinas em plantas transformadas por *Agrobacterium rhizogenes*^{3,4} e determinação de constantes de ligação de metais com aminoácidos^{5,6}.

A eletroforese utilizando gel como meio de suporte e separação obteve seu maior avanço em 1971 com o trabalho publicado por Swank e Munkers⁷. Nesse trabalho os autores utilizaram um gel de poliacrilamida de alta resolução em condições desnaturantes, no qual se utiliza dodecil sulfato de sódio (SDS), para a separação de proteínas. Em uma solução de SDS, quando aquecidas, as proteínas se desnaturam, pois as moléculas de SDS se ligam às regiões hidrofóbicas do polipeptídeo. Nestas condições, a carga do polipeptídeo se torna insignificante quando comparada à carga total das moléculas de SDS que estão ligadas à proteína. Assim, como ocorre com os poli-íons em geral, tal como os complexos SDS-proteínas não podem ser separados em solução livre, mas somente em um gel, por exemplo, de poliacrilamida. Neste caso as moléculas são separadas de acordo com seus respectivos tamanhos e não devido a relação carga/coeficiente de fricção. Esse efeito do gel de discriminar os analitos pelo seu tamanho pode ser modificado, alterando a razão de bisacrilamida e acrilamida.

Após a separação, as proteínas e peptídeos são localizados no gel pela marcação com um corante, por exemplo, “coomassie brilant blue” dissolvido em uma mistura de metanol e ácido acético. Desse modo, eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS é muito utilizada para determinação de peso molecular de proteínas pela medida da mobilidade das mesmas. Porém, para proteínas com peso molecular abaixo de 10 kD a resolução é insuficiente para separá-las. Alternativas como aumentar a proporção de bisacrilamida em relação a acrilamida e a utilização de altas concentrações de uréia (8 mol/L) contornam esse problema parcialmente.

A eletroforese em gel se tornou uma ferramenta indispensável nas mais variadas áreas, principalmente no campo das ciências biológicas, em especial nas áreas da genética, biologia molecular e biologia celular. A eletroforese contribuiu para o avanço das ciências médicas, biotecnologia, forenses, arqueologia, entre outras. O surgimento dos ensaios Southern⁸, Northern e Western Blot, reacção de polimerização em cadeia e Método de Sanger para sequenciamento de DNA são apenas alguns exemplos de técnicas que contribuíram determinantemente para o avanço da genética e biologia celular e molecular, e a eletroforese é parte integrante e indispensável para a realização desses ensaios.

Porém a eletroforese em gel traz algumas limitações ou desvantagens quando comparada à CE. Dentre elas podemos apontar: tempos de análise longos, reagentes altamente tóxicos (casos do brometo de etídeo e poliacrilamida), impossibilidade de automação, menor resolução e limite de detecção elevado.

1.2. Eletroforese Capilar

No ano de 1967, Hjerten⁹ observou que a realização de eletroforese em tubos com o diâmetro reduzido minimizava os efeitos da temperatura. O autor também demonstrou que era possível realizar separações eletroforéticas em tubos com 300 µm de diâmetro interno e detectou as bandas separadas por absorção de radiação UV. No entanto, apenas em 1974 foi demonstrada por Virtanen (citado por Carmelleri¹⁰) as vantagens de realizar eletroforese em solução livre em tubos vidro com diâmetro reduzido (200 – 500 µm). Neste trabalho o autor descreve um método de detecção potenciométrica para eletroforese aplicada na análise quantitativa de cátions (Li^+ , Na^+ e K^+). Os eletroferogramas obtidos foram teoricamente investigados pelo autor, principalmente no que diz respeito à difusão das bandas e os fatores que contribuíram para a difusão. O autor também mencionou a importância do fluxo eletroosmótico e sua influência na eletroforese dos analitos.

Em 1979, Mikkers, Everaerts e Verheggen¹¹ realizaram corridas de eletroforese em solução livre em tubos de Teflon[®] com 200 µm de diâmetro interno para resolver problemas de convecção. Analisaram ânions inorgânicos (cloreto, sulfato, cromato e clorato) e orgânicos (acetato, glutainato, naftaleno-2-monosulfato e benzil-DL-aspartato) que foram separados em curtos períodos (menos de 10 minutos) usando detecção por absorção UV e condutivimétrica. Apesar dos autores terem descoberto que aplicando pequenas quantidades de analitos se obtém picos simétricos, eles não conseguiram em demonstrar alta

eficiência de separação da CE devido a pobre sensibilidade dos detectores utilizados e do grande volume de amostra injetados.

Jorgenson e Lukacs^{12,13,14} em 1981 e 1983, foram os primeiros a demonstrar a alta eficiência de separação da CE utilizando capilares com diâmetros internos inferiores a 100 µm. Altas voltagens (30 kV) e detecção por fluorescência foram utilizadas. Os autores deram uma breve explicação de alguns aspectos teóricos da CE e demonstraram que a eletroosmose contribui com uma parte importante na determinação da mobilidade dos analitos, afetando tanto a resolução quanto o tempo de análise. Os autores demonstraram uma eficiência de separação de 4×10^5 pratos teóricos utilizando como amostra uma mistura de aminoácidos, dipeptídeos e aminas simples derivatizados com dansil e fluorescamina. Os trabalhos publicados por Jorgenson e Lukacs chamaram a atenção de pesquisadores de diversas áreas, como físico-químicos, bioquímicos, físicos, biólogos, entre outros e são citados praticamente em todas as revisões no tema, sendo que atualmente possuem 1424, 591 e 847 citações somente dos três trabalhos^{12,13,14} que os autores publicaram de 1981 a 1983.

Em 1988 com o surgimento do primeiro instrumento de CE comercial houve um aumento na velocidade do desenvolvimento e da aplicação desta técnica de separação. Um equipamento de CE é composto basicamente por: sistema de detecção, aparato de separação, sistema de aquisição de dados e fonte de alta tensão (Figura 1).

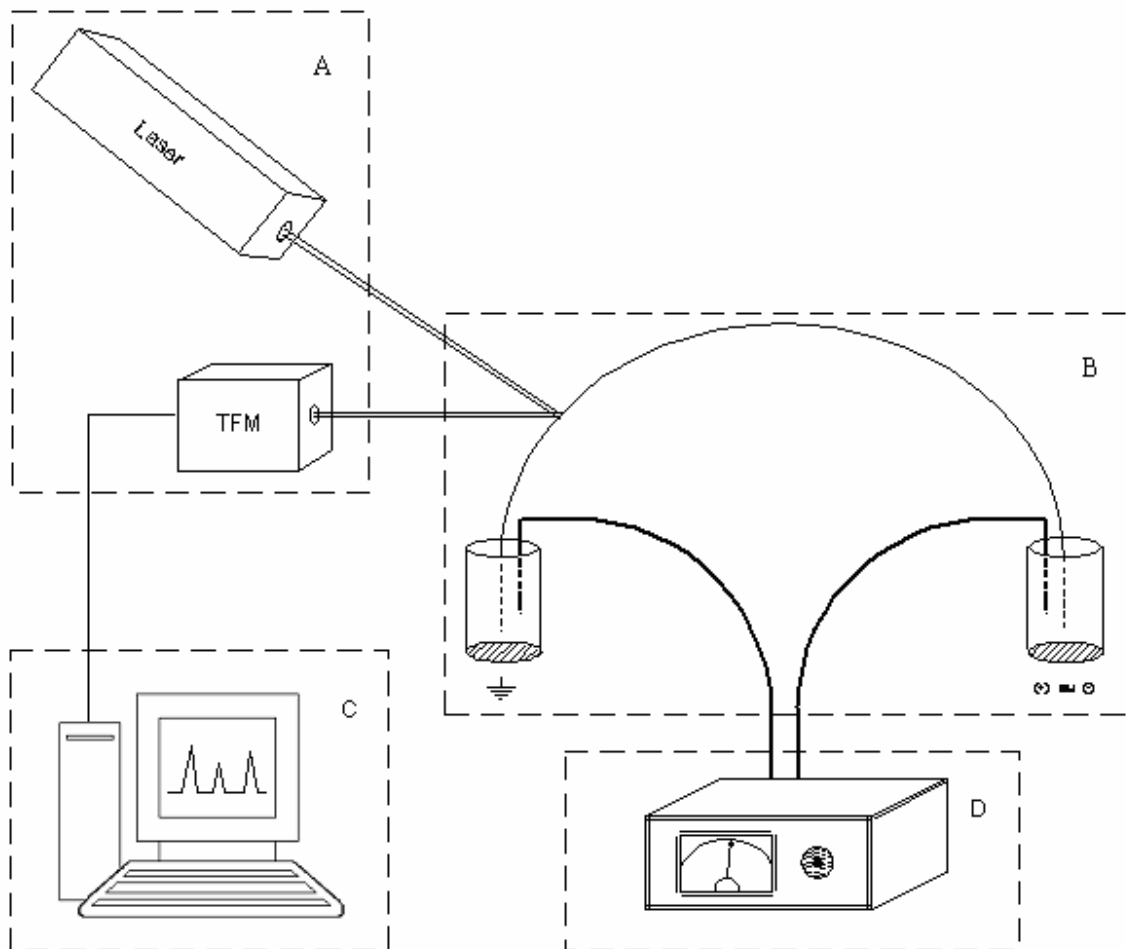


Figura 1 – Esquema dos componentes básicos de um equipamento de CE. A – sistema de detecção; B – aparato de separação; C – sistema de aquisição de dados; D - fonte de alta tensão.

Os sistemas de detecção mais utilizados atualmente são absorção UV-visível e fluorescência induzida a laser, Porém outros tipos de sistemas de detecção também são usados. A Tabela 1 traz alguns exemplos dos diferentes tipos de sistemas de detecção utilizados em CE e a sensibilidade de cada um. A existência de diferentes tipos de detectores contribui para a versatilidade da técnica em analisar os mais diferentes tipos de amostras.

Outro ponto que contribui para a versatilidade da CE é possibilidade de usar colunas de separação (capilares) de diferentes tamanhos e diâmetros, além do uso de diferentes tampões, diversos modos de operação como, por exemplo: Eletroforese Capilar em Solução Livre (CZE do inglês *Capillary Zone Electrophoresis*), Cromatografia Eletrocinética Miscelar (MEKC do inglês *Micellar Electrokinetic Capillary*) e Eletrocromatografia. Além disto, utilizam-se polímeros, aditivos modificadores de fluxo eletrosmótico, entre outros.

Tabela 1 – Sistemas de detecção utilizados em CE e seus limites de detecção.

Detector	Limite de detecção ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Absorção no UV-Visível	10^{-1}
Absorção Indireta no UV-Visível	1
Fluorescência Indireta	10^{-2}
Fluorescência Induzida por Laser	10^{-6}
Espectrômetro de Massa	10^{-4}
Amperométrico	10^{-5}
Condutividade	10^{-3}

A possibilidade de automação e multiplexação somado aos diferentes modos de operação e as vantagens em relação à eletroforese convencional em gel fizeram com que a CE se desenvolvesse rapidamente, sendo aplicada na análise de uma vasta gama de analitos.

Entre os modos de operação, a CZE é a mais popular, sendo que 60% dos trabalhos publicados utilizam esse modo de separação e é utilizado para análise desde simples moléculas orgânicas carregadas, íons inorgânicos, peptídeos, proteínas e até ácidos nucleicos. A MEKC foi introduzida em 1984 por Terabe¹⁵ e teve um incremento de utilização substancial nos últimos anos quando comparada com CZE. A grande vantagem de MEKC em relação à CZE é a possibilidade de separação de analitos de carga neutra.

Nesse trabalho foi desenvolvido um novo método para pré-concentração de amostras. A compressão de banda se dá em uma junção térmica criada no capilar por meio de aquecimento e resfriamento externo a coluna de separação. Em paralelo foi desenvolvido um novo sistema de detecção por fluorescência induzida, aquisição de dados e tratamento de sinal. Esse novo sistema foi montado utilizando componentes simples e robustos. Essa nova configuração, além de possuir elevada sensibilidade, permitiu a diminuição do custo do equipamento em mais de 1000 vezes.

2. Revisão Bibliográfica

Nos últimos dez anos, milhares de trabalhos foram publicados somente no desenvolvimento da técnica de CE e suas aplicações em bioanalítica e em outras áreas. Apesar disto, a CE ainda continua sendo uma técnica em gestação e tem muito a ser feito. Algumas vantagens da CE sobre as demais são marcantes, tais como: possibilidade de automação, rapidez na obtenção dos resultados e alto

poder de resolução, graças às características de pequeno diâmetro do capilar, usualmente de 50 ou 75 μm que por sua vez confere uma alta taxa de dissipação do calor gerado, permitindo assim, aplicar elevadas voltagens e a utilização de uma vasta gama de tampões eletrólitos.

Para muitas aplicações biológicas, a CE é superior a eletroforese em gel. Além disso, a possibilidade de automação e a utilização de diferentes meios de separação permitem analisar diferentes tipos de amostras, tais como, ácidos nucleicos, proteínas, peptídeos, aminoácidos, metabólitos em geral e outros íons orgânicos e inorgânicos.

O avanço no desenvolvimento da CE possibilitou que o Projeto Genoma Humano se acelerasse e deu um grande impulso no desenvolvimento de novos projetos genomas e transcriptomas de diversos organismos.

A pequena quantidade de amostra que é necessária para uma análise é muito interessante no estudo de sistemas biológicos, sendo normalmente injetado no capilar de 5 a 10 nL. Por outro lado, esta reduzida quantidade de amostra utilizada traz alguns problemas na detecção, pois quando se trabalha com amostras biológicas a concentração do composto de interesse (analito) geralmente é baixa.

Os sistemas de detecção por absorbância e fluorescência induzida por laser são atualmente os mais utilizados. Detecção por fluorescência induzida por laser é o sistema mais sensível, chegando a limites de detecção (LD) na ordem de amol, Porém há a necessidade de marcar a amostra com um fluoróforo que por sua vez altera as características do analito, o que pode ser desvantajoso em

função do estudo realizado, como por exemplo, estudos de afinidade de proteínas e determinação do ponto isoelétrico.

O sistema de detecção por absorvância traz como vantagens a não necessidade de marcação da amostra, custo mais baixo por análise e a resolução multi-espectral, que possibilita a identificação dos compostos em diferentes comprimentos de onda. No entanto, este sistema de detecção é menos sensível, sendo o LD na ordem de fmol.

Recentemente o nosso grupo montou um sistema de detecção por fluorescência induzida por LED¹⁶. Foi implementado um LED no lugar de um laser, o que torna o sistema bem mais barato e atingiram-se limites de detecção de 1,5 fmol para bradiginina.

Outro sistema, porém menos empregado, é a detecção indireta de fluorescência, consiste na adição de um agente fluorescente no tampão de corrida sendo o princípio de leitura do sinal semelhante ao sistema de detecção por absorvância e já se atingiu limites de detecção para amino ácidos de 1,6 fmol (Munro *et al.*, 2000).

Apesar da sensível melhora da parte eletrônica (diminuindo o ruído) e dos sensores de detecção da intensidade luminosa (arranjo de fotodiodos, fotodiodo de avalanche e tubo foto-multiplicador) em muitos casos a sensibilidade não é suficiente. Os métodos de pré-concentração compensam a insuficiência de sensibilidade pela injeção de uma quantidade maior de amostra e concentrando a amostra injetada em uma região estreita do capilar.

2.1. **Princípios de Separação em Eletroforese**

O mecanismo fundamental da separação em CZE utiliza a migração de moléculas carregadas quando um campo elétrico é aplicado. A seletividade é gerada na maioria das técnicas eletroforéticas por uma simples variação do ambiente da molécula, como por uma mudança na carga da molécula (ex. focalização isoelétrica) ou um retardo físico do movimento da molécula no campo elétrico (ex. gel de poliacrilamida, soluções de polímeros, presença de micelas).

A separação é realizada através do movimento dos íons em um campo elétrico aplicado. Este movimento é regido pela mobilidade eletroforética (μ_e ; cm^2/Vs) dos íons, onde a mobilidade é definida como a velocidade (v ; cm/s) média na qual um íon se move sob a influência de um potencial elétrico aplicado (velocidade normalizada pelo campo elétrico). Dois fatores primários afetam a mobilidade eletroforética, a força elétrica aplicada (F_E ; Equação 1), a qual é dependente da carga (q) do íon e da força de fricção (F_F ; Equação 2) que a molécula sofre quando se move por uma solução.

$$F_E = qE \quad 1$$

A simples estimativa da força de fricção (a qual negligencia o efeito de outros íons na solução, e meramente assume que a força total de retardo é igual a arrasto determinado pela Lei de Stokes) depende de alguns parâmetros como: viscosidade do tampão (η), velocidade da molécula (v), tamanho e formato da molécula.

No caso de uma molécula perfeitamente esférica e raio r temos,

$$F_F = 6\pi\eta r v \quad 2$$

Em um regime estacionário, estas duas forças estão em equilíbrio ($F_E = F_F$), e a velocidade eletroforética (Equação 3) depende de todos os parâmetros envolvendo o analito e o meio de separação.

$$v = \frac{qE}{6\pi\eta r} \quad 3$$

Como mencionado anteriormente, a mobilidade eletroforética é a velocidade da molécula normalizada pelo campo elétrico aplicado, logo temos:

$$\mu_e = \frac{v}{E} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad 4$$

Com base no efeito desse equilíbrio de forças (Equação 3 e 4) podemos observar as seguintes propriedades a respeito da mobilidade eletroforética de um íon:

- A mobilidade é diretamente proporcional à carga do íon
- A mobilidade é inversamente proporcional à viscosidade do meio
- A mobilidade é inversamente proporcional ao raio da partícula

Outra componente se faz muito importante em CE, é o fluxo eletrosmótico (FEO). A eletrosmose é o fluxo de um líquido devido o efeito de um campo elétrico nos contra-íons adjacentes a parede negativamente carregada do capilar. Devido a parede do capilar ser de sílica fundida ela é negativamente carregada, na maioria das condições de pH, ocorre então uma camada de contra-íons na solução adjacentes a parede do capilar. Quando um campo elétrico é aplicado, esta camada positiva é atraída ao eletrodo negativo, resultando em fluxo do líquido em direção a este eletrodo.

A eletroosmose está presente em algum grau em todos os formatos de eletroforese, mas ele é particularmente importante em CE. Isso é devido a alta razão entre a área da parede do capilar e volume da solução, a baixa viscosidade dos meios utilizados em CE e o alto campo elétrico usado em EC.

A mobilidade do fluxo eletroosmótico (μ_{eo}) é definida por:

$$\mu_{eo} = \frac{-\varepsilon\psi_0}{\eta} \quad 5$$

ou

$$\mu_{eo} = \frac{\sigma^*}{\kappa\eta} \quad 6$$

onde ε é a permissividade elétrica do solvente, ψ_0 é o potencial elétrico no plano de cisalhamento próximo a parede do capilar, σ^* é densidade de carga na parede do capilar, κ é a espessura da dupla camada elétrica.

A parte teórica da eletroforese e seus diferentes modos de operação são bem conhecidos e tratados na literatura^{10,17,18}.

