

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

RENATA MAYUMI SAITO

**Fundamentos, Produção
e Aplicações de Marcas Térmicas
em Eletroforese Capilar**

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890
O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do
IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
13/07/2011

RENATA MAYUMI SAITO

**Fundamentos, Produção e Aplicações
de Marcas Térmicas em Eletroforese Capilar**

*Tese apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutor em Ciências
(Química).*

Orientador: Prof. Dr. Claudimir Lucio do Lago

São Paulo
2011



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA



“Fundamentos, produção e aplicações de marcas térmicas em eletroforese capilar”

RENATA MAYUMI SAITO

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Programa: Química.

Aprovada por:

Prof. Dr. Claudimir Lucio do Lago
Orientador e Presidente

Prof. Dr. Pedro Vitoriano de Oliveira
IQ - USP

Prof. Dr. Fábio Rodrigo Piovezani Rocha
CENA - USP

Profa. Dra. Maria de Lourdes Leite de Moraes
UNIFESP - Diadema

Prof. Dr. José Alberto Fracassi da Silva
IQ - UNICAMP

SÃO PAULO
08 de agosto de 2011

*Aos meus pais, Regina e
Flavio, cujo carinho e incentivo foram
essenciais para meu sucesso.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Claudimir pelos ensinamentos, paciência e conversas no café.

Aos professores Lúcio Angnes e Ivano Gutz pelos ensinamentos e conselhos.

Aos professores Eduardo Richter e Dosil Pereira, fontes de inspiração e conhecimento.

Ao Prof. Rodrigo Munhoz, pelos ensinamentos, palavras de incentivo e amizade.

Ao amigos Thiago BL e Eric Pop pela amizade, ensinamentos, sugestões, conversas de bar e trabalhos em colaboração.

À Prof. Lúcia Helena, pela amizade, inúmeros conselhos e ao leal companheirismo no "pisa-pisa".

Ao Fernando (Ferds), pelos trabalhos em parceria e por toda a ajuda concedida, além das inúmeras conversas no bandeirão e nas caronas para casa.

Ao grande Lucas Blanes pela confiança depositada e aos diversos trabalhos em colaboração. Valeu, Produção!

Ao Luís (Sensation) pelas conversas, confidências e sugestões.

Ao André (Bolover) e ao Guilherme (Splinter) pela amizade, conversas de bar e, claro, às inúmeras caronas.

À família Iaiana: Alexandre (Peixe), Caracol, Daniela, Denis (Pimenta), Erica, Fabiana (Fabis), Guilherme Minoru, Heloyzi, Iranaldo, Ivan (Avogadrinho), Jhonny, João (*in memoriam*), José Vinícius (Vinny), Kelliton, Marcelo (Padre), Marcelo (Belezma), Márcio, Marcos, Miyuki, Osmar, Pedro, Robson (Robinho), Socorro, Suely, Thiago (Rei), Wanderson, William, Zé Geraldo e tantos outros que passaram pelo laboratório.

Ao companheirismo dos amigos presentes em tantas festas e comemorações: Alex, Ana, Daiana, Maiara, Polly, Luiza e Zozó.

Ao Jota, que me apoiou nesse crítico último mês que precedeu a defesa.

Aos funcionários da SPG, Cibele, Milton, Emiliano e Marcelo pela atenção dedicada durante tantos anos de pós-graduação.

Às funcionárias Maria e Miriam pelos cafés que impulsionaram tantas idéias.

A todos os amigos que compartilharam momentos de dificuldade e alegria, em especial aos fiéis companheiros Claudia, Nilson e Felipinho, sempre presentes desde a graduação.

Aos amigos Soninha, Zoraia e Marvin pelos diversos momentos de descontração no forró.

A todos os funcionários do IQ-USP que contribuíram direta ou indiretamente para esse trabalho.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

RESUMO

Saito, R.M. Fundamentos, Produção e Aplicações de Marcas Térmicas em Eletroforese Capilar. 2011.153p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Em eletroforese capilar, a reprodutibilidade depende essencialmente da manutenção do sinal e no tempo de migração das espécies. A alteração do fluxo eletrosmótico (EOF) entre corridas é um dos principais fatores que afetam esses parâmetros. Nesse trabalho, é proposto um sistema de monitoramento do EOF baseado em marcas térmicas (TMs), que consistem em sinais presentes em um eletroferograma devido a uma perturbação do eletrólito de corrida ocasionada por um breve aquecimento (da ordem de 100 ms) de uma pequena porção do capilar (aproximadamente 1 mm), sob ação do campo elétrico. O dispositivo responsável pelo aquecimento que se mostrou mais eficiente consistiu em um resistor SMD de 15 Ω sobre o qual 5 V eram aplicados para gerar aquecimento.

Estudos sobre a origem das TMs sugerem que o fenômeno está relacionado às mudanças do número de transporte das espécies devido à variação de temperatura. Essas conclusões foram baseadas na comparação do perfil dos sinais de TM com valores de número de transporte, além de estudos envolvendo simulação computacional.

Diversas aplicações para as marcas térmicas foram propostas: correção de variação de tempo de migração devido a alterações do EOF, medida direta do EOF e para otimização de parâmetros do detector condutométrico sem contato. As TMs revelaram-se, então, um sistema prático e de fácil implementação, que pode ser utilizado como uma espécie de padrão interno.

Adicionalmente, o emprego das TMs em um novo sistema de injeção de amostra, chamado de injeção térmica, foi também proposto. A vantagem desse tipo de injeção consiste na minimização de problemas de contínua introdução de amostra no canal de separação em *microchip*-CE. Para realizar essa injeção, o capilar é preenchido com a amostra diluída em um eletrólito de corrida e a injeção ocorre quando uma TM é gerada. Estudos com soluções de NaCl apresentaram faixa de resposta linear entre 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 1 mmol L^{-1} para sódio. Entretanto, problemas de interferência sobre a sensibilidade e a mobilidade dos analitos foram obstáculos enfrentados. Também foi alvo de estudo o emprego da injeção térmica em uma técnica de multiplexação para aumento de relação sinal/ruído, baseado em um novo algoritmo. Embora o modelamento matemático tenha sido eficiente para decodificação de sinais, não foi possível obter o aumento na relação sinal/ruído almejado, pois o tempo de análise seria excessivamente longo. No entanto, a utilização da injeção térmica nesse tipo de estratégia mostrou-se bastante adequada, pois ela requer que diversas injeções sejam realizadas sequencialmente sem a interrupção do potencial de corrida, característica que esse sistema de

injeção permite. Posteriormente, a implementação de estratégias que gerassem TMs em tempos mais curtos poderiam viabilizar a técnica.

Finalmente, a utilização de TMs como ferramenta para obtenção de constantes físico-químicas, como pK_a e mobilidade por exemplo, utilizando a eletroforese capilar mostra-se como uma grande perspectiva para a técnica.

Palavras-chave: marca térmica, eletroforese capilar, fluxo eletrosmótico, injeção, detecção condutométrica sem contato

ABSTRACT

Saito, R.M. Fundamentals, Production, and Applications of Thermal Marks in Capillary Electrophoresis. 2011. 153p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

In capillary electrophoresis, reproducibility depends essentially on the maintenance of the signal and the migration time when the analysis of the same sample is repeated. Variations in the electroosmotic flow (EOF) between runs are one of the major factors affecting these parameters. In this work, a new approach to monitor the EOF based on thermal marks (TMs) is proposed. TM consists in a signal present in the electropherogram caused by heating (typically 100 ms) a small portion of the capillary (approximately 1 mm), while the electric field is applied. The most effective device to promote the heating was a 15- Ω SMD resistor, powered at 5 V.

Studies about the origin of TMs suggest that the phenomenon is related to variations in the transport number of the species due to alterations in the temperature. This conclusion was based on comparison between the TM profile and the transport numbers values, as well as results from computer simulation.

The proposed applications for TM include: correction in variations of migration times with alterations on EOF, EOF measurement and optimization of the parameters of contactless conductivity detection. Additionally, a new sample injection procedure, called thermal injection, was also proposed. The advantage of this injection consists in minimization of leakage problems related to the continuous introduction of the sample in the separation channel in microchip-CE. To perform the thermal injection, the capillary is completely filled with the sample diluted in a BGE and the injection occurs with the generation of a TM. Studies with NaCl solutions presented extensive linear response range from 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ to 1 mmol L^{-1} . However, interference problems on sensibility and analytes mobilities appeared. The use of low-concentration solutions diminishes these problems. However, the analytical signal is also diminished, needing a strategy to raise the sensitivity. Thus, a multiplexing technique based on a new algorithm was also introduced in order to improve signal-to-noise ratio. Although the efficiency of the mathematic modeling on the signals decoding, the desired improvement of signal/noise ratio was not obtained, because the analysis time would be excessively high. However, the employment of the thermal injection seems to be very suitable for multiplexing, due to the possibility of performing several sequential injections with no interruption of the electric field. Afterwards, the implementation of fast velocity devices to generate TMs would enable the technique.

Finally, the great perspective to applications of TM concerns in the use of TMs to obtain physical chemical constants, such as pK_a and ionic mobilities. The present work describes values of ionic mobilities calculated to monopropyl carbonate, monoisopropyl carbonate, and hydronium.

Keywords: thermal mark, capillary electrophoresis, electroosmotic flow, injection, capacitively coupled contactless conductivity detection

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μCE - *Microchip Capillary Electrophoresis*

C⁴D - Detecção Condutométrica sem Contato, *Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection*

CE - Eletroforese Capilar, *Capillary Electrophoresis*

CTAB - Brometo de N-cetil-N,N,N-trimetilamônio

CZE - Eletroforese Capilar em Zona, *Capillary Zone Electrophoresis*

DB18C6 - Dibenzo-18-crown-6

DDAB - Brometo de Didodecildimetilamônio

DMSO - Dimetil sulfóxido

EOF - Fluxo Eletrosmótico, *Electroosmotic Flow*

HEC - Hidroxietilcelulose

His - Histidina

MAC - Monoalquilcarbonato

MEKC - Cromatografia Eletrocínética Micelar, *Micellar Electrokinetic Chromatography*

MES - Ácido morfolinoetanosulfônico

MIPC - Monoisopropilcarbonato

MMC - Monometilcarbonato

MPC - Monopropilcarbonato

SDS - Dodecilsulfato de sódio

SMD - *Surface Mount Device*

TM - Marca Térmica, *Thermal Mark*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Marcador térmico baseado em filamento de tungstênio de lâmpada incandescente.....	31
Figura 2. Marcador térmico baseado em resistores SMD.	32
Figura 3. Marcador térmico duplo baseado em resistor SMD.	32
Figura 4. Foto do marcador eletrotérmico.....	33
Figura 5. Diagrama de blocos do marcador eletrotérmico.....	34
Figura 6. Circuito gerador de alta tensão do marcador eletrotérmico.....	35
Figura 7. Circuito oscilador do marcador eletrotérmico.....	35
Figura 8. Eletroferograma de TM em tampão fosfato 10 mmol L ⁻¹ (pH 7,0).	37
Figura 9. Eletroferogramas de TMs utilizando (A) laser vermelho e (B) resistor em azul de metileno 5 mmol L ⁻¹	41
Figura 10. Espectros de absorção de azul de metileno em diferentes concentrações.....	41
Figura 11. A – Esquema de um corte de seção transversal do sistema de eletrólise separada.....	50
Figura 12. Esquema da parte frontal do equipamento de eletroforese capilar.	51
Figura 13. Exemplos típicos de TMs em soluções de : a – tampão acetato de sódio 10 mmol L ⁻¹ (pH 4,7), b – tampão fosfato de sódio 10 mmol L ⁻¹ (pH 7,0), c – tampão MES/His 10 mmol L ⁻¹ (pH 6,0), d – tampão borato de sódio 10 mmol L ⁻¹ (pH 9,2), e – MES/His 20 mmol L ⁻¹ (pH 6,0) com CTAB 0,2 mmol L ⁻¹ , f – KCl 10 mmol L ⁻¹ (pH 4,0), g – tampão fosfato de sódio 10 mmol L ⁻¹ (pH 7,0) com SDS 100 mmol L ⁻¹ e h – KCl 10 mmol L ⁻¹ em DMSO com DB18C6 4,0 mmol L ⁻¹	58
Figura 14. Eletroferogramas de TMs em soluções 10 mmol L ⁻¹ de (A) NaCl e (B) KCl.....	59

Figura 15. Amplitude da TM em função da distância do marcador térmico em relação ao ponto de detecção, para KCl 10 mmol L ⁻¹ como eletrólito de corrida.....	60
Figura 16. Intensidade da TM em função da distância do marcador térmico em relação ao ponto de detecção, para KCl 10 mmol L ⁻¹ como eletrólito de corrida.....	62
Figura 17. Número de transporte para Na ⁺ e K ⁺ em soluções de NaCl e KCl 10 mmol L ⁻¹ , respectivamente, em função da temperatura	67
Figura 18. Variação do produto de Walden com a temperatura para alguns íons.....	69
Figura 19. Eletroferogramas de TMs em 10 mmol L ⁻¹ de (A) KCl e (B) NaCl obtidos através de simulação computacional, em função da posição do capilar.....	71
Figura 20. Eletroferograma da fronteira móvel entre soluções 10 mmol L ⁻¹ de KCl e NaCl.....	72
Figura 21. Número de transporte de K ⁺ (KCl) 10 mmol L ⁻¹ calculados em dois dias distintos para várias temperaturas..	73
Figura 22. Número de transporte de K ⁺ (KCl 10 mmol L ⁻¹) e Na ⁺ (NaCl 10 mmol L ⁻¹) em função da temperatura, considerando o efeito do EOF.....	75
Figura 23. Variação da amplitude da TM com o campo elétrico aplicado durante o aquecimento. Após geração das TMs, o campo elétrico foi mantido constante em 178 V s ⁻¹	81
Figura 24. Variação da amplitude da TM com o campo elétrico aplicado durante o aquecimento. O campo elétrico aplicado durante a geração das TMs e para a migração dos picos até o detector foram iguais, variando de 0 a 514 V cm ⁻¹	82
Figura 25. Eletroferogramas (A) e amplitude (B) da TM em capilares de 20 µm, 50 µm e 75 µm i.d. com 40 cm de comprimento..	83
Figura 26. <i>Layout</i> em forma de cruz de um µCE.....	88
Figura 27. Difusão da amostra para o canal de separação em µCE.....	89

Figura 28. Esquema do modelamento matemático da Transformada de Hadamard.....	91
Figura 29. Eletroferograma de TMs em tampão MES/His 10 mmol L ⁻¹ (pH 6,0) contendo NaCl, KCl e LiCl 333 μmol L ⁻¹ cada.....	93
Figura 30. Esquema do circuito para geração das TMs utilizado na injeção térmica multiplexada.....	96
Figura 31. Eletroferograma de TMs em solução de MES/His 20 mmol L ⁻¹ e NaCl 100 μmol L ⁻¹	98
Figura 32. Eletroferogramas provenientes de injeções térmicas de amostras de NaCl em diferentes concentrações (de 10 μmol L ⁻¹ a 1 mmol L ⁻¹) em tampão MES/His 20 mmol L ⁻¹	99
Figura 33. Intensidade da TM referente ao Na ⁺ em função de sua concentração.....	99
Figura 34. Mobilidade do Na ⁺ em função de sua concentração.....	100
Figura 35. Eletroferograma de TMs de Na ⁺ e K ⁺	101
Figura 36. Sinal analítico de (A) K ⁺ em presença de Na ⁺ e (B) Na ⁺ em presença de K ⁺	102
Figura 37. Mobilidade de K ⁺ em presença de NaCl.....	103
Figura 38. Mobilidade de Na ⁺ em presença de KCl.....	103
Figura 39. (A) Eletroferograma experimental de uma injeção de NaCl e KCl 100 μmol L ⁻¹ . (B) Eletroferograma experimental com múltiplas injeções térmicas de NaCl e KCl 100 μmol L ⁻¹ em tampão MES/Na 20 mmol L ⁻¹ (pH 6). (C) Eletroferograma decodificado.....	107
Figura 40. Medida da mobilidade do EOF utilizando TMs.....	119
Figura 41. TMs em análise de alguns cátions em amostra de água de coco.....	120

