UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

DENIS TADEU RAJH VIDAL

**Elaboração de um sistema de controle externo do
fluxo eletrosmótico para eletroforese capilar com detecção
condutométrica sem contato.**

São Paulo
2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

DENIS TADEU RAJH VIDAL

**Elaboração de um sistema de controle externo do
fluxo eletrosmótico para eletroforese capilar com detecção
condutométrica sem contato.**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

21/05/2008

DENIS TADEU RAJH VIDAL

**Elaboração de um sistema de controle externo do
fluxo eletrosmótico para eletroforese capilar com detecção
condutométrica sem contato.**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Química
(Analítica).

Orientador: Prof. Dr. Claudimir Lucio do Iago

São Paulo
2008

Nome do Pós-Graduando: Denis Tadeu Rajh Vidal

Título da Dissertação de Mestrado: Elaboração de um sistema de controle externo do fluxo eletrosmótico para eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato.

*Dissertação apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Mestre em Química Analítica*

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

*Aos meus pais, Rubens (in memoriam) e Maria,
por todo o apoio e carinho durante a minha
vida e aos meus irmãos, Fábio e Priscila,
pelo companheirismo.*

AGRADECIMENTOS

Em especial, ao professor, amigo e mestre Claudimir Lucio do Lago por toda sua orientação, paciência e que, com sábias palavras, me conduziu por toda esta pesquisa.

Aos também amigos e professores Lúcio Angnes e Ivano Gutz por todos os seus ensinamentos.

Aos caros colegas da produção: Carlos, Ferds, Kléééston e Minoru. O meu muito obrigado pelas dicas, ferramentas e momentos de descontração. Valeu!

A todos os colegas de laboratório: Baby, Blanes, Caracol, Dani, Escobar, Fabis, João, Lúcia, Marcos, Marlene, Osmar, Pedro, Pops, Renatinha, Thiago, Vinícius.

Aos estimados amigos André, Diógenes, Paulo e Pérsio, pelo incentivo e ajuda durante os momentos de dificuldades.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

A minha querida Lucy Maris, por toda sua compreensão, carinho, amor e alegria que você me proporciona.

E a todas as pessoas que, de maneira anônima, contribuíram para a realização desta pesquisa.

“Não há lugar para a sabedoria onde não há paciência”.
(Santo Agostinho)

RESUMO

Vidal, D. T. R. **Elaboração de um sistema de controle externo do fluxo eletrosmótico para eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato**. 2008. p. 115. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

A presente dissertação trata da implementação, em um equipamento de eletroforese capilar (CE) com detecção condutométrica sem contato (C^4D), de um sistema de controle externo do fluxo eletrosmótico (EOF) via tensão radial externa (V_{rad}).

Através do potencial externo, aplicado diretamente ao capilar, é possível ter o controle do fluxo eletrosmótico em CE, pois, de forma simplificada, esta prática acopla vetorialmente um potencial externo aplicado com o potencial através da solução tampão dentro do capilar.

O emprego da técnica possibilitou o aumento de resolução de 2 aminoácidos – Leucina e Isoleucina, cujas mobilidades diferem apenas de $0,12 \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ entre si, em ácido acético $500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ com $\text{pH} = 2,55$. A estratégia empregada aqui foi a que denominamos de “coluna capilar infinita”, na qual, com as sucessivas inversões na direção do EOF, conseguimos aprisionar, dentro da coluna capilar, espécies com mobilidade eletroforética menor que a mobilidade do EOF. Dessa forma, os 2 aminoácidos citados foram retidos pelo período de aproximadamente 120 minutos no capilar, o que promoveu uma resolução de linha base.

A literatura descreve que a inversão do EOF se torna mais difícil com o aumento do pH. A fim de se obter um controle mais efetivo do EOF em pH de valor elevado (com o intuito de não limitar a técnica a uma estreita faixa de atuação), foram realizados testes em eletrólitos contendo agentes inversores de fluxo como o CTAB, o CaCl_2 e o BaCl_2 . Ambos os aditivos foram usados em concentrações muito baixas, nas quais foi mantida a direção normal do EOF, sendo que a utilização de tais agentes teve a finalidade apenas de reduzir os grupos silanolatos em soluções de pH acima de 6,0. Tal estratégia proporcionou a reversão do EOF no sistema tampão MES/HIS, cujo pH estava em torno de 6,1.

Por fim, a pesquisa gerou uma perspectiva interessante que é a possibilidade de se encontrar combinações de eletrólitos de corrida e surfactantes com o intuito de se estender a faixa de alcance do V_{rad} para valores altos de pH.

Palavras chaves: *Eletroforese capilar, Detecção condutométrica sem contato, Controle externo do fluxo eletrosmótico, Campo elétrico radial.*

ABSTRACT

Vidal, D. T. R. **Development of an external electroosmotic flow control system for capillary electrophoresis with contactless conductivity detection.** 2008. p. 115. Masters Thesis – Graduate Program in Chemistry Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

This work presents the implementation, in an equipment for capillary electrophoresis (CE) with contactless conductivity detection (C^4D), of a system for external control of the electroosmotic flow (EOF) via external radial voltage (V_{rad}).

Through external potential, directly applied to the capillary, the electroosmotic flow can be controlled, because this practice couples the applied external potential to the zeta potential through the buffer solution within the capillary.

The use of the technique allowed the baseline resolution of two amino acids (Leucine and Isoleucine), whose mobilities differ only by $0,12 \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, using acetic acid $500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ at $\text{pH} = 2,55$ as the running electrolyte. The approach, called "infinite capillary column", consists in successive reversals in the direction of the EOF, trapping species within the capillary column with electrophoretic mobility smaller than the EOF mobility. Thus, the two amino acids were retained by a period of approximately 120 minutes in the capillary that was enough to promote the baseline resolution.

Previous works describe that the reversion of the EOF becoming more difficult as pH increases. In order to achieve a more effective control of EOF at high pH values (limiting the technique to a narrow performance band), tests were carried out in electrolytes containing flow reversing agents such as CTAB, CaCl_2 , and BaCl_2 . These additives were used at very low concentrations, which kept the normal direction of EOF, and the use of such agents had only the purpose of reducing the density of silanolate groups in solutions of pH above 6,0. This approach allowed the reversion of the EOF using MES/HIS buffer, which pH was 6,1.

Finally, this research has generated an interesting perspective about the possibility of finding combinations of electrolytes and surfactants aiming the V_{rad} range's extension at high pH values.

Keywords: *Capillary Electrophoresis, Contactless conductivity detection, External electroosmotic flow control, Radial electric field.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da superfície interna do capilar de sílica fundida. Capilar de sílica fundida de 75 μm d.i. e 360 μm d.e.

Figura 2. Perfil de decaimento do potencial até o seio da solução.

Figura 3. Perfil de velocidade e efeito na variância: A) Fluxo eletrosmótico. B) Fluxo parabólico típico em HPLC.

Figura 4. Esquema do fluxo eletrosmótico (sentido normal) dentro do capilar.

Figura 5. Esquema da instrumentação de campo radial para CE, com V_{rad} constante.

Figura 6. Esquema de potencial radial constante ao longo do comprimento da coluna capilar.

Figura 7. Esquema da instrumentação de campo radial para CE, com V_{rad} variável ao longo da coluna.

Figura 8. Esquema de potencial radial variável ao longo do comprimento da coluna capilar.

Figura 9. Esquema da instrumentação de campo radial para CE, com V_{ext} setado em 0 V.

Figura 10. Esquema de potencial radial variável com V_{Ext} setado em 0 V.

Figura 11. Esquema da instrumentação de campo radial para CE com 2 detectores.

Figura 12. Foto do aparelho de eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato da graduação do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ/USP).

Figura 13. Fotos do equipamento completo.

Figura 14. Diagrama de blocos do equipamento de eletroforese capilar com oito capilares.

Figura 15. Foto do módulo interno. Os cabos vermelhos são encaixados nos conectores de alta tensão na parte interna do gabinete.

Figura 16. A) Representação da cela condutométrica; B) Foto do módulo 1; C) Caixa de proteção que compõem o módulo 1 e fixação no aparelho; D) Caixa de proteção que compõem o módulo 2 e fixação no aparelho.

Figura 17. Representação em curvas de nível da frequência e do potencial pico a pico, com escalas em logaritmo, para potássio, sódio e lítio, para intensidade de pico. O ponto de melhor relação encontra-se em $\log V_{pp} = 0,6$, ou seja, 4 Vpp e $\log$ da frequência = 3,0, ou seja, 1 MHz.

Figura 18. Representação em curvas, com escalas em logaritmo, para potássio, sódio e lítio para determinação da relação sinal/ruído. O ponto de melhor relação encontra-se em $\log V_{pp} = 0,6$, ou seja, 4 Vpp e $\log$ da frequência = 3,0, ou seja, 1 MHz.

Figura 19. A) Instrumentação de um sistema de CE tradicional de eletroforese capilar.

B) Instrumentação para um sistema de CE com eletrólise separada.

Figura 20. A) Foto ilustrativa do sistema de eletrólise separada de alta (em A) e baixa tensão (em B).

Figura 21. Esquema ilustrativo do sistema de injeção PWM do equipamento multi-canal.

Figura 22. Representação da disposição da coluna capilar nos canais 1A e 4B na placa do detector C⁴D. Foto da coluna capilar alojada nos eletrodos do detector C⁴D.

Figura 23. A) Disposição do capilar no interior do módulo interno. O capilar foi revestido com papel alumínio e aterrado junto ao equipamento com uma garra jacaré. B) Eletroferograma de uma mistura de Na⁺, Li⁺, K⁺ e Mg²⁺ 30 µmol.L⁻¹. Eletrólito Ácido acético 500 mmol.L⁻¹ em pH = 2.55. O sinal preto indica a passagem pelo detector 1 (canal 1A) e a linha vermelha é referente a passagem no detector 2 (canal 4B).

Figura 24. A) Foto do conjunto de reservatórios e sistema de válvulas solenóides, esta última identificada por *leds*. B) Foto dos reservatórios de eletrólito de corrida, com as tubulações do sistema de eletrólise separada e do sistema de vácuo.

Figura 25. Foto do software desenvolvido para o sistema de CE multi-capilar. Ao centro - *display* dos eletroferogramas. Acima e à esquerda - *display* da corrente eletroforética. No canto inferior direito - *tab* comandos de seleção da potencial nas fontes de alta tensão, injeção e temperatura. À direita superior – *tab* comandos para seleção de *off-set* dos canais.

Figura 26. A) Ponto de reversão entre dois fluxos eletrosmóticos de sentidos opostos. B) representação ilustrativa do conceito de determinação em tempo real da µEOF.

Figura 27. Mobilidade do EOF em relação à variação do V_{rad} , para ácido acético 500 mmol.L⁻¹ em pH = 2,55. A) $V_{rad} = +20$ kV; B) $V_{rad} = +15$ kV; C) $V_{rad} = +10$ kV; D) $V_{rad} = +5$ kV; E) $V_{rad} = -20$ kV; F) $V_{rad} = -15$ kV; G) $V_{rad} = -10$ kV; H) $V_{rad} = -5$ kV. Condição de injeção padrão.

Figura 28. Dependência da µEOF em relação à variação do V_{rad} para HAc 500 mmol.L⁻¹ pH = 2.55.

Figura 29. Dependência da μEOF em relação à variação do V_{rad} para HAc 500 mmol.L⁻¹ pH = 2.55. Em A, resultado experimental e, em B, resultado proveniente da modelagem matemática.

Figura 30. Dependência da densidade de carga em função do pH. Em A, perfil de densidade de carga em função do pH até o valor de 5,0, sendo densidade de carga da sílica (linha preta), densidade de do V_{rad} +20kV (linha azul) e densidade de carga do V_{rad} -20kV (linha vermelha). Em B, perfil de densidade de carga em função do pH até o valor de 10,0, sendo densidade de carga da sílica (linha preta), densidade de do V_{rad} +20kV (linha azul) e densidade de carga do V_{rad} -20kV (linha vermelha).

Figura 31. Faixa de controle do EOF em função do pH. Intervalo do potencial radial aplicado: 20 kV e - 20 kV. A) Ác. Glucônico 200 mmol.L⁻¹ pH = 2,18; B) HAc 0,5 mol.L⁻¹ pH = 2,55; C) HIBA 15 mmol.L⁻¹ pH = 3,00; D) Ác. cítrico 15 mmol.L⁻¹ pH = 3,54; E) Tampão acetato 20 mmol.L⁻¹ pH = 4,77; F) MES/His 20 mmol.L⁻¹ pH = 6,10; G) MES/His 20 mmol.L⁻¹ + CTAB 125 µmol.L⁻¹ pH = 6,08; H) KCl 20 mmol.L⁻¹ pH 7,0; I) KCl 16 mmol.L⁻¹ + BaCl₂ 2 mmol.L⁻¹ pH 7,05; J) KCl 16 mmol.L⁻¹ + CaCl₂ 2 mmol.L⁻¹ 7,08; K) Tris/Taps 20 mmol.L⁻¹ pH = 8,22; L) Tris/Taps 20 mmol.L⁻¹ + CTAB 15 µmol.L⁻¹ pH = 8,22; M) Tris/Taps 20 mmol.L⁻¹ + CTAB 25 µmol.L⁻¹ pH = 8,22; N) Tris/Taps 20 mmol.L⁻¹ + CTAB 50 µmol.L⁻¹ pH = 8,22.

Figura 32. Dependência da μEOF em função da força iônica (I): A) HIBA 15 mmol.L⁻¹ pH = 3,0 I = 1,42 mmol.L⁻¹; B) HAc 500 mmol.L⁻¹ pH = 2,5 I = 3,14 mmol.L⁻¹; C) Ác. cítrico 15 mmol.L⁻¹ pH = 3,54 I = 3,20 mmol.L⁻¹; D) Ác. Glucônico 200 mmol.L⁻¹ pH = 2,1 I = 7,0 mmol.L⁻¹; E) Tris/Taps 20 mmol.L⁻¹ pH = 8,22 I = 9,2 mmol.L⁻¹; F) Tris/Taps 20 mmol.L⁻¹ + CTAB 15 µmol.L⁻¹ pH = 8,22 I = 9,2 mmol.L⁻¹; G) Tris/Taps 20 mmol.L⁻¹ + CTAB 25 µmol.L⁻¹ pH = 8,22 I = 9,2 mmol.L⁻¹; H) Tris/Taps 20 mmol.L⁻¹ + CTAB 50 µmol.L⁻¹ pH = 8,22 I = 9,2 mmol.L⁻¹; I) Tampão acetato 20 mmol.L⁻¹ pH = 4,77 I = 10,02 mmol.L⁻¹; J) MES/HIS 20 mmol.L⁻¹ pH = 6,1 I = 10,20 mmol.L⁻¹; K) KCl 20 mmol.L⁻¹ pH = 7,0 I = 20 mmol.L⁻¹; L) KCl 16 mmol.L⁻¹ + BaCl₂ 2 mmol.L⁻¹ pH = 7,05 I = 22 mmol.L⁻¹; M) KCl 16 mmol.L⁻¹ + CaCl₂ 2 mmol.L⁻¹ pH = 7,08 I = 22 mmol.L⁻¹.

Figura 33. Faixa de controle da μ_{EOF} em função da adição de CTAB em MES/His 20 mmol.L⁻¹ a pH = 6,1: A) Sem adição de CTAB; B) Com adição de 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de CTAB; C) Com adição de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de CTAB; D) Com adição de 125 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de CTAB; E) Com adição de 150 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de CTAB.

Figura 34. Representação esquemática da adsorção do CTAB com a orientação das moléculas de surfactante sobre a superfície de sílica.

Figura 35. Representação esquemática da adsorção do CTAB mostrando a orientação das moléculas de surfactante sobre a superfície de sílica, através adsorção por admicelas.

Figura 36. Dependência da μ_{EOF} em relação à V_{rad} para MES/His 20 mmol.L⁻¹ + CTAB 125 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. N = 2.