2.2. Métodos de Pré-Concentração de Amostra em Linha

Podemos dividir os métodos de pré-concentração em linha em cinco grandes grupos: concentração de amostra em campo amplificado (FASS do inglês *field-amplified sample stacking*), concentração de amostra em grande volume (LVSS do inglês *large-volume sample stacking*), compressão de amostra mediada por pH, isotacoforese e varredura (método aplicado em MEKC). A estratégia comum nesses métodos é a geração de um gradiente de velocidade e a utilização de um sistema tamponante descontínuo. O gradiente de velocidade é gerado pela diferença entre o tampão de separação e a matriz da amostra. A concentração da amostra geralmente se dá na fronteira do *plug* da amostra injetada e o tampão de separação, ou pela focalização da amostra pelo gradiente de mobilidade gerado pelo sistema de tampões. Os detalhes de cada método serão discutidos nos subitens subsequentes.

2.2.1. Concentração de Amostra com Campo Amplificado

FASS é a técnica mais simples de concentração de amostras em linha em CE, na Figura 2 é apresentado um modelo esquemático da técnica.

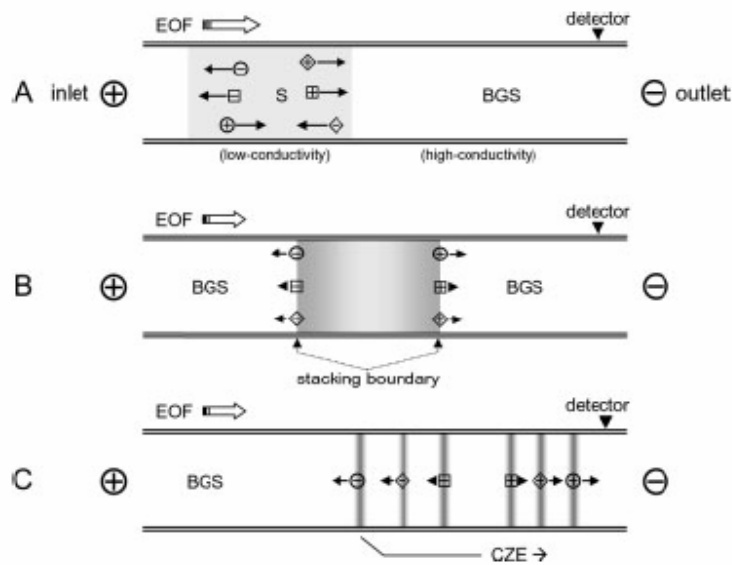


Figura 2 – Diagrama esquemático do modelo de FASS. A – o campo elétrico é aplicado após a injeção de uma amostra com baixa condutividade, B – Os analitos se concentram nas fronteiras do *plug* da amostra com o tampão de separação, C – A separação segue normalmente.

Neste método, a amostra é preparada em uma matriz de baixa condutividade que é diferente do tampão de separação (alta condutividade). A preparação da amostra geralmente se dá pela diluição em um fator de 100-1000 vezes do tampão de separação, resultando em uma solução de baixa condutividade na qual a amostra é dissolvida. Inicialmente o capilar é preenchido com o tampão de separação e a solução da amostra é injetada até certo comprimento do capilar. Após a injeção da solução da amostra, a alta voltagem é aplicada. A diferença de condutividade da solução da amostra e o tampão de separação, baixa e alta respectivamente, ocasiona um campo elétrico proporcionalmente mais elevado na zona da amostra fazendo com que os íons migrem mais rapidamente no *plug* da solução da amostra. Quando os analitos atingem a fronteira da solução da amostra com o tampão de separação, o campo

elétrico diminui bruscamente e a mobilidade diminui fazendo com que a amostra seja focalizada próxima da fronteira. Considerando que a mobilidade do FEO é superior a de todos analitos, eles migraram para a janela de detecção enquanto os analitos são separados normalmente. Nesse método, o comprimento da amostra injetada deve ser otimizado. Geralmente injeções com um comprimento de 10-30% do comprimento do capilar são realizadas. Quando um volume muito grande é injetado a focalização da amostra pode ser mais difícil e o comprimento restante do capilar pode ser insuficiente para uma separação adequada dos analitos. Aplicações desse método são listadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Exemplos de diferentes compostos analisados utilizando FASS.

Aplicação	Fator de compressão	Referência
Opiodes	1000	19
Alcalóides	1000-10.000	20
Metabólicos de heroína	10	21
Espécies de arsênico	400-2.100	22
Fármacos	>500	23
Complexo de Pb, Hg, Se	1700	24

2.2.2. Compressão de Amostra em Grandes Volumes

A LVSS utiliza um sistema de tampões semelhante ao utilizado no método FASS, a diferença é que a polaridade do campo aplicado é trocada para inverter a direção do fluxo eletrosmótico. O esquema básico LVSS está apresentado na Figura 3.

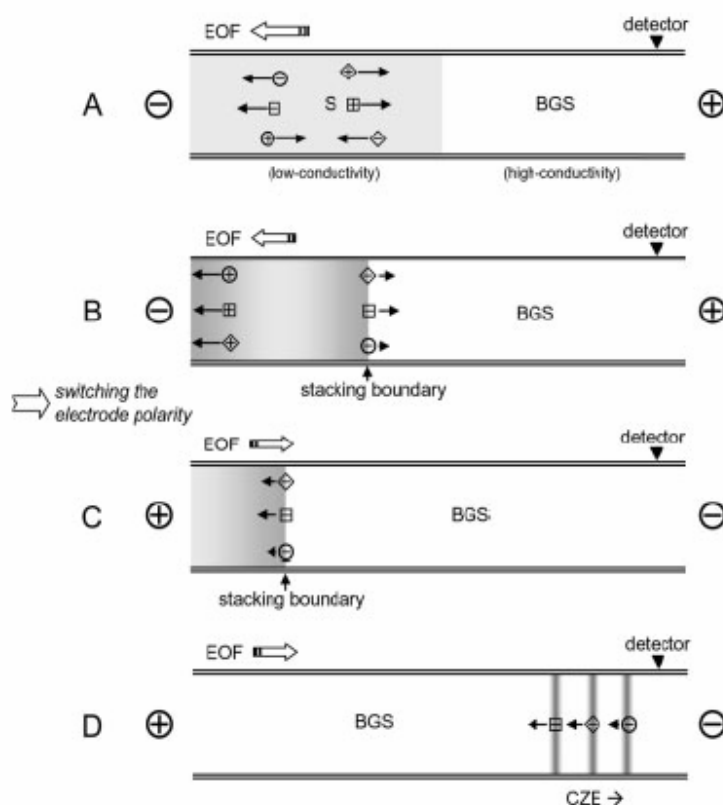


Figura 3 – Diagrama esquemático do modelo de LVSS. A – Um campo elétrico com a polaridade invertida é ligado após a injeção de um grande quantidade de amostra, B – Os analitos se concentram nas fronteiras do *plug* da amostra com o tampão de separação, C – Após o *plug* da amostra ter saído do capilar a polaridade é invertida, D - A separação segue normalmente.

A amostra é inicialmente dissolvida em um tampão com baixa condutividade ou em água. O capilar é preenchido com um tampão de separação com alta condutividade e em seguida a solução da amostra é injetada no capilar

até um determinado comprimento e a alta voltagem é aplicada, sendo o pólo negativo aplicado no início do capilar (*inlet*). Nessa situação, o fluxo eletroosmótico (FEO) está invertido, ou seja, o FEO migra na direção do início do capilar. Os analitos aniônicos migram na direção do fim do capilar (*outlet*) e se focalizam na fronteira da solução da amostra e o tampão de corrida. Enquanto isso, os analitos neutros e catiônicos migram na direção do início do capilar e são perdidos. A corrente elétrica deve ser monitorada e quando ela atinge 95-99% da corrente original inverte-se a polaridade rapidamente e a corrida segue normalmente. Se isso não é feito, os analitos aniônicos também são perdidos. Comparado com o método FASS, o LVSS permite que uma grande quantidade de amostra seja injetada sem que a eficiência de separação seja perdida. Por outro lado, para que se possa atingir uma boa reprodutibilidade é necessário fazer um preciso monitoramento da corrente elétrica. Somado a isso, cabe notar que não é possível realizar a separação de espécies catiônicas e aniônicas simultaneamente e também é limitado para analitos de baixa mobilidade. A Tabela 3 mostra um resumo de diferentes analitos analisados por LVSS.

É possível a concentração e separação de espécies catiônicas aplicando LVSS, para isso deve-se acrescentar um modificador do FEO ao tampão de separação e na solução da amostra como, por exemplo, *Cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB). A presença do CTAB inverterá a direção do FEO e para que se possa aplicar o LVSS a polaridade da voltagem aplicada também deverá ser invertida.

Tabela 3 – Exemplos de diferentes compostos analisados utilizando LVSS

Aplicação	Fator de compressão	Referência
As, Se	2,6-4,5	25
Canamicina	25	26
Sulfonato de naftaleno	100	27
Compostos fenólicos	40	28
Corantes para alimentos	80	29
Ânions	100-300	30, 31
Peptídeos	10-15	32
Complexos de ferro	>50	33

2.2.3. Concentração de Amostra Mediada pelo pH

Os dois métodos descritos acima possuem em comum o fato de utilizarem os analitos dissolvidos em um meio com baixa condutividade. Porém, esses métodos nem sempre são adequados, por exemplo, quando se deseja analisar amostras de urina ou sangue, amostras com quantidade de sais geralmente elevadas, requer pré-tratamentos para redução da condutividade da amostra. A realização da concentração de amostra mediada pelo pH é uma

alternativa para contornar esse tipo de problema. Um esquema de como funciona esse método é apresentado na Figura 4.

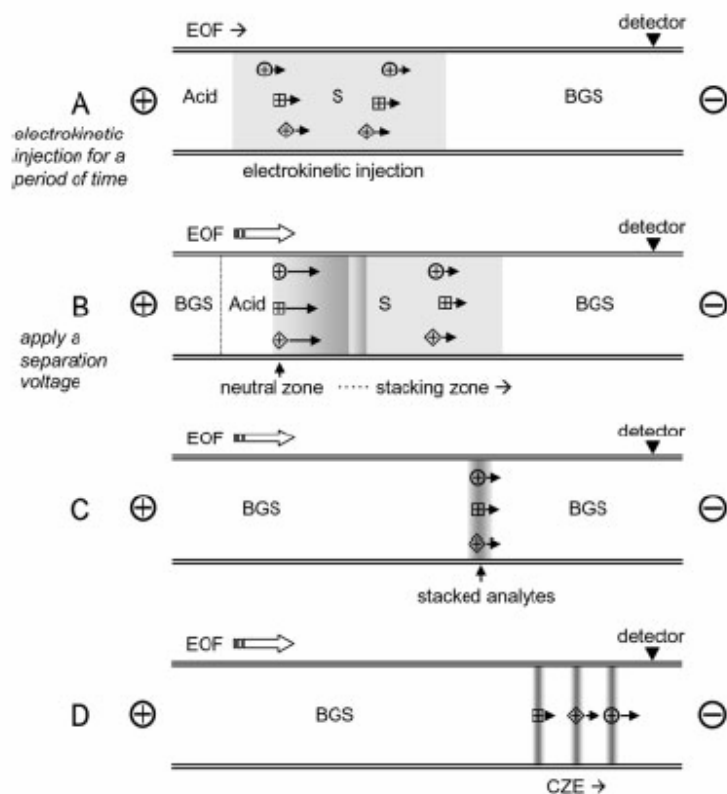


Figura 4 – Diagrama esquemático do método de pré-concentração de amostra mediada pelo pH. A – A amostra é injetada eletrocineticamente e um *plug* de um ácido forte é injetado posteriormente, B – O ácido entra no *plug* da amostra gerando uma zona neutra, C – Os analitos são concentrados, D - A separação segue normalmente.

Inicialmente a amostra é preparada em um meio de alta força iônica e é eletrocineticamente injetada no capilar. Após a injeção da amostra, um *plug* de um ácido forte é eletroforéticamente injetado e então a voltagem para separação eletroforética é aplicada. O ácido forte titula a zona da amostra criando uma zona neutra e de alta resistência (baixa condutividade), isso acontece pelo fato dos prótons do ácido forte migrarem rapidamente entrando na zona da amostra

injetada. Logo, proporcionalmente através da zona da amostra, ocorrerá um campo elétrico mais elevado, fazendo com que os íons migrem rapidamente. Como resultado, os analitos são concentrados na fronteira da zona da amostra titulada e o tampão de corrida. A Tabela 4 contém alguns exemplos de moléculas analisadas utilizando este método de compressão.

Tabela 4 – Exemplos de moléculas analisadas utilizando o método de pré-concentração de amostras mediada pelo pH.

Aplicação	Fator de compressão	Referência
Ácidos haloacético	97-120	34
Peptídeos	10	35
Metabólitos de cumarina	10-17	36
Ânions fisiológicos	66	37
Catecolaminas	250	38
AMP	50	39
Mioglobina, α -lactoalbumina	30-69	40
Anilina, ρ -bromoanilina	100-160	41
Purina	50	42
Flavinas	1200	43

Uma variação deste método é a concentração de amostra em uma junção de pH ^{44,45}. Inicialmente o capilar é preenchido por um tampão de corrida com pH elevado (ex. Borato) e a solução da amostra, que é preparada em um tampão com baixo pH (ex. fosfato), é injetada até certo comprimento do capilar. A junção de pH ocorre entre o tampão de corrida e a solução da amostra. Na solução ácida, os analitos são neutros, Porém eles adquirem carga negativa na solução alcalina. Por causa dessa propriedade dos analitos, quando a voltagem positiva é aplicada no início do capilar, resulta em uma zona de eletrólito descontínua. A migração dos íons OH^- e $\text{B}(\text{OH})_4^-$ é contrária ao FEO e atravessam a zona da amostra. Como resultado os analitos são focalizados na fronteira da junção de pH, que por sua vez é dinâmica. Na Figura 5 é apresentado o digrama esquemático do modelo de junção dinâmica de pH.

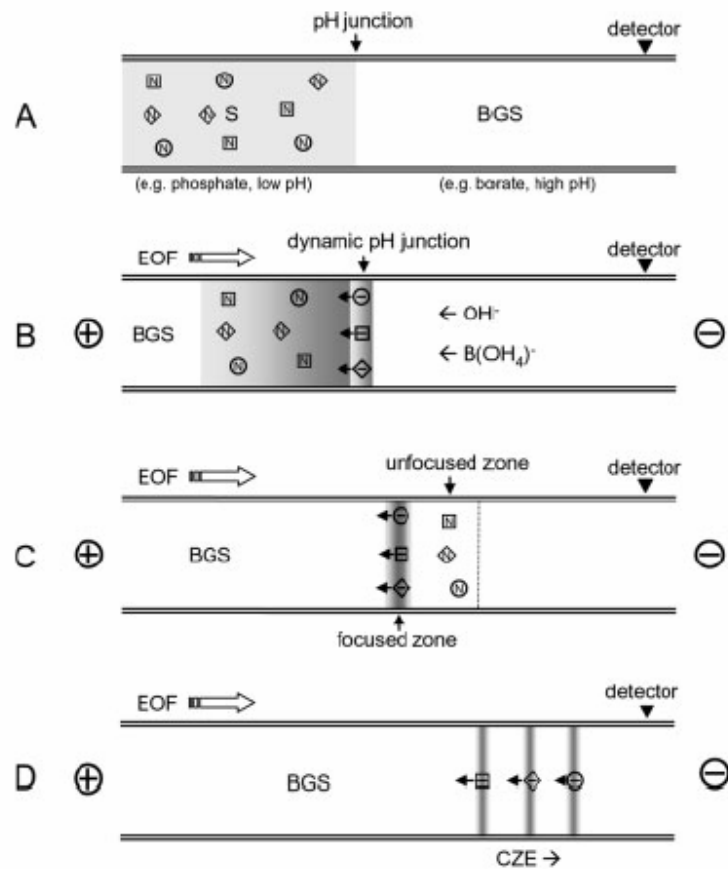


Figura 5 – Diagrama esquemático do modelo de junção dinâmica de pH. A – A amostra em um tampão de baixo pH é injetada hidrodinamicamente, B – O campo elétrico é aplicado gerando uma junção dinâmica de pH, C – Os analitos são focalizados na junção dinâmica, D - A separação segue normalmente.

2.2.4. Isotacoforese

A pré-concentração de amostra por isotacoforese também pode ser aplicada em amostras com elevada concentração de sais. Isotacoforese envolve o movimento de uma molécula carregada em um campo elétrico o qual é ditado pela mobilidade do íon mais rápido. A Figura 6 traz o modelo esquemático do método de pré-concentração por isotacoforese.

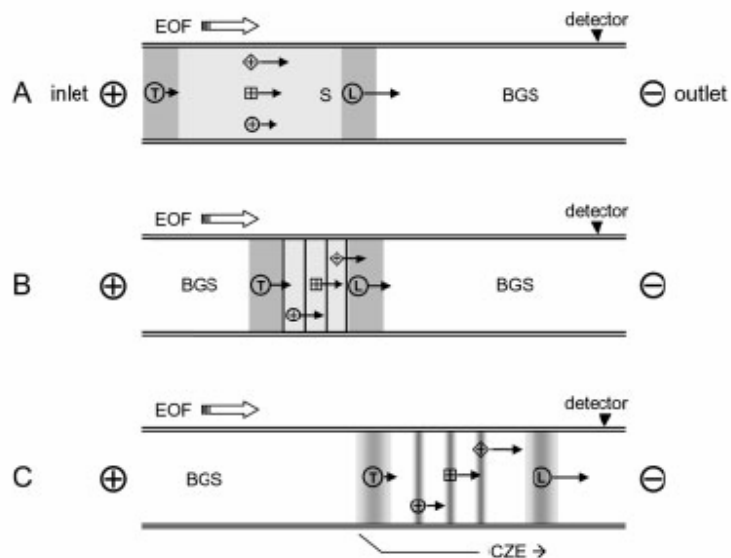


Figura 6 – Diagrama esquemático do método isotacoforese. A – A amostra é injetada entre um tampão guia (L) e um tampão de terminação (T), B – Os analitos são concentrados no gradiente de mobilidade gerado pelos tampões, C - A separação segue normalmente.

A amostra é colocada entre dois tampões, o tampão guia e o tampão de terminação, que possuem característica de alta e baixa mobilidade, respectivamente. A escolha do sistema de tampão é feita de maneira que a amostra possua uma mobilidade intermediária aos dois tampões. Quando a voltagem é aplicada, os íons da amostra irão procurar sua posição de mobilidade localizada na zona compreendida entre os dois tampões. Após os analitos da amostra se ordenarem em função das suas mobilidades, eles irão migrar com uma velocidade fixa ditada pelo tampão guia. Daí vem a origem do nome, “ISO” de mesma e “TACHO” de velocidade. Na Tabela 5 é apresentado alguns exemplos de moléculas analisadas por isotacoforese.

Tabela 5 – Exemplos de moléculas analisadas utilizando o método isotacoforese.

Aplicação	Referência
Adenosina	46
Aminoácidos e Proteínas	47, 48, 49,
Íons diversos	50, 51, 52
Angiotensina	53, 54

2.2.5. Concentração de Amostra por Varredura

Os métodos de concentração de amostra descritos anteriormente são realizado em CZE, já o método por varredura é realizado em MECK. Esse método permite a análise de moléculas carregadas e neutras. A Figura 7 apresenta o diagrama esquemático do modelo de concentração de amostra por varredura quando SDS é utilizado como surfactante.