Figura 42. Eletroferogramas de amostra de clara de ovo: a , b , c e d são, respectivamente, a 2 ^a , 5 ^a , 7 ^a e 9 ^a corrida consecutiva.....	121
Figura 43. Intensidade do sinal das TMs em função do sinal do C ⁴ D.....	122
Figura 44. Estruras químicas do CTAB e DDAB.....	123
Figura 45. Efeito da adsorção de CTAB (A) e DDAB (B) sobre a superfície do capilar.....	124
Figura 46. Estabilidade do CTAB (A) e do DDAB (B) após dessorção sobre o capilar de sílica fundida.....	125
Figura 47. Mobilidade efetiva do (A) monoetil e (B) monopropil carbonatos em diferentes valores de pH, a 20°C.....	128
Figura 48. Eletroferograma de monopropilcarbonato.....	129
Figura 49. Eletroferograma de monoisopropilcarbonato	130
Figura 50. Efeito do cloroacetato e da o-fenantrolina na mobilidade do íon hidrônio em solução aquosa	131
Figura 51. Eletroferogramas de Cs ₂ SO ₄ 25 μmol L ⁻¹ e HCl 90 μmol L ⁻¹ em LiCl 10 mmol L ⁻¹ como eletrólito de corrida (pH 4,95), utilizando mistura de H ₂ O/D ₂ O 9:1 (v/v) como solvente.....	132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições iniciais de simulação.....	53
Tabela 2. Mobilidades estimadas para o EOF em solução de NaHCO ₃ 10 mmol L ⁻¹ calculadas utilizando diferentes estratégias, a 25 °C.	80
Tabela 3. Constantes físico-químicas de alguns MACs a 25 °C.	130

SUMÁRIO

1. Introdução	20
1.1. Eletroforese Capilar e <i>Microchip</i> -CE.....	20
1.2. Sistemas de detecção em CE.....	22
2. Justificativa e Objetivos	26
2.1. Justificativa	26
2.2. Objetivos	27
2.2.1. Objetivos gerais.....	27
2.2.2. Objetivos específicos	28
3. Estratégias para marcação térmica.....	30
3.1. Introdução.....	30
3.2. Parte Experimental	30
3.2.1. O Marcador Térmico	30
3.3. Resultados e Discussão	37
3.4. Conclusões Parciais	41
4. Origens da marca térmica	43
4.1. Introdução.....	43
4.1.1. O Fluxo Eletrosmótico.....	43
4.1.2. Estratégias para monitoramento do EOF	45
4.1.3. Picos de Sistema.....	47

4.2. Parte Experimental	48
4.2.1. Reagente e soluções.....	48
4.2.2. Materiais e Métodos	48
4.3. Resultados e Discussão	57
4.3.1. A natureza da TM.....	59
4.3.2. Avaliação do modelo	69
4.3.3. Mobilidade da TM.....	75
4.3.4. Dependência da intensidade da TM com o campo elétrico.....	80
4.3.5. Efeito do diâmetro do capilar na intensidade das TMs.....	82
4.4. Conclusões Parciais	83
5. Injeção Térmica.....	86
5.1. Introdução.....	86
5.1.1. Sistemas de injeção em CE e μ CE	86
5.1.2. Multiplexação e Transformada de Hadamard	89
5.1.3. Injeção térmica e injeção térmica multiplexada	92
5.2. Parte experimental.....	95
5.2.1. Reagentes e soluções.....	95
5.2.2. Materiais e Métodos	96
5.3. Resultados e Discussão	97
5.3.1. Potencialidade analítica da técnica de injeção térmica	97
5.3.2. Injeção térmica multiplexada.....	104
5.4. Conclusões Parciais	108

6. Aplicações	111
6.1. Introdução	111
6.2. Parte experimental.....	111
6.2.1. Reagentes e soluções.....	111
6.2.2. Materiais e Métodos	112
6.3. Resultados e Discussão	118
6.3.1. Medida da mobilidade do EOF em capilar de sílica	118
6.3.2. Utilização da TM como padrão de correção de variações do EOF entre corridas	119
6.3.3. Otimização do C ⁴ D.....	121
6.3.4. Estudo sobre a estabilidade de revestimentos de CTAB e DDAB sobre a superfície de capilares de sílica	122
6.3.5. Medida da mobilidade do EOF para determinação de constantes físico-químicas de monoalquilcarbonatos.....	125
6.3.6. Utilização das TMs no estudo da mobilidade iônica do íon hidrônio	130
6.4. Conclusões Parciais	134
7. Conclusões e Perspectivas	136
8. Referências Bibliográficas.....	140

Capítulo 1
Introdução

1. Introdução

1.1. Eletroforese Capilar e *Microchip-CE*

A eletroforese capilar (CE, *Capillary Electrophoresis*) é uma técnica de separação em que compostos eletricamente carregados migram diferenciadamente por ação de um campo elétrico. Dessa forma, a separação ocorre por diferenças nas propriedades das espécies como carga e massa.

A eletroforese foi introduzida como técnica analítica por Tiselius, em 1930 [1, 2]. Nesse trabalho, foi utilizado o método da fronteira móvel para separar algumas proteínas do soro sanguíneo, que lhe garantiu o Prêmio Nobel em 1948.

Em 1967, Hjérten [3] demonstrou a utilização de campos elétricos elevados (aproximadamente 75 V cm^{-1}), utilizando tubos capilares de $300 \mu\text{m}$ de diâmetro interno. Em 1974, Virtanen [4] reportou as vantagens da redução do efeito Joule com a utilização de colunas com diâmetros menores (50 a $200 \mu\text{m}$). Mikkers e colaboradores [5] fizeram a primeira demonstração de eletroforese capilar em zona em tubos de Teflon de $200 \mu\text{m}$ de diâmetro interno, mostrando a separação de 16 ânions em 10 minutos.

Embora o conceito de eletroforese capilar já tivesse sido introduzido anteriormente, sua consolidação como técnica analítica instrumental ocorreu a partir da década de 80 quando Jorgenson e Lukacs demonstraram a alta eficiência de separação utilizando campos elétricos elevados com colunas capilares de $75 \mu\text{m}$ de diâmetro interno [6].

Também foram relevantes as contribuições de Terabe e colaboradores [7], que introduziram a Cromatografia Eletrocínética Micelar (MEKC, *Micelar*

Electrokinetic Chromatography), na qual a adição de surfactantes à solução forma um meio micelar capaz de separar moléculas neutras.

Em 1987, Cohen e Karger [8, 9] desenvolveram a eletroforese capilar em gel, que inseriu um novo parâmetro no mecanismo de separação: o formato da molécula. Desenvolvimentos instrumentais permitiram a implementação de equipamentos comerciais para eletroforese capilar em gel com até 96 capilares, um avanço que, sem dúvidas, viabilizou o projeto genoma [10-12].

Dentre as diversas técnicas de eletromigração em capilares, a eletroforese capilar de zona (CZE, *Capillary Zone Electrophoresis*) é a mais utilizada. Em CZE, o capilar é preenchido com um eletrólito de corrida, geralmente um tampão, no qual a amostra é inserida como uma banda de pequena espessura. Por ação do campo elétrico, criam-se zonas que migram independentemente com velocidade constante, porém diferenciada, que é característica de sua própria mobilidade [13,14,15].

A alta eficiência de separação, aliada à simplicidade de instrumentação e, principalmente, à grande versatilidade da técnica garantiram a popularização da CE como técnica analítica. Utilizando uma única coluna de separação é possível analisar ácidos orgânicos, proteínas e aminoácidos, DNA, compostos neutros, quirais e uma série de outros compostos, apenas alterando o sistema químico. Dentre as diversas áreas de aplicação da CE encontram-se: análises clínicas, biológicas, ambientais, de alimentos, dentre outros [16-22].

Uma tendência atual são os dispositivos microfluídicos, também chamados de *microchips*. São relatados na literatura diversos microdispositivos para análises em fluxo, eletroforese capilar (*microchip*-CE ou μ CE), cromatografia, entre outras [23]. Além de requererem reduzidos volumes de amostra e de gerarem pequenas quantidades de resíduos, os dispositivos microfluídicos possuem como vantagens a

portabilidade e o menor tempo de análise. Além disso, esses sistemas possibilitam a integração de diversas etapas analíticas em um único dispositivo (*clean-up*, pré-concentração, separação, detecção, etc), o que diminui a manipulação da amostra entre as etapas e reduz a probabilidade de contaminação e tempo de análise [24, 25].

1.2. Sistemas de detecção em CE

Os métodos de detecção em CE são basicamente divididos em duas categorias: os universais e os seletivos. Os detectores seletivos medem uma determinada propriedade do analito. Portanto, a análise é limitada às espécies que possuem esta propriedade. O uso desse tipo de detecção é vantajoso quando a matriz da amostra é complexa ou quando se deseja minimizar efeitos de *background*. Pertencem a esta classe, os detectores amperométricos, radiométricos, os espectrômetros de massa e os métodos ópticos baseados em absorção UV/Vis, fluorescência ou espalhamento Raman, entre outros. Os detectores universais respondem a diferenças entre uma propriedade do analito e do eletrólito de corrida e em geral são utilizados quando se tem completa separação de todas as espécies de interesse. Como exemplo, podem ser citados os detectores condutométricos, de índice de refração e os detectores empregando métodos indiretos [15].

A detecção condutométrica sem contato (C^4D , *Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection*) foi introduzida pela primeira vez como técnica de detecção em eletroforese capilar por do Lago [26] e Zeeman [27], que desenvolveram seus trabalhos de forma independente. Desde então, ela vem ganhando destaque no meio científico e diversas aplicações já foram propostas

utilizando esse tipo de detecção, que vão desde a análise de íons em amostras dos mais variados tipos, alimentares, ambientais, de interesse clínico e biológico, compostos enantioméricos, dentre outros [28, 29]. Além disso, devido à sua simplicidade e baixo custo, é um detector largamente utilizado em microdispositivos.

Atualmente, existem dois modelos comerciais desse detector [30, 31] e também um projeto que disponibiliza o esquema eletrônico e o código fonte para os que se interessam em montar seu próprio detector, o OpenC⁴D [32].

Nesse detector, um sinal alternado de alta frequência é aplicado entre dois eletrodos posicionados externamente ao capilar. Parte desse sinal se propaga através do capilar e da solução, sendo o sinal registrado proporcional à condutividade do meio. Esse arranjo oferece vantagens frente à detecção condutométrica com contato que é a eliminação de problemas de contaminação dos eletrodos, facilidade de posicionamento dos eletrodos em relação ao capilar e eliminação da interferência do potencial de separação.

Por se tratar de uma técnica de detecção universal, ela mede diferenças de propriedade, que nesse caso específico, é a condutividade, entre o eletrólito de corrida e a amostra. Assim, analitos que possuem mobilidade maior que o do co-íon do eletrólito de corrida são registrados como picos positivos e os de menor mobilidade, como picos negativos. De forma geral, quanto maior a diferença entre as mobilidades do analito e do co-íon do eletrólito de corrida, maior a sensibilidade [33, 34]. Assim, é uma prática comum a escolha de eletrólitos com co-íon de baixa mobilidade para detectar espécies de alta mobilidade e vice e versa. Embora o uso de eletrólitos com contra-íons de alta mobilidade tenha a tendência de aumentar a sensibilidade, espécies de baixa mobilidade são usualmente preferíveis, uma vez

que a relação sinal/ruído é menor com eletrólitos de baixa condutividade devido à redução do efeito Joule.

Capítulo 2
Justificativa e Objetivos

2. Justificativa e Objetivos

2.1. Justificativa

A eletroforese capilar vem mostrando franco crescimento. O número de modos de separação e, conseqüentemente, de analitos é cada vez maior. Inicialmente, a CE se restringia apenas a íons pequenos. Atualmente, vírus e bactérias, DNA, polímeros, compostos enantioméricos são alguns exemplos da possibilidade dessa poderosa técnica de separação. Dado o aumento da complexidade das amostras, os métodos de análise também vêm se tornando cada vez mais "complexos", evidenciando a importância do contínuo desenvolvimento instrumental para o aprimoramento da técnica.

Em qualquer técnica analítica, a reprodutibilidade é essencial. Em eletroforese capilar, ela consiste na manutenção da intensidade do sinal das espécies e dos tempos de migração quando uma mesma análise é repetida. Dentre os vários fatores que afetam esse parâmetro, a alteração do EOF pode ser citada como exemplo de fenômeno que provoca modificações na velocidade das espécies e, conseqüentemente, de seus tempos de migração.

São diversos os fatores que alteram o EOF, como força iônica, pH, viscosidade e temperatura. Um grande problema é a adsorção de macromoléculas ou espécies altamente carregadas na parede do capilar, pois amostras contendo essas espécies são frequentes. Além disso, o surgimento de novos tensoativos e polímeros para recobrimento de capilares é constante. Assim, dependendo da estabilidade desses recobrimentos, podem ocorrer problemas de estabilização de EOF. Finalmente, é importante ressaltar que o EOF exerce importante papel não só na reprodutibilidade, quanto na resolução e eficiência da separação [35].

Inicialmente, a ideia da marcação térmica surgiu da necessidade de uma estratégia rápida e simples de otimizar os parâmetros do detector condutométrico sem contato. A intensidade do sinal registrado por esse detector é dependente de diversos fatores como: eletrônica, sinal aplicado entre os eletrodos (amplitude e frequência), diâmetro do capilar e composição do eletrólito de corrida. Então, para cada C⁴D, é necessário otimizar os parâmetros para capilar e sistema químico diferentes. No entanto, essa otimização muitas vezes é um trabalho que demanda mão de obra e tempo consideráveis, pois é necessário realizar uma série de injeções de uma espécie qualquer para registrar seu sinal, variando os parâmetros de detecção. Assim, a marcação térmica seria uma estratégia conveniente para geração de sinais que fossem proporcionais aos parâmetros do detector para cada eletrólito de corrida diferente, tornando esse trabalho menos árduo, já que não seria necessário realizar nenhuma injeção.

Posteriormente, estudos mais apurados mostraram uma correlação entre a mobilidade das marcas térmicas e a do fluxo eletrosmótico. Dessa forma, as aplicações relacionadas ao monitoramento do fluxo eletrosmótico utilizando as marcas térmicas acabaram se revelando, então, mais amplas e de maior interesse aos usuários da técnica em relação à ideia inicialmente proposta.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivos gerais

Os objetivos desse trabalho consistiram na elaboração de estratégias para produção de marcas térmicas, na investigação dos fenômenos envolvidos, bem como na proposição de aplicações analíticas para as mesmas, incluindo o

monitoramento de fluxo eletrosmótico e o desenvolvimento de um novo sistema de análise em CE, denominado injeção térmica.

2.2.2. Objetivos específicos

- Desenvolvimento de instrumentação de diversos modelos de marcadores térmicos;
- Elaboração de um modelo que explicasse os fenômenos geradores e o comportamento eletroforético das marcas térmicas;
- Estudo das potencialidades analíticas da injeção térmica;
- Avaliação de um novo modelo multiplexado para aumento da relação sinal/ruído em eletroforese capilar;
- Proposição de algumas aplicações analíticas das marcas térmicas para monitoramento de variação ou cálculo de mobilidade do EOF.

Capítulo 3

Estratégias para marcação térmica

3. Estratégias para marcação térmica

3.1. Introdução

Este capítulo aborda as diferentes estratégias para gerar marcas térmicas utilizadas durante o projeto. Essa etapa do trabalho contou com a colaboração dos alunos Fernando Silva Lopes e Kelliton José Francisco Mendonça. A marca térmica (TM, *Thermal Marker*) é um sinal que surge de uma perturbação na concentração do eletrólito de corrida, decorrente da aplicação de um breve aquecimento (da ordem de 100 ms) de uma pequena porção do capilar (aproximadamente 1 mm), sob ação do campo elétrico. Neste capítulo, são encontradas descrições sobre a instrumentação utilizada e uma breve discussão sobre o desempenho de cada um dos dispositivos desenvolvidos. A origem do fenômeno, bem como suas características e algumas aplicações serão abordados em capítulos posteriores.

3.2. Parte Experimental

3.2.1. O Marcador Térmico

O marcador térmico consistiu em um dispositivo responsável pelo aquecimento do capilar, o qual daria origem à marca térmica. Ao longo do trabalho, foram propostas algumas estratégias de marcação térmica.

3.2.1.1. Filamento de Lâmpada Incandescente

A primeira versão do marcador térmico foi implementada utilizando-se uma lâmpada incandescente de 10 W / 12 V (Figura 1). O bulbo de vidro da lâmpada foi

retirado, permitindo o contato direto de uma única porção do capilar (aproximadamente 0,5 mm) com o filamento de tungstênio. Após a retirada do bulbo, a aplicação de 12 V poderia causar combustão do filamento com o ar, então os experimentos foram efetuados aplicando-se apenas 5 V. O controle de acionamento das TMs foi realizado por uma placa com interface do tipo ISA (PCL 711-S, Advantech, Taiwan) e um software desenvolvido em Delphi 5.0 (Borland, Austin, TX, EUA), que garantiram a reprodutibilidade da largura do pulso de aquecimento (tempo de aquecimento) e a sincronização com a corrida eletroforética.