Figura 37. Faixa de controle da μ_{EOF} em função da adição de CTAB em Tris/Taps 20 mmol.L⁻¹ a pH = 8,22: A) Sem adição de CTAB; B) Com adição de 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de CTAB; C) Com adição de 40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de CTAB; D) Com adição de 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de CTAB.

Figura 38. Dependência da μ_{EOF} em função do V_{rad} . Em A, eletrólito KCl 20 mmol.L⁻¹ (linha preta) e KCl 16 mmol.L⁻¹ e BaCl₂ 2 mmol.L⁻¹ (linha vermelha). Em B, eletrólito KCl 20 mmol.L⁻¹ (linha preta) e KCl 16 mmol.L⁻¹ e CaCl₂ 2 mmol.L⁻¹ (linha vermelha).

Figura 39. Esquema da estratégia para proporcionar o conceito de coluna capilar infinita.

Figura 40. Simulação do Peakmaster 5.2. Separação de Isoleucina e Leucina no eletrólito HAc 0,52 mmol.L⁻¹ em pH = 2,55, 110,8 kV, capilar 400 cm (E = 277 V/cm).

Figura 41. Eletroferogramas da separação da isoleucina e leucina ao longo do tempo em HAc 0,52 mmol.L⁻¹, em pH = 2,55. Condição de injeção padrão. Em A e B, a resolução é inexistente entre os dois analitos. Em C, resolução = 0,90. Em D, a resolução atinge 1,15 por volta de 115 minutos de corrida.

Figura 42. Em A, sentido do EOF revertido e, em B, sentido do EOF normal.

Figura 43. Esquema da estratégia adotada para proporcionar a separação isotópica.

Figura 44. A) Eletroferograma de Cu^{2+} 1 mmol L^{-1} em HAc. 500 mmol.L^{-1} com $V_{\text{rad}} = +20 \text{ kV}$. B) Eletroferograma de Pb^{2+} 1 mmol.L^{-1} em HAc. 500 mmol.L^{-1} com $V_{\text{rad}} = +20 \text{ kV}$. Condição de injeção padrão.

Figura 45. Eletroferogramas em eletrólito HAc 500 mmol.L^{-1} com adição de EDTA $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em condição de $V_{\text{rad}} = -20 \text{ kV}$. Em A, eletroferograma de injeção de Na^+ $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$, em B, Cu^{2+} 1 mmol.L^{-1} , em C, Pb^{2+} 1 mmol.L^{-1} , em D, Zn^{2+} 1 mmol.L^{-1} . Condição de injeção padrão.

Figura 46. Eletroferogramas em eletrólito HAc 500 mmol.L^{-1} com adição de EDTA $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em condição de $V_{\text{rad}} = -20 \text{ kV}$. Em A, eletroferograma de Cu^{2+} 1 mmol.L^{-1} , em B, Pb^{2+} 1 mmol.L^{-1} . Condição de injeção padrão.

Figura 47. Em A, eletroferograma em eletrólito HIBA 15 mmol.L^{-1} , em $\text{pH} = 3,0$ e condição de $V_{\text{rad}} = +20 \text{ kV}$. Em B, eletroferograma em eletrólito ácido cítrico 15 mmol.L^{-1} , em $\text{pH} = 3,5$ e condição de $V_{\text{rad}} = +20 \text{ kV}$. Para ambos os eletroferogramas o analito é Ni^{2+} $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Condição de injeção padrão.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores dos potenciais aplicados entre as duas fontes de alta tensão e suas respectivas voltagens radiais. A diferença de potencial entre as fontes é sempre o mesmo, neste caso, em particular de 20 kV.

Tabela 2. Dependência da μ_{EOF} em função do V_{rad} para ácido acético 500 mmol.L⁻¹ em pH = 2,55.

Tabela 3. Constantes de Formação dos Complexos de EDTA. Ver referência 39.

LISTA DE ABREVIATURAS

C⁴D: Detector condutométrico sem contato

CE: Eletroforese capilar

CTAB: Brometo de cetiltrimetilamônio

CZE: Eletroforese capilar de zona

d.e.: diâmetro externo

d.i.: diâmetro interno

DCE: Dupla camada elétrica

EDTA: Ácido etilenodiaminotetraacético

EOF: Fluxo eletrosmótico

EVC: *External voltage control*

GND: Aterramento

HAc: Ácido acético

HEC: Hidroxietilcelulose

HIBA: Ácido hidroxisobutírico

His: Histidina

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência

i/e: Corrente/tensão

IHP: Plano interno de Helmholtz

LED: Diodo emissor de luz

MEKC: Cromatografia eletrocinética micelar

MES: Ácido 2-[N-morfolino]etanossulfônico

OHP: Plano externo de Helmholtz

PC: Plano de cisalhamento

PVA: Álcool polivinílico

PWM: Modulação por largura de pulso

v_{EOF} : Velocidade do fluxo eletrosmótico

V_{ext} : Potencial externo ao capilar

V_{int} : Potencial interno ao capilar

V_{pp} : Tensão pico-a-pico do sinal senoidal aplicado ao detector

V_{rad} : Potencial elétrico radial

μ_{EOF} : Mobilidade do fluxo eletrosmótico

LISTA DE SÍMBOLOS

ϵ : carga elementar

k : constante de Boltzmann,

σ_{Si} : densidade de carga da superfície de sílica

σ_{Vrad} : densidade de carga para o campo elétrico radial

σ_t : densidade de carga total

ϵ : é constante dielétrica

D_0 : permissividade da água

ϵ_Q : permissividade da sílica fundida

r_0 : raio externo do capilar

r_i : raio interno do capilar

μ_e : mobilidade iônica ou eletroforética

μ_{Apa} : mobilidade aparente

E : campo elétrico

R : constante dos gases perfeitos

α : grau de dissociação das espécies

ζ : potencial zeta

η : viscosidade do meio

ψ_0 : potencial de superfície

I : força iônica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. Breve resumo sobre eletroforese capilar (CE)	24
1.2. O fluxo eletrosmótico e sua importância em CE	27
1.3. Campo elétrico radial	34
1.3.1. Histórico e instrumentação	36
1.3.2. Modelagem Matemática para o Controle Externo do EOF	44
2. OBJETIVOS	49
3. MATERIAIS E MÉTODOS	50
3.1. Um equipamento de CE com controle do campo elétrico radial	50
3.1.1. O detector C^4D	55
3.1.2. O sistema de eletrólise separada	59
3.1.3. A injeção da amostra	62
3.1.4. Adaptação do equipamento para o controle do V_{rad}	63
4. EXPERIMENTAL	69
4.1. Reagentes e soluções	69
4.2. Condicionamento do capilar	70
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
5.1. Controle do EOF	70
5.1.1. Faixa de controle	74
5.1.2. Separação de espécies e resolução	92
5.1.2.1. Separação de aminoácidos: Leucina e Isoleucina	92
5.1.2.2. Separação isotópica	98
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	107
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
8. ANEXOS	113

1. INTRODUÇÃO

Desde meados da década de 1980, a eletroforese capilar (CE) é uma técnica de separação que ganha espaço dentro da comunidade científica, devido às relevantes contribuições que esta ferramenta analítica propicia na resolução de problemas que envolvem separações de substâncias [40].

Nos últimos tempos, a eletroforese capilar recebeu diversas implementações devido ao crescente número de trabalhos que abordam o tema. Resumidamente, estas visam melhorias na detecção de analitos (tanto na pesquisa de desenvolvimento de novos detectores, como na aquisição de dados com sistemas de multi-deteção), maior controle dos parâmetros que afetam a resolução dos analitos (em especial o fluxo eletrosmótico, tanto por fatores externos quanto internos), diminuição de adsorção de certas substâncias (através do revestimento interno do capilar com o uso de filmes poliméricos), acoplamentos com outras técnicas analíticas etc.

O presente trabalho de pesquisa versa sobre a estratégia de controle do fluxo eletrosmótico (EOF) através do controle de tensão radial externa em um equipamento de CE. Com este arranjo, é possível obter um controle dinâmico do EOF e, assim, uma melhora na resolução dos picos de substâncias cujas mobilidades eletroforéticas sejam muito próximas, como ocorre, por exemplo, com isômeros.

Através do potencial externo, aplicado de forma capacitiva no lado de fora do capilar, é possível ter o controle do fluxo eletrosmótico, em CE. De forma simplificada, esta prática acopla um potencial externo aplicado com o potencial através da solução tampão dentro do capilar. Acredita-se que este gradiente de potencial elétrico, através da parede do capilar, controla a polaridade e o valor do potencial zeta (ζ) [5,14-20]. A

taxa do EOF e o sentido são dependentes da polaridade e do valor do potencial zeta e, dessa forma, pode-se atribuir, ao EOF, valores positivos, negativos e zero.

Com o controle do EOF, pode-se alterar o valor da mobilidade aparente dos analitos, pois esta mobilidade é resultante tanto da mobilidade das espécies em si, quanto do EOF. Pretende-se com esta alteração na mobilidade dos analitos, retê-los por mais tempo dentro da coluna capilar para, assim, aumentar a sua resolução [5]. A migração eletroforética depende apenas do campo elétrico axial e não é afetada pela presença do campo elétrico radial e, sendo assim, a implementação de tal estratégia possibilita ajustes independentes do EOF e da migração eletroforética em uma mesma corrida.

A separação de isótopos, em CE, é um exemplo relevante da versatilidade desta técnica de separação. Tais entidades possuem mobilidades eletroforéticas muito semelhantes, e, dessa forma, demandam controles severos tanto das condições dos sistemas químicos como da taxa do EOF para a sua detecção. Um exemplo interessante é encontrado no trabalho de Lucy *et al.* [32], no qual foi realizada a separação de isótopos de $^{35}\text{Cl}^-$ do $^{37}\text{Cl}^-$. Neste trabalho, os autores determinaram a melhor composição do eletrólito de corrida para conseguir um EOF comparável, em módulo, à mobilidade natural do cloreto, de modo a reter na coluna por um maior período as 2 entidades isotópicas e, assim, promover a sua separação.

O implemento do campo elétrico radial a um equipamento de CE visa promover maior resolução de separação dos picos de alguns analitos, e pode se tornar um acoplamento fundamental em separações intrincadas, como no caso de separações isotópicas. Ainda, a utilização do C^4D faz com que a instrumentação para o

acoplamento do campo elétrico radial em um equipamento de CE se torne mais simples, além do fato de que a maioria dos trabalhos da literatura que fazem uso da voltagem radial aponta para o uso de detectores UV/vis [5,25-26]. Com isso, torna-se necessário um estudo do acoplamento do C⁴D com a técnica de controle externo do EOF para, dessa forma, verificar sua potencialidade, também, no emprego do campo elétrico radial.

1.1. Breve resumo sobre Eletroforese Capilar (CE)

A eletroforese foi introduzida por Arne Tiselius, em 1937, aplicada no estudo de proteínas do soro sanguíneo. Seu aparato visou colocar uma mistura de proteínas em um tubo preenchido com solução tampão seguido da aplicação de um campo elétrico. Tiselius verificou a separação dos componentes da amostra que migraram com direção e velocidade definidas por suas cargas e massas [40].

Os primeiros passos no desenvolvimento histórico da CE vêm do trabalho de Hjérten, em 1967, o qual deu um significativo passo ao utilizar, em seus experimentos, colunas capilares de quartzo com cerca de 300 µm de diâmetro interno (d.i.), os quais estavam sob rotação com o intuito de minimizar os efeitos de convecção.

Em 1979, Mikkers *et al.* passam a realizar experimentos empregando colunas capilares em vidro e teflon com 200 µm de diâmetro interno. Com este arranjo, os mesmo conseguiram separar uma mistura de 16 ânions. Ainda em 1979, descreveram o processo de eletrodispersão de bandas, processo este que possui destaque nas separações dos analitos, devido às diferenças de condutividade entre as zonas do analito e do tampão de corrida.

Em 1981, Jorgenson e Lucaks descreveram a relação existente entre os parâmetros operacionais e a resolução na separação de substâncias e, com isso, formularam equações analíticas [23]. Neste mesmo trabalho, foi implementado o uso de colunas capilares de quartzo amorfo com 75 μm d.i., fato este que proporcionou dois pontos positivos: a diminuição da largura de bandas e um aumento na detecção, devido às suas propriedades ópticas.

Terabe, em 1984, trouxe uma expressiva contribuição à técnica de eletroforese capilar com a introdução da MEKC – *Micellar ElectroKinetic Chromatography* (cromatografia eletrocinética micelar), na qual foi possível, pela primeira vez, a separação de substâncias neutras.

Nos últimos tempos, a eletroforese capilar recebeu diversas implementações devido ao crescente número de trabalhos que abordam o tema. Resumidamente, estas visam melhorias na detecção de analitos (tanto na pesquisa de desenvolvimento de novos detectores, como na aquisição de dados com sistemas de multi-deteção), maior controle dos parâmetros de afetam a resolução dos analitos, em especial, o fluxo eletrosmótico, diminuição de adsorção de certas substâncias (através do revestimento interno do capilar com o uso de filmes poliméricos), acoplamentos com outras técnicas analíticas, etc.

Em CE, a migração das espécies carregadas eletricamente se dá devido ao conceito de mobilidade iônica, ou eletroforética (μ_e), a qual é diretamente proporcional à carga (q) e inversamente proporcional a fatores de atrito, que são ligados ao tamanho e à forma do íon (raio iônico hidratado - r), como também pela viscosidade do meio (η), como segue na equação:

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad \text{Eq. 1}$$

Ao se estabelecer um potencial elétrico, os íons adquirem velocidades eletroforéticas (v_e), os quais são dependentes da intensidade do campo elétrico (E) e da μ_e de cada espécie envolvida, segundo a equação 2:

$$v_e = \mu_e E \quad \text{Eq. 2}$$

A μ_e pode apresentar variações de seu valor para uma mesma espécie, desde que existam mudanças no eletrólito de corrida. Não somente mudanças da viscosidade ou da composição de solventes são relevantes, mas, também variações do pH e a adição de agentes complexantes podem originar modificação na mobilidade. Sendo assim, μ_e , depende do grau de dissociação da espécie (α). Disso resulta a mobilidade eletroforética efetiva (μ_{Ef}), como segue na equação 3:

$$\mu_{Ef} = \sum_i \alpha_i \mu_{ei} \quad \text{Eq. 3}$$

Como o grau de dissociação das espécies depende da magnitude do pK_a , a equação 3 sugere uma dependência entre a mobilidade efetiva e o pH do meio. Portanto, o pH pode ser ajustado a fornecer um valor em que as diferenças entre as

mobilidades efetivas das espécies sejam maximizadas, a fim de se obter melhor resolução durante uma corrida.

1.2. O fluxo eletrosmótico e sua importância em CE

Dentre os vários tipos de capilares usados em CE, o capilar de sílica de fundida é atualmente o mais popular¹. Por ser um material dielétrico, o mesmo permite o emprego de alta tensão, além de possuir um recobrimento de poliimida para lhe proporcionar uma melhor resistência mecânica. O interior do capilar de sílica contém grupos silanóis (SiOH) os quais se ionizam e, assim, se comportam como ácidos fracos de Lewis [16]:

Com a dissociação, a superfície do capilar fica carregada negativamente e uma camada de contra-íon, no caso cátions do tampão, é estabelecida a fim de contrabalançar o excesso de cargas negativas e, dessa forma, manter a eletroneutralidade no meio. Assim, se estabelece uma dupla camada elétrica (DCE) e é gerada uma diferença de potencial, a qual é chamada de potencial zeta (ζ).

¹ Os capilares de vidro e teflon também são bastante empregados em equipamentos convencionais e de pesquisa. O primeiro é utilizado para substâncias as quais absorvem abaixo de 280 nm. Já os de Teflon não são recomendados para o uso em tensões elevadas.