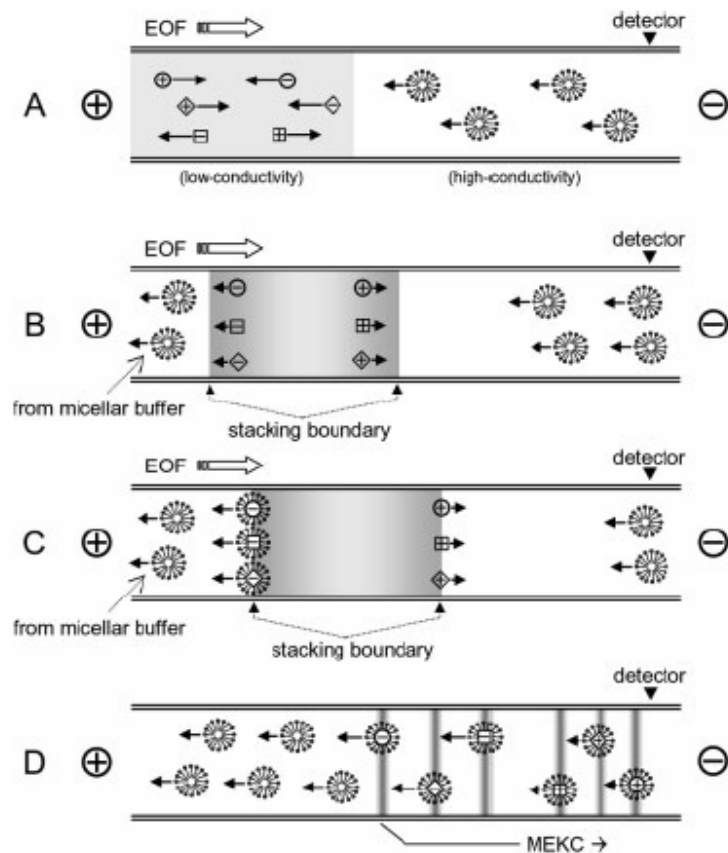


Figura 7 – Diagrama esquemático do método pré-concentração de amostra por varredura. A – Amostra em um tampão com baixa condutividade é injetada, B – Os analitos se concentram nas fronteiras do plug da amostra com o tampão de separação, C – As micelas do tampão de separação entram no *plug* da amostra, D – A separação segue normalmente.

Inicialmente a amostra é dissolvida em um tampão de baixa condutividade ou em água. O tampão de corrida possui SDS para formar as micelas e na solução da amostra não contem SDS. O capilar é preenchido com o tampão de corrida, a solução da amostra é injetada e a voltagem positiva é aplicada. As micelas formadas no início do capilar entram na zona da solução da amostra (desde que a mobilidade do FEO seja maior que a mobilidade das micelas de SDS) e interagem com os analitos. Como descrito no sub-item 2.2.1,

na zona da amostra o complexo SDS-analito migrará rapidamente até atingir a fronteira da solução da amostra e o tampão de separação. Nesse ponto os analitos serão focalizados e a separação ocorrerá normalmente por MECK. A Tabela 6 traz alguns exemplos de moléculas analisadas pelo método pré-concentração de amostra por varredura.

Tabela 6 – Exemplos de moléculas analisadas utilizando o método concentração de amostra por varredura

Aplicação	Fator de compressão	Referência
Esteróides	270-2500	55, 56
2,4,6-Triclorofenol	360	57
Bisfenol A e aquilfenol	41-69	58
Íons metálicos (Cu ²⁺ , Pb ²⁺ , Co ²⁺ , Mn ²⁺)	60-180	59
Ácido salicílico	600	56
Triazinas	30-110	60

2.3. Pré-Concentração em Linha Através de Gradientes

Térmicos e Gradientes de pH

A utilização de gradientes térmicos para compressão de bandas não é uma idéia recente. O primeiro trabalho utilizando essa abordagem foi publicado em 1970 por Luner e Colin⁶¹. Os autores utilizaram um tubo em U (Figura 8) onde a

temperatura era controlada pela circulação de água nas regiões J1 e J2 e assim gerava termicamente um gradiente de pH nas regiões M1 e M2. A utilização de TRIS como tampão permitiu que nas regiões M1 e M2 fosse gerado um gradiente de pH de aproximadamente 1 unidade de pH, pelo fato desse tampão possuir um elevado coeficiente térmico, cerca de $-0,028 \text{ un. pH} / ^\circ\text{C}$. Com essa abordagem, Lunem e Colin foram capazes de focalizar hemoglobina nas regiões M.

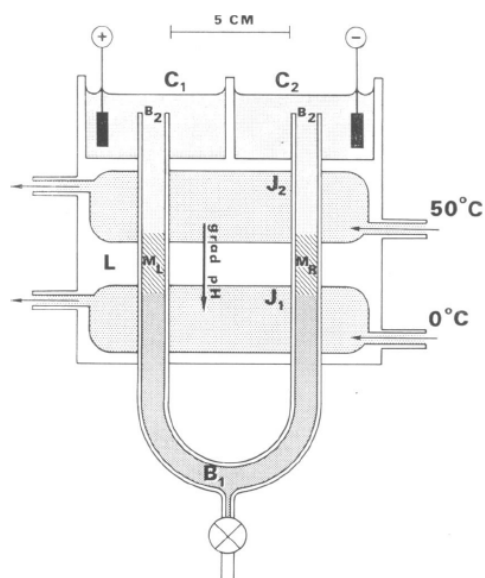


Figura 8 – Aparato de focalização isoeétrica e fracionamento em gradientes de pH termicamente gerado proposto por Luner e Colin em 1970. B – tubo de separação, C – reservatório de eletrólito, J – regiões térmicas, M – região do gradiente térmico.

Essa estratégia foi posteriormente utilizada por outros autores⁶² também em tubos de vidro, Porém com diâmetros menores. Em CE, esse princípio foi aplicado pela primeira vez por Pawliszyn e Jiaqi em 1993⁶³, onde os autores utilizaram um capilar cônico para gerar o gradiente de pH pelo efeito térmico e focalizar os analitos. Em 1994, Slais⁶⁴ apresentou um modelo teórico que descreve a migração

eletroforética na zona de focalização em um capilar cônico. O mesmo autor continuou a trabalhar no tema desenvolvendo o modelo apresentado em 1994, publicando diversos trabalhos no tema ^{65, 66, 67, 68}.

Quando é aplicado uma diferença de potencial elétrico em um capilar cônico ou em micro canal trapezoidal, um aquecimento Joule não uniforme ao longo do capilar ou micro canal é gerado, isso devido ao gradiente de condutividade que esse formato de meio de separação propicia em conjunto com o sistema tamponante, ou seja, o aumento ou diminuição da área da secção transversal em relação ao início do capilar ou micro canal. Essa abordagem é muito prática, pois elimina a utilização de um controle de temperatura externo, sendo esse controle realizado pelo ajuste da tensão aplicada na coluna de separação. Gradientes de pH são criados nesse tipo de sistema pela utilização de tampões com elevados coeficientes térmicos. A Tabela 7 traz uma relação de tampões e seus respectivos coeficientes de temperatura.

Aplicações práticas em focalização de proteínas e aumento da resolução na separação de DNA foram apresentadas por outros pesquisadores em capilares e micro chips ^{69,70,71,72} utilizando gradientes de temperatura em canais trapezoidais e capilares cônicos. Fang et al. (1999)⁶⁹ demonstraram em seu trabalho a focalização de hemoglobina em capilares cônicos. Os autores utilizaram capilares de 3,7 e 4,0 cm de comprimento total e diâmetros de 54 μm e 308 μm no início e no final do capilar para um e para outro com 180 μm e 540 μm no início e no final do capilar. Eles apresentaram um modelo teórico para estimar a temperatura ao longo do capilar e investigaram as melhores condições de corrente e dimensões

do capilar para a realização da focalização, estipulando uma temperatura máxima de 63°C para prevenir a desnaturação da proteína.

Tabela 7 – Relação de tampões típicos utilizados em eletroforese e as respectivas constantes de ionização (pK) e coeficientes térmicos.

Tampão	pK_a'	Coefficiente de Temperatura (dpK_a/dT)
Fosfato	2,04	0,0044
Benzoato	4,15	0,0180
Piridina	5,29	-0,0140
Piperazina	5,34	-0,0150
MES	6,02	-0,0110
Bis-tris	6,49	-0,0200
ACES	6,75	-0,0200
Fosfato	6,79	-0,0028
BES	7,04	-0,0160
MOPS	7,12	-0,0110
TES	7,37	-0,0200
HEPES	7,45	-0,0140
Tris	8,05	-0,0280
Tricina	8,02	-0,0210
Bicina	8,23	-0,0180
TAPS	8,27	-0,0200
Borato	9,23	-0,0080
Etanolamina	9,48	-0,0290
CHES	9,18	-0,0180
CAPS	10,28	-0,0180
Metilamina	10,59	-0,0310
Piperidina	11,09	-0,0310
Fosfato	11,54	-0,0260

Huang e Pawliszin (2002) usaram a mesma estratégia, Porém em um micro canal trapezoidal, e foram hábeis a focalizar hemoglobina em um gradiente de pH gerado por um gradiente térmico utilizando Tris como tampão. Os autores estudaram também o efeito da dissipação axial do calor no micro canal e também discutiram o fato da variação da entalpia de ionização (ΔH°) dos grupos funcionais comumente encontrados em proteínas em função da temperatura (Tabela 8).

Tabela 8 – Entalpia de ionização (ΔH°) dos grupos funcionais encontrados em proteínas.

Grupo Funcional	ΔH° (kcal/mol)
Carboxílico	1
Fenólico	6
Imidazol	7
α -Amina	10
ϵ -Amina	12

Outra técnica com gradiente de temperatura foi apresentada por Ross & Locascio em 2002⁷². Os autores construíram um chip com um micro canal onde a largura do início do canal era cinco vezes menor que a porção final, sendo que a duas porções possuíam uma largura uniforme em toda extensão. A junção dos canais de diferentes tamanho ficava exatamente entre dois blocos de cobre (com 2 mm de distância um do outro) que foram utilizados para o controle da temperatura dos dois canais, sendo que no mais estreito a temperatura era quente e no mais largo a temperatura era fria. O princípio do método é provocar uma

diminuição da mobilidade eletroforética do analíto de maneira que a mobilidade total na zona de gradiente térmico seja inversa, assim focalizando a amostra.

3. Objetivos

3.1. *Objetivos Gerais*

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de um método não convencional com a finalidade de aumentar a sensibilidade na detecção de amostras por fluorescência induzida em CE e a redução do custo de um equipamento de CE.

3.2. *Objetivos Específicos*

- Emprego de fontes de excitação de baixo custo (LEDs) em detectores por fluorescência induzida em CE;
- Emprego de componentes alternativos de baixo custo para detecção de sinal em CE;
- Desenvolvimento de um programa para tratamento de sinal e aquisição de dados via software;
- Desenvolvimento de um método de compressão de banda em CE operando em modo de solução livre por meio de gradientes térmicos longitudinal.

4. Materiais e Métodos

4.1. *Equipamento de Eletroforese Capilar*

O equipamento de CE utilizado nesse trabalho foi montado em nosso laboratório. O sistema de detecção utilizado nele é por fluorescência induzida por LED (FI-LED), nosso grupo foi pioneiro em aplicar esse tipo de dispositivo em CE¹⁶. A configuração inicial do equipamento é apresentada na Figura 9.

O primeiro LED (HR370A; Sander Electronic, Berlin, Germany) testado possuía um máximo de emissão em 370 nm. Porém outros LEDs com máximo de emissão em 405 e 470 nm também foram utilizados. O LED era pulsado a uma frequência de 500 Hz por uma onda quadrada gerada por um gerador de funções (CFG250; Tektronix, Beaverton, OR, USA) sendo que cada pulso possuía uma intensidade de quatro volts. Foi montado um suporte para os LEDs que permitisse que os mesmos pudessem ser trocados facilmente. O suporte possui duas lentes de quartzo para colimar a luz emitida pelo LED na janela de detecção do capilar. Para que a luz do LED pudesse ser colimada adequadamente pelo conjunto de lentes, foi necessário cortar a lente do LED para que ficasse plana e o local foi polido utilizando um jogo de lixas de 200 a 1000 de granulometria e por fim o acabamento foi realizado usando uma pasta de polimento.

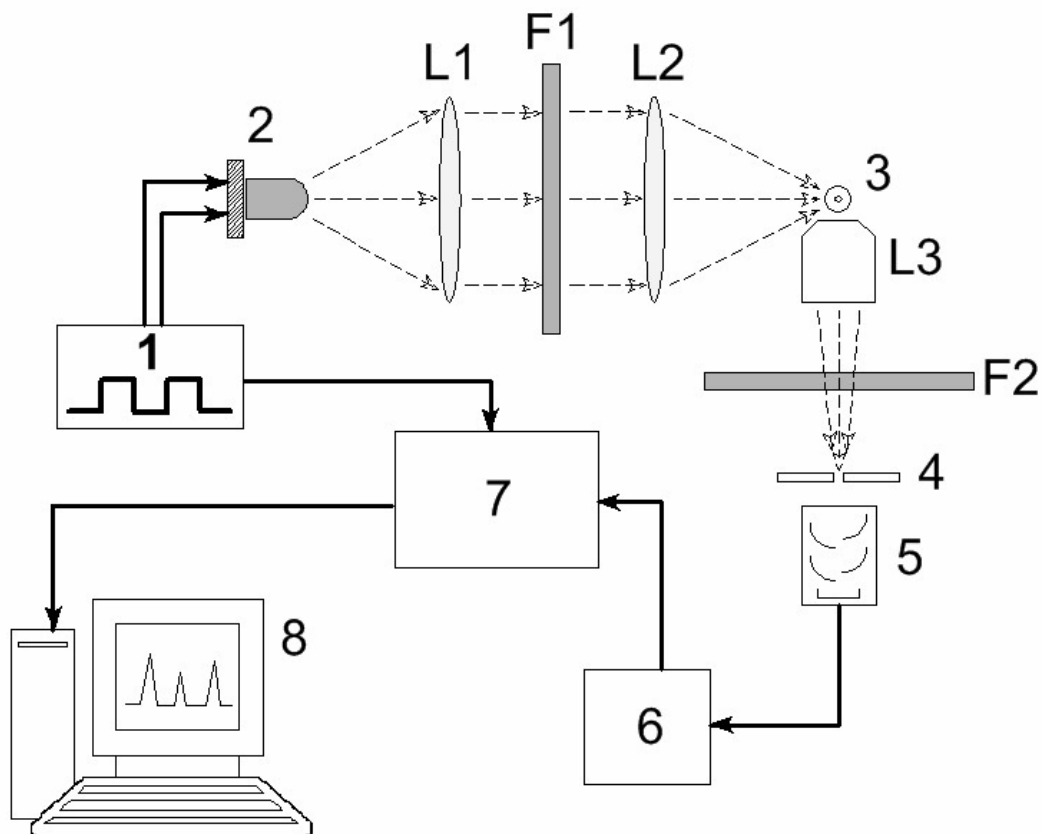


Figura 9 – Diagrama esquemático do equipamento de CE usado neste trabalho. O gerador de função (1) alimenta o LED (2) com um sinal numa frequência de 500 Hz. A luz emitida do LED é colimada na janela de detecção do capilar (3) pelo jogo de lentes (L1 e L2) que possui um filtro passa banda (F1). A fluorescência é coletada pela lente objetiva (L3) que focaliza a imagem no tubo fotomultiplicador (5) passando pelo filtro F2 e por uma fenda (4) com a largura regulada por duas lamínulas. O sinal do tubo fotomultiplicador é amplificado por um amplificador de ganho (6) e o sinal amplificado entra no integrador de sinal Boxcar (7) que também recebe o sinal do trigger do gerador de função (1). O sinal integrado no Boxcar é coletado em um micro computador (8).

A fluorescência emitida era coletada por uma lente objetiva de microscópio (PZO, 10/0.24) que projeta a imagem em um tubo fotomultiplicador (TFM) (model E850-02; Hamamatsu, Bridgewater, NJ, USA). O sinal do TFM era amplificado em um amplificador de ganho ajustável (13 AMP 003; Melles Griot,

Boulder, CO, USA) antes de entrar no integrador de sinal Boxcar (model 162/164; Princeton Applied Research, Princeton, NJ, USA). Além do sinal do amplificador, o trigger do Boxcar era feito externamente pelo mesmo gerador de funções que fazia o LED pulsar. O sinal integrado vindo do Boxcar era adquirido por uma placa de aquisição de dados (CIO-DAS08; Computer Boards, Mansfield, MA, USA) e os dados eram interpretados em um micro computador PC usando uma rotina escrita em HP VEE (HP VEE, versão 3.21).

Um segundo micro computador PC foi utilizado para a montagem de um sistema alternativo para aquisição de dados. Esse segundo sistema, que será chamado a partir daqui de sistema B, faz a aquisição de dados por meio de uma placa de som PCI (Vibra 128 PCI card, modelo CT4810, Chipset CT5880, Creative Labs) e faz o tratamento de sinal por meio de um amplificador Lock-in emulado por uma sub-rotina escrita em LabView (LabView, versão 7.0, National Instruments). O sistema B foi ligado em paralelo com o sistema anterior (sistema A) de maneira a permitir que os dados de sejam adquiridos simultaneamente pelos dois sistemas, permitindo assim uma comparação do desempenho dos dois sistemas (Figura 10).

O equipamento de CE foi equipado com capilares de sílica fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) de diferentes dimensões, as quais serão discriminadas no decorrer de cada ensaio. A alta tensão era fornecida por uma fonte ajustável de 0 à 30 kV (Series 205B; Bertan, Hicksville, NY, USA).

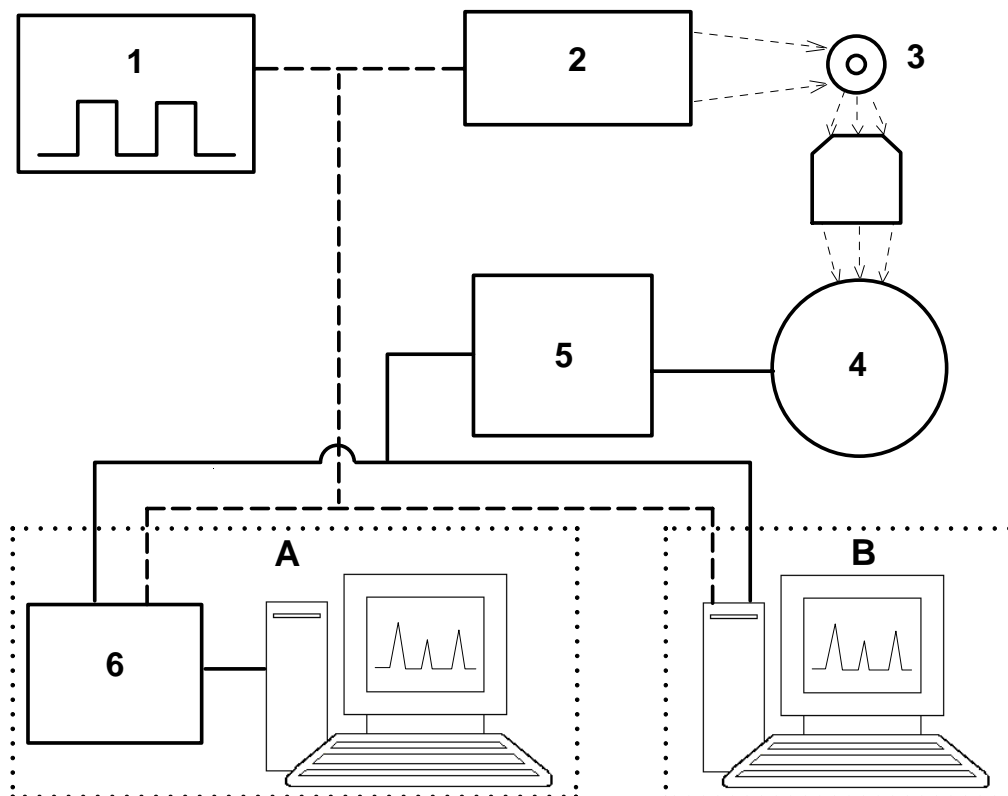


Figura 10 – Configuração dos dois sistemas de aquisição de dados e tratamento de sinal montados em paralelo. 1 – Gerador de funções; 2 – LED; 3 – Janela de detecção do capilar; 4 – Tubo foto-multiplicador; 5 – Pré-amplificador de sinal; 6 – Boxcar.