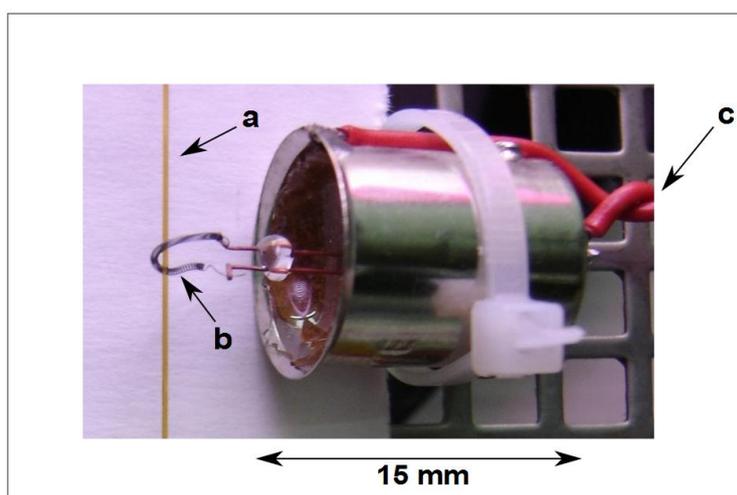


Figura 1. Marcador térmico baseado em filamento de tungstênio de lâmpada incandescente: a - b capilar de sílica, b – filamento de tungstênio, c – conexões elétricas.

3.2.1.2. Resistor SMD

A segunda versão do marcador térmico foi implementada utilizando um resistor SMD de 15 Ω (tipo 0402) soldado sobre uma placa de circuito impresso (Figura 2). O aquecimento do resistor ocorria quando sobre ele eram aplicados 5 V. Da mesma forma que o marcador utilizando filamento de tungstênio, o acionamento desse dispositivo também era controlado pelo software anteriormente descrito. Devido à maior reprodutibilidade dos sinais, baixo custo e tamanho reduzido dos

dispositivos, essa foi a versão utilizada durante praticamente todo o trabalho de doutorado.

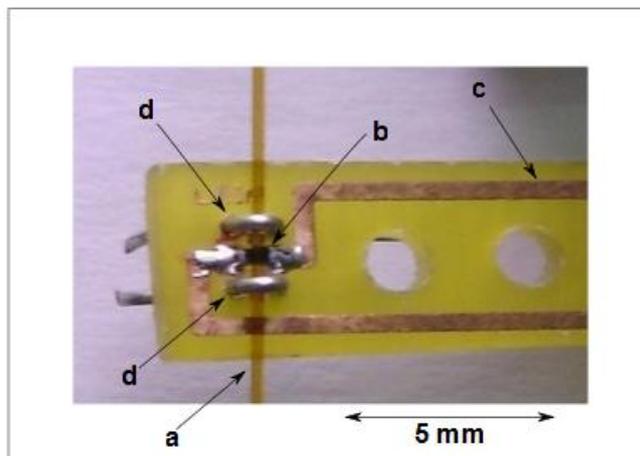


Figura 2. Marcador térmico baseado em resistores SMD: a – capilar de sílica, b – resistores SMD, c – trilha de cobre, d – suportes para fixação do capilar.

Em diversas etapas desse trabalho, foi utilizado um marcador térmico duplo (figura 3), o qual consiste em dois resistores SMD soldados a 5,0 cm entre si sobre uma mesma placa de circuito impresso, que são acionados simultaneamente durante a aplicação da marcação térmica. Esse dispositivo tem a finalidade de facilitar os cálculos quando se deseja obter a mobilidade da TM, uma vez que a distância entre os marcadores é bem definida.

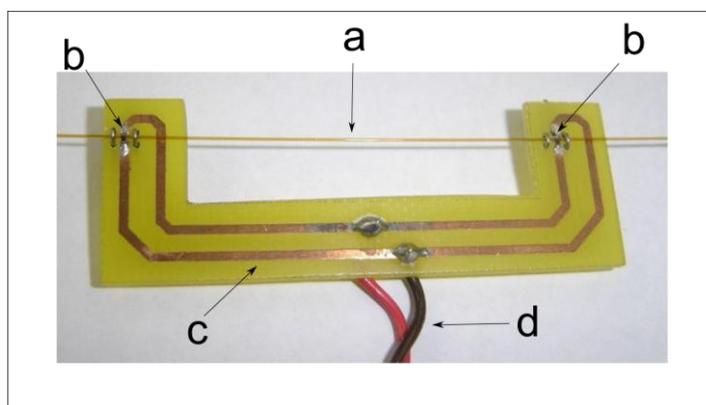


Figura 3. Marcador térmico duplo baseado em resistor SMD: a – capilar de sílica, b – resistor SMD, c – trilha de cobre, d – conexões elétricas.

3.2.1.3. Marcador eletrotérmico

O marcador eletrotérmico foi baseado na mesma célula utilizada no detector de condutividade sem contato com acoplamento capacitivo, ou seja, dois eletrodos envolvem o capilar externamente. Entre eles, era aplicado um sinal pulsado da ordem de 11 kHz, e com potencial pico a pico (V_{pp}) de até 35 kV. Assim como ocorre com o detector condutométrico sem contato, parte do sinal é capaz de propagar-se através da parede do capilar e, conseqüentemente, da solução. Como, neste caso, utilizou-se um potencial muito maior que o aplicado em C^4D , a expectativa era de que a solução naquela região fosse aquecida. Uma foto da cela com os eletrodos e o capilar, bem como o diagrama de blocos do marcador eletrotérmico são mostrados nas figuras 4 e 5, respectivamente. A cela foi preenchida com silicone para isolar eletricamente os dois eletrodos.

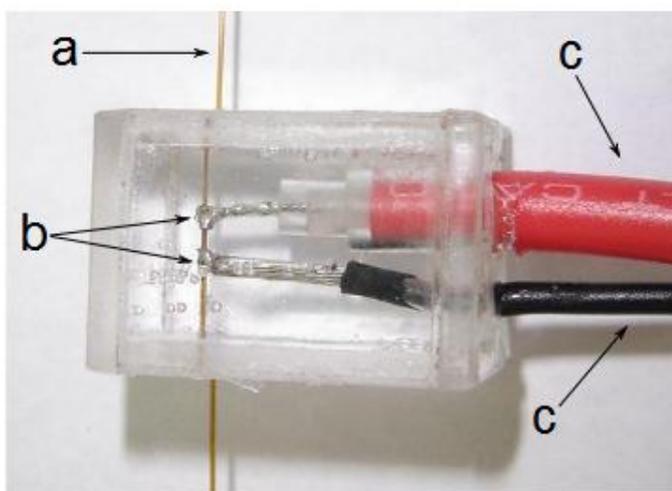


Figura 4. Foto do marcador eletrotérmico: a - capilar; b - eletrodos; c - conexões elétricas.

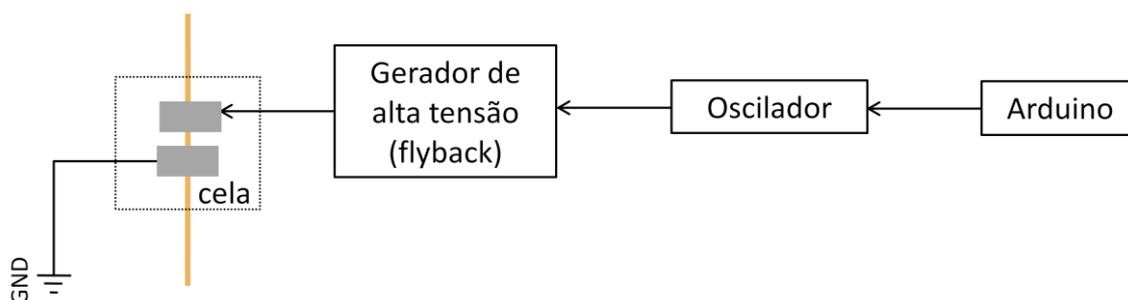


Figura 5. Diagrama de blocos do marcador eletrotérmico. Na cela, os dois retângulos representam os eletrodos por onde passa o capilar (representado pela linha laranja).

A aplicação da alta tensão foi realizada por um transformador *flyback* de televisão, modelo 8400D (XT Flyback). O esquema eletrônico do sistema gerador de alta tensão encontra-se na figura 6. O acionamento da alta tensão na saída deste dispositivo foi induzido por um sinal pulsado de alta frequência gerado por um oscilador baseado no circuito integrado LM555. O esquema eletrônico do circuito oscilador está mostrado na figura 7. O sinal de saída deste oscilador foi ajustado para um perfil de onda quadrada com frequência de oscilação de 11 kHz.

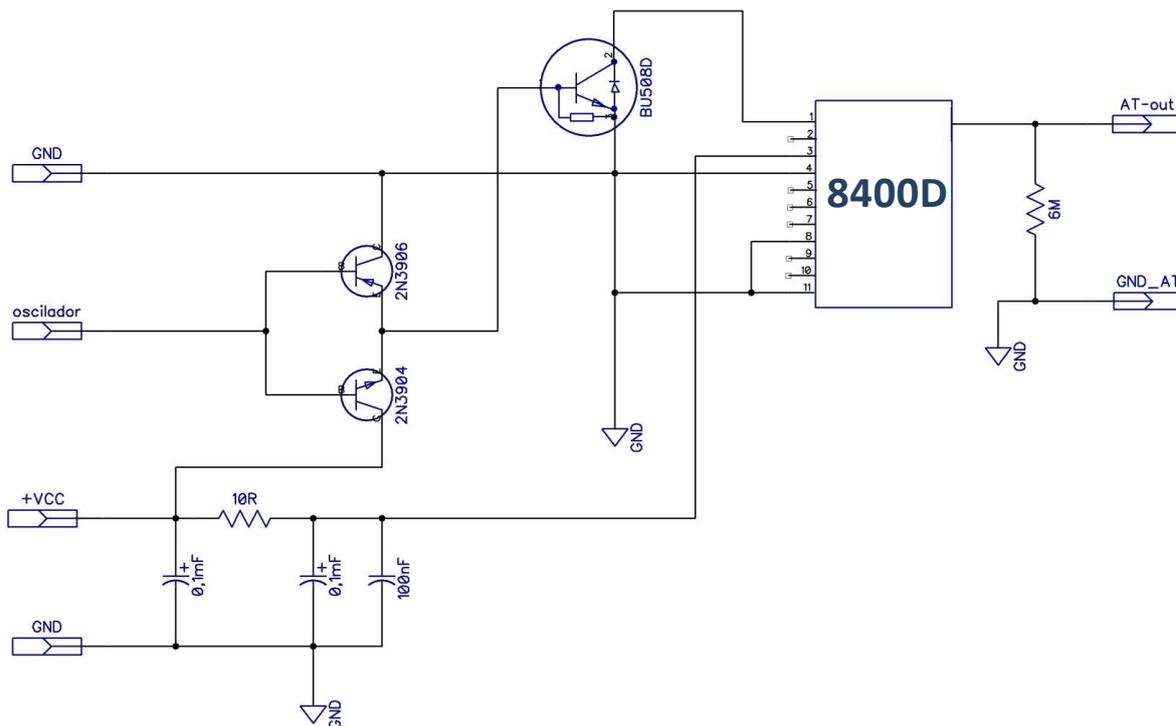


Figura 6. Circuito gerador de alta tensão do marcador eletrotérmico.

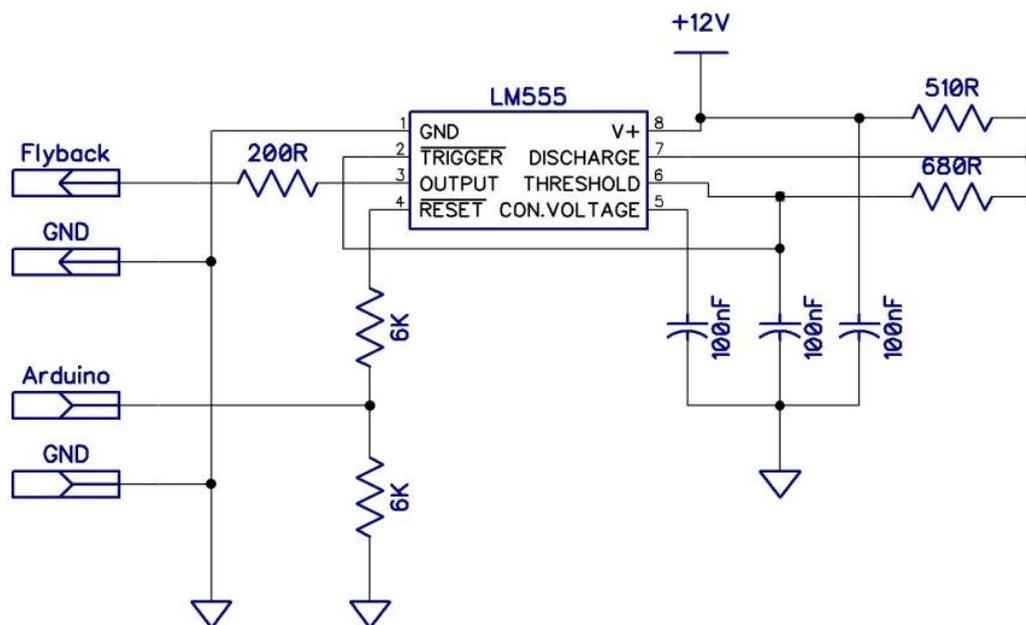


Figura 7. Circuito oscilador do marcador eletrotérmico.

O acionamento do oscilador, referente às larguras dos pulsos de aquecimento do marcador térmico e sua temporização, foi controlado com o auxílio de uma microcontroladora ATmega168 (Atmel, San Jose, CA, EUA), amplamente difundida através do projeto Arduino de open hardware e open software [36]. O *firmware* responsável pelo controle e interfaceamento entre o marcador térmico e o computador foi desenvolvido na plataforma de desenvolvimento disponibilizada pelo projeto Arduino, que é baseada em linguagem C.

3.2.1.4. Marcador térmico a laser

A utilização de um laser foi proposta como uma alternativa ao resistor para a geração de TMs. A ideia era utilizar um dispositivo no qual não houvesse aquecimento da sílica e da poliimida que reveste externamente o capilar de sílica fundida, mas somente da solução que preenchesse o mesmo. Dessa forma, o aquecimento da solução e seu posterior resfriamento ocorreriam de forma mais rápida.

Utilizou-se, assim, um diodo laser com comprimento de onda de 650 nm, 70 mW de potência e 5 V (DealExtreme, Hong Kong). Um anteparo contendo uma fenda de 1 mm de espessura era posicionada na saída do laser, a fim de reduzir sua área de incidência sobre o capilar. A distância de incidência do laser sobre o capilar até o detector era de aproximadamente 5 cm.

A temporização e a largura dos pulsos de aquecimento foram realizadas com o auxílio do mesmo circuito microcontrolado descrito na seção 3.2.1.3.

3.3. Resultados e Discussão

Para se gerar TMs, o capilar é preenchido com um eletrólito qualquer e, durante a corrida eletroforética, ou seja, sob ação do campo elétrico, um breve pulso de aquecimento (da ordem de 100 ms) é aplicado sobre uma pequena região do capilar (aproximadamente 1 mm). A figura 8 apresenta um eletroferograma contendo um sinal típico de TM. Discussão mais detalhada sobre o perfil do sinal, estudos sobre a natureza do fenômeno e algumas aplicações serão apresentados em capítulos posteriores.

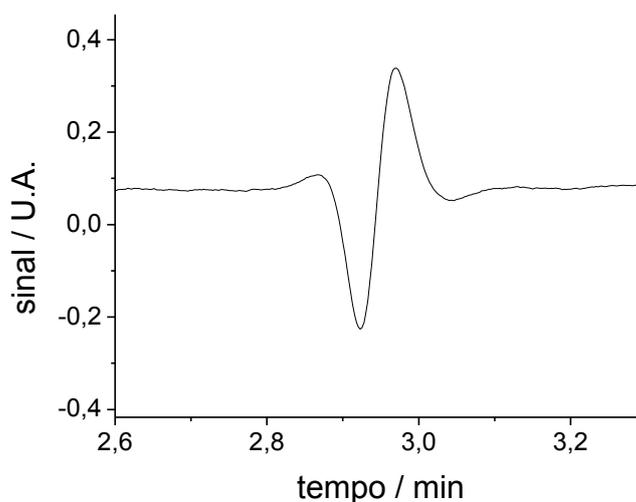


Figura 8. Eletroferograma de TM em tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 7,0). Potencial de corrida: +10 kV. Marcador térmico baseado em filamento de tungstênio (300 ms de pulso de aquecimento).