Atualmente o modelo proposto por Gouy-Chapman-Stern-Grahame diz que a região contígua à superfície do capilar é ocupada por moléculas de água e íons (possivelmente não solvatados) atraídos por forças eletrostáticas [40]. Denomina-se como Plano Interno de Helmholtz o plano em que íons não solvatados podem estar adsorvidos especificamente [40]. O Plano Externo de Helmholtz (ou camada de Stern) delimita a região da camada compacta da dupla camada elétrica. É definida pelo centro dos íons solvatados mais próximos e de carga contrária à da superfície do capilar de sílica, sendo a interação destes íons ligada a fatores químicos de adsorção não-específica.

O balanço eletrostático e o movimento térmico aleatório determinam a distribuição desses íons de carga oposta. Dessa forma, quando se aumenta a distância em relação à superfície interna da parede do capilar, o potencial decai, de forma linear, na camada de Stern e de forma exponencial através da região da dupla camada elétrica, também conhecida por camada difusa, até atingir o seio da solução, na qual o potencial se aproxima do limite de zero, pois, teoricamente, nessa região do capilar, as concentrações de cargas elétricas positivas e negativas são idênticas, como mostra a figura 2.

À fronteira na dupla camada elétrica, na qual parte dos íons consegue escapar das forças de atração provenientes da superfície carregada do capilar, dá-se o nome de

plano de cisalhamento e, neste plano, delimita-se a parte imóvel (camada de Stern) da camada difusa. O potencial elétrico desenvolvido nesta fronteira está relacionado com a mobilidade das partículas e por isso é conhecido, também, por potencial eletrocinético ou, mais comumente, por potencial ζ . É relevante o conhecimento da magnitude do potencial zeta (principalmente em CE), pois a mobilidade do EOF é dependente direto do potencial ζ , que, por sua vez, é exatamente o potencial da camada difusa [38].

Ao se aplicar o campo elétrico dentro da coluna capilar, ocorre o deslocamento das cargas presentes da camada difusa no sentido do eletrodo de carga contrária. No processo de migração, os íons transportam consigo moléculas de água, o que induz, por sua vez, a um fluxo da solução como um todo, processo este conhecido como fluxo eletrosmótico, ou simplesmente EOF (derivado do inglês *electroosmotic flow*).

Como visto antes, o potencial zeta é determinado pela carga na superfície interna do capilar, e esta carga é dependente do pH da solução. Após o potencial elétrico ser estabelecido (geralmente na ordem de 30 kV), os íons e as moléculas solvatadas migram em direção ao pólo negativo, sendo este considerado EOF normal. Através da migração, o fluxo faz com que as espécies migrem em direção ao detector, normalmente acoplado próximo ao final da coluna capilar.

O EOF está relacionado diretamente com o pH do eletrólito de corrida, visto que o potencial zeta está ligado à ionização dos grupos silanóis da sílica. Abaixo de $\text{pH} = 4,0$, a ionização dos grupos silanóis é pequena e o EOF não é significativo, enquanto que acima de $\text{pH} = 9,0$ os silanóis ficam completamente ionizados e, portanto,

o EOF é alto. A magnitude do fluxo eletrosmótico pode ser expressa em termos de velocidade ou mobilidade, segundo as equações:

$$v_{EOF} = \frac{(\varepsilon \cdot \varepsilon_0 \cdot \zeta)}{\eta} E \quad \text{Eq. 5}$$

$$\mu_{EOF} = \frac{\varepsilon \cdot \varepsilon_0 \cdot \zeta}{\eta} \quad \text{Eq. 6}$$

em que v_{EOF} é velocidade do EOF, ε é constante dielétrica, ε_0 é a permissividade do vácuo, ζ é o potencial zeta, η é a viscosidade do meio, E é o potencial aplicado e μ_{EOF} a mobilidade do EOF.

O rearranjo das equações 2 e 3 fornece a relação do v_{EOF} em função da mobilidade e do campo elétrico:

$$v_{EOF} = \mu_{EOF} \cdot E \quad \text{Eq. 7}$$

A presença do EOF indica que a migração das espécies, dentro do capilar, não depende somente de suas respectivas mobilidades, mas também da mobilidade do EOF. Denomina-se de velocidade aparente (v_{Apa}) a soma da velocidade efetiva e da velocidade do EOF, sendo que este último possuirá sinal negativo ou positivo dependendo do seu sentido. A v_{EOF} terá sinal positivo quando estiver no mesmo sentido de migração de espécies catiônicas:

$$v_{Apa} = v_{Ef} + v_{EOF} \quad \text{Eq. 8}$$

Assim, verifica-se que o EOF possui papel fundamental em CE, pois a migração das espécies depende, também, deste fenômeno. O conhecimento do seu mecanismo, como também do seu controle fornece subsídios para a elaboração de protocolos para a separação de espécies.

Comumente, em CE, empregam-se alguns fatores que alteram o EOF com o intuito de aumentar, diminuir, reverter e até mesmo, em alguns casos, de extinguir o EOF. Dentre estes fatores que promovem a alteração do EOF, um dos parâmetros mais simples a ser alterado é o campo elétrico (E). O incremento do E faz com que a v_{EOF} seja elevada, o que, em condições favoráveis, pode levar a um aumento na resolução dos picos dos analitos. No entanto, tal estratégia resulta em um aumento da corrente eletroforética, no interior do capilar, o que pode ocasionar uma má dissipação de calor e, conseqüentemente, o efeito Joule e assim havendo perda na eficiência da separação. Com a aplicação de potenciais acima de 60 kV, em caso de fuga de alta tensão, há formação de até 15 cm de arco de eletricidade [5].

A viscosidade (η) e a temperatura (T) são fatores que também alteram o EOF e estão, intimamente, relacionados entre si. O aumento da viscosidade do meio dificulta a mobilidade dos íons na camada difusa o que ocasiona uma diminuição no valor da mobilidade do EOF. Mudanças na temperatura da ordem de apenas um grau Celsius acarretam variações de até 2% na viscosidade do eletrólito e, por conseqüência, na mobilidade do EOF. Dessa maneira, para se manter a reprodutibilidade nos resultados, em CE, a temperatura deve ser constante. Os modificadores orgânicos como o álcool polivinílico (PVA), hidróxi-etil celulose (HEC), entre outros, também alteram o EOF,

sendo que, na maioria das vezes, ocasionam na sua redução, pois esses modificadores tendem a aumentar a viscosidade do meio [40].

O pH também é um outro fator muito relevante em CE, pois o mesmo atua, como visto antes, diretamente na ionização dos grupos silanóis e estes, por sua vez, no potencial zeta. A temperatura também pode influenciar no pH do eletrólito e causar variações de 0,5 % [3,40].

A força iônica do eletrólito também pode causar efeito na variação da mobilidade do EOF. Eletrólitos com elevada força iônica produzem compressão da dupla camada elétrica e com isso, uma diminuição do EOF.

Os surfactantes tendem a atuar por adsorção na parede de sílica e consequentemente na densidade de carga da superfície. Em alguns casos, a adição de surfactantes pode aumentar a μ_{EOF} , sendo que, na maioria das vezes, são empregados surfactantes catiônicos como inversores de fluxo, ou seja, reverterem totalmente o sentido do EOF.

Também através da aplicação do campo elétrico radial é possível se controlar a taxa e o sentido da μ_{EOF} . Essa estratégia possui algumas vantagens em relações às já anteriores citadas, pois é possível a realização de alterações em tempo real do EOF, ou seja, durante a corrida.

1.3. Campo elétrico radial

Como visto no tópico anterior, o domínio do EOF é de fundamental importância para CE, no sentido de que com seu controle é possível se obter melhor resolução,

redução do alargamento de bandas, menor tempo de análise e maior reprodutibilidade para os mais diversos tipos de analitos.

Chang e Yeung [3] sugerem duas vertentes para o controle do EOF: um controle estático e outro dinâmico. O controle estático, diz respeito às modificações de natureza tanto física como química da parede interna do capilar, via adição de polímeros e/ou surfactantes, ou ainda em separações em que são fixados o pH, temperatura e a composição do eletrólito. Sendo assim, nenhum dos parâmetros citados sofre alteração durante a corrida.

Já o controle dinâmico, pode ser obtido através de gradientes de pH, temperatura e campo elétrico externo. O controle dinâmico pode proporcionar uma melhor resolução e maior eficiência de separação de amostras complicadas, uma vez que é possível gerar diferentes ambientes de corrida dentro do capilar, o que pode provocar alterações, simultaneamente, no EOF e mobilidade eletroforética durante o período de separação. Na prática, porém, o controle estático é mais simples de se executar e criar protocolos.

Optamos por trabalhar com o controle externo do EOF, via campo elétrico radial, por se tratar de uma técnica de controle do EOF pouco trivial, pelo fato da mesma requerer adaptação de um equipamento comercial ou ainda, na maioria vezes, a construção de um equipamento dedicado. Ainda, em todos os trabalhos que relatam o uso de tal técnica, nenhum deles faz uso da detecção condumétrica sem contato.

1.3.1. Histórico e instrumentação

Um dos primeiros artigos da literatura a descrever a aplicação de um potencial externo, em CE, com o intuito de controlar o EOF é o trabalho de Lee *et al.* [29], em 1990, no qual pela primeira vez foi implementado um sistema que permitia controlar o potencial ζ da dupla camada elétrica dentro do capilar. Nesse experimento, Lee demonstrou que o EOF pode ser aumentado, diminuído e até mesmo revertido pela aplicação do campo elétrico radial (V_{rad}). Tal campo é obtido através da diferença do potencial elétrico entre o exterior (V_{ext}) e o interior (V_{int}) do capilar, o que resulta em um campo elétrico perpendicular ao capilar, que influencia no potencial ζ e, conseqüentemente, na velocidade e no sentido do EOF.

Seu sistema consistiu em envolver uma coluna capilar de 375 μm d.e. (diâmetro externo) x 75 μm d.i. (diâmetro interno) x 20 cm (comprimento) com outro capilar de 630 μm d.e. x 530 μm d.i. x 17 cm, sendo ambos preenchidos com eletrólito e conectados externamente a duas fontes de alta tensão. A cada capilar foi acoplada uma fonte, ajustada de forma a se estabelecer um potencial radial (V_{rad}) ao longo de todo o capilar.

O arranjo proposto por Lee apresentava um inconveniente do ponto de vista instrumental, que era a dificuldade de se acoplar os dois capilares de diâmetros diferentes.

Outro trabalho de 1992, também de Lee *et al.* [44], propõe um modelo de instrumentação para o controle externo do EOF, no qual parte do capilar era colocada dentro de uma caixa de acrílico contendo ar ionizado por partículas α de polônio. O ar

ionizado era então utilizado como meio condutor para a aplicação do potencial externo. Tanto a instrumentação de capilares concêntricos quanto o uso do aparato com gás ionizado, propostos por Lee e seu grupo, não foram alvos de estudos posteriores, pois estas instrumentações eram muito complexas e de difícil implementação.

Ghowsi e Galé [15], na década de 1990 (em paralelo ao primeiro trabalho dos capilares concêntricos de Lee), apresentaram uma proposta similar para o controle direto do EOF, cuja instrumentação serviu de referência para outros pesquisadores como Andrew Ewing e Mark Hayes [17]. Estes, em 1992, propuseram uma instrumentação mais simples. Três fontes de alta tensão foram utilizadas, sendo uma fonte usada para gerar o potencial interno e as outras duas fontes acopladas do lado externo de um capilar revestido com Nafion, como é ilustrado na figura 5.

Com esse aparato, foi possível estabelecer um decaimento, em paralelo, entre o potencial externo (V_{ext}), em relação ao potencial interno (V_{int}). Disto resultou um potencial radial (V_{rad}) que nesta instrumentação, permanece constante ao longo de todo o comprimento do capilar, conforme a

Na figura 6, as linhas pontilhadas representam os limites em que o capilar foi pintado com o polímero resistivo. Com isso, pode-se averiguar que V_{rad} mantém-se constante ao longo do capilar.

Já em 1993, Ewing *et al.* [18] propuseram alterações na instrumentação anterior. O aparato contava com apenas duas fontes de alta tensão (uma para o V_{int} e outra para o V_{ext}), sendo que o capilar, dessa vez, foi recoberto com uma placa metálica, a fim de se estabelecer um potencial externo fixo, como mostra o esquema da figura 7.

Esta montagem resulta numa instrumentação mais simplificada, pois agora passa a contar com apenas duas fontes de alta tensão. Este esquema fixa o V_{ext} ao longo de toda a coluna fazendo com o V_{rad} não seja constante em função da sua localização ao longo do comprimento do capilar, como apresentado na figura 8.

Culbertson e Jorgenson [5], em 1998, apresentaram algumas mudanças relevantes na instrumentação para o emprego do campo radial. Tal aparato proporciona menores riscos de acidente com a alta tensão do que o modelo proposto por Ewing, pois o capilar é recoberto com tinta de prata e aterrado, o que faz que o V_{ext} fique determinado em 0 V, enquanto que, duas fontes de alta tensão são utilizadas para gerar o potencial interno. Assim, alterando-se simultaneamente a tensão em cada fonte, pode-se manter o potencial de separação constante, enquanto que o potencial radial é livremente controlado.

Com essa configuração, o potencial radial também varia de forma linear ao longo do comprimento do capilar, pois como a tensão da separação ao longo do comprimento do capilar descrece a tensão radial também diminui, conforme figura 10. Desta forma, V_1 e V_2 são os potenciais das duas fontes, o que faz com que o potencial interno (V_{int}) seja a média entre V_1 e V_2 e ainda, como o potencial externo (V_{ext}) é nulo, a resultante é um V_{rad} médio que é expresso da seguinte forma:

$$\overline{V_{ext}} = 0$$

$$\overline{V_{int}} = \frac{(V_1 + V_2)}{2}$$

$$\overline{V_{rad}} = \overline{V_{ext}} - \overline{V_{int}} = -\frac{(V_1 - V_2)}{2}$$

Eq. 9

Para a presente pesquisa, utilizou-se, basicamente, o modelo proposto por Culbertson e Jorgenson. No entanto, realizaram-se alguns acréscimos à instrumentação como, por exemplo, a inserção de mais um detector ao longo da coluna capilar, que nos permite ter um melhor monitoramento em tempo real da corrida, conforme o esquema da figura 11.

Pelos modelos apresentados acima, fica evidente que o V_{rad} pode ser constante ou variável, dependendo do arranjo instrumental utilizado. No entanto, ambas as vertentes produzem resultados similares quando comparados entre si, como apresentado por Sázelová *et al.* [36], pois a carga induzida pela tensão radial é dispersa ao longo de toda a dupla camada sobre a superfície interna do capilar [18], o que faz com que o potencial ζ tenha a tendência de se manter uniforme. Sendo assim, este fato resulta em implicações práticas como a simplificação da instrumentação para a implementação do campo elétrico radial, uma vez que é possível utilizar apenas uma fonte extra de alta tensão externa, além daquela própria do instrumento original.

1.3.2. Modelagem Matemática para o Controle Externo do EOF

Como visto anteriormente, a superfície interna do capilar se torna carregada negativamente quando em contato com soluções com pH acima de 2,0. Íons e moléculas polares positivas em solução sofrem atração eletrostática a superfície carregada o capilar e, assim, resulta na formação da dupla camada elétrica, a qual é dividida em uma parte imóvel (também chamada de camada de Stern) e em uma camada difusa.

Da interação coulômbica, origina-se uma diferença de potencial muito próxima à parede do capilar, a qual é conhecida por potencial zeta (ζ), sendo que seu perfil decresce a partir da parede do capilar até o potencial da solução. O potencial zeta é essencialmente determinado pela carga da superfície na parede do capilar e está intimamente ligado a formação do EOF [49].