O equipamento com os dois sistemas de aquisição de dados e tratamento de sinal montados em paralelo funcionava como a descrição feita anteriormente para o sistema A. Para que o sistema B fizesse a aquisição dos dados simultaneamente com o sistema A, o cabo do sinal de saída do gerador de funções foi dividido com um conector “T” BNC, sendo que um dos braços fornece o trigger do Boxcar do sistema A e o outro braço fornece o sinal de referência para o sistema B que é adquirido pelo canal 1 da entrada de linha da placa de som. O sinal de saída do amplificador foi dividido também utilizando um conector “T” BNC.

Um dos braços é ligado na entrada do Boxcar do sistema A, enquanto o outro braço é ligado no canal 0 da entrada de linha da placa de som do sistema B.

Ao contrario do sistema A, onde o sinal entra no computador já tratado, isto é, com o ruído “filtrado” pelo Boxcar, no sistema B o sinal que entra no computador possui ruído misturado com o sinal oriundo do TFM e o processo de tratamento de sinal é realizado via software.

Depois da validação do sistema B, o sistema A foi desligado do equipamento e a aquisição de dados e tratamento de sinal passou a ser realizada somente pelo sistema B.

4.2. *Recobrimento Interno dos Capilares*

Nos ensaios de compressão térmica, os capilares foram revestidos internamente para suprimir o FEO. O método de revestimento utilizado foi a descrita por Hjerten (1985)⁷³ com algumas modificações. Resumidamente, o capilar é tratado com uma solução de 10% de Extran Alcalino em fluxo constante por 10 minutos e após é lavado com um fluxo de água por 2 minutos e seco com N₂. O capilar então é preenchido com uma solução contendo 80 µL de γ -metacriloxpropiltrimetoxsilano em 20 mL de água com o pH ajustado para 3,5 com ácido acético e permanece no capilar por uma hora a temperatura ambiente. Após esse período o capilar é lavado com um fluxo de água por 2 minutos e seco com N₂. Após essa lavagem o capilar é preenchido com uma solução deaerada de 3,5 % de acrilamida, 1 µL/mL de TEMED e 1 mg/mL de per sulfato de amônio por

um período de 5 – 10 minutos. O capilar é novamente lavado e seco como descrito anteriormente e está pronto para ser utilizado.

4.3. *Analitos Utilizados e Reações de Marcação e Derivatização das Amostras.*

Nesse trabalho utilizou-se como analito: o peptídeo bradicinina (BK) e os fragmentos de bradicinina BK1-8, BK1-7, BK1-6, BK1-5, BK6-9 e BK1-3; os aminoácidos L-Lisina, L-Ácido aspártico, L-Ácido glutâmico, L-Tirosina, L-Alanina e L-Serina; os co-fatores de nicotinamina NADP e NADPH; Etanolamina; e Fluoresceína.

Os padrões de BK foram preparados em tampão 20 mM HEPES pH 7,4 na concentração de 50 µmol/L e estocados a -18°C. Os padrões de aminoácidos foram preparados em tampão 100 mM Borato pH 9,0 na concentração de 1 mM e estocados a -18°C. Os padrões dos co-fatores de nicotinamina foram preparados em água na concentração de 500 µmol/L antes do uso. O padrão de etanolamina foi preparado em água na concentração de 500 µmol/L e estocado a 4°C. O padrão de fluoresceína foi preparado em água na concentração de 1 mM e estocado a 4°C.

Naftaleno-2-3-dicarboxaldeído (NDA) e fluorescamina foram utilizados para derivatizar as amostras e isotiocianato de fluoresceína (FITC) foi utilizado para a marcação das amostras. A solução estoque de NDA foi preparada em acetonitrila na concentração de 20 mM. A solução estoque de fluorescamina foi

preparada em acetona na concentração de 10 mM. A solução estoque de FITC foi preparada em dimetilformamida na concentração de 20 mM.

A Figura 11 mostra as reações do NDA, fluorescamina e FITC. A reação de derivatização de aminas primárias com NDA^{74,75} foram realizadas misturando na proporção molar de 1:5:5 o analito, NDA e cianeto de potássio, respectivamente. Para que a reação ocorresse o pH era ajustado para 9,0, a exceção foi para L-lisina onde a reação era realizada em pH 7,1 para evitar que a amina da cadeia lateral também fosse derivatizada. As reações de derivatização com NDA foram realizadas 30 minutos antes de serem utilizadas.

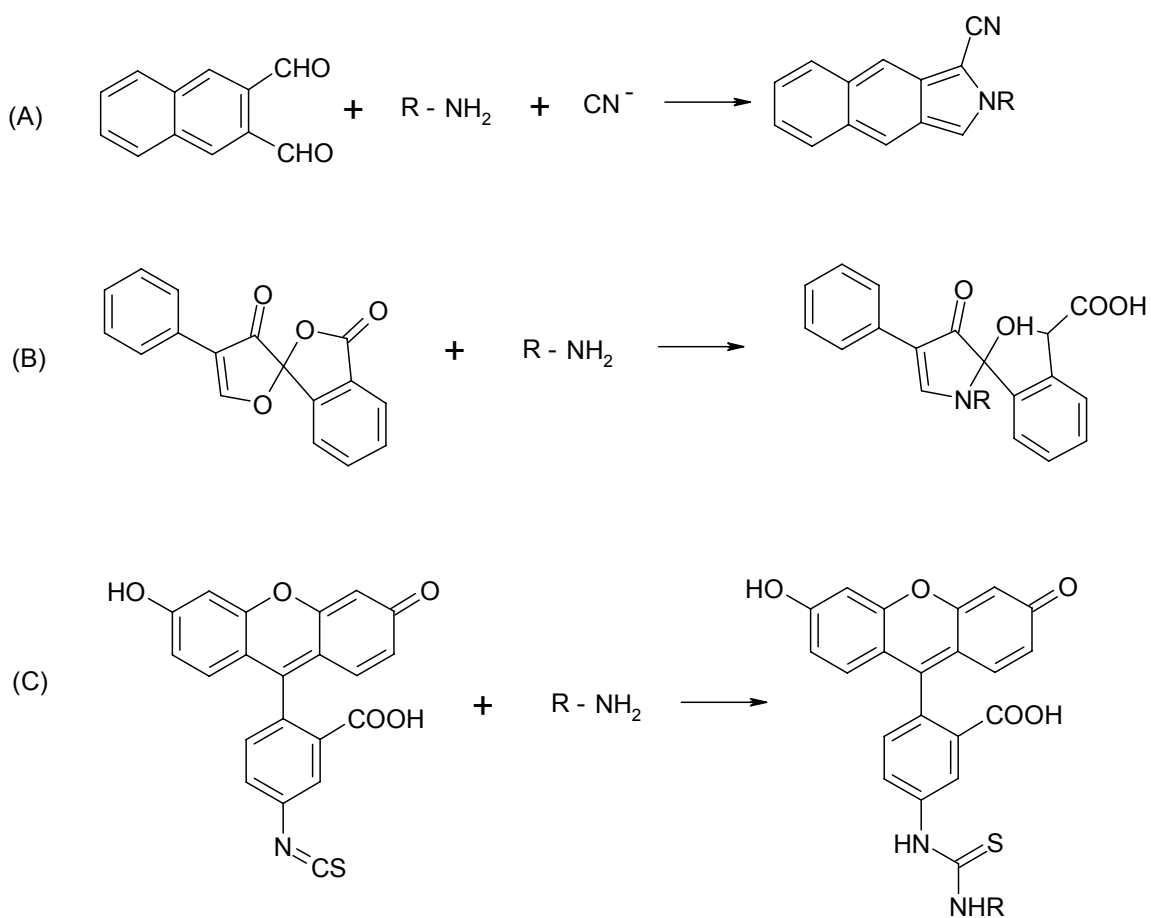


Figura 11 – Reação fluorogênica de derivatização de amina por NDA (A) e Fluorescamina (B) e reação de uma amina primária com FITC (C).

A reação de derivatização com fluorescamina^{74,75} foi realizada pela mistura do analito com o reagente fluorescamina na proporção molar de 1:5. A porção de fluorescamina era adicionada em 3 alíquotas com um intervalo de dois minutos da adição de uma alíquota para a outra. Essa prática foi adotada devido a alta velocidade com que a fluorescamina é hidrolizada pela água e desse modo garantir que toda a amostra seja derivatizada.

A reação de marcação com FITC eram realizadas pela mistura do analito com o FITC na proporção molar de 1:10. O pH da reação era justado para 9,0 e a reação era realizada 4 horas antes de ser utilizada.

4.4. Utilização de LEDs em Sistemas de Detecção por Fluorescência Induzida

Nesse trabalho foram utilizados 3 LEDs diferentes com o máximo de emissão em diferentes comprimentos de onda (λ). Na faixa do UV, um com o máximo de emissão em 370 nm (λ_{370}) e outro em 405 nm (λ_{405}) e na faixa do visível foi utilizado um LED azul com o máximo de emissão em 470 nm (λ_{470}). Os LEDs UV, λ_{370} e λ_{405} , foram utilizados na detecção de analitos derivatizados com fluorescamina e NDA (Molecular Probes) respectivamente, enquanto que o azul foi utilizado para a detecção de analitos marcados com isotiocianato de fluoresceína (BLL, division of BioQuest, Maryland - USA) e detecção por fluorescência indireta utilizando fluoresceína como sonda no tampão de corrida.

4.5. Pré-Concentração em Linha Através de Gradientes

Térmicos

Para a realização dos experimentos de pré-concentração através de gradientes térmicos, o equipamento de CE precisou ser adaptado de modo que a temperatura do capilar fosse controlada. Para isso o capilar foi montado passando por mangueiras de silicone. Essa montagem permitiu o controle da temperatura em duas zonas do capilar (Figura 12).

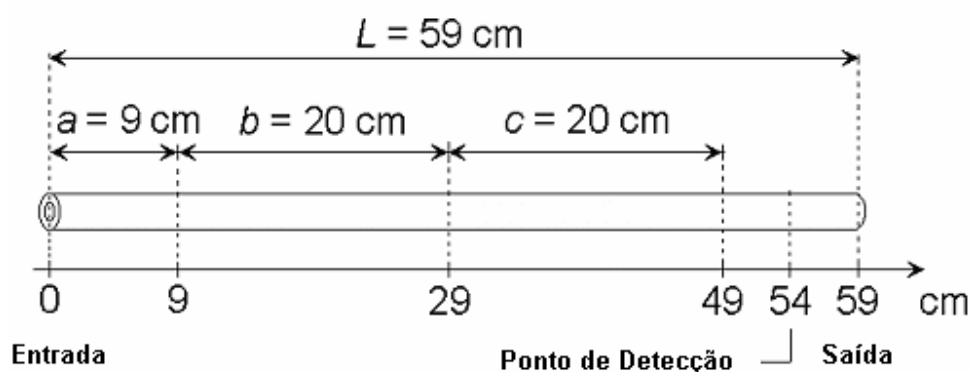


Figura 12 – Representação esquemática do capilar utilizado nos ensaios de gradientes térmicos. A – início do capilar, B e C – regiões de controle da temperatura.

A temperatura nas porções b e c do capilar (Figura 12) foram controladas pela circulação de água. A água era bombeada de três reservatórios térmicos, que possuíam água a 2, 25 e 60 °C. A Figura 13 ilustra o controle de temperatura das regiões b e c do capilar durante a corrida eletroforética.

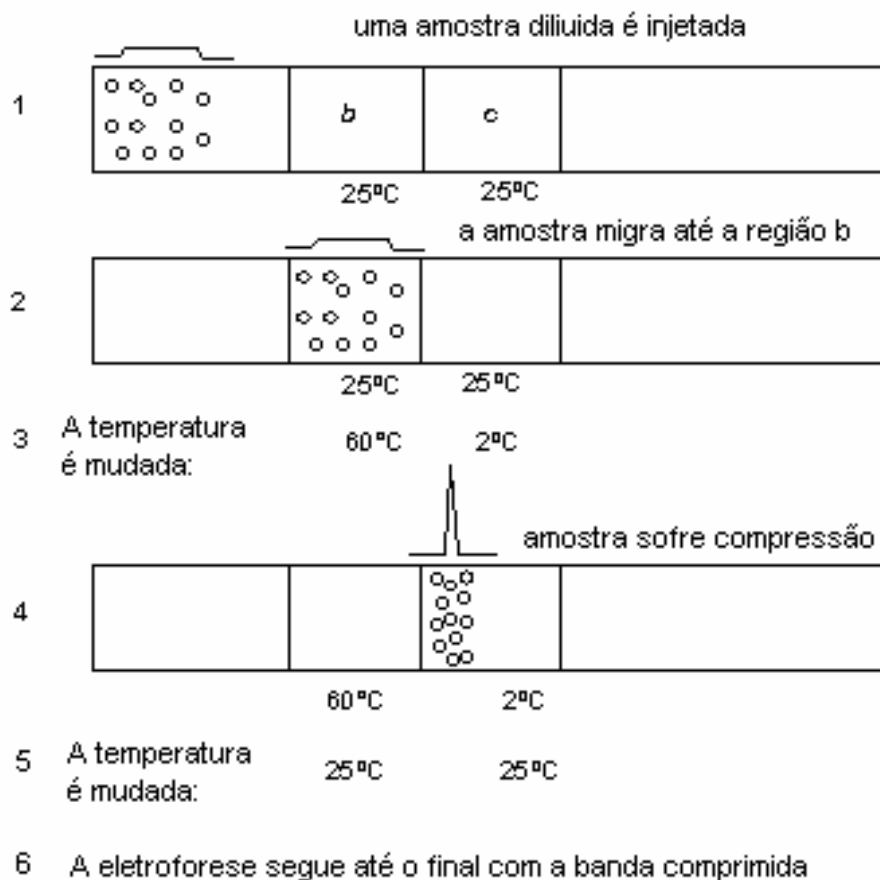


Figura 13 – Representação esquemática do controle de temperatura para aplicar o efeito de compressão de banda por gradientes térmicos.

Uma quantidade grande da amostra é injetada no capilar que está a 25°C (Figura 13 – 1). Aplica-se o campo elétrico e quando o analito se encontra na região *b* do capilar a temperatura é comutada para 60°C e 2°C nas regiões *b* e *c* respectivamente sem interromper a corrida (Figura 13 – 2 e 3). Quando o analito está na região *c*, a temperatura retorna a 25°C nas duas regiões e a corrida segue normalmente até o fim (Figura 13 – 4, 5 e 6).

Uma válvula de duas posições foi montada para que as mudanças de temperatura nas regiões *b* e *c* pudessem ser realizadas rapidamente e sem a

necessidade de interromper a corrida (Figura 14). Além disso, permitiu uma circulação fechada da água, pois a água após passar pelo capilar retornava aos respectivos reservatórios de origem.

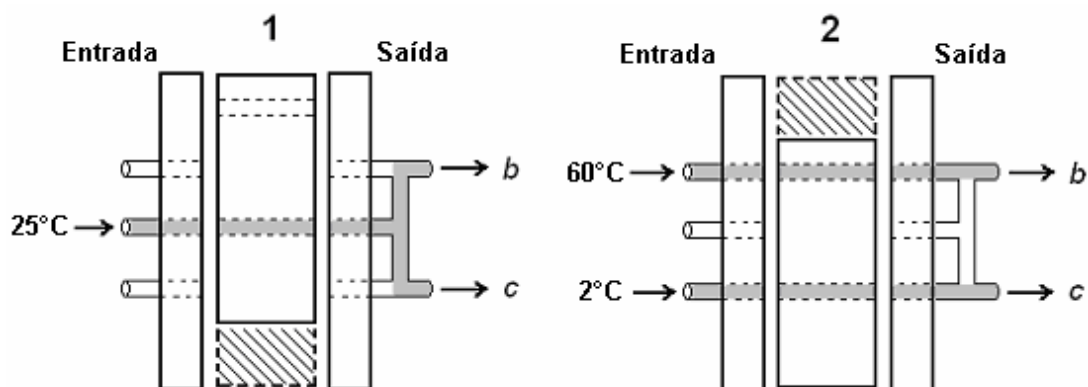


Figura 14 – Representação esquemática da válvula de comutação da temperatura nas regiões *b* e *c* do capilar. Na posição 1, água a 25°C é bombeada pelas regiões *b* e *c* do capilar. Na posição 2, água a 60°C é bombeada pela região *b* e água a 2°C é bombeada pela região *c*.

No estudo da mobilidade eletroforética da lisina derivatizada com NDA em função do pH e temperatura, foi utilizado etanolamina derivatizado com NDA como marcador de fluxo eletroosmótico e serina derivatizada com NDA como um padrão interno com uma carga negativa. As corridas foram realizadas em capilar comum utilizando tampões na concentração de 10 mM na faixa de pH de 7.0 a 10,5. Os tampões utilizados estão relacionados na Tabela 9.

Tabela 9 – Relação de tampões utilizados no estudo da mobilidade eletroforética da Lisina derivatizada com NDA. A faixa de pH utilizada para cada tampão está marcada em preto e o *pK* de cada tampão está informado em branco.

Tampão	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	9,5	10,0	10,5
Carbonato ^{a)}								10,25
Borato ^{a)}					9,25			
Fosfato ^{a)}	7,20							
Etanolamina ^{b)}						9,50		
TAPS ^{b)}				8,40				
Tris ^{b)}			8,10					

a) Tampões de baixa capacidade térmica (< -0,01 un. pH / °C)

b) Tampões de alta capacidade térmica (> -0,02 un. pH / °C)

Os tampões foram escolhidos pela capacidade térmica e faixa tamponante de cada um (Tabela 7).

5. Resultados e Discussões

5.1. Utilização de Componentes Alternativos para Equipamentos de Eletroforese capilar

Na introdução deste trabalho foram apresentados os componentes básicos de um equipamento de CE (Figura 1). Um dos objetivos deste trabalho foi a investigação de componentes alternativos para equipamentos de CE que propiciem elevada sensibilidade na detecção dos analitos, diminuição do custo do equipamento de CE, simplificação do instrumento e robustez. Dentro dessa linha, a fonte de excitação do equipamento (originalmente um laser de hidrogênio) foi substituída por um LED, o integrador de sinal (Boxcar) foi substituído por um Lock-in emulado por um programa de computador e a placa de aquisição de dados foi substituída por uma placa de som. A viabilidade do uso desses componentes alternativos em um equipamento de CE foi investigada e os resultados e discussão são apresentados nos dois sub-itens subseqüentes.