Marcadores térmicos baseados em filamento de tungstênio e em resistor SMD

Devido à facilidade de implementação, o marcador térmico baseado em filamento de tungstênio foi o primeiro a ser utilizado. A aplicação de 5 V sobre o filamento proporcionou aquecimento substancial do mesmo, gerando TMs intensas. Períodos de aquecimento maiores que 1250 ms causaram alteração na superfície do capilar devido à queima da camada de poliimida, evidenciada pela alteração de sua

coloração de amarronzada para preta. No entanto, um problema apresentado por esse dispositivo foi a falta de reprodutibilidade na intensidade dos sinais devido à área do filamento em contato com o capilar ser variável. Assim, foi implementado o marcador térmico baseado em resistor SMD.

Dois anéis nas extremidades do resistor (figura 2) serviram como guia para o capilar, proporcionando fixação da coluna e melhor reprodutibilidade da área de contato da superfície do capilar com o resistor, frente ao marcador baseado em filamento. Utilizando esse dispositivo, o aquecimento com tempos mais prolongados que 1000 ms provocaram sua queima, antes mesmo de ser observada alguma alteração na superfície do capilar.

A velocidade das TMs pode ser obtida da mesma forma que qualquer outra espécie, através da distância percorrida em determinado período:

$$v_{TM} = \frac{d}{t} \quad \text{Equação 1}$$

onde d é a distância do marcador térmico até o ponto de detecção e t é o tempo de migração da TM.

Muitas vezes, estabelecer o ponto exato de detecção não é uma tarefa trivial. Assim, foi implementado um marcador térmico duplo (figura 3), que consiste em dois resistores soldados em paralelo sobre uma mesma placa de circuito impresso a uma distância fixa conhecida. A marcação térmica é realizada, então, acionando os dois resistores simultaneamente. Dessa forma, a velocidade da TM pode ser obtida através da diferença do tempo de migração entre as duas marcas (Δt):

$$v_{TM} = \frac{d_{TM}}{\Delta t}$$

Equação 2

onde d_{TM} é a distância entre os dois marcadores térmicos.

Dessa forma, como a distância entre os dois marcadores é bem conhecida, o marcador térmico duplo oferece maior exatidão no cálculo da velocidade das marcas térmicas, em comparação com o marcador simples com um único resistor.

Marcador eletrotérmico

De forma simplificada, pode-se dizer que a coluna capilar apresenta características de um capacitor, sendo esse o motivo pelo qual se aplicou um sinal alternado no marcador eletrotérmico. Caso o sinal fosse contínuo, o capilar atuaria como um capacitor carregado, bloqueando o sinal. Em sua grande maioria, os *flybacks* possuem um diodo na saída, impedindo a passagem do semi-ciclo negativo do sinal de alta tensão e inviabilizando a descarga do capacitor (capilar). Assim, foi introduzido um resistor de 6 M Ω ligado em paralelo ao capilar, o qual possui a função de promover a descarga do capacitor representado pela coluna de sílica.

Testes utilizando esse dispositivo não apresentaram resultados satisfatórios, não sendo possível a observação de sinais de TMs em nenhum dos sistemas químicos estudados. Tal fato se deve, provavelmente, à deficiência do resistor de 6 M Ω na descarga do sinal. A utilização de um resistor de menor resistência facilitaria a condução do sinal, entretanto elevaria demais a corrente, inviabilizando a aplicação.

Marcador térmico a laser

A figura 9 mostra eletroferogramas comparando TMs geradas com um laser vermelho (A) e com um resistor de 15Ω (B). Utilizou-se como eletrólito de corrida uma solução de azul de metileno 5 mmol L^{-1} , que possui máximo de absorção em 608 e 663 nm, conforme mostram os espectros da figura 10. Para a geração das TMs, utilizou-se um laser vermelho, cujo comprimento de onda está na ordem de 650 nm, que está próximo da região de absorção máxima do azul de metileno.

Pode-se notar nessa figura que os perfis das TMs (vale-pico) são iguais empregando ambos os dispositivos, resistor e laser, independente da fonte de aquecimento, sugerindo que a origem do fenômeno é igual para ambos os casos. Discussão detalhada sobre a natureza do fenômeno é apresentada no capítulo 4. Embora as larguras do pulso de aquecimento não sejam exatamente as mesmas utilizando o resistor e o laser, a intensidade das marcas com o resistor mostrou-se muito mais intensa que as geradas com o laser. Uma limitação no marcador a laser é que ele restringe a aplicação somente às espécies que absorvem no comprimento de onda do laser. Neste sentido, uma perspectiva interessante seria a utilização de laser na região do infravermelho, região na qual a água absorve. Assim, não haveria a necessidade de ter outra espécie absorvente no meio.

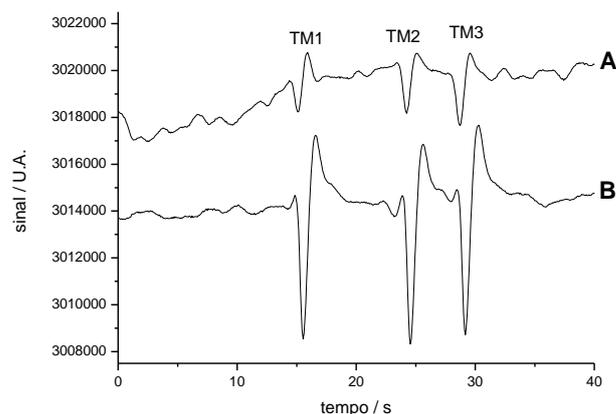


Figura 9. Eletroferogramas de TMs utilizando (A) laser vermelho e (B) resistor em azul de metileno 5 mmol L^{-1} . Condições experimentais: $+10\text{kV}$, largura de pulso de 73 ms e 365 ms utilizando resistor e laser, respectivamente.

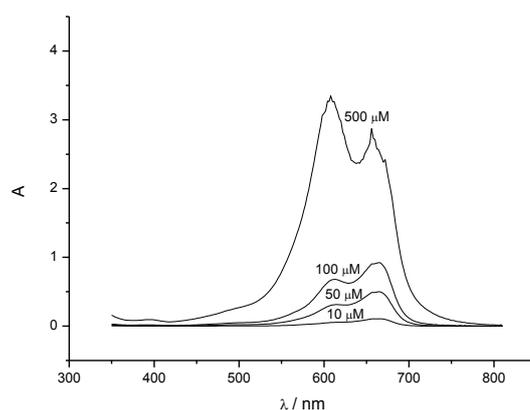


Figura 10. Espectros de absorção de azul de metileno em diferentes concentrações. Máximos de absorção em 608 e 663 nm.

3.4. Conclusões Parciais

Os marcadores térmicos baseados em filamento de tungstênio e em resistor SMD demonstraram melhor desempenho e espectro mais amplo de aplicação frente aos marcadores eletrotérmico e a laser. Devido à maior reprodutibilidade na área de contato do capilar com o dispositivo de aquecimento e, conseqüentemente, na intensidade dos sinais gerados, o marcador baseado em resistor SMD revelou-se o melhor dos quatro dispositivos propostos.

Capítulo 4

Origens da Marca Térmica

4. Origens da marca térmica

4.1. Introdução

A marca térmica é um sinal presente em um eletroferograma que surge como produto da aplicação de um breve aquecimento de uma pequena porção do capilar enquanto um campo elétrico é aplicado. Estudos mais detalhados mostraram uma correlação entre a mobilidade do fluxo eletrosmótico e a da TM, originando diversas aplicações envolvendo o monitoramento de variações do fluxo eletrosmótico utilizando esse sistema, as quais são mostradas no capítulo 6. Neste capítulo, são discutidos os fenômenos geradores dessas marcas, bem como algumas de suas características e propriedades.

A introdução dos conceitos das marcas térmicas em eletroforese capilar foi tema de um trabalho publicado na literatura pelo nosso grupo de pesquisa [37]. A partir desse trabalho, outro grupo de pesquisa publicou um artigo sobre a utilização de marcas térmicas para monitoramento de EOF em soluções de líquidos iônicos em meio não aquoso [38] e outro propondo um algoritmo para identificação de picos e correção de linha base do eletroferograma, utilizando as marcas térmicas para corrigir variações do EOF [39].

4.1.1. O Fluxo Eletrosmótico

O fluxo eletrosmótico (EOF, *Electroosmotic Flow*) é um fenômeno ubíquo nas análises por eletroforese capilar, que consiste no transporte da solução como um todo no interior do capilar por efeito do campo elétrico.

A sílica fundida, uma espécie de dióxido de silício amorfo, é o material mais amplamente utilizado na confecção de capilares para CE. Esse fato se deve a

algumas de suas propriedades, tais como dimensões precisas, alta constante dielétrica, baixa condutividade elétrica, alta condutividade térmica, resistência mecânica, maleabilidade, resistência a ataques químicos, dentre outros[15].

A sílica possui diversos tipos de grupos silanóis (-Si-OH), os quais possuem caráter ácido. Dependendo do pH do eletrólito de corrida (tipicamente > 2), esses grupos podem se dissociar, conferindo carga negativa à superfície do capilar. Os cátions do eletrólito de corrida são, então, atraídos eletrostaticamente para essa superfície, gerando uma distribuição de cargas não homogênea chamada de dupla camada elétrica. Quando um campo elétrico é aplicado, essas cargas positivas migram em direção ao cátodo (polo negativo) e estando essas espécies solvatadas, elas impulsionam toda a solução gerando um fluxo chamado de fluxo eletrosmótico.

Como todas as espécies que estão no capilar sofrem com o efeito do EOF, a mobilidade de qualquer espécie é uma somatória da mobilidade do EOF e da sua mobilidade efetiva, essa última dependente de propriedades específicas da espécie como carga e tamanho. O resultado dessa soma é chamado de mobilidade aparente da espécie. Dessa forma, o controle do EOF possibilita melhorar o desempenho das separações através da modificação das mobilidades aparentes dos analitos, além de exercer um importante papel na manutenção da reprodutibilidade, resolução e eficiência da separação [35].

Os métodos de controle mais comumente empregados exploram alterações nas propriedades físico-químicas do eletrólito de corrida, tais como pH, força iônica, viscosidade ou adição de aditivos orgânicos [14, 40]. Também é possível alterar a densidade de carga superficial da coluna através de revestimentos físicos ou métodos de derivatização química [41, 42]. Além disso, o EOF pode ser controlado

através da aplicação de um campo elétrico externo na direção radial ao capilar [43, 44].

Na análise de ânions, em geral são empregados inversores de EOF, que são tensoativos ou polímeros catiônicos que, quando adsorvidos pela parede do capilar, conferem carga positiva a ele. Logo, a aplicação do campo elétrico gera um fluxo eletrosmótico migrando na direção do ânodo (polo positivo). Esse sentido é chamado de sentido inverso do EOF. O EOF migrando no sentido do cátodo é chamado de sentido normal.

O brometo de N-cetil-N,N,N-trimetilamônio (CTAB) é um dos tensoativos mais utilizados como inversores de EOF. Tavares e colaboradores estudaram as características do CTAB para análise de ânions, mostrando que a concentração mais adequada do tensoativo é acima de 10% da Concentração Micelar Crítica (CMC) [45]. O brometo de didodecildimetilamônio (DDAB) também é comumente utilizado como inversor de EOF. Lucy e colaboradores realizaram um estudo comparativo entre o CTAB e o DDAB, mostrando que o DDAB possui melhor desempenho quanto à repetibilidade [46]. O polybrene é um exemplo de um polímero catiônico empregado como inversor de EOF [47]. Nesse caso, o recobrimento é realizado utilizando múltiplas camadas de um composto iônico com o polímero, resultando em um recobrimento estável.

4.1.2. Estratégias para monitoramento do EOF

O monitoramento e o controle do EOF são de grande importância nas análises por CE. Alterações no EOF podem causar modificações nos tempos de migração das espécies, dificultando a identificação dos picos nos eletroferogramas. Dentre algumas causas de alterações no EOF estão: adsorção na parede do capilar

e alterações na composição do eletrólito de corrida, como viscosidade ou pH [14, 40].

Métodos para a determinação do EOF, bem como estudos teóricos e práticos sobre esse assunto, foram temas do trabalho de diversos autores [48-58]. O método mais amplamente utilizado para a determinação do EOF é a injeção de um marcador neutro, através do cálculo de sua velocidade até o ponto de detecção [59, 60].

Outra estratégia envolve a medida de corrente ao se trocar a solução que preenche o capilar por outra de condutividade diferente [61]. Embora a instrumentação seja bastante simples – não requer nada além do que um equipamento de eletroforese capilar convencional já contenha – esse método não é muito preciso, pois entre os vários fatores que alteram a mobilidade do EOF, a força iônica é um deles. Além disso, é um processo relativamente demorado, pois é necessário esperar que o capilar seja totalmente preenchido com a nova solução.

Alguns autores propuseram métodos de monitoramento em sistemas microfluídicos utilizando sensores. Freitag e Szekely [54] propuseram um sensor óptico que mede o nível do reservatório que permite o ajuste automático do potencial de corrida aplicado em função do fluxo medido. Da Silva e colaboradores [62] mostraram um sensor fotométrico baseado em um microscópio trinocular e em um fotodiodo integrado, utilizando um diodo emissor de luz (LED) como fonte de radiação.

Algumas estratégias de monitoramento do EOF são baseadas na "marcação" de um pequeno volume do eletrólito de corrida em movimento, como, por exemplo, através de aquecimento. StClaire e Hayes [50] propuseram um método baseado em aquecimento e subsequente detecção por LIB (*Laser Induced Interferometric Backscatter*). Nessa montagem, uma pequena região do capilar é envolta por um fio

de Ni-Cr e o aquecimento se dá pela passagem de corrente elétrica pelo fio. A variação no índice de refração da região de maior temperatura é posteriormente detectada por LIB. Apesar de possuir potencial para ser utilizada em eletroforese capilar, essa técnica foi usada somente com fluxo gerado por diferença de pressão em capilares de 184 μm de diâmetro interno.

Schrum e colaboradores [49] propuseram um método de monitoramento do EOF por fotodegradação de um fluoróforo neutro incorporado ao eletrólito de corrida, no qual a região degradada, movendo-se com o EOF, era detectada na região do UV/Vis.

4.1.3. Picos de Sistema

Em eletroforese capilar, o canal de separação e os reservatórios estão preenchidos com uma mesma solução com composição homogênea. Quando a amostra é injetada no capilar, ocorre uma perturbação nessa composição. Essa perturbação ocasiona uma distribuição diferenciada das espécies carregadas do eletrólito de corrida e, quando um campo elétrico é aplicado, essas espécies migram, originando as chamadas zonas de sistema (*system zones* ou *system eigenzones*). Quando esses sinais conseguem ser registrados pelo detector, são chamados de picos de sistema (*system peaks* ou *system eigenpeaks*) [63-67].

A previsão sobre o surgimento dos picos de sistema ainda é uma tarefa difícil, assim como a compreensão sobre a natureza desse fenômeno. Entretanto, existem na literatura modelos que permitem prever a mobilidade e o número de zonas de sistema, de acordo com o sistema químico utilizado [65-67].

Mesmo diante da complexidade do fenômeno, a observação dos picos de sistema é comum aos usuários da técnica. Sabe-se que em alguns casos são

registrados, além dos picos relativos aos analitos, picos adicionais que não se referem a nenhuma espécie presente na amostra. Por exemplo, quando se utiliza um eletrólito de corrida contendo CTAB, frequentemente observa-se um pico de sistema [68]. O eletroferograma de qualquer tipo de amostra, ou mesmo de água, utilizando esse eletrólito de corrida apresenta sempre um pico com mobilidade aproximada à do brometo, mesmo que a amostra não contenha essa espécie ou qualquer outra que com ela co-migre.

4.2. Parte Experimental

4.2.1. Reagente e soluções

Dimetil sulfóxido (DMSO), dibenzo-18-crown-6 (DB18C6), histidina (His), sulfato de céσιο, ácido morfolinoetanosulfônico (MES) e hidroxietilcelulose (HEC) foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, EUA). Cloreto de sódio, cloreto de potássio, sulfato de sódio, sulfato de potássio, sulfato de lítio, acetato de sódio, tetraborato de sódio e CTAB foram adquiridos da Merck (Rio de Janeiro, Brasil). Dodecilsulfato de sódio (SDS) foi obtido da Synth (Diadema, São Paulo, Brasil). Todos os reagentes eram de grau analítico e usados sem tratamento adicional. Água deionizada (Barnsted/Thermolyne, Dubuque, IA, EUA) foi usada para preparar as soluções.