A densidade de carga da superfície interna de um capilar de sílica é devida, quando na ausência de outros fatores, pela a dissociação dos grupos silanóis, cuja dissociação é dada em função do pH, regido pela seguinte equilíbrio:

$\text{SiOH} \xrightleftharpoons{K} \text{SiO}^- + \text{H}^+$, sendo a constante K expressa por [17]:

$$K = \frac{[\text{SiO}^-][\text{H}^+]}{[\text{SiOH}]} \quad \text{Eq. 10}$$

onde SiO^- e SiOH são os grupos funcionais da superfície do capilar e K , a constante de dissociação cujo valor é de aproximadamente $4,2 \times 10^{-10}$ [13]. A concentração superficial analítica (γ) é constante e dada por:

$$[\text{SiO}^-] + [\text{SiOH}] = \gamma \quad \text{Eq. 11}$$

Ao combinarmos as equações 10 e 11 e solucionando os termos para SiO^- , obtemos uma nova equação que define a carga superficial por unidade de área (σ_{Si}) em função da concentração de H^+ [13], como é mostrado a seguir:

$$\frac{[\text{SiO}^-][\text{H}^+]}{[\text{SiOH}]} = K \quad \text{Eq. 10}$$

$$[\text{SiO}^-] = \frac{K [\text{SiOH}]}{[\text{H}^+]}$$

$$[\text{SiO}^-] + [\text{SiOH}] = \gamma \quad \text{Eq. 11}$$

$$[\text{SiO}^-] = \gamma - [\text{SiOH}]$$

Combinando as duas equações:

$$\frac{K [\text{SiOH}]}{[\text{H}^+]} = \gamma - [\text{SiOH}]$$

$$[\text{H}^+].\gamma - [\text{H}^+].[\text{SiOH}] = K[\text{SiOH}]$$

$$[\text{H}^+].\gamma = K[\text{SiOH}] + [\text{H}^+].[\text{SiOH}]$$

$$[H^+].\gamma = (K + [H^+])[SiOH]$$

$$[SiOH] = \frac{[H^+].\gamma}{(K + [H^+])}$$

Substituindo:

$$[SiO^-] = \left(K \frac{[H^+]\gamma}{K + [H^+]} \right) \frac{1}{[H^+]}$$

$$[SiO^-] = \left(K \frac{\gamma}{K + [H^+]} \right)$$

$$[SiO^-] = \gamma \left(\frac{K}{K + [H^+]} \right)$$

$$[SiO^-] = \frac{\gamma}{\frac{K + [H^+]}{K}}$$

$$[SiO^-] = \frac{\gamma}{1 + \frac{[H^+]}{K}} = \sigma_{Si}$$

Eq. 12

a qual mostra a dependência da densidade de carga da sílica com o pH.

Sob ação do campo elétrico radial, σ_{Si} , que é proveniente dos grupos silanóis dissociados, não é a única densidade de carga presente no meio, pois quando se aplica um potencial externo ao capilar, este passa a agir como um capacitor cilíndrico, adquirindo uma carga interna que é dada por [18]:

$$q = \frac{2\pi\epsilon_Q l V_{rad}}{\ln(r_0/r_i)} \quad \text{Eq. 13}$$

onde ϵ_Q é a permissividade da sílica fundida, l o comprimento do capilar, V_{rad} o potencial radial, r_0 e r_i , respectivamente, o raio externo e interno do capilar. Se dividirmos a equação 13 pela área de superfície do raio interno, ou seja, por $2\pi r_i l$, obtemos a equação de densidade de carga para o campo elétrico radial ($\sigma_{V_{rad}}$):

$$\sigma_{V_{rad}} = \frac{\epsilon_Q V_{rad}}{r_i [\ln(r_0/r_i)]} \quad \text{Eq. 14}$$

Assim, segundo Hayes e Ewing [13], a densidade de carga total (σ_t) sob ação do campo elétrico radial é expressa em função do pH (para σ_{Si}) e da V_{rad} (para a $\sigma_{V_{rad}}$), como expresso na equação:

$$\sigma_t = \sigma_{Si} + \sigma_{V_{rad}} \quad \text{Eq. 15}$$

Tanto a densidade de carga total quanto as propriedades da solução definem o potencial psi (Ψ_0). O mesmo é definido como o potencial de superfície através da dupla camada elétrica enquanto que, o potencial ζ , define apenas o potencial através da camada difusa. Davies e Rideal propuseram que o potencial Ψ_0 é expresso por [13]:

$$\Psi_0 = (2kT/\epsilon) \sinh^{-1} \left(\sigma_t [500\pi/D_0 RTC]^{1/2} \right) \quad \text{Eq. 16}$$

onde k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura, e é a carga elementar, R é a constante dos gases, D_0 é a permissividade da água e C a concentração do eletrólito [18].

Se considerarmos que a viscosidade e a propriedade dielétrica através da dupla camada elétrica são constantes, em um potencial de superfície relativamente pequeno, ou seja, $\leq 50\text{mV}$, podemos relacionar Ψ_0 e ζ através da teoria de Debye-Hückel. Disto resulta a seguinte equação [17-20]:

$$\zeta = \Psi_0 e^{-\kappa x} \quad \text{Eq. 17}$$

Onde x descreve o perfil do potencial com a distância e κ relaciona as propriedades do eletrólito com a dimensão da dupla camada elétrica, sendo expresso por [17-20]:

$$\kappa = \left(\frac{2N_0 z^2 e^2}{\epsilon_b k T} \right)^{1/2} \quad \text{Eq. 18}$$

Na equação 18, N_0 é a concentração do eletrólito no seio da solução, Z é a carga eletrônica, k é a constante de Boltzmann, ϵ_b é a permissividade do eletrólito, T é a temperatura e e é a carga elementar [5,18,38].

Através das aproximações de Debye-Hückel para o potencial ζ é possível se estabelecer combinações entre as equações citadas acima, a fim de se obter uma equação que relacione o EOF e a densidade de carga [18]. Para isso, podemos substituir o termo potencial ζ da equação do v_{EOF} (Eq. 5) pelos termos $\Psi_0 e^{-\kappa x}$ (Eq. 17) e,

por sua vez, Ψ_0 pelos termos da equação 17. Dessa forma, obtemos uma equação que descreve a relação entre o EOF, temperatura, concentração do analito, pH (através da σ_{Si}) e campo elétrico radial (pela σ_{Vrad}), como segue na equação 19:

$$v_{EOF} = E \frac{2kTD_0}{\epsilon_c \eta} e^{-kx} \sinh^{-1} \left[\sigma_t \left(\frac{500\pi}{D_0 RTC} \right)^{1/2} \right] \quad \text{Eq. 19}$$

A densidade de carga total é um dos termos de maior relevância em tal equação, pois indica, em determinado pH, a densidade de carga (proveniente do campo radial σ_{Vrad}) necessária para se obter um controle efetivo do EOF, seja para seu incremento, cancelamento ou até mesmo para a total reversão do sentido [5].

2. OBJETIVOS

A presente pesquisa tem como objetivo implementar um sistema de eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato, no qual possa ser feito o controle do fluxo eletrosmótico, via campo elétrico radial. Com isso, espera-se obter uma melhora na resolução de picos de substâncias cujas mobilidades eletroforéticas sejam muito próximas e, sendo assim, necessitem de condições muito singulares para a sua separação. Para tal fim, foram adotados os seguintes objetivos específicos:

- Adaptar um equipamento de eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato para permitir o controle externo do fluxo eletrosmótico através da diferença de potencial radial;

- Proporcionar, com este equipamento, maior resolução de separação dos picos de algumas substâncias.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Um equipamento de CE com controle do campo elétrico radial

Como parte do aprendizado em instrumentação voltada à química, participei da construção de dois aparelhos de Eletroforese Capilar. Um dos equipamentos é utilizado hoje nas aulas de Eletroforese Capilar de alunos de graduação do IQ-USP. Este consiste num aparelho convencional, de uma única coluna capilar, com detecção condutométrica sem contato.

Figura 12. Foto do aparelho de eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato da graduação do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ/USP).

O segundo equipamento é um sistema de CE com multi-deteção. Este possui oito capilares e quatro fontes de alta tensão. Este já se encontrava em fase de desenvolvimento quando do meu ingresso no grupo de pesquisa. Assim, como tal equipamento ainda estava em fase de construção foram realizadas algumas modificações (tanto na parte de software quanto na parte de hardware) para o acoplamento do uso do campo elétrico radial.

Em resumo, trata-se de um equipamento constituído de um gabinete (módulo externo) de $50 \times 100 \times 62$ cm (altura $\times$ largura $\times$ profundidade), no qual os vários sistemas que permitem a realização dos experimentos estão instalados, além de um computador equipado com uma interface para a aquisição de dados.

A alimentação do aparelho garante o fornecimento de energia elétrica nos padrões requeridos por cada um dos sistemas e dispositivos. Esta possui quatro níveis que são eles: (1) acionamento mecânico de chave geral no painel traseiro; (2) ativação da fonte base, que fornece 5 V e 12 V; (3) ativação do subsistema 1, que inclui as fontes simétricas limpas, o gerador de sinais e o sistema de vácuo; (4) subsistema 2, que inclui as quatro fontes de 24 V que alimentam as fontes de alta tensão. A ativação dos níveis 2, 3 e 4 é feita pelo programa de controle, através da interface NI 6229 da National Instruments.

O aparelho possui quatro fontes de alta tensão limitadas a 150 μ A de corrente, sendo seu potencial estabelecido pela placa de aquisição de dados. Os conectores das fontes de alta tensão são fixados em um painel no interior do gabinete, o que permite que se faça uso destas fontes em várias montagens individuais, como, por exemplo, no módulo de oito canais ou, quando no caso de um novo equipamento conceitual deva ser testado, pode-se substituir o módulo interno.

Pelo diagrama de blocos da figura 14 é possível observar as várias conexões elétricas existentes no aparelho e ainda, ter uma melhor visualização de como estas se relacionam entre si.

Dentro do gabinete, o qual é protegido por tampos de acrílico, encontra-se uma segunda estrutura onde estão localizados, principalmente, o módulo 1 dos detectores, reservatórios de eletrólito, placa de controle de temperatura (que promove o aquecimento controlado do ar antes de recirculá-lo por uma câmara posterior), os dois sistemas de eletrólise separadas, entre outros, como ilustrado na foto 15:

Figura 15. Foto do módulo interno. Os cabos vermelhos são encaixados nos conectores de alta tensão na parte interna do gabinete.

Na câmara de recirculação de ar, foi instalado parte do sistema de despressurização dos reservatórios de alta tensão, além do sistema pneumático de injeção de amostra. O retorno do ar, à câmara frontal, ocorre através de um duto equipado com uma ventoinha extra e um dissipador de alumínio e cobre. A finalidade deste dissipador é, em caso de variações de temperatura, absorver ou fornecer calor ao ar antes que ele entre em contato com as colunas capilares e o detector. Desta forma, seu funcionamento é o de um amortecedor térmico que minimiza flutuações de temperatura que comprometem o desempenho de um sistema de CE-C⁴D.

3.1.1.O detector C⁴D

Em CE, os detectores podem ser classificados como seletivos ou universais. Os detectores seletivos medem uma propriedade intrínseca do analito. A detecção por LIF (*Laser-Induced Fluorescence*), absorção UV/Vis, espalhamento Raman, como também os detectores amperométricos são representantes bastante difundidos desta classe de detectores [39]. Com efeito, a classe dos detectores seletivos é mais utilizada quando uma amostra é complexa e não se tem completa separação de seus constituintes.

Já a classe dos detectores universais mede diferenças de uma propriedade específica entre o eletrólito de corrida e o analito. Por sua vez, os detectores universais são utilizados, na maioria das vezes, quando se tem a separação de todos os analitos de uma amostra. O detector condutométrico sem contato C⁴D (*capacitively coupled contactless conductivity detection*), desenvolvido em nosso laboratório [10], é um representante desta classe.

Basicamente em um detector condutométrico sem contato, a medida de condutividade é obtida aplicando-se um sinal de alta frequência (600 kHz, aproximadamente) entre dois eletrodos envoltos no capilar. Com isso, mudanças de condutividade no interior do capilar (devida à substituição parcial das espécies iônicas do eletrólito de corrida pelo analito) são captadas através do eletrodo (em forma de anel) fixado no exterior da coluna capilar. A intensidade da corrente resultante é proporcional à condutividade do meio. Este sistema tem a vantagem do desacoplamento entre o circuito de detecção e potencial de separação, além do fato dos eletrodos externos (de entrada e saída do sinal) não serem contaminados [10].

O conjunto que forma o sistema de detecção é composto basicamente por três módulos: o gerador de sinais; o módulo 1 do circuito de medida de condutividade (responsável pela pré-amplificação e retificação do sinal elétrico que flui pela cela) e o módulo 2, cuja função é compensar a linha base, além da filtragem e amplificação final do sinal analógico.

Para o equipamento de CE multi-capilar, foi necessária a construção de um modelo do detector condutométrico sem contato que atendesse as oito colunas capilares. Devido às dimensões do módulo interno, foram alocados os eletrodos em duas fileiras de oito cada, um lado do outro e, dessa forma, todos os eletrodos foram alocados em uma única placa de circuito impresso. Este novo detector multicanal pode gerar até oito eletroferogramas simultâneos. A placa de circuito impresso, bem como as fotos dos módulos 1 e 2 do equipamento são ilustradas na figura 16.

Para a elaboração deste novo detector, foi necessária a reestruturação de todo o projeto eletrônico, pois além do novo dimensionamento para oito colunas capilares, novos componentes eletrônicos foram utilizados com o intuito de melhorar a relação sinal/ruído e ampliar a frequência de trabalho.

Foram realizados testes para se estabelecer uma frequência que otimizasse a relação sinal/ruído. Estes testes foram baseados na injeção hidrodinâmica por 20

segundos em uma coluna d'água de 10 cm de uma amostra de potássio, sódio e lítio com concentração de $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

A melhor condição de trabalho foi estipulada com base na intensidade do sinal (medido em Volt) resultante da relação entre a frequência do sinal aplicado ao eletrodo e o potencial pico a pico. Também a melhor condição de trabalho se baseou na relação sinal/ruído, em que a região de melhor relação é semelhante àquela encontrada entre a intensidade do sinal e a frequência aplicada.

Assim, geraram-se gráficos de superfície em forma de curvas de nível, os quais representam a intensidade dos picos dos analitos por meio de cores. Os gráficos das figuras 17 e 18 sugerem que a melhor condição seja 1 MHz e 4 Vpp.

Figura 17. Representação em curvas de nível da frequência e do potencial pico a pico, com escalas em logaritmo, para potássio, sódio e lítio, para intensidade de pico. O ponto de melhor relação encontra-se em $\log V_{pp} = 0,6$, ou seja, 4 Vpp e $\log$ da frequência = 3,0, ou seja, 1 MHz.

Figura 18. Representação em curvas, com escalas em logaritmo, para potássio, sódio e lítio para determinação da relação sinal/ruído. O ponto de melhor relação encontra-se em $\log V_{pp} = 0,6$, ou seja, 4 Vpp e $\log$ da frequência = 3,0, ou seja, 1 MHz.

3.1.2. O sistema de eletrólise separada

A corrente que flui pelo interior de uma coluna capilar em CE é responsável pelo surgimento de reações de oxi-redução no eletrólito de corrida, devido ao fato de uma instrumentação de CE ser uma célula eletroquímica, sendo seus dois reservatórios comparados a duas semi-células. Sendo assim, a água presente como solvente no eletrólito sofre os efeitos da eletrólise, gerando, no cátodo, $2\text{H}_2\text{O} + 2\text{e}^- \rightleftharpoons \text{H}_2 + 2\text{OH}^-$ e no ânodo $2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$. A consequência destes produtos da eletrólise é a alteração do pH da solução no decorrer das análises.

Devido ao fato do pH da solução influenciar na mobilidade do EOF e, também, na mobilidade efetiva das espécies, são utilizados, em CE, sistemas tampões. No entanto, um ponto negativo no uso de sistemas tampões é a da limitação da composição do eletrólito. Ainda, mudanças na composição do eletrólito podem ser ocasionadas por reações de espécies eletroativas caso não sejam compensados pelo tampão.

O sistema de eletrólise separada desenvolvida por de Jesus *et al.* [6] visa minimizar os problemas de contaminação, bem como permite o uso de eletrólitos não tamponados. Sua instrumentação consiste em adicionar dois reservatórios extras a configuração convencional, ligando-os, via ponte salina contendo o mesmo eletrólito de corrida, aos dois reservatórios principais já existentes no equipamento. Dessa forma, o capilar encontra-se imerso nos reservatórios de injeção e descarte, enquanto que os eletrodos da fonte de alta tensão são imersos nesses dois reservatórios extras. A figura 19 ilustra os reservatórios em um sistema de CE convencional e em um equipamento com eletrólise separada.