5.1.1. Utilização de LEDs em Sistemas de Detecção por Fluorescência Induzida

O sistema de detecção por fluorescência induzida por laser é o mais sensível que existe em CE (Tabela 1) e atingem limites de detecção da ordem de amol. Porém o custo destes lasers varia na faixa de 3.000 a 30.000 dólares.

Recentemente começaram a aparecer no mercado uma diversidade de LEDs com uma ampla faixa de emissão, do ultra-violeta ao infra-vermelho e com uma potência relativamente elevada para esse tipo de dispositivos (até 12 mW). Devido a seu tamanho reduzido, baixo custo e fácil funcionamento, a possibilidade de utilização de LEDs em sistemas de detecção por fluorescência induzida em CE é bem atrativa. Foram testados quatro modos de operação desse detector, dois deles utilizando LED UV em 370 e 405 nm para detecção por fluorescência direta do analito e os outros dois modos utilizando um LED azul em 470 nm realizando a detecção do analito por fluorescência direta e indireta.

Nosso grupo em 2002 apresentou um trabalho pioneiro utilizando LED em sistemas de detecção por fluorescência induzida em CE¹⁶ (Anexo 1). Resumidamente, a utilização de um LED UV com o máximo de emissão em 370 nm permitiu atingir limites de detecção de 3 fmol para bradicinina derivatizada com fluorescamina e 18 fmol para lisina derivatizada com fluorescamina, considerando o limite de detecção igual a três vezes o ruído da linha de base.

O LED utilizado nesse trabalho era controlado por um gerador de função que gerava um pulso quadrado em uma frequência pré-determinada. Essa frequência foi investigada de modo que a razão sinal ruído fosse otimizada sendo que o melhor resultado foi obtido em 500 Hz de uma faixa de 20 a 2000 Hz. Somado a isso, outro aspecto importante foi a faixa de linearidade do detector. Utilizando lisina derivatizada com fluorescamina, foram realizadas corridas com a concentração do analito variando 54 à 417 $\mu\text{mol/L}$ e o coeficiente de correlação da equação de regressão linear foi de 0,9956 e 0,9895 respectivamente para a área e altura dos picos. A boa linearidade do detector o credencia para a realização de

ensaios analíticos quantitativos, pois uma vez realizada uma calibração pode-se utilizar a equação da curva padrão para estimar a concentração do analito na amostra analisada.

A configuração desse equipamento permitiu que a fonte de luz (LED) fosse trocada facilmente, proporcionando uma grande flexibilidade do sistema de detecção e a possibilidade de utilização de diferentes tipos de marcadores assim como estratégias de detecção.

A utilização de um LED azul, com o máximo de emissão em 470 nm, possibilita a análise de analitos marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC). Essa configuração foi testada utilizando bradicinina e fragmentos do mesmo peptídeo marcados com FITC (Figura 15). O FITC é um composto fluorescente e é detectado na corrida de separação. Para contornar essa interferência do excesso de FITC na amostra, geralmente a amostra marcada deve ser separada do marcador antes de ser injetada no capilar, usualmente em uma coluna de sefadex. Na separação da bradicinina e seus respectivos fragmentos não foi necessário fazer a purificação da amostra, uma vez que o branco da reação de marcação não apresentou nenhum interferente na região onde os picos dos analitos saem (Figura 16).

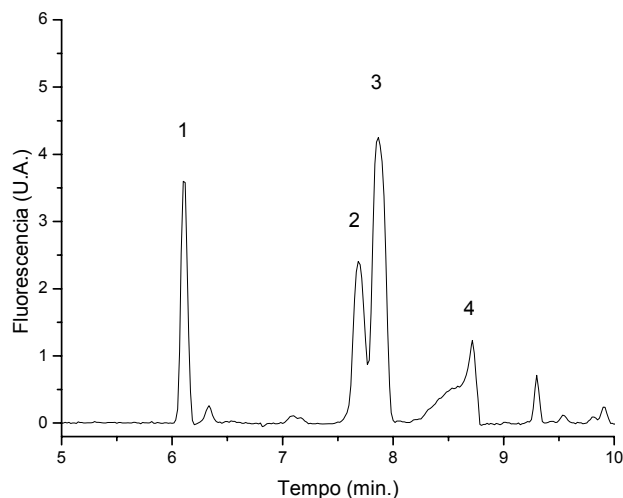


Figura 15— Separação de bradycinin e fragmentos de bradycinin marcados com FITC em solução livre. 1 – bradycinin; 2 – fragmento 1-6; 3 – fragmento 1-5 e 4 – fragmento 1-3. Condições experimentais: capilar comum com 55 cm de comprimento total e 50 cm de comprimento até o detector, diâmetro externo de 363 μm e interno de 50 μm , 50 mM Borato pH 9,0 foi utilizado como tampão de separação, $E = 363 \text{ V/cm}$, $i = 20 \mu\text{A}$, $t = 20 \text{ }^\circ\text{C}$, injeção foi realizada eletrocineticamente à 5 kV por 10 segundos.

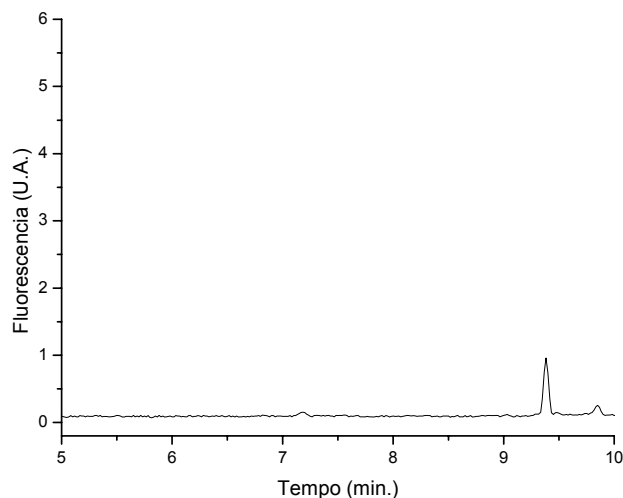


Figura 16 – Separação do branco da reação com isotiocianato de fluoresceína. Demais condições idênticas à Figura 15.

Considerando o limite de detecção (LD) a razão entre o sinal e o ruído (S/R) de três vezes, o LD desse sistema foi de 0,641, 0,959, 0,542 e 1,877 fmol para bradicinina, bradicinina 1-6, bradicinina 1-5 e bradicinina 1-3 respectivamente. A utilização do LED azul e a detecção dos analitos marcados com FITC apresentaram uma sensibilidade muito boa, na ordem de *amol*, limite esse apenas conseguido com a utilização de laser no sistema de detecção.

O melhor limite de detecção obtido utilizando o LED azul e as amostras marcada com FITC pode ser explicado por dois motivos, primeiro por que o LED azul (λ_{470}) possui uma potência superior ao LED UV (λ_{370}) e segundo porque o rendimento quântico do FITC é superior ao da fluorescamina.

O detector também foi testado para operar em modo de detecção indireta de fluorescência induzida. A detecção indireta por absorbância ou por fluorescência surgiu em CE para a análise de analitos cuja propriedade de absorver ou emitir luz é muito pobre. Em 1967, Hjertén⁹ descreveu os conceitos de detecção indireta por absorbância em CE e a detecção por fluorescência indireta foi aplicada pela primeira vez em 1988 por Kurn & Yeung⁷⁶. O princípio de ambas as técnicas é o mesmo e consiste no deslocamento da sonda contida no tampão eletrólito (responsável pelo elevado sinal do background) pelo analito de interesse.

O desafio de se utilizar detecção por fluorescência indireta está em escolher a condição ideal para analisar a amostra de interesse. Considerando que o limite de detecção é dado por:

$$C_{LD} = \frac{[B]}{TR.DR} \quad 1$$

onde B é a sonda, DR é a razão do sinal da linha de base pelo ruído da mesma e o TR é quanto da sonda é deslocada pelo analito, que pode ser calculado por:

$$TR = -\frac{Z_A \mu_B [\mu_A + \mu_C]}{Z_B \mu_A [\mu_B + \mu_C]} [A] \quad 2$$

onde Z é a carga, A é o analito, e μ_A é a mobilidade eletroforética efetiva do analito, μ_B é a mobilidade eletroforética efetiva da sonda e μ_C é a mobilidade eletroforética efetiva do tampão. Por essas expressões temos que a concentração da sonda, ruído do detector e a concentração do tampão de corrida influenciam no limite de detecção e que uma variável é dependente da outra. Inicialmente foi determinada a faixa ideal do detector na qual a contribuição do ruído eletrônico fosse mínima (Figura 17).

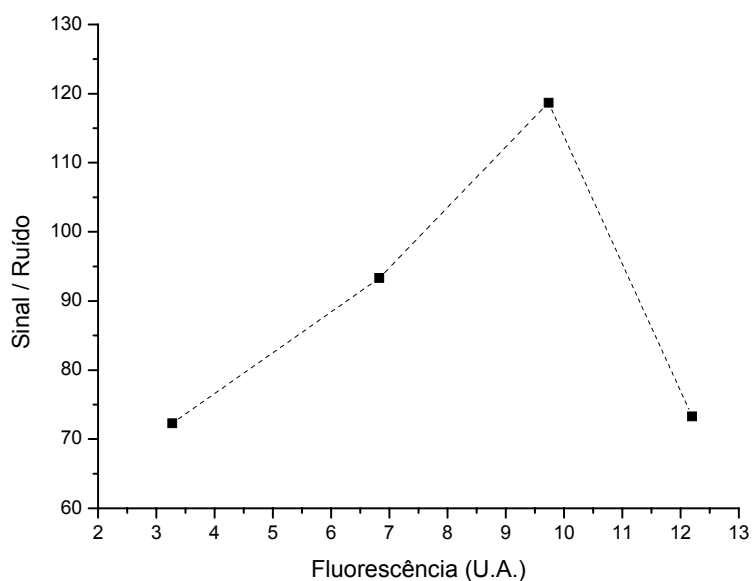


Figura 17 – Variação da razão do sinal de fluorescência pelo ruído no sinal da fluorescência.

O sinal de fluorescência apresentado na Figura 17 foi medido com a fonte de alta tensão do equipamento de CE desligada, evitando assim a medida de ruído oriundo da composição do eletrólito e variação térmica do mesmo. A concentração de fluoresceína foi fixada em 20 $\mu\text{mol/L}$ e variou-se o ganho da TFM e a melhor relação sinal/ruído (S/R) foi obtida quando o ganho da TFM fornece um sinal de fluorescência de 10 U.A. que foi fixada e utilizada em todos experimentos subsequentes.

O próximo passo foi a determinação da melhor concentração da sonda no tampão eletrólito. Para isso escolheu-se trabalhar com um tampão de corrida 10 mM de TAPS pH 8,4 e testou-se a concentração de fluoresceína em 50, 200, 500 e 1000 $\mu\text{mol/L}$ no tampão de corrida utilizando os dois padrões de aminoácidos como analitos (**Figura 18**).

A melhor relação S/R foi obtida utilizando 1 mM de fluoresceína no tampão de corrida. Com 50 $\mu\text{mol/L}$ o ruído da linha de base fica muito acentuado devido a diversos fatores, entre eles, baixas concentrações de sonda podem ser facilmente perturbadas pela migração de co-íons e contra-íons, sendo esse efeito minimizado em concentrações maiores de sonda.

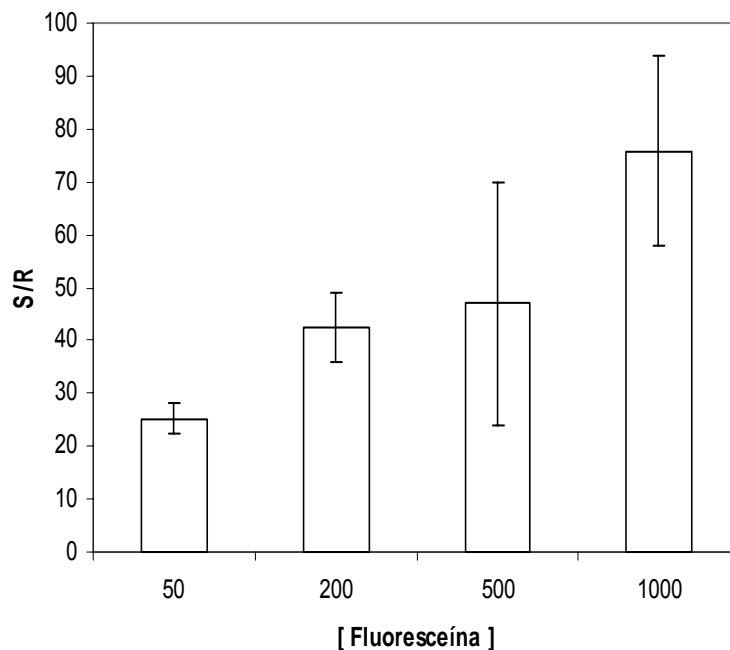


Figura 18 – Influência da concentração de fluoresceína na relação S/R na detecção por fluorescência indireta de ácido aspártico e ácido glutâmico em CE. Capilar com 50 μm de diâmetro interno, 48 cm de comprimento e 42 cm de comprimento efetivo. Tampão 10 mM de TAPS pH 8,4. Corridas a 15 kV, $i=12 \mu\text{A}$ e injeção eletrocinética, 5 segundos à 1 kV. Cada barra representa a média obtida para 4 corridas.

O passo seguinte foi a verificação do efeito da concentração do tampão eletrólito no limite de detecção, para isso utilizou-se as concentrações de 2, 10 e 20 mM de TAPS pH 8,4 com 1 mM de fluoresceína (**Figura 19**).

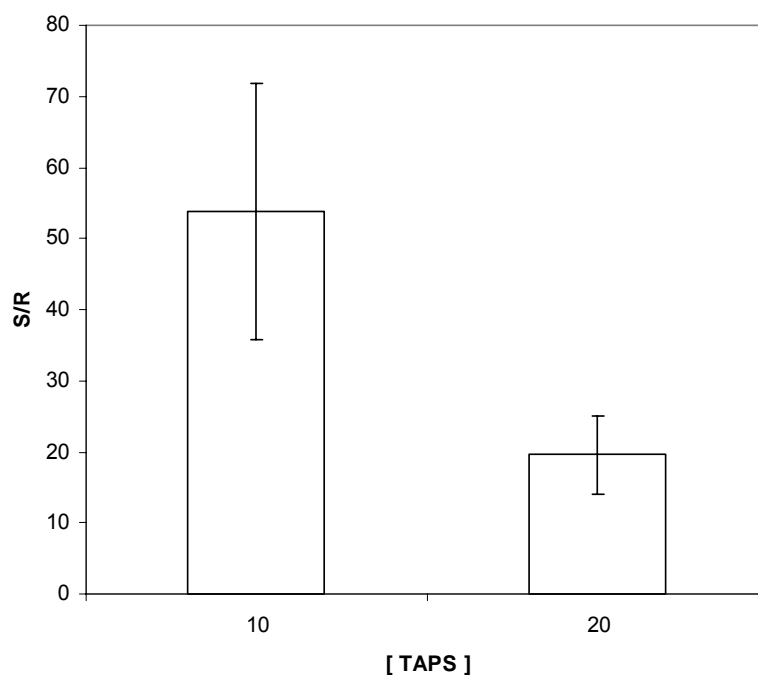


Figura 19 – Efeito da concentração do tampão eletrólito na relação S/R na detecção por fluorescência indireta de ácido aspártico e ácido glutâmico em CE. Tampão com 1 mM fluoresceína. Demais condições idênticas a Figura 18.

Com 2 mM de TAPS não se obteve um resultado satisfatório, não foi possível separar os analitos e a flutuação da linha de base foi muito grande. O melhor resultado foi obtido com 10 mM de TAPS com 1 mM de fluoresceína, S/R de 53,8 enquanto que com 20 mM de TAPS foi de 19,5. Foi observado que quanto menor a concentração do tampão eletrólito melhor é o limite de detecção em detecção por fluorescência indireta, por outro lado, a diminuição da concentração do tampão acarreta no empobrecimento da resolução. Com 20 mM a resolução entre o ácido aspártico e ácido glutâmico foi melhor, Porém o limite de detecção aumento em 2,7 vezes. A Figura 20 ilustra um eletroferograma obtido para ácido aspártico e ácido glutâmico em detecção por fluorescência indireta.

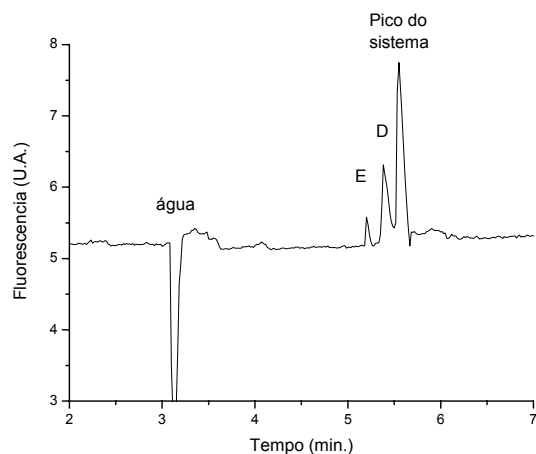


Figura 20 – Detecção por fluorescência indireta de ácido aspártico (D) e ácido glutâmico (E) em CE. Amostra 200 $\mu\text{mol/L}$ E e 400 $\mu\text{mol/L}$ D, outras condições de corrida iguais a Figura 18.

Depois de otimizado, o método permitiu atingir limites de detecção de 300 fmoles para os aminoácidos testados, limite esse que o torna aplicável para a análise de amostras biológicas. Essa metodologia permitiu a análise de compostos que não são facilmente marcados, como por exemplo, co-fatores de nicotinamida (Figura 21). Esses compostos participam de vários eventos do metabolismo celular, reações biosintéticas e eventos de sinalização celular, o que desperta um grande interesse em poder detectá-los com precisão e rapidez. Devido a alta instabilidade apresentada por esses co-fatores se faz necessário a utilização de métodos analíticos rápidos e com a mínima manipulação da amostra. Somado a isso, a ausência de grupos reativos fáceis nessas estruturas impede a realização de reações de marcação ou derivatização para que se possa detectá-las por fluorescência. Dentro desse contexto, o método de detecção por fluorescência

indireta que foi implementado e otimizado em nosso laboratório é indicado para analisar NADP e NADPH por CE.