4.2.2. Materiais e Métodos

4.2.2.1. Eletroforese capilar

Os experimentos foram realizados utilizando-se um equipamento de eletroforese capilar construído no próprio laboratório, equipado com detector

condutométrico sem contato (C⁴D) [26, 33, 34] operando em 550 kHz e 2 Vpp. Em muitos experimentos, principalmente aqueles sobre o estudo dos fenômenos das TM, foram utilizados eletrólitos de corrida não tamponados. Assim, foi utilizado um equipamento contendo compartimentos adicionais para eletrólise separada [69], que minimizaram problemas de contaminação do eletrólito de corrida decorrente de eletrólise, possibilitando a utilização de tais eletrólitos sem capacidade tamponante. O sistema de eletrólise separada contém quatro reservatórios: em dois deles encontram-se imersas as extremidades da coluna capilar e nos outros dois estão os eletrodos responsáveis pela aplicação da alta tensão, que é onde ocorre a eletrólise. Os reservatórios contendo o capilar encontram-se ligados, dois a dois, aos reservatórios da alta tensão através de pontes salinas preenchidas com o próprio eletrólito de corrida. O esquema do sistema de eletrólise separada, bem como outro do equipamento de CE utilizado encontram-se nas figuras 11 e 12, respectivamente.

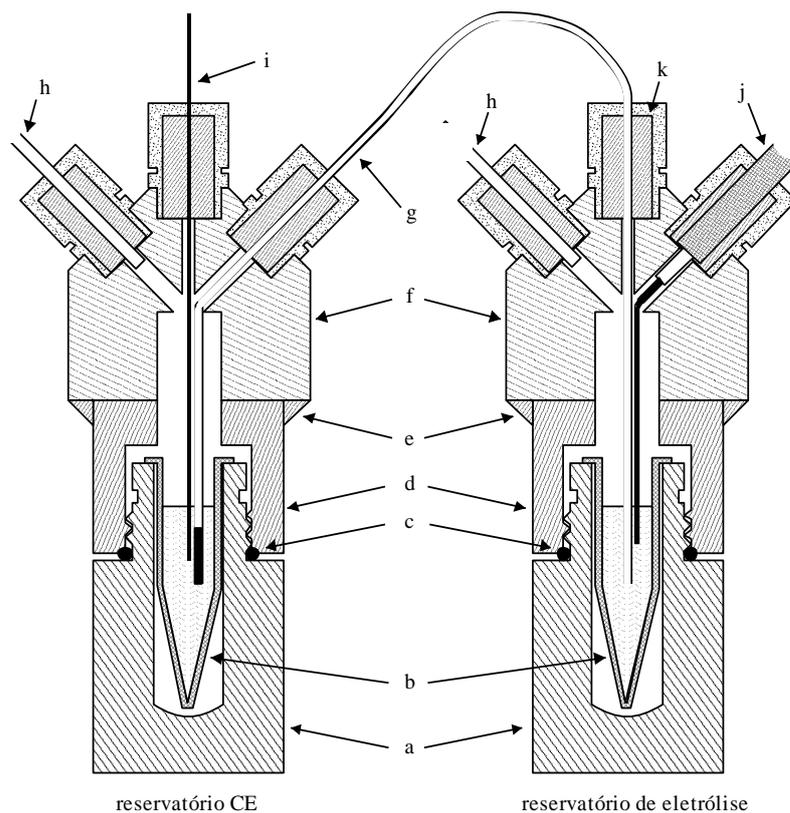


Figura 11. A – Esquema de um corte de seção transversal do sistema de eletrólise separada. Frascos de acrílico (a) foram usados como suporte para os microtubos de 1,5 mL contendo eletrólito de corrida (b). Tubos de polietileno contendo na ponta um pequeno fragmento de capilar de 250 μm d.i. (g) foram utilizados como ponte salina. Uma peça de acrílico (f) foi utilizada como encaixe para a tampa que fecha o suporte dos reservatórios (d), a qual foi colada com uma resina epóxi (e) e vedada com um anel de borracha (c). A pressurização dos reservatórios foi realizada através de aberturas (h). Septos de silicone (k) foram utilizados para vedar o sistema. Com esse sistema, capilar (i) e eletrodo de alta tensão (j) são posicionados em reservatórios diferentes.

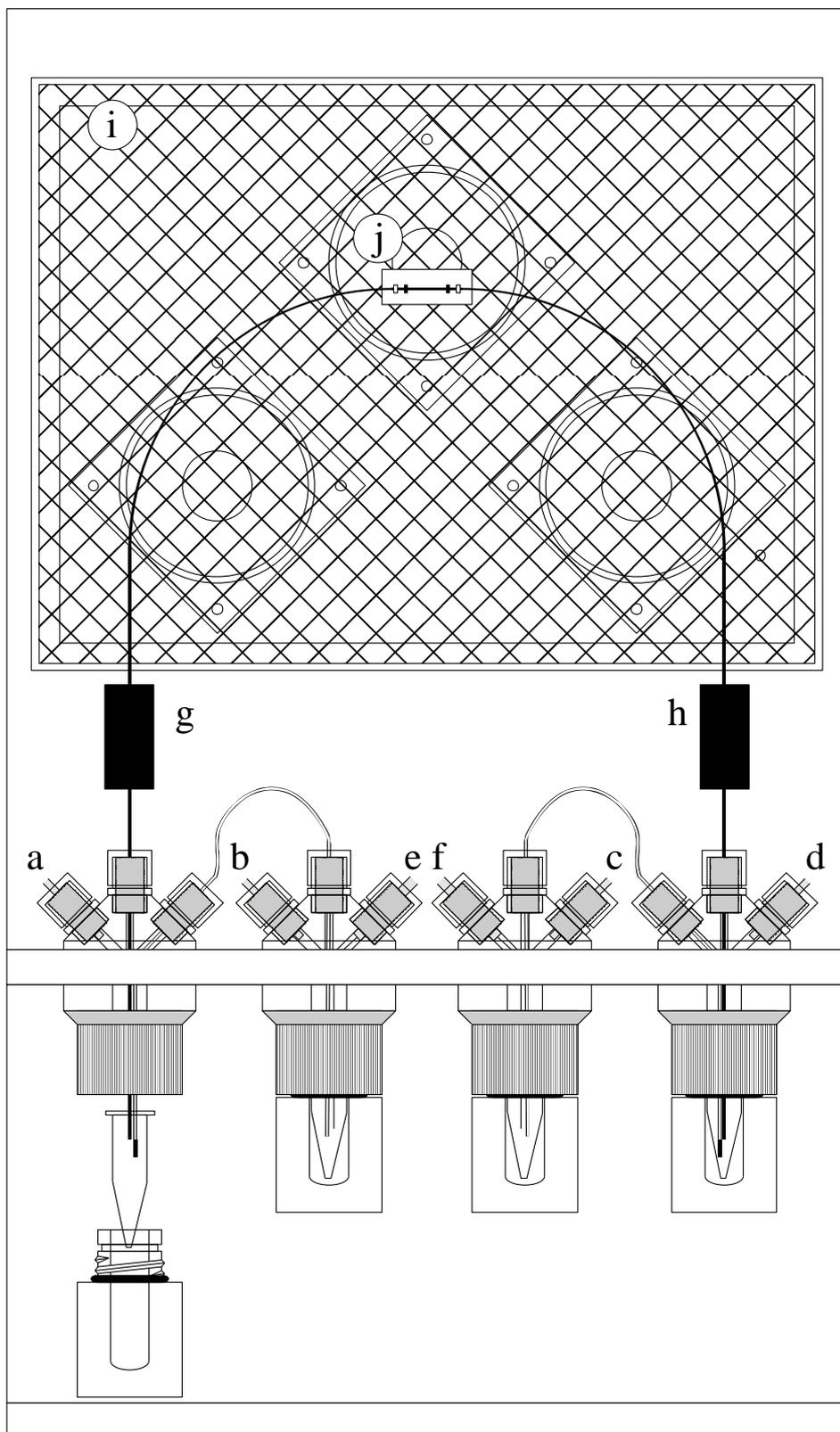


Figura 12. Esquema da parte frontal do equipamento de eletroforese capilar. Entradas de ar (a-d) foram utilizadas para pressurizar os reservatórios. A fonte de alta tensão foi conectada através dos cabos (e - f). Dois C⁴D (g-h) foram posicionados próximos às duas extremidades do capilar, o qual ficava encostado em uma grade metálica (i) que também servia para fixar o marcador térmico (j).

Em todos os experimentos, foi utilizado capilar de sílica fundida (Agilent, Santa Clara, CA, EUA) de 75 μm d.i. e 360 μm d.e. Antes de cada dia de análise, o capilar foi lavado e pré-condicionado da seguinte maneira: *flush* com solução de NaOH 0,1 mmol L⁻¹, seguido de água e eletrólito de corrida, cada etapa durante 15 min, e aplicação do potencial de corrida até estabilização da linha base.

Após aplicação do campo elétrico para início da corrida, as TMs eram geradas através de pulsos de aquecimento com duração da ordem de centenas de milissegundos realizadas a qualquer momento da corrida, conforme a conveniência. A intensidade dos sinais das TMs foi quantificada através do valor de sua amplitude, ou seja, da diferença de altura entre o vale e o pico de cada TM. Para isso, foi utilizado o software Origin 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA).

As demais condições experimentais como comprimento do capilar, campo elétrico e composição do eletrólito de corrida foram variadas para cada experimento e encontram-se nas legendas da figura a qual se referem.

4.2.2.2. Avaliação do modelo

Simulação computacional

Nas simulações de TM, foi utilizado o software livre Simul 5.0 [70]. Este permite a escolha do eletrólito de corrida, das espécies a serem injetadas e parâmetros eletroforéticos (tamanho do capilar, potencial de corrida, mobilidade do EOF, etc.). A simulação resulta em um gráfico com perfis de concentração das espécies em estudo ao longo do capilar em função do tempo. Como condição inicial, adotou-se um capilar de 20 cm preenchido com o eletrólito de corrida e um *plug* de injeção de 1 mm com formato gaussiano contendo as mesmas espécies do eletrólito,

entretanto com mobilidades mais altas, que simularam a região aquecida pela marcação térmica. As mobilidades utilizadas na condição inicial encontram-se na tabela 1.

Tabela 1. Condições iniciais de simulação

Experimento	Espécie	Local [‡]	Mobilidade ($10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	Concentração (mmol L^{-1})
NaCl	Na ⁺	T	51,9	10
	Na ⁺	A	83,0	10
	Cl ⁻	T	79,1	10
	Cl ⁻	A	110,7	10
KCl	K ⁺	T	76,2	10
	K ⁺	A	106,7	10
	Cl ⁻	T	79,1	10
	Cl ⁻	A	126,5	10

[‡] Refere-se à localização da espécie no interior do capilar: A - região da amostra e T - no tampão de corrida.

O processo de simulação teve início aplicando-se 200 V cm^{-1} e após 100 ms, ele foi interrompido. Essa etapa correspondeu ao tempo de aquecimento durante a formação da TM. Em seguida, as mobilidades das espécies contidas na região da amostra foram substituídas pelos valores das mobilidades dos íons "frios", ou seja, as mobilidades passaram a ser 51,9, 79,1 e 76,2 ($\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) para sódio, potássio e cloreto, respectivamente, tanto na região do eletrólito de corrida quanto na da amostra. A seguir, deu-se continuidade à simulação por mais 1 s aplicando 200 V cm^{-1} , tempo necessário para que não mais houvesse alteração no formato do pico, apenas seu deslocamento pelo EOF. Essa etapa teve o objetivo de simular o resfriamento na região da TM.

Número de transporte

Para calcular o número de transporte de algumas espécies foi utilizado o método da fronteira móvel. Nesse método um tubo é preenchido com duas soluções eletrolíticas contendo o mesmo cátion (se a espécie de interesse for o ânion) ou mesmo ânion (se a espécie de interesse for o cátion), formando uma fronteira bem definida. Aplica-se, então, uma diferença de potencial entre as duas extremidades do tubo, de tal forma que a fronteira começa a se mover. O número de transporte é obtido medindo-se a quantidade de carga referente à espécie de interesse, que passa por uma determinada região do tubo, durante um intervalo de tempo. Dessa forma, o número de transporte da espécie A pode ser obtido através da seguinte equação:

$$t_A = \frac{I_A}{I} = \frac{cVF}{\int idt} \quad \text{Equação 3}$$

onde t_A é o número de transporte da espécie A, I e I_A são as correntes total e da espécie A, respectivamente, V é o volume, F é a constante de Faraday, i é a corrente do sistema, c é a concentração e t é o tempo do experimento.

Os experimentos foram realizados no próprio equipamento de eletroforese capilar, empregando soluções 10 mmol L^{-1} de KCl e NaCl para a medida do K^+ e soluções 10 mmol L^{-1} de NaCl e LiCl para a medida do Na^+ . Para cada experimento, o capilar era primeiramente preenchido com a solução contendo o cátion de maior mobilidade. Em seguida, um reservatório contendo a solução com o cátion de menor mobilidade era posicionado em uma das extremidades do capilar (na região de maior potencial). Finalmente, o campo elétrico era aplicado e o sinal registrado pelo

C⁴D até observar mudança nos patamares de linha base. As corridas foram efetuadas em modo de corrente constante (10 μ A).

Para eliminar o EOF, foi utilizado HEC 0,1% (m/v), o qual foi adicionado nas próprias soluções de KCl, NaCl e LiCl.

O capilar revestido empregado foi o BioCAPTM com 75 μ m d.i., 375 μ m d.e. e 60 cm de comprimento (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA), de sílica modificada com poly AAEE (N-acryloylaminoethoxyethanol) [71]. O capilar foi lavado previamente apenas com água deionizada e depois com o próprio eletrólito de corrida.

4.2.2.3. Mobilidade da TM

Para a realização da calibração do detector, o capilar foi inteiramente preenchido primeiramente com solução de KCl 10 mmol L⁻¹ e o sinal da linha base foi registrado. Em seguida, a solução que preenchia o capilar foi trocada por KCl 10,1 mmol L⁻¹ e o sinal da linha base foi novamente registrado. A diferença de sinal entre as soluções de KCl 10,0 e 10,1 mmol L⁻¹ equivale à intensidade de sinal de uma solução de KCl 0,1 mmol L⁻¹.

O cálculo da mobilidade do pico da água foi realizado da seguinte forma: um pequeno *plug* d'água foi injetado no capilar (injeção hidrodinâmica, 4 s, 3,5 psi) preenchido com uma solução de NaHCO₃ 10 mmol L⁻¹. Aplicou-se um potencial de corrida de +30 kV e foi registrado um eletroferograma até que o pico da água fosse observado. Sabendo que o comprimento total do capilar era 50,0 cm e que a distância entre os dois detectores era de 30,0 cm, foi possível calcular a mobilidade do pico da água através da equação 28. Para obter-se a mobilidade da TM, o capilar foi preenchido com solução de NaHCO₃ 10 mmol L⁻¹, o potencial de corrida de

+30 kV foi aplicado e duas TMs geradas simultaneamente por resistor SMD (700 ms de largura de pulso, resistores separados por 5,0 cm). Após registro das TM nos eletroferogramas, foi possível calcular a mobilidade da TM utilizando a equação 29. Os cálculos das mobilidades são melhor discutidos na seção 4.3.3.

4.2.2.4. Dependência da intensidade da TM com o campo elétrico

Para os experimentos com campo elétrico constante durante a migração da TM até o detector, adotou-se o seguinte procedimento: nos 15 s iniciais de corrida, foram aplicados valores de campo elétrico variáveis. Durante esse período, aguardou-se 5 s: tempo necessário para estabilização da coluna capilar. Então um pulso de 100 ms foi aplicado para gerar as TMs e os 10 s finais tiveram a finalidade de garantir o completo resfriamento da coluna e da solução. Em seguida, foi aplicado campo elétrico constante de 178 V cm^{-1} para transportar as TMs até o detector. O campo elétrico constante teve a finalidade de garantir que o efeito da difusão fosse o mesmo em todas as corridas.

Para o experimento com campo elétrico variável durante a migração da TM até o detector, foram aplicados valores de campo elétrico variando de 0 a 514 V cm^{-1} durante os 15 s iniciais. Em seguida, o mesmo valor de campo elétrico foi mantido para que a TM migrasse até o detector.

4.2.2.5. Efeito do diâmetro do capilar na intensidade das TMs

Nesse experimento, as intensidades das TMs foram avaliadas em capilares de sílica fundida de 20 μm , 50 μm e 75 μm de diâmetro interno com 40 cm de comprimento cada um. Empregou-se marcador térmico duplo baseado em resistor SMD, aplicando-se 584 ms de pulso de aquecimento. O potencial de corrida utilizado

foi de +20 kV. Como eletrólito de corrida, foi utilizado o tampão MES/Na 20 mmol L⁻¹ (pH 6,0), que consistiu na mistura 1:1 de ácido morfolinoetanosulfônico e morfolinoetanosulfonato de sódio, que foi preparado adicionando-se solução de NaOH a 20 mmol L⁻¹ de ácido morfolinoetanosulfônico até atingir pH 6,0, que foi medido com auxílio de um pHmetro (Quimis, Q-400M1S, Diadema, SP, Brasil).