Em nosso equipamento multi-capilar, o sistema de eletrólise separada, assim como o detector, foi ampliado a fim de atender as oito colunas capilares. Para o sistema de eletrólise do lado da baixa tensão foram utilizados seringas de 5 mL descartáveis como reservatórios secundários individuais para cada coluna. As seringas foram conectadas aos reservatórios principais de injeção por meio de tubos de polietileno, os quais foram preenchidos com eletrólito de corrida. Estes tubos constituem a ponte salina da conexão de baixa tensão.

Com o intuito de reduzir as dimensões do sistema de eletrólise separada no lado da alta tensão, os capilares foram alocados em pares. Desta forma, conseguiu-se reduzir em 50% o número de reservatórios secundários e, conseqüentemente, as dimensões físicas do módulo interno. A figura 20 ilustra o esquema de eletrólise separada utilizada em nosso equipamento multi-capilar.

O sistema de eletrólise separada demonstra ser um diferencial importante (além de inédito) para o estudo do campo elétrico radial, pois (pelo fato de se poder trabalhar com eletrólitos não tamponados), este sistema permite uma maior versatilidade na escolha dos eletrólitos de corrida, conseqüentemente, maior liberdade da escolha da faixa de pH, além de se minimizar as trocas periódicas de eletrólito caso este seja um sistema tampão.

3.1.3. A injeção da amostra

O sistema de injeção utilizado em nosso aparelho é basicamente um sistema de injeção hidrodinâmica, com uma implementação conhecida por Modulação por largura de pulso (ou pela sigla inglesa PWM - *Pulse-Width Modulation*).

A injeção hidrodinâmica é realizada quando se aplica pressão pela introdução de um gás no reservatório que contém a amostra, ou ainda, pela redução da pressão do reservatório de descarte, na outra extremidade do capilar. Optamos pela aplicação de vácuo no reservatório de descarte.

Na injeção hidrodinâmica por PWM, temos uma modulação ou chaveamento de uma válvula que irá estabelecer a diferença de pressão desejada entre os reservatórios. Uma bomba de aquário modificada para a realização de vácuo retira o gás de um câmara que a qual é responsável pelo amortecimento das flutuações exercidas pela pulsação desta bomba. Uma válvula solenóide faz o chaveamento da pressão, a qual é armazenada no sistema por um tempo definido via software, para sua estabilização. O comando W (*width*) é responsável pela largura da abertura das válvulas solenóides.

Quanto menor o valor de W , menor será abertura do solenóide e, conseqüentemente, maior o vácuo para a injeção da amostra. Outro comando é responsável pelo tempo de injeção da amostra no capilar.

Este sistema é bastante eficiente, pois fornece diversas combinações tanto para o tempo de injeção quanto para a largura da pressão de vácuo que se deseja obter. A figura 21 ilustra todo o sistema de injeção de nosso aparelho.

3.1.4. Adaptação do equipamento para o controle do campo elétrico radial

Para a presente pesquisa, foram necessárias pequenas adaptações do equipamento multi-capilar para a implementação do controle do campo elétrico radial, como, por exemplo, a disposição e o aterramento da coluna capilar no equipamento.

Todas as modificações efetuadas não foram, em nenhum momento, empecilho para a adaptação do aparelho, pois o mesmo foi elaborado de tal forma a receber implementações extras, ou seja, o equipamento foi criado com o intuito de se tornar uma espécie de “estação de provas” para as nossas pesquisas de instrumentação em eletroforese capilar. Assim, como uma resultante positiva de nossa adaptação conseguimos estabelecer dois pontos de detecção na coluna capilar, o que significa um melhor monitoramento e controle em tempo real do EOF.

Para nossos estudos, era necessário o uso de duas fontes de alta tensão bipolares. Os oito canais existentes no aparelho foram classificados em pares devido ao fato de serem projetados quatro reservatórios (com entrada para dois capilares cada um) do lado da alta tensão. Esta estratégia foi usada para diminuir as dimensões do aparelho. Sendo assim, os oito canais foram nomeados de 1 a 4 com subdivisões em A e B para facilitar a localização de uma determinada coluna, caso fosse necessário. Assim, canais 1 e 2 foram nomeados para 1A e 1B, os canais 3 e 4 para 2A e 2B e assim sucessivamente com os demais canais.

A única forma possível para o arranjo usando duas fontes de alta tensão era o de alocar o capilar entre dois dos oito canais existentes no aparelho. Com isso, posicionamos o capilar entre o canal 1A e o canal 4B, como segue na figura 22.

Figura 22. Representação da disposição da coluna capilar nos canais 1A e 4B na placa do detector C⁴D. Foto da coluna capilar alojada nos eletrodos do detector C⁴D.

Como comentado antes, este arranjo permite que uma mesma coluna capilar possua dois pontos de detecção (um a cerca de 15 cm do ponto de injeção e outro a 15 cm do ponto de descarte), o que nos possibilita um melhor monitoramento do EOF, pois os pontos de detecção servem, também, como uma espécie de “pontos marcadores de inversão” do EOF. Doravante, os pontos de detecção referentes aos canais 1A e 4B serão denominados, respectivamente, de detector 1 e detector 2.

Foi usado folha de alumínio de 0,02 mm para recobrir o capilar externamente e o aterramento foi feito através de um conector de garra ligado diretamente no terra do equipamento. Com este procedimento o potencial externo do capilar é de 0 V. A figura 23 ilustra a passagem do pico de sistema (pico d’água), em sentido normal, pelos dois pontos de detecção ao longo da coluna capilar.

Em relação à forma de injeção da amostra no capilar, foi feita uma pequena modificação em relação ao projeto inicial. No modo convencional de operação, o aparelho possui um amostrador com sistema óptico de posicionamento, o qual faz a injeção PWM automaticamente, sendo apenas necessário selecionar no software qual canal do equipamento vai receber a injeção.

Em nossa adaptação, os canais 1 e 4 acabam sendo conectados pela coluna capilar. Sendo assim, adaptamos o software para fazer vácuo no canal 4 e, por diferença de pressão, o material é injetado para dentro da coluna. Este procedimento foi empregado nos testes com o EOF no sentido normal. Quando era necessária a análise do EOF no sentido revertido (forma aniônica), o canal de injeção passava a ser o

número 4 e o de descarte o canal de número 1. A inversão do canal a fazer vácuo é selecionada, via software. O mesmo chaveamento PWM ainda é usado nesta adaptação e o tempo de injeção, tempo de estabilização, bem como o W são todos programados, também, via software.

Com relação ao software, este foi desenvolvido pelo nosso especialista de laboratório Fernando Silva Lopes, para aquisição de dados e para facilitar o acesso a todos os comandos do equipamento como: registro do sinal de detectores, corrente, temperatura etc. Foram também inseridos indicadores, botões de controle e um *tab* que possui parâmetros como, por exemplo, potencial a ser aplicado pela fonte de alta tensão, *off-set* dos detectores, tempo e potencial de injeção da amostra. Trata-se de um software construído em plataforma Lab VIEW, o qual se comunica com a interface NI 6229 (National Instruments).

Para o presente projeto de pesquisa acrescentamos, ao software, apenas o parâmetro que nos permitiu alterar para qualquer valor do potencial, positivo ou negativo, das fontes de alta tensão durante a corrida. Este incremento no software possibilitou que pudéssemos trabalhar com potencial radial (V_{rad}) que variavam de -20 kV a +20 kV, como será visto na discussão dos resultados. A figura 25 mostra tela do software desenvolvido para o aparelho multi-capilar e seu incremento para o campo elétrico radial.

Com estas alterações, foi possível realizar todos os nossos experimentos envolvendo o controle do EOF via campo elétrico radial. Não foram realizados experimentos que envolvessem mais de uma coluna capilar. Nossa intenção ao usar o equipamento multi-canal foi o de aproveitar a disponibilidade de duas fontes bipolares de alta tensão, do uso de dois detectores para monitoramento em tempo real e a fácil adaptação do software à técnica. Devido aos resultados satisfatórios obtidos com este equipamento, estudamos a possibilidade de criar um equipamento mais compacto e dedicado ao estudo do campo elétrico radial, com detecção condutométrica sem contato.

4. EXPERIMENTAL

4.1. Reagentes e soluções

Ácido acético glacial, Ácido Glucônico, Ácido, Lático, Ácido cítrico, EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético), Acetato de sódio, Borato de sódio decahidratado, TRIS (Tris-hidroximetil-aminometano), TAPS (Ácido Tris-propano sulfônico), Histidina, Cloreto de sódio, HIBA (Ácido hidroxí-isobutírico), Cloreto de potássio, Cloreto de Lítio, Cloreto de bário, Cloreto de cobre II, Nitrato de níquel II, Histidina foram adquiridos da MERCK (Darmstadt, Germany). MES (Ácido 2 morfolino-etano sulfônico) foi adquirido da (Fluka, USA). Todos os reagentes utilizados tinham de grau analítico. Todas as soluções, tampões e amostras foram preparadas utilizando-se água deionizada, com resistividade maior a 18.0 M Ω (NANOpure UV, Barnsted, Dubuque, USA).

4.2. Condicionamento do capilar de sílica

Os capilares de sílica de 75 μm d.i. e 360 μm d.e. (Agilent,USA) eram condicionados antes de cada análise com fluxo constante de solução de NaOH 1,0 mol.L⁻¹ por cerca de 10 minutos. Após o fluxo de NaOH, era realizada a limpeza com fluxo de água deionizada também por 10 minutos, seguida por fluxo de 10 minutos com o eletrólito de corrida. Posteriormente, aplicava-se a alta tensão até a estabilização da linha base. Paralelamente ao condicionamento do capilar, o sistema de termostatização era acionado e, com cerca de 15 minutos, todo o ambiente interno do aparelho estava estabilizado termicamente em 28° C. O capilar foi recoberto com folha de alumínio de 0,02 mm, em cerca de 35 cm na região central do capilar, o que perfaz 47% de sua extensão total. O seu aterramento se deu através de garras metálicas ligadas ao terra do equipamento.

Para todos os nossos testes, foi fixado: tempo de injeção em 10 segundos, tempo de estabilização em 30 segundos e o valor de W determinado em 0,5. Portanto, essa configuração de injeção será, doravante, denominada de condição de injeção padrão.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Controle do EOF

Após a adaptação do equipamento para o uso do campo elétrico radial, o primeiro passo foi o de estabelecer os potenciais eletroforéticos, de campo radial e polaridade das fontes para as nossas análises. Por uma questão de praticidade,

definimos que as fontes de alta tensão dos canais 1 e 4 seriam denominadas, respectivamente, como Fontes 1 e 2. Por convenção foi estipulado que a Fonte 2 sempre seria mais negativa que a Fonte 1. Foi estabelecido, também, que a diferença de potencial entre as fontes de alta tensão seria sempre de 20 kV. Com este potencial sempre fixo entre as fontes, pudemos estabelecer nove arranjos diferentes de tensão entre as Fontes 1 e 2, porém sempre mantendo o mesmo potencial eletroforético, como pode ser visto na tabela 1.

Podemos calcular o potencial radial resultante dos nove arranjos diferentes de tensão, fixados nas fontes, através da equação 9, pois V_{int} é a média aritmética das voltagens das fontes internas e V_{ext} é sempre 0 V.

Tabela 1. Valores dos potenciais aplicados entre as duas fontes de alta tensão e suas respectivas voltagens radiais¹

Fonte 1	Fonte 2	$V_{\text{eletroforética}}$	V_{rad}
-10	-30	20	20
-5	-25	20	15
0	-20	20	10
5	-15	20	5
10	-10	20	0
15	-5	20	-5
20	0	20	-10
25	5	20	-15
30	10	20	-20

¹ Todos os potenciais estão em kV.

Para determinação do EOF na forma catiônica (sentido normal), o *plug* d'água era injetado no canal 1 e era realizado vácuo no canal 4. Quando fazíamos a análise do EOF na forma aniônica (sentido revertido), a injeção passava a ser no canal 4 e o vácuo era feito no canal 1. Para facilitar os cálculos da mobilidade do EOF, tanto no sentido normal como no sentido reverso, os dois detectores foram dispostos ambos a cerca de 15 cm do ponto de injeção.

Denominamos de condição 1 aquelas nas quais o EOF seguia em sentido normal e de condição 2, aquelas nas quais o EOF estava revertido. Tais denominações facilitaram o aprisionamento de analitos na coluna, pois bastava criar duas condições distintas: uma na qual o EOF migrasse juntamente com os analitos e uma outra em que o EOF fosse revertido. Com o EOF revertido, era possível reter o analito na coluna ou até mesmo reverter o seu sentido. Com isso, criávamos um *trap* na coluna capilar e aumentávamos a resolução entre os analitos. Um comando de chaveamento no software permitia a mudança, em tempo real, das condições.

Como relatado antes, podemos avaliar a μ_{EOF} no sentido normal e no sentido reverso através da mudança do lado de injeção, ou seja, se a injeção for do canal 1 para o canal 4 determinamos o EOF no sentido normal. Do canal 4 para o canal, o EOF no sentido reverso. Todas as determinações foram realizadas sob a condição imutável de manter uma diferença de potencial de 20 kV entre as fontes e ainda, com a premissa da Fonte 2 ser mais negativa em relação a Fonte 1.

Nossos estudos revelaram também como determinar a μ_{EOF} em tempo real, o que nos permite fazer compensações na migração do EOF durante uma corrida, o que permite compensar dinamicamente a mobilidade aparente dos analitos.

Para este monitoramento em tempo real, adotou-se o seguinte procedimento. Do ponto de injeção até o detector mais próximo existe cerca de 15 cm (L_1), como mostra a figura 26. Assim, quando o *plug* d'água passa pelo detector, obtém-se, além da distância já sabida (L_1), o tempo (t_1) que o *plug* d'água levou para percorrer os 15 cm. Isto permite calcular a velocidade do EOF por $v_{EOF1} = L_1/t_1$. No ponto de reversão (P_r), muda-se a condição de forma a promover a reversão do EOF. Este é um ponto importante, pois como é conhecida a velocidade fluxo e também o tempo (t_2) que o *plug* d'água levou até o ponto de reversão, pode-se estimar qual a distância (L_x) que o mesmo percorreu até ser revertido. O cálculo para L_x é dado por: $L_x = v_{EOF1}/t_2$. O cálculo da v_{EOF2} (revertido) é baseado na expressão: $v_{EOF2} = L_x/t_2$, pois L_x é a distância do ponto de reversão até o detector e t_2 , o tempo necessário para o EOF ser detectado novamente. A figura 26 ilustra esse conceito.

Figura 26. A) Ponto de reversão entre dois fluxos eletrosmóticos de sentidos opostos. B) representação ilustrativa do conceito de determinação em tempo real da μ EOF.

5.1.1. Faixa de controle

Nosso equipamento permitiu que conseguíssemos potenciais radiais entre -20 kV e +20 kV. Essa é uma questão tecnológica a se destacar do ponto de vista instrumental, pois, na literatura, a maioria dos trabalhos como, por exemplo, o de Jorgenson [5] apresenta menor alcance dos potenciais radiais, da ordem de -15 kV a +15 kV (para a separação de leucina e isoleucina), outros trabalhos apresentam potenciais radiais entre -10 kV e +10 kV [16-20,26,36].

A maior abrangência do V_{rad} em nosso equipamento nos possibilitou uma maior faixa de controle da mobilidade do EOF, tanto para valores positivos, quanto para a sua reversão. A tabela 2 e a figura 27 ilustram, respectivamente, a variação da μ_{EOF} em função do V_{rad} , para ácido acético 500 mmol.L⁻¹ em pH = 2,55.