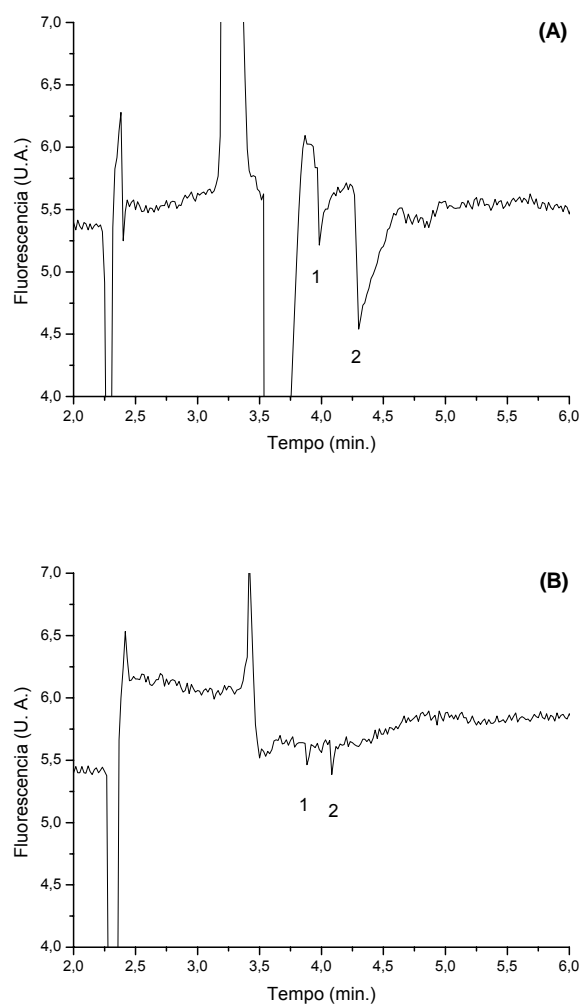


Figura 21 – Detecção de NADP¹ e NADPH² por detecção por fluorescência indireta. Capilar com 50 μm de diâmetro interno, 48 cm de comprimento e 42 cm de comprimento efetivo, 2,5 mM TAPS pH 8,4 com 250 $\mu\text{mol/L}$ Fluoresceína, $E = 312 \text{ V/cm}$, injeção a 1 kV por 30 segundos. **(A)** 500 $\mu\text{mol/L}$ de NADP e NADPH; **(B)** 50 $\mu\text{mol/L}$ de NADP e NADPH.

O limite de detecção para NADP e NADPH obtido nestas condições foi de 225 e 158 fmol respectivamente. O limite de detecção obtido para os co-fatores de nicotinamina foi melhor que o obtido para os aminoácidos. Esse melhor limite de detecção já era esperado, pois pelo TR (Equação 2) que é utilizado para calcular o limite de detecção teórico é uma função das mobilidades eletroforéticas dos íons do tampão, do analíto e da sonda, sendo as mobilidades eletroforéticas do NADP e NADPH mais próximas da mobilidade da fluoresceína do que a dos aminoácidos testados. Essa metodologia de detecção em conjunto com estratégias de pré-concentração de amostras permitirá a análise desses co-fatores em amostras biológicas.

5.1.2. Usando uma Placa de Som para Aquisição de Dados e Lock-in Emulado por Software para Tratamento de Sinais

Nesse trabalho, são comparados dois métodos de detecção de sinal e o que basicamente os distingue é que um integra uma janela do sinal enquanto o outro detecta o sinal em uma fase modulada por um sinal de referência. O primeiro tipo de detecção é tipicamente feita com uma janela de tempo que define o período onde tanto o ruído quanto o sinal irão ser detectados e posteriormente o ruído é subtraído do sinal utilizando a leitura do sinal de fundo. Isto é feito por equipamentos chamados BOXCAR e também pode ser implementado em osciloscópios e placas conversoras de sinal analógico para digital (A/D). A algumas desvantagens nesse tipo de tratamento de sinal, por exemplo, se a

relação sinal ruído é baixa, a subtração do sinal de fundo não permitirá a separação do sinal. O segundo tipo utiliza um amplificador Lock-in que é projetado para uma medida precisa de sinais modulados.

Placas de aquisição de dados e amplificadores Lock-in estão entre os componentes mais caros de um sistema de detecção. Atualmente, todo PC possui uma placa de som e em muitos casos é integrada com a própria placa mãe. Por outro lado, uma placa de som PCI e de 10 a 100 vezes mais barata que uma placa de aquisição de dados tradicional. As placas de som possuem conversores analógico para digital e digital para analógico com resolução de 16 bits ou 24 bits. Essa resolução torna as placas de som muito interessantes para serem usadas em sistemas de aquisição de dados de baixo custo e apropriadas para aplicações de baixa frequência.

Lock-ins e Boxcars são utilizados com frequência na detecção de sinais com baixa intensidade em meio a alto ruído. Dessa forma, uma rotina escrita em Labview (LabVIEW 7 Express, v. 7.0, National Instruments) que emula um Lock-in junto com uma placa de som parece ser muito interessante em sistemas de aquisição de dados em CE. No presente trabalho foi testado o desempenho desse sistema e comparado com um sistema tradicional. A Figura 22 mostra um esquema de amplificador Lock-in.

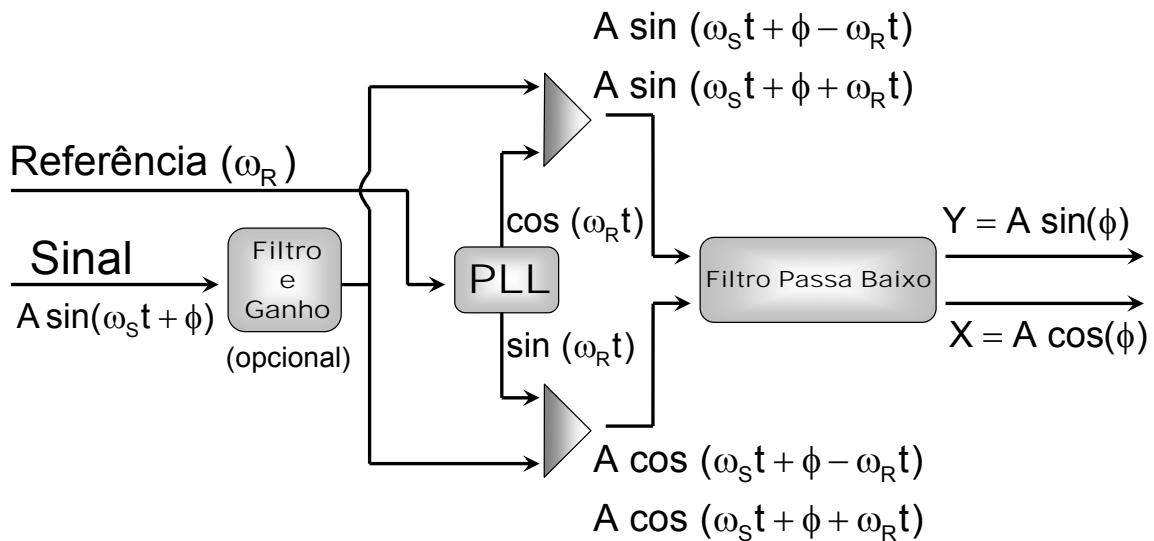


Figura 22 – Diagrama esquemático de um amplificador Lock-in.

Um amplificador Lock-in basicamente trabalha extraindo informações de frequência e fase do sinal de referência e gerando uma onda harmônica pura. Essa função é realizada pelo PLL (do inglês “phase-locked loop”) digital do circuito, o qual nesse trabalho foi emulado por uma rotina do programa. Esta onda harmônica é combinada com o sinal pré-amplificado e pré-filtrado. Para cada componente no sinal de entrada, o processo de mixagem gera duas componentes na saída: uma com a frequência igual a diferença entre as frequências do sinal de referência e a componente do sinal ($\omega_R - \omega_S$) e o outro igual a soma das duas frequências ($\omega_R + \omega_S$). Desde que o sinal e a referência interna tenham a mesma frequência, para uma fase específica, a diferença será um sinal DC. Isto é usualmente chamado de componente X e é proporcional a fase relativa da referência interna ($\cos \theta$) e a amplitude do sinal. Um filtro passa baixo, tão estreito quanto 1 MHz, permitirá passar o sinal, mas a soma $\omega_R + \omega_S$ irá ser filtrada. Se o

processo de filtragem e mixagem é realizado em quadratura, então usando o cosseno da onda com frequência ω_R que resulta a componente Y e é proporcional ao $\sin \theta$, a componente Y poderá ser extraída independentemente da componente X. Em um amplificador Lock-in, a medida e comparação destas duas componentes permitirá a determinação da amplitude e a fase relativa do sinal.

Amostras contendo 1, 2, 4 e 6 $\mu\text{mol/L}$ de tirozina e alanina derivatizadas com NDA foram utilizadas para determinar o limite de detecção dos dois sistemas. Os resultados são mostrados na Figura 23.

Considerando a definição do LD como a concentração que produz S/R igual a 3, o LD no sistema A foi de 9,1 e 10,6 fmol para tirozina e alanina respectivamente, enquanto que para o sistema B esses valores foram 3,3 e 3,5 respectivamente. Dessa forma, o sistema B demonstrou ser cerca de 3 vezes melhor que o sistema A nesse experimento (Figura 24). Estes resultados demonstraram que o Lock-in emulado por software em conjunto com uma placa de som possui um desempenho tão bom, ou melhor, quanto ao desempenho do sistema de aquisição de dados convencional.

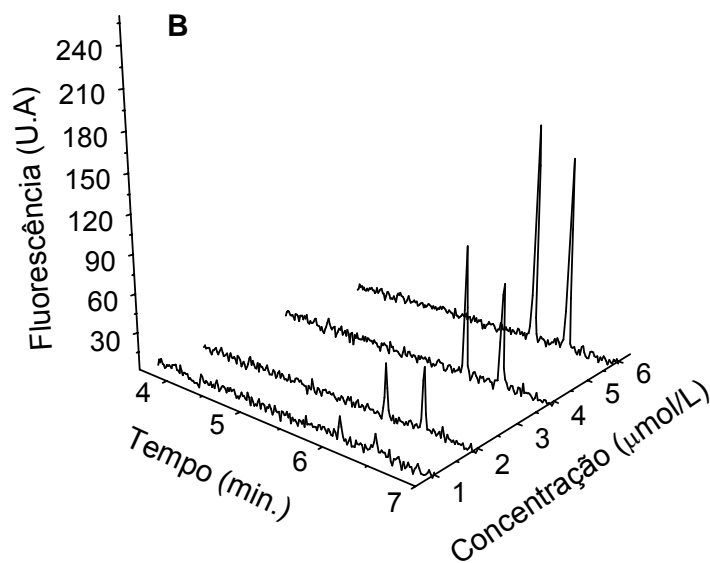
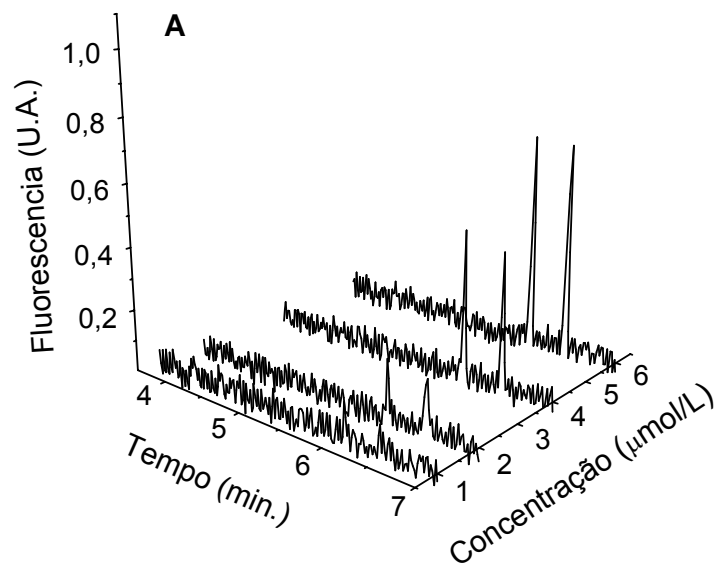


Figura 23 – Diluição das amostras de alanina e tirosina até o limite de detecção. A Figura 23A mostra os resultados obtidos no sistema A e na Figura 23B os resultados obtidos no sistema B. As amostras foram injetadas por 30 segundos a 1 kV.

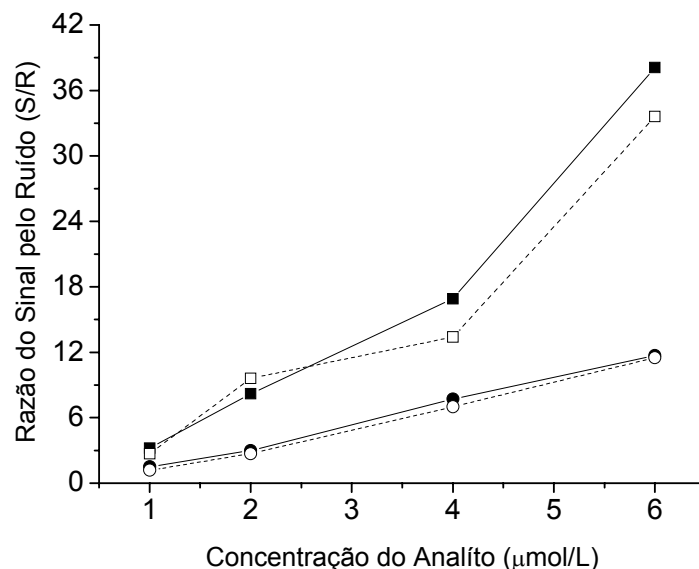


Figura 24 – Razão do sinal pelo ruído da tirosina/NDA (símbolos abertos) e alanina/NDA (símbolos fechados) em função da concentração medida no sistema A (círculos) e no sistema B (quadrados).

Em geral, a melhora da S/R está relacionada a dois aspectos: a resolução do A/D e o mecanismo de detecção de fase intrínseco do Lock-in⁷⁷. A resolução do Lock-in pode ser estimada pela resolução da placa A/D. No caso da placa de som com um A/D de 16 bits, a pior S/R que pode ser medida é em torno de 48 dB. Devido a alta resolução da placa de som do computador e a capacidade do Lock-in emulado por software realizar as medidas em fase, baixo LD são conseguidos. Dentro deste contexto, o uso de placas A/D com resolução elevada e alta taxa de amostragem permitirá atingir melhores LD. Essa situação é especialmente verdadeira onde ruídos intensos estão presentes, por exemplo, quando a escala do A/D está saturada, uma unidade de sinal em um A/D de 24 bits (um em 2^{24}) dificilmente será detectada em um A/D de 16 bits (um em 2^{16})

porque o A/D não possui resolução suficiente para detectar um sinal dessa intensidade. No caso do sistema aqui apresentado, a resolução do A/D não tem um papel tão importante porque o ruído no sistema não é intenso.

A taxa de amostragem é outro parâmetro importante que deve ser otimizada de maneira a se atingir a S/R máxima. De acordo com o teorema de Nyquist⁷⁸, a taxa de amostragem deve ser pelo menos duas vezes maior que a frequência observada no sinal. Nas medidas realizadas neste trabalho, a taxa de repetição do sinal (pulso de LED) tem uma frequência 0,5 kHz, dessa forma taxa de amostragem de pelo menos 1,0 kHz deveria ser usada. No entanto, a placa de som utilizada possui apenas quatro frequências disponíveis: 8, 11, 22 e 44 kHz. Na configuração do equipamento usado neste trabalho, uma taxa de amostragem de 8 kHz foi utilizada.

A placa de som mostrou ser uma boa alternativa em relação a placa de aquisição de dados convencionais. Quando utilizada para detectar baixas concentrações dos analitos, o sistema B exibiu uma excelente linearidade, com os valores de coeficiente de correlação da regressão linear superiores a 0,974 para a altura e área dos picos apresentados no eletroferograma da Figura 23. O coeficiente de variação das 4 corridas para cada um dos pontos foi menor que 5%, o que demonstra que a utilização da placa de som com o Lock-in emulado pode substituir os sistemas tradicionais de aquisição de dados.

Outro ponto investigado foi a faixa de resposta linear da placa de som utilizada. Para isso o LED UV foi substituído por um LED azul e fluoresceína foi utilizada como analito. A fluoresceína foi escolhida para esse ensaio para evitar os

problemas de estabilidade e solubilidade freqüentemente apresentados pelos aminoácidos derivatizados com NDA em concentrações elevadas.

A placa de som apresentou uma resposta linear na faixa de 20 a 200 $\mu\text{mol/L}$, enquanto o sistema com integrador de tempo (sistema A) exibiu uma resposta linear na faixa de 20 a 150 $\mu\text{mol/L}$ (Figura 25).

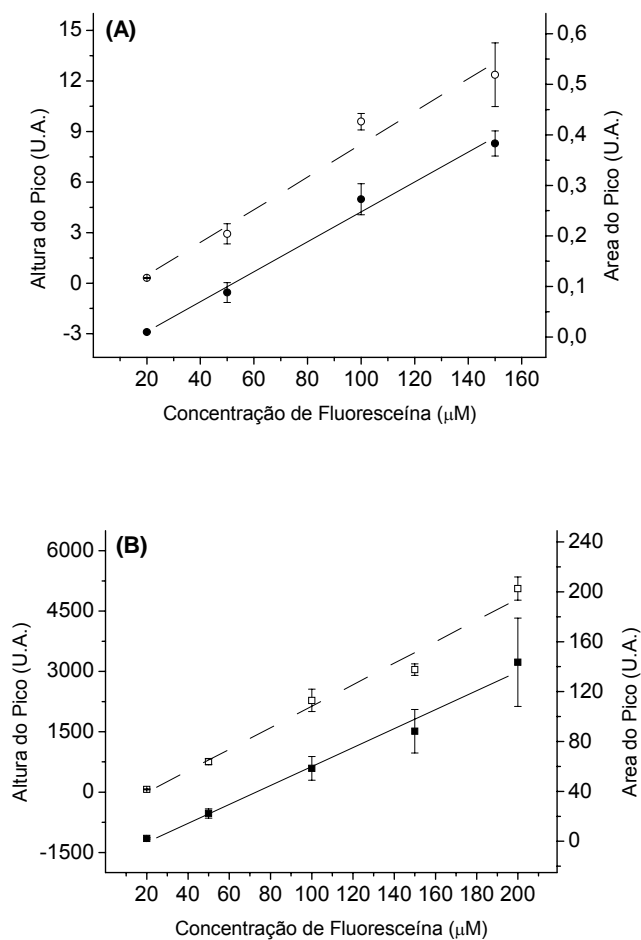


Figura 25 – Curva de calibração para fluoresceína para altura de pico (símbolos abertos) e área de pico (símbolos fechado). (A) sistema A; (B) sistema B. Valores médios de 4 repetições ($n=4$).

Faixas de concentração de fluoresceína de 20 a 300 $\mu\text{mol/L}$ foram utilizadas para a verificação da linearidade dos dois sistemas. Os resultados com

os valores da regressão linear calculada para todas as medidas realizadas estão reunidos na Tabela 10.

Tabela 10 – Dados da regressão linear para quatro faixas de concentração de fluoresceína obtidas pelos dois sistemas.

FCF ^{a)} ($\mu\text{mol/L}$)	Altura do Pico		Area do Pico	
	Sistema A	Sistema B	Sistema A	Sistema B
20-150	0.972	0.981	0.989	0.998
20-200	n.d. ^{b)}	0.982	n.d. ^{b)}	0.987
20-250	n.d. ^{b)}	0.955	n.d. ^{b)}	0.969
20-300	n.d. ^{b)}	0.762	n.d. ^{b)}	0.864

a) Faixas de concentração de fluoresceína

b) Dados não disponíveis (saturação do sinal analógico)

A faixa de linearidade apresentada pela placa de som com o Lock-in emulado (sistema B) foi superior a do sistema de aquisição de dados convencional (sistema A). Esse resultado qualifica o novo sistema desenvolvido a ser utilizado em análises tanto qualitativas quanto quantitativas em CE, como por exemplo, os resultados apresentados nas Figura 26 e Figura 27.