4.3. Resultados e Discussão

Diversos eletrólitos de corrida foram estudados ao longo do trabalho. A figura 13 apresenta alguns exemplos de TMs em diferentes eletrólitos, alguns bastante utilizados em eletroforese capilar, como é o caso dos tampões MES/His, borato, acetato e fosfato. Além disso, também são mostrados exemplos de eletrólitos em meio não aquoso (NACE, *Non-aqueous Capillary Electrophoresis*) e para análise em meio micelar (MEKC, *Micellar Electrokinetic Capillary Electrophoresis*).

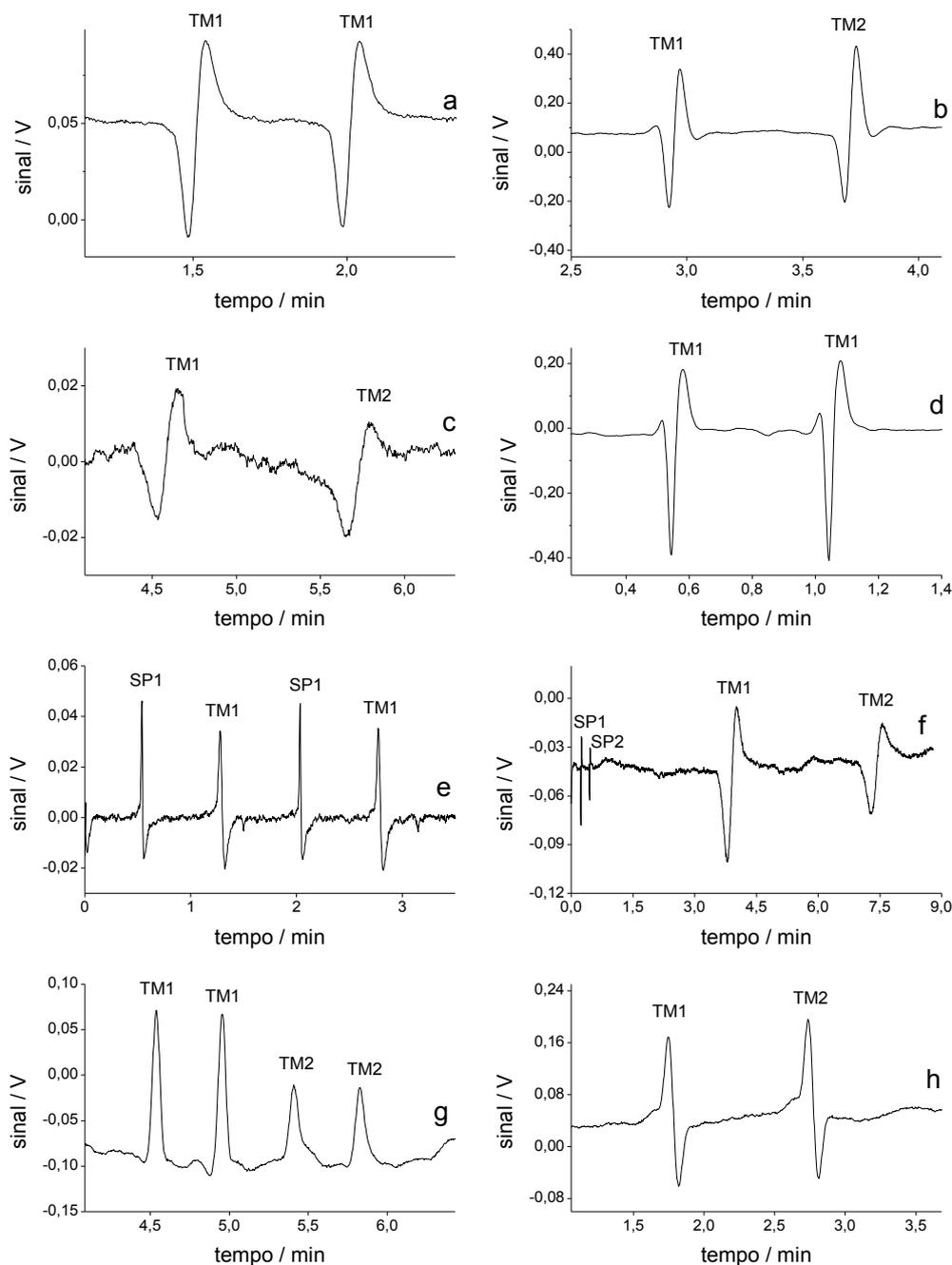


Figura 13. Exemplos típicos de TMs em soluções de : a – tampão acetato de sódio 10 mmol L^{-1} (pH 4,7), b – tampão fosfato de sódio 10 mmol L^{-1} (pH 7,0), c – tampão MES/His 10 mmol L^{-1} (pH 6,0), d – tampão borato de sódio 10 mmol L^{-1} (pH 9,2), e – MES/His 20 mmol L^{-1} (pH 6,0) com CTAB $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$, f – KCl 10 mmol L^{-1} (pH 4,0), g – tampão fosfato de sódio 10 mmol L^{-1} (pH 7,0) com SDS 100 mmol L^{-1} e h – KCl 10 mmol L^{-1} em DMSO com DB18C6 $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Eletroferogramas **a**, **d** e **e** foram obtidos com um único filamento acionados duas vezes. Eletroferograma **b** foi obtido utilizando dois filamentos acionados uma única vez, simultaneamente. Eletroferogramas **c**, **f** e **h** foram obtidos utilizando 2 resistores SMD, acionados uma vez. Eletroferograma **g** foi obtido com filamento duplo acionado duas vezes. *TM1* e *TM2* referem-se aos marcadores térmicos 1 e 2, respectivamente e *SP1* e *SP2* referem-se aos picos de sistemas relacionados aos marcadores térmicos 1 e 2, respectivamente.

4.3.1. A natureza da TM

De uma forma geral, as TMs possuem um perfil típico de vale-pico ou pico-vale, que depende exclusivamente das espécies presentes na solução. Soluções de cloreto de sódio (figura 14-A) e cloreto de potássio (figura 14-B) são exemplos típicos de perfil pico-vale e vale-pico, respectivamente. Observando esse perfil típico, foram elaboradas algumas hipóteses acerca dos fenômenos envolvidos na geração das TMs.

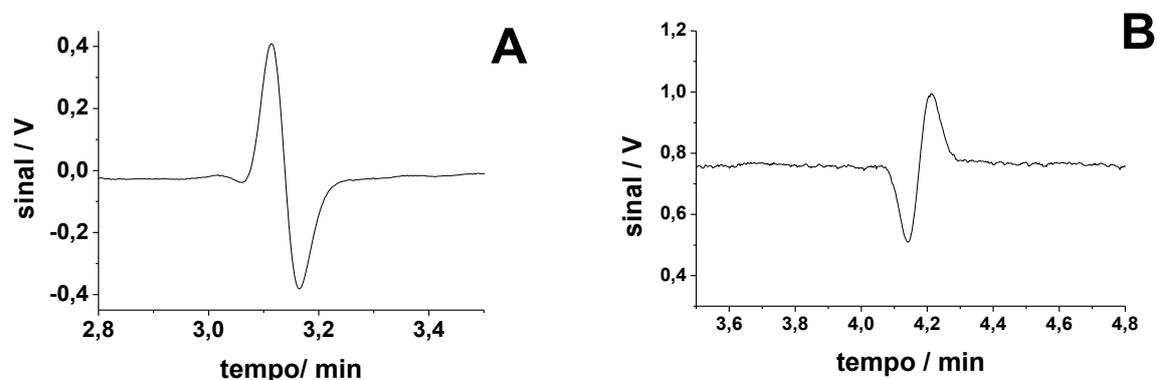


Figura 14. Eletroferogramas de TMs em soluções 10 mmol L^{-1} de (A) NaCl e (B) KCl. Capilar: $75 \mu\text{m}$ i.d., 50 cm de comprimento. Potencial de corrida: +10 kV. TM acionados com largura de pulso de aquecimento de 300ms, com resistor SMD.

Hipótese 1:

A hipótese mais imediata sobre a natureza do fenômeno está relacionada com alterações físicas das propriedades do eletrólito quando quente. Assim, variou-se a distância entre o detector e a TM para que a amplitude do sinal fosse detectada em possivelmente diferentes temperaturas. A figura 15 mostra que, de fato, ocorre um decréscimo na amplitude da TM em função da distância do marcador em relação ao detector. No entanto, é necessário considerar que o efeito de difusão pode também responder por essa redução de intensidade.

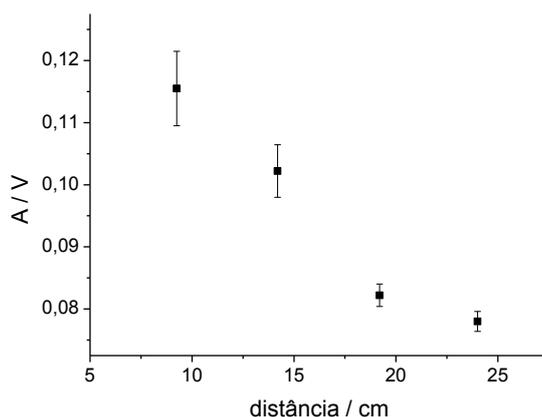


Figura 15. Amplitude da TM em função da distância do marcador térmico em relação ao ponto de detecção, para KCl 10 mmol L⁻¹ como eletrólito de corrida. Marcador térmico: resistor SMD, largura do pulso: 200 ms. Condições – Potencial: +10 kV. Capilar: 75 μ m d.i., 57,3 cm de comprimento. Média e desvio padrão de 6 replicatas.

Embora os sinais das TMs não possuam exatamente um perfil gaussiano de distribuição de concentração, esse é um modelo adequado aos fenômenos de distribuição de espécies que ocorrem no interior do capilar. Se forem considerados os efeitos difusionais sobre uma banda que se desloca com perfil gaussiano no interior de uma coluna, a distribuição da concentração ao longo da banda pode ser descrita como [72]:

$$c = \frac{m}{\sqrt{4\pi Dt}} e^{-\frac{x^2}{4Dt}} \quad \text{Equação 4}$$

onde c é a concentração, m é o número de mols por unidade de área transversal da coluna, t é o tempo, x é a distância ao longo da coluna a partir do centro da banda e D é o coeficiente de difusão.

No ponto de máximo da gaussiana, onde $x = 0$, a amplitude do sinal pode ser expressa por:

$$A = \frac{m}{\sqrt{4\pi Dt}} \quad \text{Equação 5}$$

onde A é a amplitude do sinal. A velocidade v da banda que migra no interior do capilar é:

$$v = \frac{d}{t} \quad \text{Equação 6}$$

onde d é a distância percorrida no tempo t . Assim, substituindo a equação 6 na equação 5 e redistribuindo tem-se:

$$A\sqrt{d} = \frac{m}{\sqrt{\frac{4\pi D}{v}}} \quad \text{Equação 7}$$

Considerando constantes a largura do pulso de aquecimento da TM, o eletrólito, o tamanho do capilar e o potencial de corrida, todos os parâmetros da porção direita da expressão da equação 7 também são constantes. Logo, se a

variação na intensidade da TM fosse devida somente ao efeito da difusão, o termo $A\sqrt{d}$ também seria constante.

Utilizando os mesmos dados da figura 15 é possível traçar um gráfico correlacionando $A\sqrt{d}$ em função da distância do marcador térmico (figura 16). O resultado é uma relação constante, do qual se conclui que o decréscimo na amplitude da TM em função da posição do marcador em relação ao detector pode ser atribuído somente à difusão.

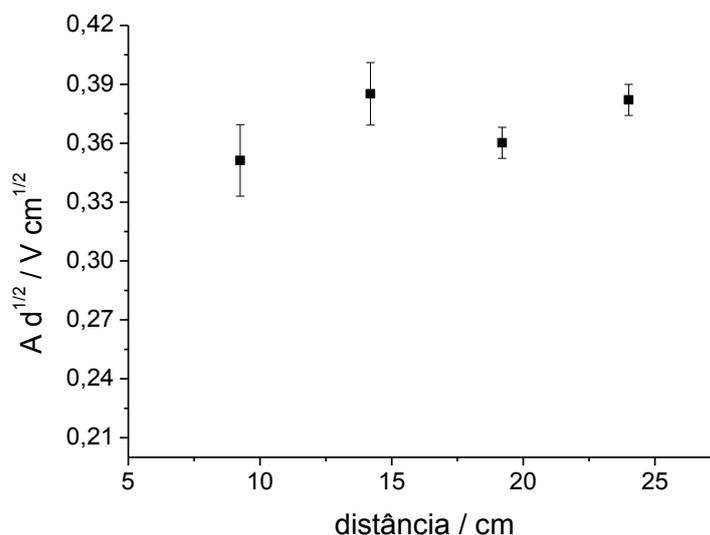


Figura 16. Intensidade da TM em função da distância do marcador térmico em relação ao ponto de detecção, para KCl 10 mmol L^{-1} como eletrólito de corrida. Marcador térmico: resistor SMD, largura do pulso: 200 ms. Condições – Potencial: 10 kV. Capilar: $75 \mu\text{m}$ d.i., 57,3 cm de comprimento total. Média e desvio padrão de 6 replicatas.

Então, se a TM não decorre de mudanças de propriedades físicas da solução devido ao aquecimento, qual a sua origem?

Hipótese 2:

A segunda hipótese levantada seria a formação de novas espécies provocada pelo aquecimento, as quais migrariam em direção ao detector. De fato, o

aquecimento da solução pode ocasionar reações químicas ou mesmo algum deslocamento químico que levariam à formação de novas espécies, aumentando ou diminuindo a concentração das espécies presentes no interior do capilar. No entanto, o surgimento de TMs em eletrólitos simples como NaCl ou KCl sugerem não ser esse o fenômeno preponderante na geração das TMs, uma vez que soluções desses sais não sofrem transformações químicas em temperaturas abaixo de seu ponto de ebulição. Entretanto, é importante salientar que, em alguns casos, o aquecimento pode ocasionar a formação de novas espécies que levaria ao surgimento de um comportamento anômalo ou de picos adicionais, embora não seja essa a causa principal da formação das TMs.

Hipótese 3:

Uma terceira hipótese considera que o aumento da temperatura ocasionaria alterações na viscosidade da solução, que acarretaria em mudança na mobilidade e, conseqüentemente, na velocidade das espécies. As espécies na região quente migrariam com uma velocidade diferente do restante da solução, criando uma zona com composição diferente que atuaria como um *plug* de amostra. Após resfriamento da solução, a viscosidade voltaria a ficar homogênea e as espécies retornariam ao seu comportamento inicial. O resultado seria uma zona com concentração diferente do restante da solução e, conseqüentemente, com condutividade diferente, que seria arrastada pelo EOF em direção ao detector. Essa terceira hipótese é avaliada a seguir.

O campo elétrico dentro do capilar é dado por $E = \frac{dV}{dx}$, onde V é o potencial de corrida e x a posição ao longo do capilar. Através da lei de Ohm e considerando

que a corrente se mantém constante ao longo da corrida, o campo elétrico pode ser expresso como:

$$E = I \frac{dR}{dx} = \frac{I}{ka} = \frac{J}{k} \quad \text{Equação 8}$$

onde I é a corrente, R e κ são a resistência e a condutividade da solução, respectivamente, a é a área da secção transversal do capilar e J , a densidade de corrente.

A condutividade é a soma da contribuição de todas as espécies portadoras de carga:

$$k = \sum_j \lambda_j c_j \quad \text{Equação 9}$$

onde c_j é a concentração da espécie j e λ_j é a sua condutividade molar, expressa por:

$$\lambda_j = z_j \mu_j F \quad \text{Equação 10}$$

onde F é a constante de Faraday e z_j e μ_j correspondem à carga e a mobilidade, respectivamente, da espécie j .

A mobilidade de uma espécie j esférica de raio r_j , maior que as moléculas do solvente, num solvente de viscosidade η pode ser obtida através da relação de Stokes:

$$\mu_j = \frac{e}{6\pi} \cdot \frac{1}{\eta} \cdot \frac{z_j}{r_j} \quad \text{Equação 11}$$

onde e é a carga elementar. Através dessa equação, é possível observar que, de fato, a mobilidade das espécies depende da viscosidade do meio. Entretanto, substituindo as equações 9, 10 e 11 na equação 8, é possível reescrever o campo elétrico da seguinte forma:

$$E = \eta J \frac{6\pi}{eF} \left(\sum_j \frac{z_j^2 c_j}{r_j} \right)^{-1} \quad \text{Equação 12}$$

Se levarmos em conta que a velocidade de uma espécie s é o produto de sua mobilidade (equação 11) pelo campo elétrico (equação 12), a espécie irá migrar com velocidade igual a:

$$v_s = \frac{Jz_s}{Fr_s} \left(\sum_j \frac{z_j^2 c_j}{r_j} \right)^{-1} \quad \text{Equação 13}$$

Dessa equação, é possível perceber que a velocidade da espécie não depende da viscosidade da solução, uma vez que o aumento da mobilidade e a redução do campo elétrico ocorrem na mesma proporção. Então, essa equação mostra que, embora a dependência da viscosidade com a temperatura seja significativa na mobilidade das espécies na região aquecida, ela não explica o fenômeno das TMs.