Tabela 2. Dependência da μ_{EOF} em função do V_{rad} para ácido acético 500 mol.L⁻¹ em pH = 2,55

V_{rad}	μ_{EOF}	Sentido do EOF
20	-2.78E-04	revertido
15	-2.36E-04	revertido
10	-1.51E-04	revertido
5	-1.01E-04	revertido
-5	8.93E-05	normal
-10	1.72E-04	normal
-15	2.62E-04	normal
-20	3.51E-04	normal

Vê-se que a mobilidade do EOF varia de forma acentuada, sendo dependente do V_{rad} aplicado durante a corrida. O eletroferograma para $V_{rad} = 0$ V foi omitido, pois ao que parece, o μ_{EOF} possuía, nesta condição, um valor igual ou muito próximo de zero. Para se verificar esta hipótese, foram realizados ensaios com cerca de 60 minutos ininterruptos de eletroforese, com $V_{rad} = 0$ V, no sentido normal e reverso e, em nenhum deles, o *plug* d'água foi detectado. Nossos resultados para o ácido acético 500 mmol L⁻¹ em pH = 2.55 demonstram que conseguimos variar a mobilidade do EOF de $-27.8 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a $35.1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, como mostrado a seguir.

Figura 28. Dependência da μ_{EOF} em relação à variação do V_{rad} para HAc 500 mmol.L⁻¹ pH = 2.55.

Pelo gráfico da figura 28, há indícios de que nossa suposição de que a μ_{EOF} em $V_{rad} = 0$ V seja igual ou próximo de zero parece se confirmar, pois conforme os valores de V_{rad} tornam-se positivos, a mobilidade do fluxo eletrosmótico tende a ser reduzida, até um momento em que ocorre a sua completa reversão. Sem dúvida existe um potencial radial em que o EOF é cancelado e, ao que parece, esse potencial é de 0 V ou bem próximo a este valor.

Uma comparação entre os resultados para o ácido acético 500 mmol.L⁻¹ obtidos experimentalmente e a equação 19 da modelagem matemática (aplicada ao mesmo ácido), mostra que o aumento do potencial radial ocasiona a diminuição da μ_{EOF} . No entanto, há uma diferenciação entre os valores dos pontos das curvas, pois a equação

da modelagem matemática foi elaborada para a determinação do EOF em um V_{rad} constante e em nossa montagem, como visto anteriormente, o V_{rad} é dependente da localização ao longo da coluna capilar. A figura 29 ilustra a comparação feita entre o resultado experimental e a modelagem matemática, para o ácido acético 500 mmol.L⁻¹ em pH 2,55.

Figura 29. Dependência da μ_{EOF} em relação à variação do V_{rad} para HAc 500 mmol.L⁻¹ pH = 2.55. Em A, resultado experimental e, em B, resultado proveniente da modelagem matemática.

Outro aspecto interessante surge se compararmos 2 condições distintas. Por exemplo, se compararmos uma condição na qual sejam fixados os valores das fontes em: Fonte 1 = 10 kV e Fonte 2 = 30 kV e uma outra condição a qual seja como se fosse sua “imagem especular”, seu reflexo, sendo então a Fonte 1 = -30 kV e a Fonte 2 = -10 kV, veremos que a μ_{EOF} nestas 2 condições não possui o mesmo valor

com o sinal invertido. Verificamos que a condição 1, neste caso, gera um V_{rad} de -20 kV e que na condição 2, $V_{rad} = +20$ kV. A mobilidade na condição 1, que propicia o EOF no sentido normal, é cerca de 20% maior em módulo que aquela da condição 2, que promove a sua reversão. Esse resultado se dá ao fato de que, na condição 1, a densidade de carga, proveniente do incremento do potencial radial, é somada a densidade de carga da parede sílica. Isso acarreta, quando o EOF está em sentido normal, num aumento de sua mobilidade. Por outro lado, na condição 2, a densidade de carga proveniente do potencial radial possui sinal inverso a da densidade de carga da sílica e, conseqüentemente, o valor resultante será menor, o que promove um menor valor da μ_{EOF} em sentido reverso. O gráfico 30 ilustra a relação existente entre a densidade de carga da sílica e do V_{rad} em função do pH.

Figura 30. Dependência da densidade de carga em função do pH. Em A, perfil de densidade de carga em função do pH até o valor de 5,0, sendo densidade de carga da sílica (linha preta), densidade de do $V_{rad} +20kV$ (linha azul) e densidade de carga do $V_{rad} -20kV$ (linha vermelha). Em B, perfil de densidade de carga em função do pH até o valor de 10,0, sendo densidade de carga da sílica (linha preta), densidade de do $V_{rad} +20kV$ (linha azul) e densidade de carga do $V_{rad} -20kV$ (linha vermelha).

Empregamos o uso do potencial radial em vários eletrólitos, os quais foram escolhidos em função do valor de pH. Como visto anteriormente, o pH é um fator relevante, pois está relacionado com a densidade de carga da superfície de sílica. Sendo assim, realizamos teste em várias faixas de pH com o intuito de verificar a extensão da influência do potencial radial sobre a μ_{EOF} . Como já era esperado, o alcance de controle sobre o EOF que a V_{rad} proporciona torna-se cada vez menor com o aumento do valor do pH. O gráfico da figura 31 ilustra os eletrólitos estudados para valores de V_{rad} entre -20 kV e +20 kV.

Figura 31. Faixa de controle do EOF em função do pH. Intervalo do potencial radial aplicado: 20 kV e - 20 kV. A) Ác. Glucônico 200 mmol.L⁻¹ pH = 2,18; B) HAc 0,5 mol.L⁻¹ pH = 2,55; C) HIBA 15 mmol.L⁻¹ pH = 3,00; D) Ác. cítrico 15 mmol.L⁻¹ pH = 3,54; E) Tampão acetato 20 mmol.L⁻¹ pH = 4,77; F) MES/His 20 mmol.L⁻¹ pH = 6,10; G) MES/His 20 mmol.L⁻¹ + CTAB 125 μmol.L⁻¹ pH = 6,08; H) KCl 20 mmol.L⁻¹ pH 7,0; I) KCl 16 mmol.L⁻¹ + BaCl₂ 2 mmol.L⁻¹ pH 7,05; J) KCl 16 mmol.L⁻¹ + CaCl₂ 2 mmol.L⁻¹ 7,08; K) Tris/Taps 20 mmol.L⁻¹ pH = 8,22; L) Tris/Taps 20 mmol.L⁻¹ + CTAB 15 μmol.L⁻¹ pH = 8,22; M) Tris/Taps 20 mmol.L⁻¹ + CTAB 25 μmol.L⁻¹ pH = 8,22; N) Tris/Taps 20 mmol.L⁻¹ + CTAB 50 μmol.L⁻¹ pH = 8,22.

Iniciamos nossos estudos em campo elétrico radial com soluções em pH acima de 2,0, pois, segundo a literatura [7], quando a sílica atinge o ponto de carga zero (ponto no qual o potencial elétrico superficial é nulo), a dupla camada elétrica colapsa e o EOF deixa de existir [40].

Dessa forma, o pH mais baixo que trabalhos foi para o ácido glucônico (conforme a figura 29), cujo valor era de 2,18. Com a variação de V_{rad} de -20 kV a +20 kV, obtivemos, respectivamente, $\mu_{EOF} = 17,06 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e $-29,59 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Um fato interessante é o de que o módulo do limite negativo de μ_{EOF} é maior do que aquele no sentido positivo. No pH em questão, muitos grupos silanóis ainda estão protonados.

Comparando-se o alcance das mobilidades encontradas para o ácido acético 500 mmol.L⁻¹ em pH = 2,55 e o ácido cítrico 15 mmol.L⁻¹ pH = 3,50 (sendo que o pH foi corrigido para este valor com hidróxido de potássio), verifica-se que os intervalos são, respectivamente, de $\mu_{\text{EOF}} = -27,83 \times 10^{-5} \text{ cm}^2.\text{V}^{-1}.\text{s}^{-1}$ a $35,06 \times 10^{-5} \text{ cm}^2.\text{V}^{-1}.\text{s}^{-1}$ e de $\mu_{\text{EOF}} = -17,01 \times 10^{-5} \text{ cm}^2.\text{V}^{-1}.\text{s}^{-1}$ a $13,51 \times 10^{-5} \text{ cm}^2.\text{V}^{-1}.\text{s}^{-1}$. O aumento do pH, como era de se esperar, reduziu o alcance efetivo do EOF, visto que a densidade de carga superficial aumentou. Esse aumento de uma unidade de pH reduziu a faixa de ação em cerca de 50%, pois no pH = 2,55 o alcance total do campo elétrico radial cobria uma extensão de $62,9 \text{ cm}^2.\text{V}^{-1}.\text{s}^{-1}$, enquanto que no pH = 3,50, este valor caiu para $30,52 \text{ cm}^2.\text{V}^{-1}.\text{s}^{-1}$. A força iônica para ambos os ácidos é em torno de 2,53 mmol.L⁻¹, portanto, um efeito de compressão da dupla camada elétrica pela força iônica fica descartado.

O eletrólito contendo HIBA (ácido hidroxí-isobutírico) foi o que apresentou a maior faixa de controle. A extensão de controle do EOF é por volta de $72,74 \text{ cm}^2.\text{V}^{-1}.\text{s}^{-1}$, considerando-se os valores positivo e negativos do EOF. Era de se esperar que este eletrólito de corrida tivesse, por causa do seu pH por volta de 3,0, uma extensão menor do que aquela do ácido acético. No entanto, ao compararmos a força iônica do HIBA, a força iônica fica em torno de 1,43 mmol.L⁻¹, ou seja, cerca de 1 mmol.L⁻¹ menor que para o ácido acético. Com isso, constata-se que o efeito do campo elétrico radial em um

eletrólito, depende tanto do pH como, também, da força iônica da solução. O gráfico da figura 32 ilustra a μ_{EOF} em função da força iônica dos eletrólitos.

Constata-se que no sistema tampão acetato, em pH = 4,77 e o sistema tampão MES/His, em pH = 6,1, ambos com força iônica em torno de 10 mmol.L⁻¹, o EOF não pode ser mais revertido. No entanto, ainda temos um controle sobre sua mobilidade, só

que, no entanto, com uma faixa de controle mais limitado, entre $\mu_{\text{EOF}} = 6,37 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a $26,32 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para o tampão acetato e de $\mu_{\text{EOF}} = 27,28 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a $40,20 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para o sistema MES/His. Ainda, neste último tampão, verifica-se que a faixa de controle (por volta de $12,9 \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) é ainda menor do que para o tampão acetato (em torno de $29,9 \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), pois aqui o fato do pH possuir um valor maior para MES/His influencia severamente na densidade de carga da sílica e, conseqüentemente, na extensão do controle do fluxo eletrosmótico.

Escolheu-se realizar um estudo mais aprofundado em torno do MES/His pelo fato de ser um sistema tampão de uso muito difundido em eletroforese capilar e ainda pela faixa de pH em que esse eletrólito se encontra.

Nosso intuito com o emprego do campo elétrico radial era o de poder ter controle efetivo do EOF em várias faixas de pH. Tal prática se torna inviável em pH elevado, novamente, devido ao fato do alto grau de dissociação dos grupos silanóis, e somente com o emprego de um V_{rad} muito elevado, tal controle seria possível, o que se torna impraticável com a atual configuração de que dispomos.

Para compensar essa concentração de silanolato disponível, resolvemos adicionar um surfactante catiônico ao eletrólito de corrida para, dessa forma, reduzir a densidade de carga da superfície e, com isso, conseguir um maior controle em pH elevado. Assim, escolhemos empregar o CTAB (Brometo de cetil-trimetil amônio) em concentração suficiente para apenas diminuir a densidade de carga da superfície de sílica e não para promover a reversão do EOF pela sua adição. Foi preparada uma solução estoque de MES/HIS $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, em $\text{pH} = 6,1$ e realizado, a seguir, várias

corridas com adições de CTAB que variaram de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ a $150 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para, dessa forma, averiguar qual seria a concentração de surfactante necessária para a reversão do EOF via V_{rad} . A figura 33 ilustra as várias concentrações estudadas e suas respectivas faixas de controle da μ_{EOF} .

A faixa de controle para o tampão MES/His 20 mmol.L^{-1} sem qualquer adição de CTAB é de $13,20 \text{ cm}^2.\text{V}^{-1}.\text{s}^{-1}$. Verifica-se que, com a adição de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$, há uma diminuição drástica da faixa de controle do EOF, caindo para cerca de apenas $3,14 \text{ cm}^2.\text{V}^{-1}.\text{s}^{-1}$. Esse resultado pode ser explicado pelo fato do CTAB ser um surfactante catiônico e estar sendo adsorvido na camada de sílica. Com isso, algumas

moléculas de CTAB neutralizam parte da carga negativa proveniente do silanolato de tal forma que a dupla camada elétrica acaba sendo reduzida, como na figura 34.

Ao passo que a concentração de CTAB é aumentada, ocorre, também, um aumento gradativo da faixa do EOF (que se desloca também para a forma mais aniônica, em comparação com o tampão sem surfactante), fato que pode ser verificado nas concentrações de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $125 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Com $125 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de CTAB, disponibiliza-se mais moléculas do surfactante para interação e estas, por sua vez, são adsorvidas na parede carregada de sílica por influência eletrostática (adsorção não específica).

As forças de London atuam na parte alifática (cauda) da molécula do surfactante [33]. Estas interações são mais fortes que a repulsão eletrostática existente

entre os grupos da cabeça da molécula com cargas iguais. Assim, a resultante é um par de moléculas de surfactante, com um grupo catiônico voltado para a superfície de sílica e com o outro grupo dirigido para a solução. Este tipo de adsorção de tensoativos em interface sólido/líquido é conhecido pelo nome de admicelas [33], como ilustrado na figura 35.

Tal arranjo das moléculas atenuou a densidade de carga da sílica ao ponto em que, a $125 \mu\text{mol.L}^{-1}$, conseguimos tanto aumentar o controle do EOF como também induzimos a reversão do EOF. A figura 36 mostra a dependência da μ_{EOF} com o potencial radial para o tampão MES/His 20 mmol.L^{-1} + CTAB $125 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Figura 36. Dependência da μ_{EOF} em relação à V_{rad} para MES/His 20 mmol.L⁻¹ + CTAB 125 μ mol.L⁻¹. N = 2.

Para os resultados na concentração em 150 μ mol.L⁻¹ de CTAB, a faixa de controle volta a se atenuar, sendo apenas de 2,25 $cm^2.V^{-1}.s^{-1}$ e o EOF totalmente revertido. É possível que a formação da bicamada esteja quase totalmente estabelecida, ou seja, o número de agregados em forma de admicelas recobriu toda a superfície interna do capilar, revertendo, com isso, o sentido do EOF.

Os resultados em MES/His + CTAB são significativos, pois até o momento, não localizamos na literatura, nenhum trabalho ao qual a reversão do EOF tenha sido alcançada neste pH, com exceção do trabalho de Hayes [16], o qual se vale de silanização da superfície interna do capilar. Lee *et al.* [21] trabalharam com o

incremento de campo elétrico radial e fizeram uso de outro surfactante, o DTAB (Brometo de dodecil trimetil-amônio). No entanto, os autores fazem uso de concentrações da ordem de 1 mmol.L^{-1} e não conseguem promover um controle do EOF, o qual sempre se encontrava, dada a alta concentração de DDAB, na forma aniônica.

Estes resultados abrem caminhos para a implementação de V_{rad} para se estudar outros sistemas tampões associados a surfactantes. Assim, o próximo teste foi trabalhar como tampão Tris/Taps 20 mmol.L^{-1} , em $\text{pH} = 8,22$ e com a adição gradativa de CTAB, conforme foi feito com o MES/His. Optou-se por se trabalhar com a concentração de 20 mmol.L^{-1} pelo fato do valor da força iônica do Tris/Taps (por volta de $9,3 \text{ mmol.L}^{-1}$) se aproximar do valor da força iônica do MES/His.