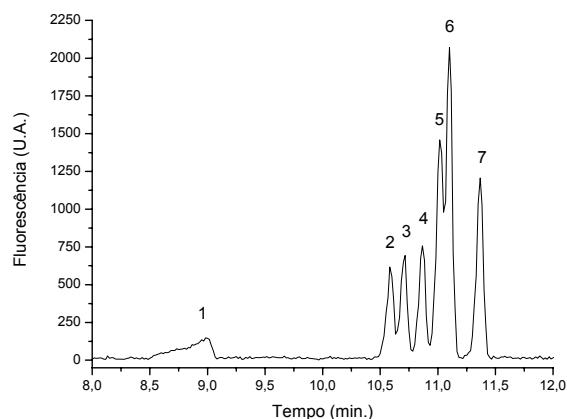


Figura 26 – Separação de padrões de bradicinina. Amostra: 6,5 μM de BK1-9¹, BK1-8², BK1-7³, BK1-6⁴, BK1-5⁵, BK6-9⁶ e BK 1-3⁷ derivatizados com fluorescamina. Tampão de corrida: 100 mM de TAPS pH 9,5. E=195 v/cm, injeção por uma diferença de nível de 11 cm por 30 segundos.

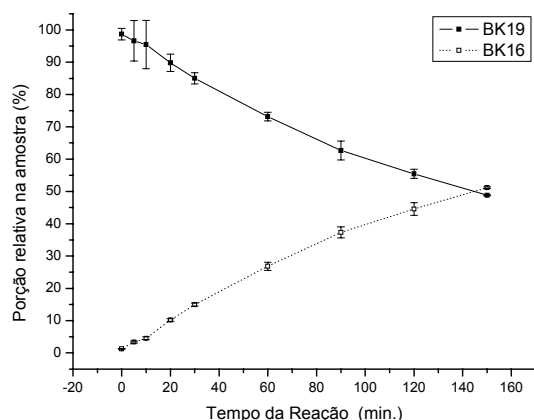


Figura 27 – Cinética de hidrólise da bradicinina. Cada ponto é a média de 3 corridas. Condições de separação iguais as da Figura 26.

A Figura 27 é o resultado da análise de bradicinina encubada com o extrato celular de um patógeno. A bradicinina é um peptídeo bioativo que possui 9 aminoácidos (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) e está envolvida na resposta de processos inflamatórios. O novo sistema de detecção e aquisição de dados foi

utilizado para a determinação do ponto onde a BK é hidrolisada bem como a determinação da cinética dessa reação. Cada ponto da curva apresentada na Figura 27 é a média da área do pico de BK e do fragmento de BK 1-6 expresso em valores relativos do total dos dois analitos.

5.2. Pré-Concentração em Linha Através de Gradientes

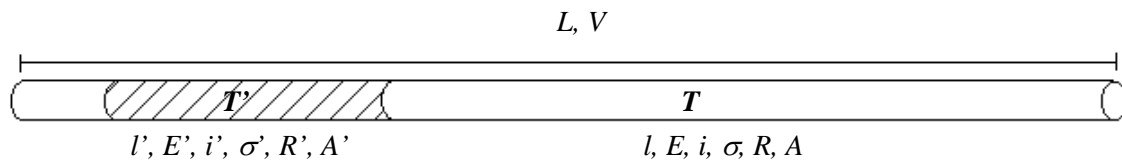
Térmicos

A possibilidade de comprimir bandas no começo das corridas de CE tem muitas vantagens. Em primeiro lugar permite a análise de amostras muito diluídas. Esse é um procedimento simples para superar a baixa sensibilidade de alguns sistemas de detecção. Além disso, permite analisar analitos de concentrações extremamente baixas nos sistemas de detecção mais sensíveis. Finalmente, às vezes é necessário injetar amostras com desvio padrão muito baixo e obter alta resolução entre as bandas em um tempo de corrida mais curto, por exemplo, sequenciamento de DNA e outras aplicações. Nestes casos, a compressão se torna uma ferramenta extremamente valiosa.

Muitos trabalhos de pré-concentração têm sido desenvolvidos. Os procedimentos de compressão de bandas descritos podem chegar a aumentar a detecção em uma ordem de até 1000 vezes. Porém possuem algumas desvantagens, por exemplo, descontinuidade dos tampões, pouca praticidade em alguns casos e muitas vezes pouca reprodutibilidade. Dentro deste contexto, a possibilidade de compressão de bandas através dos efeitos de junção térmica seria vantajosa.

5.2.1. Tratamento teórico

Um modelo teórico inicialmente desenvolvido por este grupo de pesquisa pretendia prever a taxa de compressão das bandas que se poderia obter quando aplicado um gradiente térmico em CE. Considerando um capilar com recobrimento interno para suprimir o fluxo eletroosmótico, pois o seu efeito não é tratado pelo modelo, com uma zona de troca térmica (esquema abaixo) temos:



onde, a porção marcada do capilar é a zona de troca térmica (T'), l e l' são os comprimentos das zonas onde são aplicadas, respectivamente as temperaturas T e T' . E e E' são os campos elétrico, i e i' são as correntes elétrica, σ e σ' são as condutividades elétricas, R e R' são as resistências elétricas e A e A' são as áreas transversais do capilar. Utilizando esses parâmetros, pela lei de Ohm é válido afirmar que:

$$i = i' \quad 1$$

$$A = A' \quad 2$$

$$l + l' = L \quad 3$$

$$El + E'l' = V \quad 4$$

$$R = \frac{l}{A\sigma} \text{ e } R' = \frac{l'}{A'\sigma'} \quad 5$$

portanto, usando 1 e 5 obtemos

$$\frac{El}{\left(\frac{l}{A\sigma}\right)} = \frac{E'l'}{\left(\frac{l'}{A'\sigma'}\right)} \quad 6$$

e

$$E = \frac{\sigma'E'}{\sigma} \text{ e } E' = \frac{\sigma E}{\sigma'}, \quad 7$$

utilizando 4 e 7 resulta em

$$\left(\frac{\sigma E}{\sigma'}\right)l' + El = V \quad 8$$

portanto,

$$E = \frac{\sigma'V}{\sigma l' + \sigma' l} \text{ e } E' = \frac{\sigma V}{\sigma l' + \sigma' l} \quad 9$$

Estas expressões somente são validas quando desprezamos o efeito de fronteiras móveis⁷⁹. Para a validação destas expressões, devem ser aplicados os seguintes limites:

$$\lim_{\sigma \rightarrow 0} E = \frac{V}{l} \quad 10$$

$$\lim_{\sigma \rightarrow \infty} E = 0 \quad 11$$

$$\lim_{\sigma \rightarrow \sigma'} E = \frac{V}{l + l'} \quad 12$$

Calculando o efeito da temperatura na viscosidade. A viscosidade da água pura a uma temperatura T ($f(T)$) é dada por:

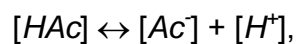
$$f_1(T) = \frac{1301}{998,333 + 8,1855(T - 20) + 0,00585(T - 20)^2} \quad 13$$

$$f_2(T) = \frac{1,3272(20 - T) - 0,001053(T - 20)^2}{T + 105} \quad 14$$

finalmente, tem-se

$$\eta_{(T)} = \begin{cases} 10^{f_1(T) - 4,30233} & \text{se } 0^\circ\text{C} < T \leq 20^\circ\text{C} \\ 1,002 \cdot 10^{f_2(T) - 3} & \text{se } 0^\circ\text{C} \leq T < 20^\circ\text{C} \end{cases} \quad 15$$

Supondo um anáfito ácido que se dissocia da seguinte maneira



com uma constante de dissociação K definida por

$$K = \frac{[Ac^-][H^+]}{[HAc]} \quad 16$$

onde [] são as atividades molares que vamos supor iguais a concentração molar.

Vamos supor uma banda que se encontra num meio homogêneo e temperatura constante (T), neste caso o valor médio da carga do analito vai ser:

$$q \cong \frac{e[Ac^-]}{[Ac^-]+[HAc]} = \frac{e}{1 + \frac{[HAc]}{[Ac^-]}} \quad 17$$

usando 16 e 17 temos que

$$q = \frac{e}{1 + \frac{[H^+]}{K}} = \frac{e}{1 + 10^{pK - pH(T)}} \quad 18$$

Portanto, usando 9, 18 e $\eta(T)$ temos que a razão entre a velocidade eletroforética na temperatura T' ($Ve_{(T')}$) e a velocidade eletroforética na temperatura T ($Ve_{(T)}$) é dada por

$$\frac{Ve_{(T')}}{Ve_{(T)}} = \frac{[1 + 10^{pK - pH(T')}] \sigma_{(T')} \eta_{(T')}}{[1 + 10^{pK - pH(T)}] \sigma_{(T)} \eta_{(T)}} \quad 19$$

Pela expressão 19 podemos calcular a taxa de compressão de banda esperada em CE que é dada por $\frac{Ve_{(T')}}{Ve_{(T)}}$. Essa equação, no entanto, negligencia a variação do pK dos grupos funcionais em função da temperatura (Tabela 8). Portanto, podemos reescrever 19 colocando o pK em função de T e T' :

$$\frac{Ve_{(T)}}{Ve_{(T)}} = \frac{[1 + 10^{pK_{(T)} - pH_{(T)}}] \sigma_{(T)} \eta_{(T)}}{[1 + 10^{pK_{(T)} - pH_{(T)}}] \sigma_{(T)} \eta_{(T)}} \quad 20$$

5.2.2. Tratamento experimental

Para comprovar experimentalmente o efeito de compressão de bandas por meio de junções térmicas utilizou-se lisina como analito modelo. A escolha da lisina se deu por ela possuir uma amina na cadeia lateral cujo pK teórico é igual a 10,5. Pela lei da dissociação de ácidos e bases, a lisina em um meio com pH igual a 10, tem 100% das espécies protonadas, portanto com uma carga positiva e em um meio com pH igual a 11, 100% das espécies estariam desprotonadas, portanto com uma carga nula. Considerando que a lisina é derivatizada com NDA (Lys/NDA), o qual não possui carga e reage com a amina primária do amino ácido, a carga líquida da Lys/NDA pode variar na faixa de -1 a 1, Porém para este trabalho a faixa de variação da carga líquida da Lys/NDA ficou em -1 a 0, pois as corridas foram realizadas em meio alcalino, no qual a carboxila do aminoácido está sempre desprotonada e portanto contribui com uma carga negativa. Essa variação da carga do analito é desejável, uma vez que a mobilidade eletroforética é uma função direta da carga.

Para determinar o pK da amina lateral da Lys/NDA, foi medida a mobilidade eletroforética deste analito na faixa de pH de 7,0 a 10,5 (Figura 28).

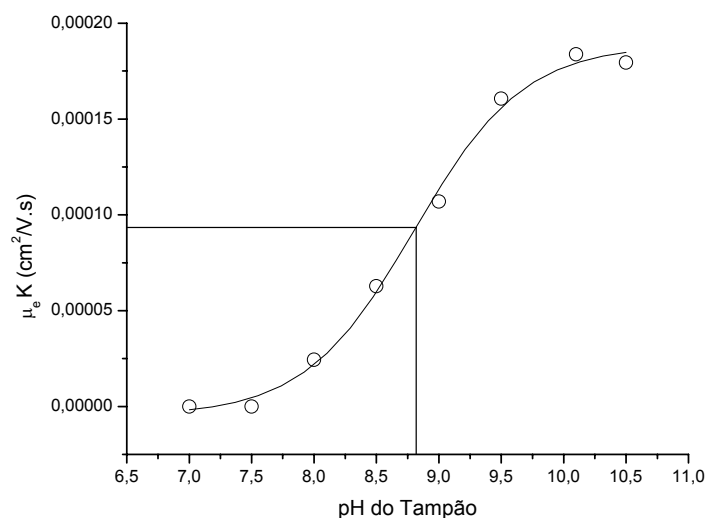


Figura 28 – Mobilidade eletroforética da Lys/NDA em diferentes pH. Os tampões utilizados nas corridas possuem baixa capacidade térmica e estão indicados na Tabela 9.

Pelos dados da Figura 28 pode-se constatar que a constante de ionização da Lys/NDA é 8,8. Verificou-se também a mobilidade eletroforética da Lys/NDA quando as corridas são realizadas em tampões de alto e baixo coeficiente térmico e em três temperaturas: 2, 25 e 60 °C (Figura 29).

Na Figura 29 foram utilizados os valores da mobilidade eletroforética da Lys/NDA descontando a contribuição da viscosidade nas diferentes temperaturas. Para fazer essa normalização, serina derivatizada com NDA (Ser/NDA) foi utilizada como padrão interno. A serina foi escolhida por ser um aminoácido de cadeia lateral neutra, portanto a carga líquida da Ser/NDA é sempre -1 na faixa de pH onde foi realizado o estudo. A mobilidade eletroforética medida nas temperatura de 2 e 60°C foi normalizada utilizando a razão da μ_e da Ser/NDA a

25°C pela μ_e da Ser/NDA a 2°C e a razão da μ_e da Ser/NDA a 60°C pela μ_e da Ser/NDA a 25°C respectivamente.

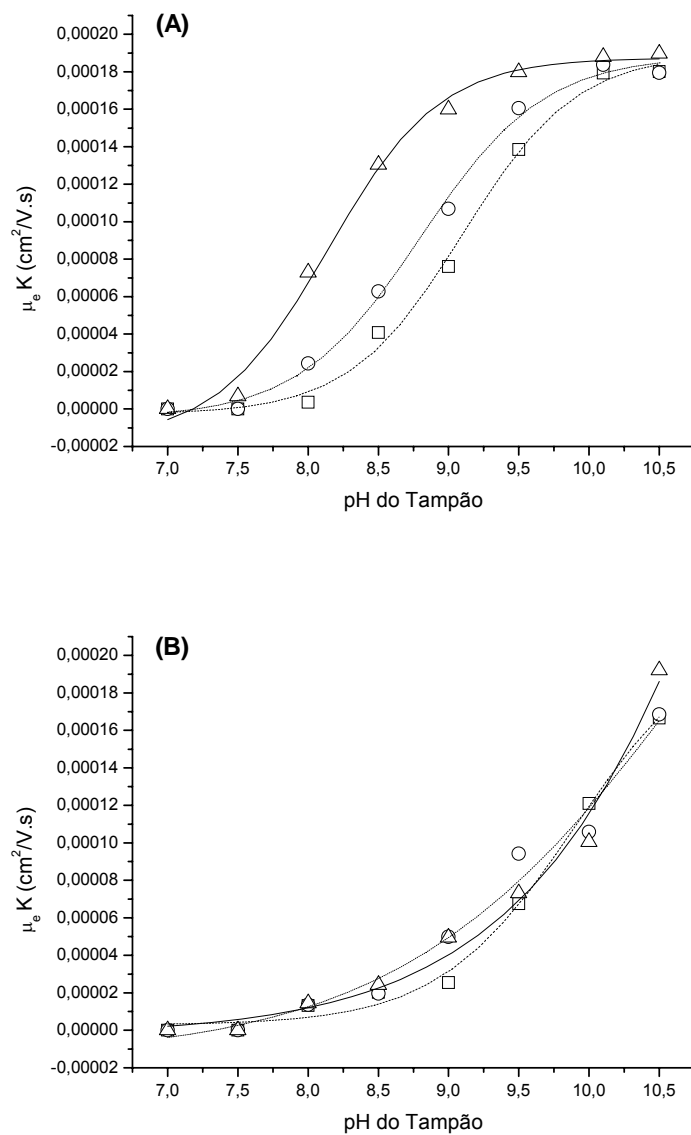


Figura 29 – Mobilidade eletroforética da Lys/NDA na faixa de pH de 7,0 a 10,5 nas temperaturas de 2°C (quadrado), 25°C (círculo) e 60°C (triângulo) em tampões de baixo (A) e alto (B) coeficiente térmico. Os tampões utilizados estão indicados na Tabela 9.

A Figura 29 (A) mostra que a mobilidade eletroforética da Lys/NDA varia em função da temperatura quando o tampão não muda seu pH com a temperatura. Isso indica que a constante de ionização da amina da cadeia lateral da Lys/NDA é dependente da temperatura, comportamento esse abordado por Huang & Pawliszin (2002)⁷¹. Na Figura 29 (B) a mobilidade eletroforética da Lys/NDA foi medida em tampões com alto coeficiente térmico e pode-se constatar que a μ_e da Lys/NDA não variou com a mudança de temperatura. O coeficiente térmico dos tampões utilizados na Figura 29 (B) é $-0,028$ un. pH/°C, como a μ_e da Lys/NDA não alterou com a temperatura, é válido afirmar que a constante de ionização da amina da cadeia lateral da Lys/NDA varia na mesma proporção que o coeficiente térmico dos tampões utilizados.

Sendo $T = 60$ °C e $T' = 5$ °C e utilizando: pK da Lys/NDA é igual a 8,8 e varia $-0,028$ un. pH/°C, as $\sigma_{(T)}$ e $\sigma_{(T')}$ medidas para o tampão Tris e borato, e as $\eta_{(T)}$ e $\eta_{(T')}$ calculadas para água, podemos estimar o valor teórico da compressão térmica utilizando a Equação 20 em função do pH do meio (Figura 30). Com Base nos resultados apresentados na Figura 29 também podemos estimar a taxa de compressão de bandas pela razão das mobilidades eletroforéticas mediadas a 60°C e 2°C (Figura 31).

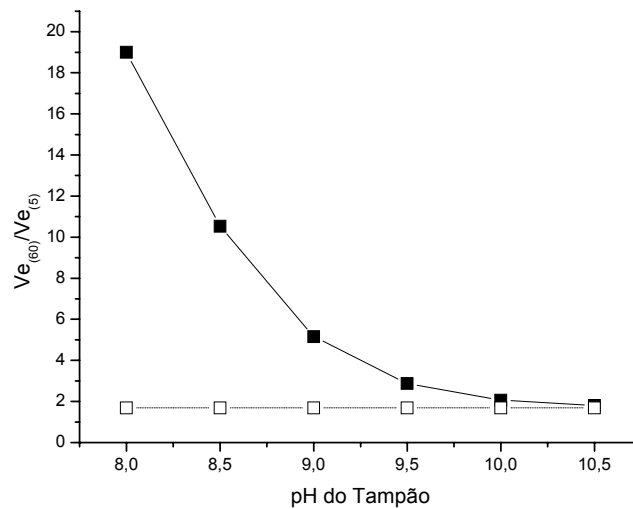


Figura 30 – Taxa de compressão de banda calculada pela Equação 20 para os tampões Tris (símbolo aberto) e Borato (símbolo fechado).

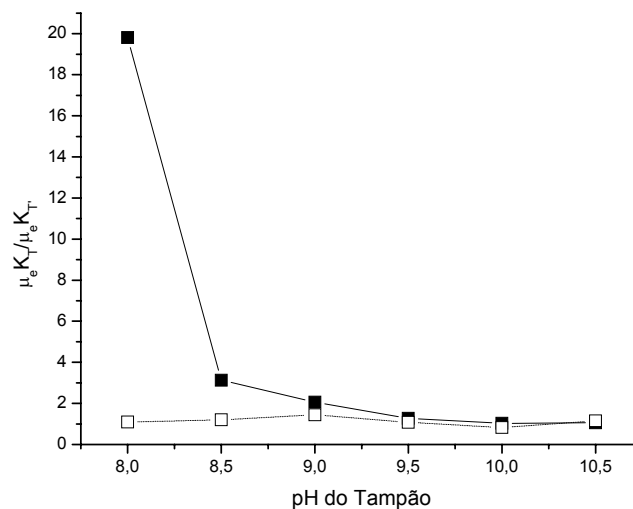


Figura 31 - Taxa de compressão de banda estimada pela razão das mobilidades eletroforéticas medidas a 60°C e 2°C utilizando os dados apresentados na Figura 29. Tampões com alto coeficiente térmico (símbolo aberto) e tampões com baixo coeficiente térmico (símbolo fechado).