Hipótese 4:

A partir da equação 13, é possível elaborar uma outra hipótese similar à anterior, porém considerando o efeito da temperatura sobre o raio das espécies (r_s).

Se o raio hidrodinâmico variar com a mudança de temperatura diferentemente para cada espécie, então suas velocidades na região aquecida serão diferentes. Essa região iria se comportar, então, como um *plug* com composição diferente do restante da solução. Novamente, após o resfriamento da solução, as espécies teriam sua mobilidade restaurada, mas uma marca permanente (alteração na concentração do eletrólito) seria criada.

A equação 13 pode ser reescrita da seguinte forma:

$$v_s = \frac{J}{F} \frac{\mu_s}{\sum_j z_j c_j \mu_j} \quad \text{Equação 14}$$

Para um eletrólito composto por um cátion e um ânion univalentes, essa equação pode ser escrita como:

$$v_s = \frac{J}{Fc} \frac{\mu_s}{\sum_j \mu_j} = \frac{J}{Fc} \frac{\lambda_s}{\sum_j \lambda_j} = \frac{J}{Fc} t_s \quad \text{Equação 15}$$

onde c é a concentração do eletrólito e t_s o número de transporte da espécie s .

O número de transporte pode ser calculado através de valores de condutância molar. A figura 17 mostra o número de transporte de Na^+ e K^+ em soluções de NaCl e KCl 10 mmol L^{-1} em função da temperatura. De fato, essas curvas sugerem que a mobilidade dos íons quentes varia diferentemente com a temperatura. Além disso, elas sugerem que o sódio quente (aqui denominado como $^*\text{Na}^+$) se torna relativamente mais rápido que o cloreto quente ($^*\text{Cl}^-$), enquanto que o contrário ocorre com o potássio quente ($^*\text{K}^+$). Se essa afirmação for válida, $^*\text{Na}^+$ migraria mais

rápido que o Cl^- durante o processo de aquecimento. Após resfriamento, o efeito global seria a formação de uma zona concentrada seguida de outra diluída, que seriam detectadas como sinais com formato de pico-vale. Já para uma solução de KCl, seria esperado um perfil de vale-pico. Ambas as previsões são suportadas pelos resultados de eletroferogramas de soluções de KCl e NaCl mostrados na figura 14, corroborando esta hipótese.

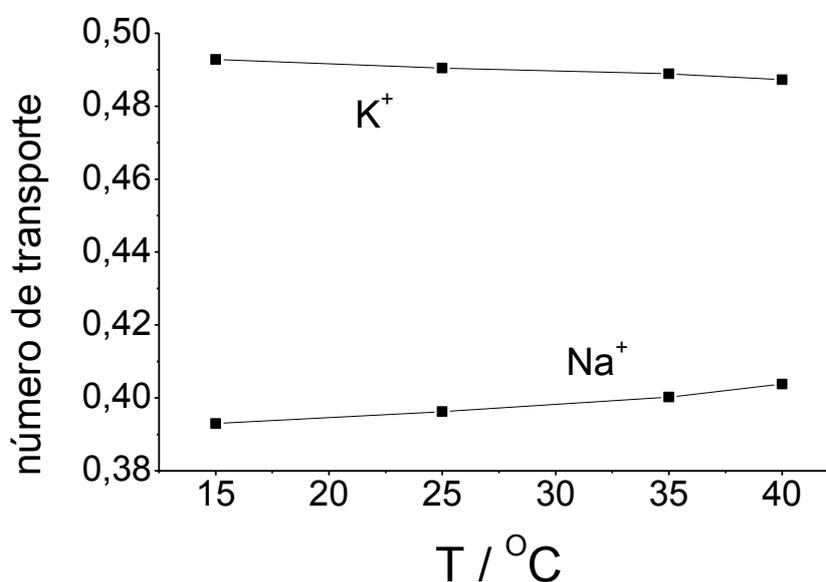


Figura 17. Número de transporte para Na^+ e K^+ em soluções de NaCl e KCl 10 mmol L^{-1} , respectivamente, em função da temperatura (calculados com base nos dados da ref. [73])

Erdey-Gruz discute a relação do raio iônico hidratado de íons pequenos com a mobilidade iônica limite [74]. De fato, a mobilidade iônica limite de todas as espécies aumenta com o aumento da temperatura. Entretanto, a intensidade dessa variação não é igual para todas as espécies, como mostra a figura 17. Segundo a Lei de Stokes (equação 11), a relação $\mu^0 \eta$ é independente da temperatura. Então:

$$\mu^0 \eta = cte$$

onde μ^0 é a mobilidade iônica limite. Essa relação é chamada de produto de Walden e tem validade somente para íons grandes, os quais não têm seus raios de hidratação alterados com a temperatura.

Íons migram com suas esferas de hidratação. Com o aumento da temperatura, o raio de hidratação tende a diminuir devido à perda das moléculas do solvente, então o produto de Walden deveria aumentar. Entretanto, não é isso que se observa para grande parte dos íons, conforme mostra a figura 18. Na verdade, o produto de Walden decresce para a maioria das espécies. Esse fato leva a crer que o fenômeno é mais complexo e que as variações nas mobilidades iônicas das espécies não estão relacionadas somente com o tamanho dos raios de hidratação das espécies, mas também envolve modificações nas estruturas de agregação das moléculas do solvente com o íon e a forma como essa estrutura se comporta sob ação do campo elétrico. De qualquer forma, segundo o modelo proposto, as TMs seriam geradas por alterações no número de transporte das espécies componentes do eletrólito de corrida.

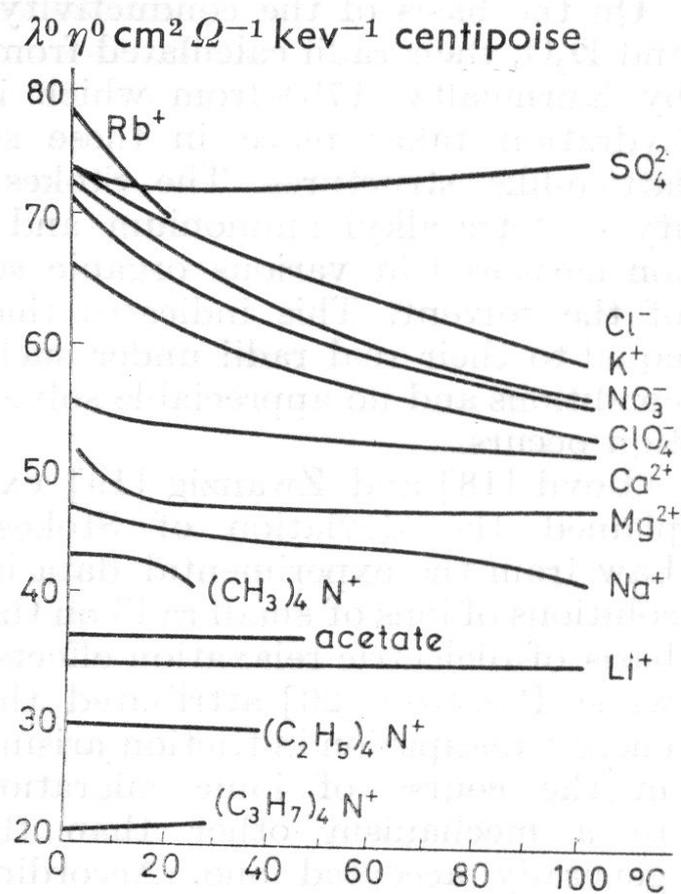


Figura 18. Variação do produto de Walden com a temperatura para alguns íons. Reproduzido da referência [74].

4.3.2. Avaliação do modelo

Simulação computacional

Utilizando o software Simul 5.0, foram realizados alguns experimentos de simulação computacional. Soluções de KCl e NaCl 10 mmol L⁻¹ foram tomadas como exemplo. Os valores iniciais de mobilidade para K⁺, Na⁺ e Cl⁻ a 25 °C foram retirados da literatura [75].

Como condição inicial, foi considerado o capilar preenchido com uma das soluções (KCl ou NaCl) e um *plug* de injeção simulando a região de aquecimento pela marcação térmica contendo as mesmas espécies, porém com mobilidades mais

altas. Para o KCl, considerou-se um aumento de 40% na mobilidade do potássio e de 60% para o cloreto. Para o NaCl, considerou-se o oposto: aumento de 60% na mobilidade do cátion e de 40% na do ânion.

A simulação se iniciou com a aplicação de um campo elétrico de 200 V cm^{-1} durante 100 ms. Após esse período, ela foi interrompida. O cátion e o ânion do *plug* de injeção tiveram suas mobilidades restauradas para seu valor a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, igual ao restante da solução. A simulação foi retomada com aplicação do mesmo campo elétrico por mais 1 s. O resultado final é mostrado na figura 19, onde se podem observar os sinais transientes em formato de pico-vale ou vale-pico nos eletroferogramas simulados. É importante ressaltar que esses gráficos têm domínio no espaço, ou seja, refletem a condutividade em função da posição do capilar, e que o ponto de detecção encontra-se em 20 cm. Assim, como o EOF está se movendo na direção do detector, o registro do eletroferograma em função do tempo seria o inverso do observado, ou seja, para o KCl seria observado um perfil de vale-pico e para o NaCl, pico-vale. De fato, esses são os formatos de picos esperados quando comparados com os eletroferogramas obtidos experimentalmente (figura 14). Esses resultados corroboram, assim, com a hipótese de que as TMs surgem de uma mudança temporária nas mobilidades relativas de cátions e ânions.

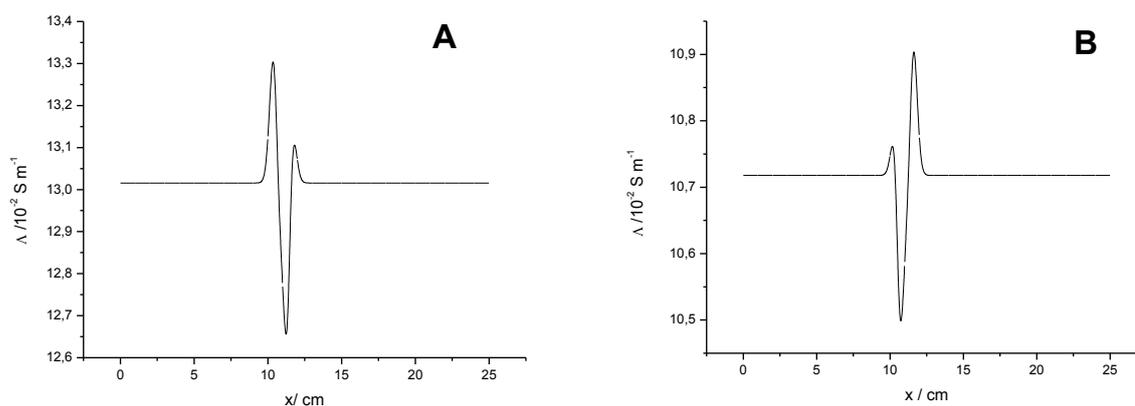


Figura 19. Eletroferogramas de TMs em 10 mmol L^{-1} de (A) KCl e (B) NaCl obtidos através de simulação computacional, em função da posição do capilar.

Número de transporte

O modelo adotado para a geração das TMs considera que as TM surgem de uma alteração diferenciada no número de transporte das espécies causada pela combinação do aquecimento com o efeito do campo elétrico. Assim, confrontar os valores de variação do número de transporte de algumas espécies com o perfil de suas respectivas TMs seria de suma importância para corroborar o modelo. Entretanto, esses dados são escassos na literatura e, portanto, foram efetuados alguns experimentos com o intuito de sua obtenção.

Um dos desafios para realizar esse experimento em um equipamento de eletroforese capilar convencional é a presença do EOF, que adiciona um componente a mais na velocidade das espécies. Sendo assim, foram adotadas três estratégias para contornar esse problema: (i) eliminação do EOF utilizando HEC, (ii) eliminação do EOF utilizando capilar revestido e (ii) medida do EOF utilizando TMs. Além disso, é necessária aplicação de um campo elétrico não muito elevado, para

evitar o aumento da temperatura da solução por ação do efeito Joule e também a mudança do pH das soluções pela eletrólise.

A figura 20 mostra um perfil típico registrado pelo detector condutométrico sem contato para o experimento do método da fronteira móvel, onde se observa o primeiro patamar, com linha base mais elevada, relativa à solução de maior condutividade, seguida por uma queda da linha base, levando a um segundo patamar relativo à solução de menor condutividade.

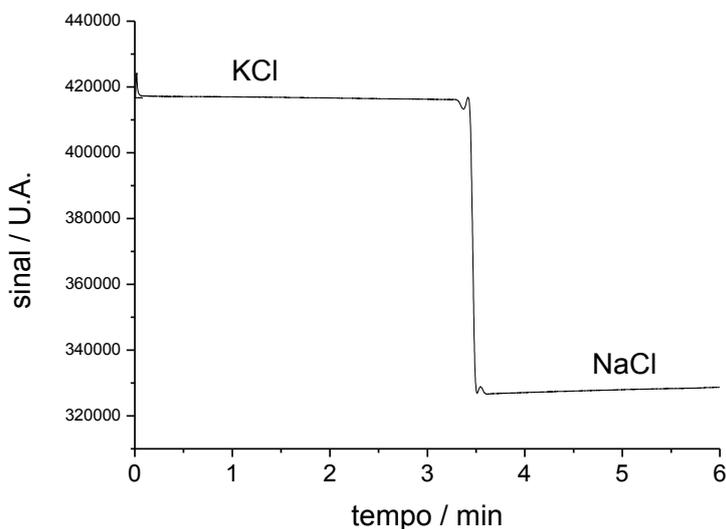


Figura 20. Eletroferograma da fronteira móvel entre soluções 10 mmol L^{-1} de KCl e NaCl. Corrente: $10 \mu\text{A}$.

Inicialmente, foram utilizadas soluções contendo HEC para eliminar o EOF. A figura 21 mostra dois resultados calculados para o número de transporte de K^+ (KCl) obtidos em dois dias diferentes para o mesmo experimento. É possível observar nesses gráficos que a tendência de variação do número de transporte para o K^+ foi diferente, embora o experimento tenha sido realizado de forma idêntica nos dois dias. Embora a utilização da HEC tenha reduzido de forma significativa a mobilidade do EOF, é possível que ele não tivesse sido completamente eliminado, podendo ter

influenciado nas medidas. Assim, as prováveis fontes de erro foram atribuídas a: (i) influência do EOF na medida da velocidade da espécie e (ii) não homogeneidade da temperatura ao longo do capilar.

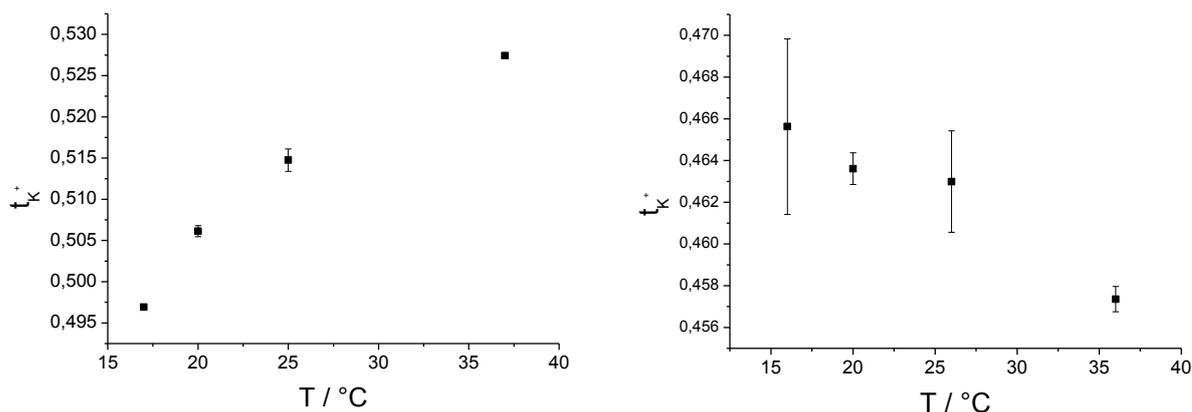


Figura 21. Número de transporte de K^+ (KCl) 10 mmol L^{-1} calculados em dois dias distintos para várias temperaturas. Média e desvio padrão de duplicatas.