Notou-se uma diferença nos valores da faixa de controle, entre os dois eletrólitos, por volta de $12,9 \text{ cm}^2.\text{V}^{-1}.\text{s}^{-1}$, no MES/His e de $8,0 \text{ cm}^2.\text{V}^{-1}.\text{s}^{-1}$ no Tris/Taps. Tal diferença se dá por conta do aumento do pH e, conseqüentemente, do aumento da densidade de carga. No entanto, por se tratar de um pH demasiado elevado para o controle do EOF via campo elétrico radial, tal faixa de controle é expressiva.

Mais uma vez, com o intuito de reduzir a densidade de carga superficial da sílica, foram feitos vários testes de adições de CTAB, com concentrações diferentes para, dessa forma, localizar uma concentração que promovesse um aumento significativo na faixa de controle do EOF.

Diferentemente do que ocorreu como MES/His, no tampão Tris/Taps, o aumento da concentração de CTAB promoveu redução na μ_{EOF} e na faixa de controle. Ainda, na concentração de $50 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ de CTAB, o sentido do EOF passa a ser revertido pelo

estabelecimento da bicamada e mais, a variação do V_{rad} parece não causar nenhuma mudança na mobilidade do EOF, conforme mostra a figura 37.

Dessa forma, com a faixa de controle reduzida, cerca de $0,38 \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, e com o sentido do EOF já revertido pelo surfactante, optou-se pela continuidade dos estudos com outras substâncias que também promovem a diminuição da densidade de carga da sílica. No entanto, não se descarta aqui a perspectiva de se estudar outros tampões associados com surfactantes, os quais podem gerar resultados satisfatórios associados ao campo elétrico radial.

Paralelamente ao estudo com o CTAB, pesquisamos o efeito de alguns adsorvedores como o Ba^{2+} e o Ca^{2+} em $\text{pH} = 7$. Pelo fato do equipamento possuir eletrólise separada, podemos realizar inúmeros testes com eletrólitos não tamponados. Sendo assim, escolhemos trabalhar com um eletrólito trivial: o KCl na concentração de 20 mmol.L^{-1} .

O pH de uma solução de KCl em 20 mmol.L^{-1} encontra-se por volta de $\text{pH} = 7$ e neste valor de pH a reversão do fluxo é inviável, mesmo aplicando-se o valor máximo de V_{rad} . Medimos a faixa de alcance do V_{rad} nestas condições e encontramos um valor por volta de $16,1 \text{ cm}^2.\text{V}^{-1}.\text{s}^{-1}$. Não é uma expressiva faixa de alcance, mas, no entanto, um resultado positivo, pois trata-se de um pH elevado para o uso de V_{rad} e também pelo fato de uma variação na mobilidade aparente de $16,0 \text{ cm}^2.\text{V}^{-1}.\text{s}^{-1}$.

A adição de BaCl_2 e CaCl_2 ao KCl foi feita, mantendo-se a mesma força iônica do eletrólito. Dessa forma, foram realizados ensaios para um eletrólito contendo KCl 20 mmol.L^{-1} variando-se a concentração de cloreto de bário e de cálcio de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ até 8 mmol.L^{-1} . Para os resultados com concentração de CaCl_2 e BaCl_2 abaixo de 1 mmol.L^{-1} , não houve aparente mudança na faixa do EOF. Já com a concentração desses dois sais maior que 1 mmol.L^{-1} , tivemos de corrigir, também, a concentração do KCl a fim de manter a força iônica do eletrólito e ainda de se evitar uma corrente eletroforética muito grande. Dessa forma, ajustamos a concentração do eletrólito para KCl 16 mmol.L^{-1} e de 2 mmol.L^{-1} para BaCl_2 e CaCl_2 . Não utilizamos maior valor na concentração de cálcio e bário, pois a corrente eletroforética já se encontrava em valor demasiado alto, da ordem de $28 \mu\text{A}$.

Os resultados mostram que adição de metais alcalinos terrosos atenua a densidade de carga da superficial de tal modo a diminuir a faixa de controle do EOF, não promovendo, nas condições estudadas, a reversão do EOF. No entanto, verifica-se que a faixa para a condição com o eletrólito de KCl 16 mmol.L⁻¹ e BaCl₂ 2 mmol.L⁻¹ é de aproximadamente $7,0 \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, enquanto que para o eletrólito contendo KCl 4 mmol.L⁻¹ e CaCl₂ 2 mmol.L⁻¹, a faixa é de $3,8 \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. O resultado obtido com essas faixas de controle pode indicar, assim como para o sistema MES/His visto anteriormente, que um possível controle com reversão do EOF seja possível, pois o controle foi atenuado como no sistema de MES/His, o que indica uma sensibilização na densidade de carga da sílica. Talvez caso nestas condições de eletrólitos pudéssemos aplicar um maior valor V_{rad} , conseguiríamos uma maior faixa de controle e possivelmente a reversão do EOF, também, neste pH. Ainda, caso a corrente eletroforética não tivesse chegado a um valor elevado (por conta da adição de bário e

cálcio ao sistema), poderíamos realizar mais alguns arranjos de concentrações entre o KCl, BaCl₂ e CaCl₂ para verificar se a V_{rad} poderia promover um aumento na faixa de controle do EOF.

5.1.2. Separação de espécies e resolução

5.1.2.1. Separação de aminoácidos: Leucina e Isoleucina

O item anterior foi destinado, exclusivamente, a avaliação da faixa de controle do V_{rad} em vários valores de pH. Como era esperada, essa faixa de controle diminui conforme aumentamos o valor de pH em virtude do aumento de densidade de carga da superfície do capilar. No entanto, conseguimos obter um controle expressivo e até mesmo a reversão do EOF no sistema tampão MES/His, em pH = 6. Neste novo tópico, voltamos nossa atenção à separação de alguns compostos via campo elétrico radial. Com a faixa de controle do EOF estabelecido, nossa intenção agora é o de avaliar o uso do V_{rad} para o aumento da resolução entre espécies químicas. O intuito aqui é de proporcionar uma “coluna capilar infinita”. Tal estratégia é alcançada desde que um analito tenha mobilidade efetiva menor que nosso controle. Assim, através das sucessivas reversões do sentido do EOF proporcionamos um *trap* da amostra, dentro da coluna, até que o grau de resolução desejado seja alcançado, como exemplificado na figura 39.

A resolução entre 2 analitos, em eletroforese capilar, pode ser calculada através da equação:

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{(w_1 + w_2)} \quad \text{Eq. 21}$$

onde t_1 e t_2 são respectivamente, o tempo de migração do analito 1 e do analito 2, em segundos e w_1 e w_2 são, respectivamente, a largura do pico do analito 1 e a largura do pico do analito 2, em segundos.

Para nossa avaliação da resolução, utilizamos como eletrólito de corrida o ácido acético 500 mmol.L⁻¹, por se tratar de um eletrólito de linha base estável e por fornecer uma relevante faixa de controle do EOF, tanto na forma catiônica como na aniônica. Seleccionamos dois aminoácidos, a leucina e a isoleucina, cuja diferença de mobilidade efetiva entre eles, neste eletrólito, é de apenas $0,127 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, sendo, ainda, seus respectivos pkas (dos grupos carboxila) muito semelhantes (2,33 para a leucina e

de 2,32 para a isoleucina), segundo consta na simulação realizada no software Peakmaster [56].

Foram realizados cerca de 125 minutos de eletroforese ininterrupta, na qual conseguiu-se a separação dos dois aminoácidos. O V_{rad} variou neste experimento de -10 kV a +10 kV. As fontes foram ajustadas da seguinte forma: condição 1 com Fonte 1 = + 20 kV e Fonte 2 = 0 V; condição 2 com Fonte 1 = 0 V e Fonte 2 = - 20 kV. As reversões eram feitas todas as vezes que os picos dos dois aminoácidos passavam pelos detectores. Por vezes, a reversão era feita no detector número 2, quando os analitos e o EOF estavam em sentido normal, ora era feita no detector 1, ou seja, quando tanto os aminoácidos quanto o EOF estavam na forma aniônica.

Esse V_{rad} promoveu uma μ_{EOF} na condição 1 de $17,24 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e uma μ_{EOF} na condição 2 de $- 15,14 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Os valores das mobilidades aparentes (μ_{Apa}) dos aminoácidos ficaram entre $27,37 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e $-5,01 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, para a leucina, e $27,49 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e $\mu_{\text{Apa}} = - 4,88 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, para a isoleucina.

Segundo a simulação feita no software Peakmaster, utilizando-se as mesmas condições de eletrólito e campo elétrico num experimento convencional de eletroforese capilar, seria necessária uma coluna capilar de 4 m de comprimento total, com um potencial de 110 kV. Ainda, nesta simulação, por volta de 58 minutos, os picos começariam a mostrar um pequeno grau de separação, como se pode ver na figura 40.

Figura 40. Simulação do Peakmaster 5.2. Separação de Isoleucina e Leucina no eletrólito HAc 0,52 mmol.L⁻¹ em pH = 2,55, 110,8 kV, capilar 400 cm (E = 277 V/cm).

Em nosso equipamento, esse mesmo experimento foi realizado com uma coluna de 74 cm e sob um potencial eletroforética de 30 kV. Os eletroforegramas da figura 41 mostram o histórico do aumento da resolução ao longo do tempo.

A figura 41 A, mostra a primeira passagem dos analitos pelo detector com resolução muito baixa. Também na figura 41 B, a resolução está comprometida, porém podem-se ver indícios de que os picos começam a se desdobrar. Já na figura 41 C, vemos, claramente, dois picos desdobrados com resolução em torno de 0,90. Na figura 41 D, o tempo de permanência na coluna aumentou a resolução para 1,15. Decidimos

interromper a corrida por volta de 125 minutos, uma vez que o conceito estava demonstrado.

De fato, existe uma relação entre tempo de permanência na coluna capilar e o efeito de alargamento dos picos. Podemos aprisionar o analito por tempo indefinido na coluna, mas em consequência disso, a difusão longitudinal tenderia a ser maior.

Uma vantagem de nossa instrumentação em relação ao trabalho de Jorgenson [5] reside no fato de podermos realizar a detecção em tempo real, ou seja, conseguimos detectar os picos dos analitos tanto no sentido normal, quanto no sentido reverso. Isso nos proporciona saber, de uma forma mais eficiente, o grau de separação dos analitos. A figura 42 ilustra dois eletroferogramas, um no sentido normal e outro detectado no sentido reverso.

Dado ao relevante resultado obtido na separação da leucina e isoleucina e mais, como a nossa presente pesquisa está calcada em levantar estudo de base sobre o uso do campo elétrico radial em eletroforese capilar, decidimos estudar a possibilidade de se realizar uma separação isotópica.

5.1.2.2. Separação isotópica

Como é conhecido, isótopos são átomos que possuem igual número de prótons e diferente do número de massa gerada pela diferença no número de nêutrons. Na natureza, os isótopos aparecem em certa proporção isotópica, que varia de elemento para elemento.

A diferença existente entre as massas dos isótopos promove ligeiras diferenças nas mobilidades efetivas dos mesmos. Assim, por exemplo, a mobilidade do $^{35}\text{Cl}^-$ difere da mobilidade do $^{37}\text{Cl}^-$ por um fator de apenas 0,12% [32].

Na literatura encontramos trabalhos como os de Lucy *et al.* [32], no qual os autores se valem da eletroforese capilar para realizar a separação isotópica. No entanto, tal separação exige um controle muito fino da mobilidade do EOF.

Sendo assim, nossa expectativa era a de que, com o controle em tempo real do EOF, conseguiríamos promover uma separação isotópica, pois, em determinados eletrólitos, tínhamos uma faixa de controle expressiva.

Dentre os vários elementos que apresentam isótopos na natureza, nossa primeira escolha seria entre os elementos dos primeiros períodos da tabela periódica, visto que o efeito isotópico seria mais pronunciado em átomos de menor massa.

Nossa primeira escolha foi o lítio tanto por se tratar de um átomo do segundo período da tabela periódica, quanto pela sua mobilidade, por volta de $39,0 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, sendo ainda sua relação isotópica de 92,5% $^7\text{Li}^+$ e 7,5% como $^6\text{Li}^+$ [50]. Utilizamos novamente o ácido acético $500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ como eletrólito (pelo fato de apresentar uma linha base estável e também pelo lítio apresentar um bom sinal de condutividade) e um V_{rad} de +20 kV de forma a promover a maior taxa de EOF no sentido invertido. No entanto, não foi possível aprisionar o íon lítio na coluna pelo tempo necessário para provocar o desdobramento de seus isótopos.

Outra espécie de interesse, numa ordem crescente visando elementos de baixa massa, seria o boro. Este apresenta uma relação isotópica mais interessante com $^{10}\text{B} = 19,9\%$ e $^{11}\text{B} = 80,1\%$ [51]. Para o boro, a relação isotópica tem especial importância, pois é conhecido que o ácido bórico formado com boro 10 tem pKa

diferente do formado com boro 11. Para estudarmos o boro, precisaríamos trabalhar com esse elemento na forma de borato. No entanto, surge aqui um ponto a ser considerado, que é o fato do borato ser formado apenas em valores de pH elevado, acima de 8,0. Sendo assim, não conseguiríamos uma faixa de controle adequado nesta faixa de pH com a atual configuração de que dispomos, fato este que nos levou a descartar fazer qualquer estudo sobre este elemento.

Outro conjunto de espécies seria os de metais de transição, principalmente dos elementos que compõem o quarto período da tabela periódica, visto que para eles, também, o efeito isotópico seria mais pronunciado do que para os demais metais dos períodos posteriores. Os elementos escolhidos para os nossos estudos foram: níquel (cinco isótopos estáveis) [52], cobre (dois isótopos estáveis) [53], zinco (quatro isótopos estáveis) [54]. Também o chumbo (quatro isótopos estáveis) [55] foi escolhido para os nossos estudos dado a riqueza isotópica que este possui.

Não foi possível aprisionar ou mesmo reter por um tempo considerável estes metais na coluna com o eletrólito ácido acético 500 mmol.L⁻¹ (mesmo em pH baixo e com a μ_{EOF} revertida ao máximo valor), pelo fato dos mesmos possuírem alta mobilidade.

Então, nossa próxima estratégia foi a de se propiciar a formação de complexos lábeis e, assim, atenuar a mobilidade efetiva dos metais para uma faixa na qual a nossa faixa de controle do EOF pudesse prendê-los (ou até mesmo revertê-los), por um tempo maior dentro do capilar.

Nossa primeira escolha foi a do EDTA dissódico, tanto pela sua alta constante de formação de complexos com os metais de nosso estudo.

Tabela 3. Constantes de Formação dos Complexos de EDTA. Ver referência 39.

Cátion	K
Ni ²⁺	$4,2 \times 10^{18}$
Cu ²⁺	$6,3 \times 10^{18}$
Zn ²⁺	$3,2 \times 10^{16}$
Pb ²⁺	$1,1 \times 10^{18}$

Sendo assim, adicionamos, ao ácido acético 500 mmol.L⁻¹, EDTA dissódico em várias concentrações para verificarmos seu efeito (figura 45).

A concentração inicial usada de EDTA foi de 100 µmol.L⁻¹. Nesta condição, todos os metais encontravam-se complexados com o EDTA e apareciam na forma aniônica [Metal-EDTA]ⁿ⁻, pois, quando aplicávamos uma condição favorável ao EOF no sentido normal, não era detectado qualquer sinal pertinente. Sendo assim, adicionamos nas amostras, uma pequena quantidade de sódio, a fim de se verificar a possibilidade de algum problema em nosso equipamento, tanto da parte de injeção como detecção. Conseguimos detectar o sódio. No entanto, não houve indício de sinal analítico dos demais metais. Logo constatamos que de fato os metais de transição haviam sido expulsos da coluna capilar por estarem na forma aniônica, conforme mostra a figura 45.

Para maximizar nossas corridas, passamos a realizar testes com apenas cobre e chumbo, a fim de coletarmos o maior número de informações no menos tempo possível. Como as constantes de formação para estes metais são próximas umas das outras, percorreríamos um maior número de combinações eletrólito e complexante em menor espaço de tempo.