Comparando os resultados apresentados na Figura 30 e Figura 31 podemos validar o modelo teórico apresentado no sub-item anterior, podendo

assim utilizá-lo em simulações que auxiliam no planejamento experimental para aplicar o efeito de compressão de bandas em junções térmicas. Pelos resultados da Figura 30 e Figura 31 podemos ver que a compressão de banda não ocorre para a Lys/NDA em tampões com alto coeficiente térmico, isso se dá pelo fato da dependência térmica do pK da amina da cadeia lateral da Lys/NDA que acaba variando na mesma proporção que varia o pH do tampão. Quando o pH do tampão não varia em função da temperatura, a variação do pK da Lys/NDA é suficiente para variar a mobilidade eletroforética do analíto.

Com base nesses resultados o passo seguinte foi aplicar o gradiente térmico em uma corrida. Para isso utilizou-se Ser/NDA como padrão interno e Lys/NDA como analito modelo. As corridas foram realizadas utilizando tampão borato nos pH 9,0 e 8,7 em um capilar revestido internamente para suprimir o FEO. O resultado pode ser visto na Figura 32.

Na Figura 32 (A e B) as corridas foram realizadas em pH 9,0. Em A as regiões *b* e *c* do capilar permaneceram a 25 °C durante toda corrida. Em B as regiões *b* e *c* do capilar permaneceram a 25 °C nos 10 primeiros minutos da corrida, após esse período as temperaturas nas duas regiões foi trocada para 60 °C e 2 °C, respectivamente. Esse gradiente foi mantido por 6 minutos e a temperatura do capilar foi trocada novamente para 25 °C nas duas regiões.

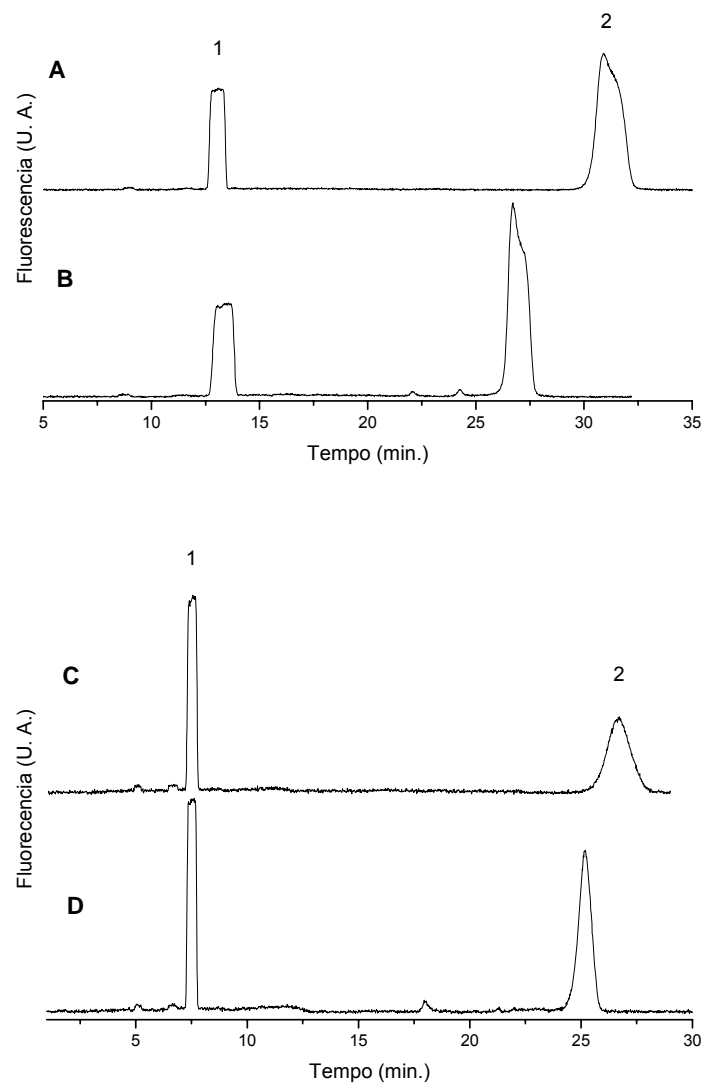


Figura 32 – Compressão térmica da banda da Lys/NDA. A injeção da amostra foi realizada por uma diferença de nível de 11 cm por um período de 60 segundos. 1 – Ser/NDA; 2 – Lys/NDA; A e B – corridas realizadas em 20 mM Borato pH 9,0 com um $E = 300\text{V/cm}$. C e D – corridas realizadas em 20 mM Borato pH 8,7 com um $E = 500\text{ V/cm}$. Em A e C a temperatura foi de 25°C durante toda corridas e em B e D foi aplicado o gradiente térmico com 2°C e 60°C nas regiões *b* e *c* do capilar respectivamente.

Esse tratamento térmico resultou em um aumento na altura do pico de 1,6 vezes e uma compressão da largura do pico de 2 vezes. Nas corridas mostradas na Figura 32 (C e D) o mesmo tratamento térmico foi aplicado. Utilizou-se o tampão no pH 8,7 e o campo elétrico passou de 300 V/cm para 500 V/cm para manter o tempo de migração semelhante, uma vez que a mobilidade eletroforética da Lys/NDA nesse pH diminuiu. Como resultado obteve um aumento de 2 vezes na altura do pico e uma compressão na largura do pico 2,5 vezes.

Esses resultados comprovam que a compressão de bandas por gradientes térmicos pode ser aplicada para o aumento da sensibilidade e resolução em uma corrida em CE ou em micro canais.

O método de compressão de bandas por gradientes térmicos abre um novo leque de aplicações. Pode ser aplicado, por exemplo, para todos os aminoácidos se a detecção for realizada sem a necessidade de derivatização da amina primária. Peptídeos e ou polipeptídeos podem ser comprimidos ou até mesmo focalizados considerando os parâmetros: tipo de tampão (alto ou baixo coeficiente térmico), pH do meio tamponante e variação do ponto isoelétrico do analito com a temperatura.

Esse efeito também pode ser multiplicado graças à possibilidade de automação de um equipamento de CE. Se ao longo de um capilar ao invés de apenas uma junção térmica (como apresentado neste trabalho) o mesmo possuir n junções térmicas a compressão final será multiplicada por n .

6. Conclusão

O sistema de detecção por fluorescência induzida por LED apresenta uma sensibilidade elevada. Além da sensibilidade, a utilização de LEDs torna o sistema de detecção bem flexível, podendo ser utilizado para excitar amostras em diferentes comprimentos de onda, do UV ao infravermelho. E por último, a redução do custo do sistema de detecção, uma vez que um LED custa 1 à 5 dólares e um laser custa de 3.000 à 30.000.

O sistema de aquisição de dados pela placa de som do PC com um Lock-in emulado por software apresentou um bom desempenho e capacidade para substituir o sistema de tratamento de sinal (Boxcar) e a placa de aquisição de dados convencional em sistemas de detecção em CE. Este novo sistema mostrou ser mais sensível que o sistema convencional e possui uma ampla faixa linear de detecção em concentração. Somado a isso, esse sistema é pelo menos 100 vezes mais barato que os sistemas convencionais, além de simplificar o equipamento e torná-lo mais fácil de operar. E por fim, considerando que neste trabalho foram utilizados um A/D com uma resolução de 16 Bits e uma taxa de amostragem máxima de 44 KHz, é possível melhorar o desempenho do sistema utilizando um A/D com resolução de 24 Bits ou maior e com taxas de amostragens de 96 KHz ou maiores.

O método de compressão de banda por gradientes térmicos apresentado neste trabalho é uma nova opção para aumentar a sensibilidade e a resolução em CE. A aproximação teórica desenvolvida nesse trabalho é uma

ferramenta valiosa para o planejamento experimental, podendo ser integrada em programas de simulação de corridas em CE. Ao contrário dos métodos clássicos de pré-concentração, esse novo método pode ser aplicado em amostras tanto com alta ou baixa condutividade iônica, comprimir bandas de analitos aniônicos ou catiônicos e ser aplicado em corridas em solução livre ou não. Além disso, considerando que o controle de temperatura seja realizado de maneira automatizada, pode apresentar altas taxas de reprodutibilidade, além de ser simples e de fácil aplicação, podendo ser empregado em análises de rotina.

7. Referencia Bibliográficas

-
- 1 - Robert, E. A., Iland, P. G., Tate, M. E. & Jones, G. P.; *Anal. Biochem.* 318, 291–299 (2003).
 - 2 - Karir, T., Pal, N. & Sivaprasad, N.; *J. Radioanal. Nucl. Ch.*, 256, 127–131 (2003).
 - 3 - Shi, H.-P. & Kintzios, S.; *Plant Cell Rep.*, 21, 1103-1107 (2003).
 - 4 - Devi, P. & Rani. S.; *Sci Hortic-Amsterdam*, 93, 179-186 (2002).
 - 5 - Tewari, B. B.; *Main Group Met. Chem.*, 27, 145-153 (2004).
 - 6 - Tewari, B. B.; *J. Chromatogr. A*, 962, 233–237 (2002)
 - 7 - Swank, R. T. & Munkers, K. D.; *Anal. Biochem.*, 39, 462 (1971).
 - 8 - Southern, E. M.; *J. Mol. Biol.*, 98, 503-& (1975).
 - 9 - Hjerten, S.; *Chromatography, Rev.* 9, 122, (1967).
 - 10 - Carmelleri, P.; *Capillary Electrophoresis – Theory and Practice.* CRC Press LLC, 2° ed., Boca Raton, Florida, 1998.
 - 11 - Mikkers, F. E. P., Everaerts, F. M. & Verheggen, T. P. E. M.; *J. Chromatogr.*, 169, 11, (1979).
 - 12 - Jorgenson, J. W. & Lukacs, K. D.; *Anal. Chem.* 53, 1298, (1981).

-
- 13 - Jorgenson, J. W. & Lukacs, K. D.; *J. CHROMATOGR.*, 218, 209-216 (1981).
- 14 Jorgenson, J. W. & Lukacs, K. D., *Science*, 222, 266 (1983).
- 15 - Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, K., Tsuchiya, A. & Ando, T.; *Anal. Chem.*, 56, 111-113 (1984).
- 16 - Hillebrand S, Schoffen, J. R., Mandaji, M., Termignoni, C., Grieneisen, H. P. H. & Kist, T. B. L.; *Electrophoresis*, 23, 2445–2448 (2002).
- 17 - Grossman, P. D. & Colburn, J. C.; *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*. Academic Press, INC, San Diego, California, USA (1992).
- 18 - Weinberger, R.; *Practical Capillary Electrophoresis*. Academic Press, INC, San Diego, California, USA (1993).
- 19 - Wey, A. B. & Thormann, W., J.; *Chromatogr. A*, 924, 507–518 (2001).
- 20 - Liu, S., Li, Q., Chen, X. & Hu, Z.; *Electrophoresis*, 23, 3392–3397 (2002).
- 21 - Alnajjar, A. & McCord, B.; *J. Pharmaceut. Biomed.*, 33, 463–473 (2003).
- 22 - Chen, Z. L., Lin, J.-M. & Naidu, R.; *Anal. Bioanal. Chem.*, 375, 679–684 (2003).
- 23 - Zhao, Y., McLaughlin, K. & Lunte, C. E.; *Anal. Chem.*, 70, 4578–4585 (1998).
- 24 - Liu, W. & Lee, H.-K.; *Electrophoresis*, 20, 2475–2483 (1999).
- 25 - Sun, B., Macka, M. & Haddad, P. R.; *J. Chromatogr. A*, 1039, 201–208 (2004).

-
- 26 - Long, Y. H., Hernandez, M., Kaale, E., Van Schepdael, A., Roets, E., Borrull, F., Calull, M. & Hoogmartens, J.; *J. Chromatogr. B*, 784, 255–264 (2003).
- 27 - Chen, H.-C. & Ding, W.-H.; *J. Chromatogr. A*, 996, 205-212 (2003).
- 28 - Kruaysawat, J., Marriott, P. J., Hughes, J. & Trenerry, C.; *Electrophoresis*, 24, 2180–2187 (2003).
- 29 - Huang, H.-Y., Chiu, C.-W., Sue, S.-L. & Cheng, C.-F.; *J. Chromatogr. A*, 995, 29–36 (2003).
- 30 - Quirino, J. P. & Terabe, S.; *J. Chromatogr. A*, 850, 339–344 (1999).
- 31 - He, Y. & Lee, H.-K.; *Anal. Chem.*, 71, 995–1001 (1999).
- 32 - Siri, N., Riolet, P., Bayle, C. & Couderc, F.; *J. Chromatogr. B*, 793, 151–157 (2003).
- 33 - Chen, Z.-L. & Naidu, R.; *J. Chromatogr. A*, 1023, 151–157 (2004).
- 34 - Tu, C., Zhu, L., Ang, C. H. & Lee, H. K.; *Electrophoresis*, 24, 2188–2192 (2003).
- 35 - Neusüß, C., Pelzing, M. & Macht, M., *Electrophoresis*, 23, 3149–3159 (2002).
- 36 - Ward, E. M., Smyth, M. R., O’Kennedy, R., Lunte, C. E.; *J. Pharmaceut. Biomed.*, 32, 813–822 (2003).
- 37 - Zhao, Y. & Lunte, C. E.; *Anal. Chem.*, 71, 3985–3991 (1999).

-
- 38 - Britz-McKibbin, P., & Chen, D. D. Y.; *Anal. Chem.*, 72, 1242–1252 (2000).
- 39 - Britz-McKibbin, P., Bebault, G. M. & Chen, D. D. Y.; *Anal. Chem.*, 72, 1729–1735 (2000).
- 40 - Wang, S.-J., Tseng, W.-L., Lin, Y.-W. & Chang, H.-T.; *J. Chromatogr. A*, 979, 261–270 (2002).
- 41 - Kim, J.-B., Okamoto, Y. & Terabe, S.; *J. Chromatogr. A*, 1018, 251–256 (2003).
- 42 - Britz-McKibbin, P., Nishioka, T. & Terabe, S.; *Anal. Sci.*, 19, 99–104 (2003).
- 43 - Britz-McKibbin, P., Markuszewski, M. J., Iyanagi, T., Matsuda, K., Nishioka, T. & Terabe, S.; *Anal. Biochem.*, 313, 89–96 (2003).
- 44 - Britz-McKibbin, P., Bebault, G. M. & Chen, D. D. Y.; *Anal. Chem.*, 72, 1729–1735 (2000).
- 45 - Wang, S. J., Tseng, W. L., Lin, Y. W. & Chang, H. T.; *J. Chromatogr. A*, 979, 261–270 (2002).
- 46 - Wang, C. -C, McCann, W. P. & Beale, S. C.; *J. Chromatogr. B*, , 676, 19-28 (1996).
- 47 - Stegehuis, D. S., Irth, H., Tjaden, U. R. & van der Greef, J.; *J. Chromatogr. B*, , 538, 393-402 (1991).
- 48 - Thompson, T. J., Foret, F., Vouros, P. & Karger, B. L.; *Anal. Chem.*, 65, 900–906 (1993).

-
- 49 - Bergmann, J., Jaehde, U., Mazereeuw, M., Tjaden, U. & Schunack, W.; J. Chromatogr A, 734, 381-389 (1996).
- 50 - Krivankova, L. & Bocek, P.; J. Chromatogr. B, 689, 13-34 (1997).
- 51 - Krivankova, L., Pantukova, P. & Bocek, P.; J. Chromatogr. A, 838, 55-70 (1999).
- 52 - Jones, W. R., Soglia, J., McGlynn, M., Harber, C., Reineck, J. & Krstanovic, C.; Am. Lab., 28, 25-& (1996).
- 53 - Chen, S. & Lee, M. L.; Anal. Chem., 72, 816-820 (2000).
- 54 - Waterval, J. C. M., la Porte, C. J. L., van 't Hof, R., Teeuwsen, J., Bult, A., Lingeman, H. & Underberg, W.J.M., Electrophoresis, 19, 3171-3177 (1998).
- 55 - Quirino, J. P. & Terabe, S.; Science, 282, 465-468 (1998).
- 56 - Kim, J.-B., Otsuka, K. & Terabe, S.; J. Chromatogr. A, 912, 343-352 (2001).
- 57 - Monton, M. R., Otsuka, K. & Terabe, S.; J. Chromatogr. A, 985, 435-445 (2003).
- 58 - Takeda, S., Omura, A., Chayama, K., Tsuji, T., Fukushi, K., Yamane, M., Wakida, S.-I., Tsubota, S. & Terabe, S.; J. Chromatogr. A, 1014, 103-107 (2003).
- 59 - Isoo, K. & Terabe, S.; Anal. Chem., 75, 6789-6798 (2003).

-
- 60 - Lin, C. E., Liu, Y. C., Yang, T. Y., Wang, T. Z., & Yang, C. C.; J. Chromatogr. A, 916, 239–245 (2001).
- 61 - Luner S. J. & Kolin, A.; P. Natl. Acad. Sci. USA, 66, 898-903 (1970).
- 62 - Lochmuüller, C. H. & Breiner, S. J., J. Chromatogr. A, 480, 293-300 (1989).
- 63 - Pawliszyn, J. & Wu, J.; J. Microcolumn. Sep., 5, 397 – 401 (1993).
- 64 - Slais, K.; J. Chromatogr. A, 684, 149-161 (1994).
- 65 - Slais, K.; J. Chromatogr. A, 730, 247-259 (1996).
- 66 - Slais, K.; J. Microcolumn. Sep., 7, 127 – 135 (1995).
- 67 - Slais, K.; J. Chromatogr. A, 764, 309-321 (1997).
- 68 - Stastnd, M. & Slais, K.; J. Chromatogr. A, 768, 283-294 (1997).
- 69 - Fang, X.-H., Adams, M. & Pawliszyn, J.; Analyst, 124, 335–341 (1999).
- 70 - Paegel, B. M., Hutt, L. D., Simpson, P. C. & Mathies, R. A.; Anal. Chem., 72, 3030-3037 (2000).
- 71 - Huang, T. & Pawliszyn, J. Electrophoresis, 23, 3504-3510 (2002).
- 72 - Ross, D. & Locascio, L. E., Anal. Chem., 74, 2556-2564 (2002).
- 73 - Hjerten, S.; J. Chromatogr., 347, 191-198 (1985).

-
- 74 - Bantan-Polak, T.; Kassal, M. & Grant, K. B.; *Anal. Biochem.*, 297, 128-136 (2001).
- 75 - Zhan, W.; WANG, T. & Li, S. F. Y.; *Electrophoresis*, 21, 3593-3599 (2000).
- 76 - Kuhr, W. G. & Yeung, E. S.; *Anal. Chem.*, 60, 1832-1834 (1988).
- 77 - Northrop, R.B., *Analog Electronic Circuits: Analysis and Applications*, Addison-Wesley, 521 pages (1989).
- 78 - Demler, M.J., *High-speed analog-to-digital conversion*, Academic Press, 182 pages (1991).
- 79 - Stedry, M., Popelka, S., Gas, B. & Kenndler, E; *Electrophoresis*, 17, 1121-1125 (1996).