Reduzimos a concentração de EDTA dissódico dissolvido no eletrólito para $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Nesta nova combinação de eletrólito e complexante, os picos do cobre e do chumbo voltaram a ser detectados, mas, no entanto, a mobilidade de ambos era muito semelhante à mobilidade do metal livre, segundo nossa simulação no Peakmaster. Isso indicava que os mesmos não haviam sofrido modificações significantes em suas mobilidades. A figura 46 traz os eletroferogramas para cobre e chumbo 1 mmol.L^{-1} .

Não foi possível estabelecer uma condição de bom compromisso para a formação de complexos com o EDTA dissódico que satisfizesse nossas necessidades com relação à mobilidade dos metais, pois quando aumentávamos a concentração de EDTA havia a formação de complexos inertes (quando a substituição de ligantes ocorre lentamente). Como resultados disto, havia a formação de complexos na forma aniônica os quais possuíam, também, expressiva mobilidade impedindo o seu aprisionamento na coluna.

Nossos próximos testes envolvendo V_{rad} e a possibilidade de separação de isótopos foi conduzida em outros eletrólitos, cuja característica era de propiciar a formação de complexos com os metais durante a corrida. Assim, empregamos uma série de eletrólitos nos respectivos valores de pH: Ácido Glucônico 200 mmol.L^{-1} pH = 2,1; HIBA 15 mmol.L^{-1} pH = 3,0; Ácido láctico 15 mmol.L^{-1} pH = 3,0; Ácido cítrico 15 mmol.L^{-1} pH = 3,50 (sendo que o pH foi corrigido para este valor com hidróxido de potássio).

A escolha destes eletrólitos ocorreu em virtude de já possuímos suas respectivas faixas de controle, além de serem agentes complexantes para os metais de transição de nossos estudos. Também nossa preocupação residiu em empregarmos baixos valores de pH, pois, assim, teríamos maior taxa do controle do EOF.

Mais uma vez, não conseguimos estabelecer uma condição na qual pudéssemos promover um controle significativo do EOF para o aprisionamento das espécies dentro da coluna capilar, a fim de obter a separação isotópica.

A figura 47 A apresenta em $V_{\text{rad}} = +20 \text{ kV}$, ou seja, na condição de maior faixa de controle para o EOF revertido, o eletroferogramas de dois eletrólitos: HIBA 15 mmol.L^{-1} pH = 3,0 e Ácido cítrico 15 mmol.L^{-1} com o pH corrigido para 3,50. O primeiro trata-se de eletrólito com a maior faixa de controle de EOF que conseguimos obter. No entanto, mesmo assim, não conseguimos reter o analito tempo suficiente na coluna pra que houvesse o desdobramento de isótopos. No segundo eletrólito, com pH um pouco mais elevado, figura 47 B, a finalidade era a de promover com maior facilidade a complexação do cobre (visto que o primeiro pKa pra o ácido cítrico é de 3,1). No

entanto, isto não foi o suficiente para promover a separação das duas entidades isotópicas.

Visto que não conseguimos alcançar uma condição ideal para a separação isotópica em vários eletrólitos em pH, decidimos finalizar nossos estudos neste tipo de separação, pois como demonstrado anterior, conforme o valor de pH aumenta também se eleva a densidade de carga superficial da sílica e, conseqüentemente, nossa faixa de controle para o EOF diminui expressivamente. No entanto, o resultado obtido no sistema tampão de MES/His com adição de CTAB abre a perspectiva de se estudar outros sistemas químicos com combinações deferentes de eletrólito e surfactantes com o acoplamento do campo elétrico radial.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Com a presente pesquisa, tínhamos o objetivo de construir um sistema de eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato, no qual pudesse ser feito o controle externo do fluxo eletrosmótico, o qual foi concluído. A presença de um sistema de eletrólise separada nos permitiu trabalhar com eletrólitos não tamponados, expandindo a possibilidade de eletrólitos a serem utilizados.

Também era nosso objetivo obter com o acoplamento do V_{rad} uma melhora na resolução e detecção de substâncias com acentuada dificuldade de separação, pois estas necessitam de condições muito singulares para o seu desdobramento. Obtivemos sucesso na separação dos dois aminoácidos: a leucina e a isoleucina, cuja diferença de mobilidade não ultrapassa $0,12 \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Neste sentido, o acoplamento com dois detectores condutométricos sem contato, se mostrou de relevante valia, pois tornou-se fácil acompanhar durante a corrida, o ponto de reversão do sentido do EOF para, dessa forma, os analitos ficarem retidos na coluna capilar.

Nossa configuração das duas fontes de alta tensão proporcionou um V_{rad} que variava de -20 kV a +20 kV, estabelecendo, assim, um expressivo ganho frente aos outros arranjos encontrados na literatura, cujo V_{rad} varia, na maioria dos trabalhos de -10 kV a +10 kV. Assim, com esta extensão do V_{rad} , pudemos estipular a faixa de controle de vários eletrólitos de corrida. Esta faixa de controle é variável de eletrólito para eletrólito.

O sucesso obtido no sistema MES/His com adição de CTAB abre perspectivas no estudo de sistemas químicos compostos por eletrólitos e surfactantes, com

incremento de campo elétrico radial. Mesmo com a faixa reduzida, por conta da densidade de carga, estabelecer a reversão do EOF trás benefícios no aumento da resolução para vários analitos, principalmente para aqueles cuja mobilidade eletroforética se encontra dentro da nossa faixa de alcance.

Uma perspectiva interessante é a possibilidade de se encontrar outras combinações de eletrólitos de corrida e surfactantes que possam estender a faixa de alcance do V_{rad} para valores altos de pH.

Mesmo não obtendo sucesso na separação isotópica, esta se mostra como outra perspectiva interessante, pois o conceito de coluna capilar infinita, como demonstrado no item anterior, tem o poder de reter os metais e, também, outras substâncias por um tempo maior. Resta agora realizar estudos para se encontrar composição de eletrólitos que promovam um bom compromisso entre labilidade e mobilidade efetiva dos complexos para daí se realizar novos testes com o uso do campo elétrico radial em separações isotópicas.

7. Referências bibliográficas

1. BELLO, M. S.; CAPELLI, L.; RIGHETTI, P. G. *Journal of Chromatography A* **1994**, 684, 311-322.
2. BERLI, C. L. A.; PIAGGIO, M. V.; DEIBER, J. A. *Electrophoresis* **2003**, 24, 1587-1595.
3. CHANG, H. T.; YEUNG, Edward S. *Electrophoresis* **1995**, 16, 2069-2073.
4. CHEN, Y.; ZHU, Y. *Electrophoresis* **1999**, 20, 1817-1821.
5. CULBERTSON, C. T.; JORGENSEN, J. W. *Journal of Microcolumn Separations*, **1999**, 11, 167-174.
6. De Jesus, D.P.; Brito-Neto, J.G.A.; Richter, E.M.; Angnes, L.; Gutz, I.G.R.; do Lago, C.L. *Analytical Chemistry* **2005**, 77, 607-614.
7. ELVERS, B., HAWKINS, S., RARENSCROFT, M., ROUNSAVILLE, J. F., SCHULZ, G. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Fifth, completely revised edition, **1989**. v. A12, p. 399-401.
8. EVENHUIS, C. J.; GUIJT, R. M.; MACKA, M.; MARRIOTT, P. J.; HADDAD, P. R. *Electrophoresis* **2006**, 27, 672-676.
9. FALLER, T.; ENGELHARDT, H. *Journal of Chromatography A* **1999**, 853, 83-94.
10. FRACASSI da Silva, J. A.; DO LAGO, C. L. *Analytical Chemistry*, **1998**, 70, 4339-4343.
11. GEISER, L.; MIRGALDI, M.; VEUTHEY, J. L. *Journal of Chromatography A* **2005**, 1068, 75-81.
12. GEISER, L.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L. *Electrophoresis* **2005**, 26, 2293-2302.
13. GHOSAI, S. *Annual Review of Fluid Mechanics* **2006**, 38, 309-338.

14. GHOSAL, S. *Journal of Fluid Mechanics* **2003**, 491, 285-300.
15. GHOWSI, K.; GALE, R. J. *Journal of Chromatography* **1991**, 559, 95-101.
16. HAYES, M. A. *Analytical Chemistry* **1999**, 71, 3793-3798.
17. HAYES, M. A.; EWING, A. G. *Analytical Chemistry* **1992**, 64, 512-516.
18. HAYES, M. A.; EWING, A. G. *Analytical Chemistry* **1993**, 65, 2407-2407.
19. HAYES, M. A.; KHETERPAL, I.; EWING, A. G. *Analytical Chemistry* **1993**, 65, 27-31.
20. HAYES, M. A.; KHETERPAL, I.; EWING, A. G. *Analytical Chemistry* **1993**, 65, 2010-2013.
21. HUANG, T. L.; TSAI, P.; WU, C. T.; LEE, C. S. *Analytical Chemistry* **1993**, 65, 2887-2893.
22. JAGER, A. V.; TAVARES, M. F. M. *Química Nova*, **2001**, 24, 363-373.
23. JORGENSEN, J. W.; LUKACS, K. D. *Analytical Chemistry*, **1981**, 53, 1298-1302.
24. KANG, K. H.; LI, D. Q. *Langmuir* **2006**, 22, 1602-1608.
25. KASICKA, V.; PRUSIK, Z.; SAZELOVA, P.; BARTH, T.; BRYNDA, E.; MACHOVA, L. *Journal of Chromatography A* **1997**, 772, 221-230.
26. KASICKA, V.; PRUSIK, Z.; SAZELOVA, P.; BRYNDA, E.; STEJSKAL, J. *Electrophoresis* **1999**, 20, 2484-2492.
27. KEELY, C. A.; HOLLOWAY, R. R.; VANDEGOOR, T. A. A. M.; MCMANIGILL, D. *Journal of Chromatography A* **1993**, 652, 283-289.
28. KIM, S. J.; KANG, K. H.; LEE, J. G.; KANG, I. S.; YOON, B. J. *Analytical Chemistry* **2006**, 78, 5192-5197.
29. LEE, C. S.; BLANCHARD, W. C.; WU, C. T. *Analytical Chemistry* **1990**, 62, 1550-

1552.

30. LEE, C. S.; MCMANIGILL, D.; WU, C. T.; PATEL, B. *Analytical Chemistry* **1991**, 63, 1519-1523.
31. LEE, C. S.; WU, C. T.; LOPES, T.; PATEL, B. *Journal of Chromatography* **1991**, 559, 133-140.
32. LUCY, C.A.; MCDONALD, T. L. *Analytical Chemistry* **1996**, 67, 1074-1078.
33. LUCY, C.A.; UNDERHILL, R.S. *Analytical Chemistry* 1996, 68, 300- 305.
34. POPPE, H.; CIFUENTES, A.; KOK, W. T. *Analytical Chemistry* **1996**, 68, 888-893.
35. QIAO, R. *Langmuir* **2006**, 22, 7096-7100.
36. SÁZELOVÁ, P; KASICKA, V; KOVAL, D; PRUSÍK, Z; FANALI, S; ATURKI, Z. *Electrophoresis*, **2007**, 28, 756-766.
37. SCHAEFER, J. P.; SEPANIAK, M. J. *Electrophoresis* **2000**, 21, 1421-1429.
38. SCHWER, C.; KENNDLER, E. *Analytical Chemistry* **1991**, 63, 1801-1807.
39. SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. Fundamentos de Química Analítica. Pioneira São Paulo. p.436, 2006.
40. TAVARES, M. F. M. *Química Nova*, 1996, 19, 173-181.
41. TAVARES, M. F. M.; COLOMBARA, Rosana; MASSARO, Sérgio. *Journal of Chromatography A* **1997**, 772, 171-178.
42. USUI, S.; HEALY, T. W. *Journal of Colloid and Interface Science* **2002**, 250, 371-378.
43. WU, C. T.; HUANG, T. L.; LEE, C. S.; MILLER, C. J. *Analytical Chemistry* **1993**, 65, 568-571.

44. WU, C. T.; LEE, C. S.; MILLER, C. J. *Analytical Chemistry* **1992**, 64, 2310-2311.
45. WU, C. T.; LOPES, T.; PATEL, B.; LEE, C. S. *Analytical Chemistry* **1992**, 64, 886-891.
46. YANG, J.; KWOK, D. Y. *Journal of Physical Chemistry B* **2002**, 106, 2851-2855.
47. YEUNG, K. K.C.; LUCY, C. A. *Analytical Chemistry* **1998**, 70, 3286-3290.
48. ZHOU, M. X.; FOLEY, J. P. *Analytical Chemistry* **2006**, 78, 1849-1858.
49. ZHUKOV, A. N.; ZVIAGUILSKAYA, Y. V.; BENNDORF, C. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **2003**, 222, 341-348.
50. <http://pt.wikipedia.org/wiki/L%C3%ADtio>
51. <http://pt.wikipedia.org/wiki/Boro>
52. <http://pt.wikipedia.org/wiki/N%C3%ADquel>
53. <http://pt.wikipedia.org/wiki/Cobre>
54. <http://pt.wikipedia.org/wiki/Zinco>
55. <http://pt.wikipedia.org/wiki/Chumbo>
56. <http://www.natur.cuni.cz/~gas/>

8. Anexos

Curriculum Vitae

Nome: Denis Tadeu Rajh Vidal

Data de nascimento: 31/10/1975

Naturalidade: Brasileiro

Educação

Escola Estadual Alexandre de Gusmão, 1994 – Ensino Médio.

Centro Universitário Fundação Santo André, Santo André-SP, 2001 - Química

Bacharelado e Licenciatura

Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2008 - Mestrado em Química Analítica

Comunicação em Congresso

Evento: XLIII CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA.

Título: O R.P.G.(Role Playing Game) no Ensino de Química.

Autores: Denis Tadeu Rajh Vidal, Simone Jaconetti Ydi e Toshiharu Condo.

Local: - Ouro Preto - MG - Brasil

Ano: 2003.

Evento: 14^o Encontro Nacional de Química Analítica - ENQA

Título: Sistema para controle do fluxo eletrosmótico em eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (C⁴D).

Autores: Denis Tadeu Rajh Vidal, Fernando Silva Lopes, Kelliton J. M. Francisco e Claudimir Lúcio do Lago.

Local: JOÃO PESSOA - PB - Brasil

Ano: 2007.

Evento: *14º Encontro Nacional de Química Analítica - ENQA*

Título: Um equipamento de eletroforese capilar (CE) com oito detectores condutométricos sem contato (C⁴D) e eletrólise separada

Autores: Fernando Silva Lopes, Denis Tadeu Rajh Vidal, Lucas Blanes, Guilherme Minoru e Claudimir Lúcio do Lago.

Local: JOÃO PESSOA - PB - Brasil

Ano: 2007.

Evento: *14º Encontro Nacional de Química Analítica - ENQA*

Título: Caracterização de detector condutométrico sem contato multicanal - C⁴D.

Autores: Kelliton J. M. Francisco, Denis Tadeu Rajh Vidal, Fernando S. Lopes, Claudimir Lúcio do Lago.

Local: JOÃO PESSOA - PB - Brasil

Ano: 2007.

Evento: *3º Simpósio Latino Americano em Aplicações de Eletroforese Capilar (LACE)*

Titulo: Development of a multi-capillary electrophoresis instrument with contactless conductivity detection and a module for separated electrolysis.

Autores: Lucas Blanes, Denis Tadeu Rajh Vidal, Fernando Silva Lopes, Kelliton J. M. Francisco, Tiago G. Santos e Claudimir Lucio do lago.

Local: SANTIAGO - Chile

Ano: 2007.

Atuação em Monitoria

Local: Centro Universitário Fundação Santo André

Disciplina: Química Analítica Qualitativa

Curso: Química (diurno)

Período: 2000.

Local: Centro Universitário Fundação Santo André

Disciplina: Química Analítica Quantitativa

Curso: Química (diurno)

Período: 2001.

Local: Universidade de São Paulo

Disciplina: (QFL0230) Química Qualitativa e Quantitativa

Curso: Farmácia (diurno)

Período: segundo semestre de 2007.