Os experimentos utilizando capilar revestido apresentaram resultados semelhantes aos anteriores com HEC, provavelmente devido aos mesmos problemas do EOF.

Assim, as TMs foram utilizadas na medida do EOF no intuito de considerar a sua velocidade no cálculo do número de transporte. Utilizando as TMs para monitorar o EOF, o número de transporte da espécie de interesse pode ser obtido da seguinte forma: o volume percorrido pela espécie pode ser escrito como:

$$V = v_A t A$$

Equação 17

onde v_A é a velocidade da espécie, t o tempo que leva para ela percorrer o volume V e A é a área da secção transversal do capilar.

Substituindo-se a equação 17 na equação 3, que descreve o número de transporte no método da fronteira móvel, é possível reescrevê-la da seguinte forma:

$$t_A = \frac{v_A t A c F}{\int i dt} \quad \text{Equação 18}$$

A velocidade de uma espécie na presença do EOF é:

$$v = \frac{\Delta x}{t} = v_A + v_{EOF} \quad \text{Equação 19}$$

onde Δx é a distância percorrida. Substituindo a equação 19 na equação 18, é possível obter o número de transporte da espécie A na presença do EOF:

$$t_A = \frac{(\Delta x - v_{EOF} t) A c F}{\int i dt} = \frac{(\Delta x - \mu_{EOF} E t) A c F}{\int i dt} \quad \text{Equação 20}$$

Utilizando a equação 20, foi possível calcular o número de transporte de K^+ e Na^+ em soluções de KCl e NaCl, respectivamente. Os gráficos da figura 22 mostram os resultados de número de transporte obtidos para essas espécies em diferentes temperaturas. Esses resultados não mostram a mesma tendência encontrada em dados da literatura (figura 17). As prováveis fontes de erro atribuídas a essa divergência são: (i) não homogeneidade da temperatura ao longo do capilar e (ii) alargamento da fronteira.

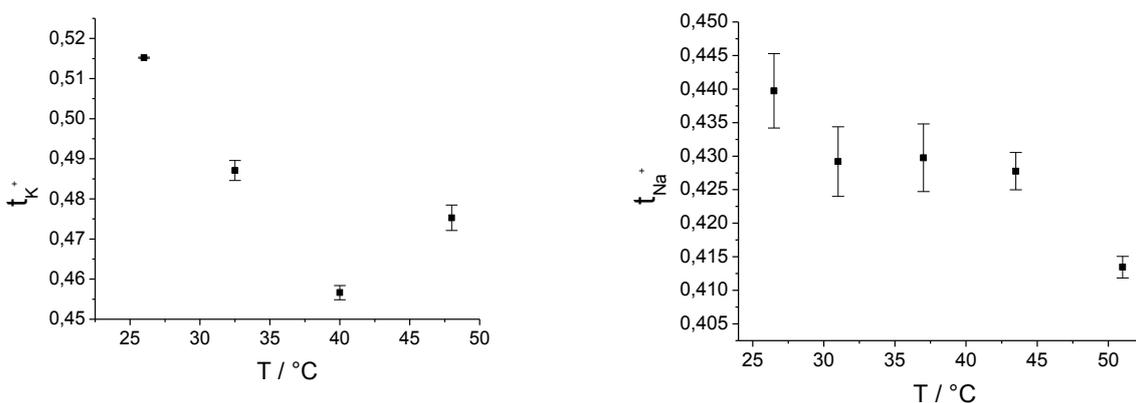


Figura 22. Número de transporte de K^+ (KCl 10 mmol L^{-1}) e Na^+ (NaCl 10 mmol L^{-1}) em função da temperatura, considerando o efeito do EOF.

Assim, a obtenção de número de transporte de diversas espécies que pudessem corroborar com o modelo de geração das TMs proposta não foi possível, provavelmente por uma limitação instrumental, já que estratégias para eliminação do EOF não foram bem sucedidas.

4.3.3. Mobilidade da TM

Conforme explicado anteriormente, adotando o modelo proposto, a TM decorre da formação de fronteiras de concentração causadas pela mudança de temperatura localizada em um determinado ponto do capilar, sob a ação de um campo elétrico. Esse fato sugere que, como não há formação de espécies carregadas adicionais, a fronteira caminha com a mesma mobilidade do EOF. No entanto, as perturbações na concentração do eletrólito de corrida gerada pelo marcador térmico, bem como aquelas causadas por qualquer outro tipo ocasionado por injeção de uma amostra, leva à formação de zonas que se propagam pelo capilar com mobilidade própria. Essas zonas, chamadas de picos de sistemas, foram assunto de um trabalho de revisão de Kenndler e Gaš [76], que mostraram

experimentalmente que o pico da água e o sinal de um marcador neutro possuem mobilidades distintas.

Evidências experimentais sugerem que as diferenças de concentrações causadas pela TM são bastante tênues. Uma calibração do detector com soluções de KCl 10,0 mmol L⁻¹ e 10,1 mmol L⁻¹, mostrou que a amplitude da TM pode ser expressa como da ordem de 0,4 mmol L⁻¹, para um marcador baseado em filamento. Stockmayer propôs uma equação que descreve a velocidade de uma fronteira entre duas soluções de diferentes composições sob a ação de um campo elétrico [77]:

$$v_b = \frac{J(t_1 - t_2)}{F(c_1 - c_2)} \quad \text{Equação 21}$$

onde J é a densidade de corrente, F a constante de Faraday, t o número de transporte, c a concentração e os índices 1 e 2 referem-se às duas faces da fronteira.

Essa equação mostra que, durante uma corrida eletroforética, a velocidade da fronteira será zero somente se t_1 e t_2 forem iguais. No que tange a presente discussão, é de interesse o caso particular da equação 21 para a velocidade limite da fronteira na presença de diferenças de concentração bastante reduzidas, uma vez que evidências experimentais sugerem que a variação de concentração induzida pelo aquecimento durante a marcação térmica é pequena.

O número de transporte de uma espécie pode ser definido como a fração da condutância de determinada espécie sobre a soma de condutância de todas as espécies portadoras de carga da solução (equação 22):

$$t_+ = \frac{\lambda_+}{\lambda_+ + \lambda_-} \quad \text{Equação 22}$$

No caso de íons monovalentes, a condutância de uma espécie pode ser expressa em função da sua condutividade molar à diluição infinita, acrescido da contribuição do produto da concentração por uma constante α (Lei de Kohlrausch):

$$\lambda = \lambda^0 - \alpha\sqrt{c} \quad \text{Equação 23}$$

onde λ_0 é a condutância limite e α é uma constante que depende da espécie, temperatura e propriedades do solvente.

Substituindo a equação 23 na equação 22, é possível escrever a velocidade limite da fronteira como:

$$\lim_{\Delta c \rightarrow 0} v_b = v_0 = \frac{J}{F} \frac{dt}{dc} = \frac{J}{2F} \frac{(\lambda_+^0 \alpha_- - \lambda_-^0 \alpha_+)}{(\lambda_+^0 + \lambda_-^0 - (\alpha_+ + \alpha_-)\sqrt{c})^2 \sqrt{c}} \quad \text{Equação 24}$$

onde os sinais + e - se referem às propriedades do cátion e do ânion, respectivamente.

Substituindo J pelo valor do campo elétrico dado pela equação 8, é possível obter uma forma mais conveniente dessa equação:

$$v_0 = \frac{E}{2F} \frac{(\lambda_+^0 \alpha_- - \lambda_-^0 \alpha_+) \sqrt{c}}{(\lambda_+^0 + \lambda_-^0 - (\alpha_+ + \alpha_-)\sqrt{c})} \quad \text{Equação 25}$$

Sabendo que a velocidade de uma espécie é o produto da mobilidade pelo campo elétrico, a equação 25 permite então definir a mobilidade da fronteira como:

$$\mu_0 = \frac{(\lambda_+^0 \alpha_- - \lambda_-^0 \alpha_+) \sqrt{c}}{2F(\lambda_+^0 + \lambda_-^0 - (\alpha_+ + \alpha_-) \sqrt{c})} \quad \text{Equação 26}$$

onde μ_0 é a mobilidade limite, λ a condutância molar, α é um coeficiente que depende da espécie, temperatura e do solvente.

É importante salientar que essa mobilidade é somada vetorialmente à mobilidade do EOF. Então, para que a TM tivesse a mesma mobilidade do EOF, a mobilidade expressa pela equação 26 acima deveria ser nula. Analisando essa expressão, conclui-se que a mobilidade seria nula se: (i) a concentração fosse zero ou (ii) o numerador dessa expressão fosse zero. Em termos práticos, somente a segunda condição é possível.

De acordo com a equação de Onsager, o coeficiente α pode também ser expresso em função da condutância limite. Então, a mobilidade será zero quando:

$$\frac{A + B\lambda_+^0}{\lambda_+^0} = \frac{A + B\lambda_-^0}{\lambda_-^0} \quad \text{Equação 27}$$

onde A e B são coeficientes que não dependem da espécie, apenas das propriedades do solvente, e o numerador é diretamente proporcional a α .

Logo, a fronteira terá mobilidade nula se as condutâncias molares dos íons forem iguais. Dessa forma, a TM fornecerá um valor de EOF confiável se as zonas tiverem concentrações semelhantes e se os íons tiverem condutâncias molares próximas.

Foi feita uma calibração do detector com soluções de KCl 10,0 e 10,1 mmol L⁻¹, que mostrou que as diferenças de concentrações geradas pela TM são bastante pequenas. Utilizando o marcador baseado em filamento, a amplitude

da TM pode ser expressa como da ordem de $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$. Além disso, a mobilidade da TM calculada através da equação 26 foi de $-6,5 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, que introduziria um erro sistemático menor que -0.7% para um EOF com mobilidade maior que $10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Na prática, a mobilidade da TM, bem como a de qualquer espécie, pode ser calculada utilizando parâmetros experimentais e o tempo de migração obtido através do eletroferograma, através da seguinte equação:

$$\mu = \frac{lL}{tV} \quad \text{Equação 28}$$

onde l é a distância do marcador térmico (ou do ponto de injeção) até o detector, L é o comprimento total do capilar, t é o tempo de migração da espécie ou da TM e V é o potencial de corrida.

Muitas vezes, estabelecer o ponto exato de detecção é tarefa difícil. Para isso, implementou-se um marcador térmico duplo, que consiste em posicionar dois marcadores ao longo do capilar, em distâncias conhecidas, e acioná-los simultaneamente. Dessa forma, podem ser observadas duas TMs no eletroferograma e a mobilidade pode ser calculada da seguinte forma:

$$\mu_{TM} = \frac{dL}{t_{TM}V} \quad \text{Equação 29}$$

onde d é a distância entre os dois marcadores e t_{TM} é a variação de tempo entre as duas TMs, tomando-se os mesmos pontos (vale e vale, por exemplo).

Em alguns sistemas químicos podem surgir picos adicionais que não possuem mobilidade próxima à do EOF. Isso pode acontecer quando se trabalha

com eletrólitos com composição complexa. Um exemplo é o tampão MES/His com CTAB (figura 13-e), onde se pode observar um pico mais rápido que o EOF, referente à presença de um segundo ânion em menor concentração: no caso, o brometo. Mesmo em eletrólitos com composição simples é observado este fenômeno. Por exemplo, TMs em solução de KCl (pH 4,0) apresentam um pico de alta mobilidade, relacionado ao H_3O^+ (figura 13-f). Como se pode ver na figura 14-b, o mesmo não pode ser observado em pH 7,0. Esses picos estão diretamente relacionados com os chamados picos de sistema [65, 66].

A mobilidade do pico da água e da TM foram comparadas em eletrólito de corrida $NaHCO_3$ 10 mmol L^{-1} . As mobilidades calculadas dos picos obtidos através da injeção de um *plug* d'água e utilizando as TMs são mostradas na tabela 2, onde se observa uma diferença menor que 0,1% entre os dois valores.

Tabela 2. Mobilidades estimadas para o EOF em solução de $NaHCO_3$ 10 mmol L^{-1} calculadas utilizando diferentes estratégias, a $25\text{ }^\circ\text{C}$.

Estratégia	$\mu^{\#}$ ($10^5\text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$)
TM	67,5 (0,2)
Injeção de <i>plug</i> d'água	67,4 (0,3)

[#]média e desvio padrão de quadruplicatas

4.3.4. Dependência da intensidade da TM com o campo elétrico

O modelo proposto para a geração das TMs sugere uma dependência da amplitude da TM com a corrente e, conseqüentemente, com o campo elétrico aplicado durante a sua formação (equação 15). Essa dependência surge do fato de que quanto maior a diferença nas velocidades do Na^+ e Na^+ , maior a acumulação de espécies na região frontal. Assim, em condições extremas, na qual o campo elétrico é nulo, nenhuma TM seria gerada.

Dessa forma, foi executada uma série de corridas eletroforéticas obtidas após a geração da TM sob diferentes valores de campo elétrico, mantendo o campo elétrico para migração das marcas até o detector constante. Os resultados desse experimento encontram-se na figura 23 e mostram que, de fato, a amplitude da TM depende do campo elétrico aplicado durante o aquecimento. Além disso, a curva mostra duas regiões distintas: uma para campo elétrico baixo, que mostra o aumento do sinal em função do aumento do campo elétrico, que é coerente com o modelo proposto, e outra para campo elétrico mais elevado, que sugere saturação. Uma hipótese que justificaria essa região saturada seria a difusão longitudinal agindo contra a tendência de formação de uma região em que as diferenças de concentração seriam cada vez mais acentuadas.

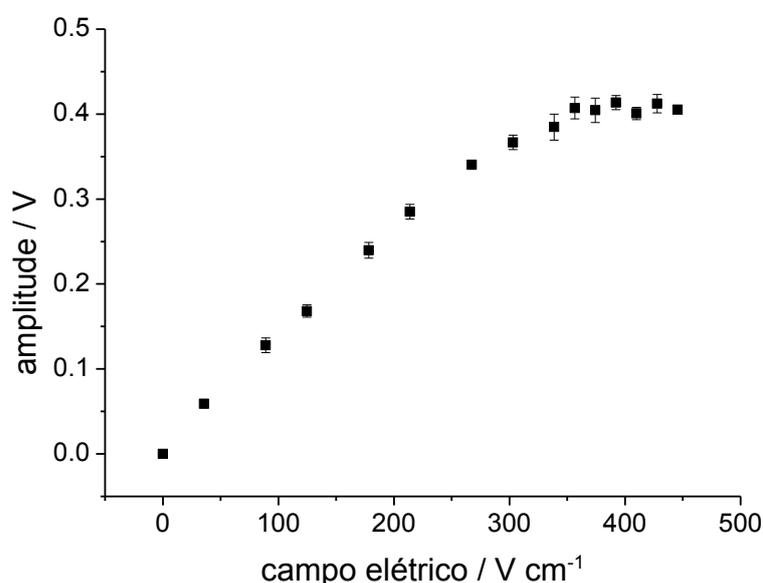


Figura 23. Variação da amplitude da TM com o campo elétrico aplicado durante o aquecimento. Após geração das TMs, o campo elétrico foi mantido constante em 178 V s^{-1} .

A variação da amplitude da TM também foi avaliada mudando-se também o campo elétrico durante o processo de migração da mesma até o detector. Esse resultado é mostrado na figura 24, que mostra a mesma tendência para a

dependência da intensidade do sinal com o campo elétrico. Nesse experimento, para cada corrida, manteve-se o mesmo valor de campo elétrico para a geração das TMs e para a migração das mesmas até o detector.

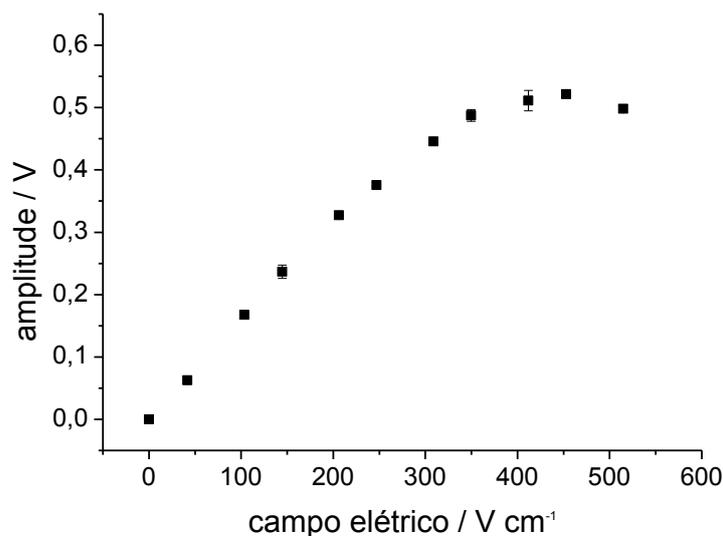


Figura 24. Variação da amplitude da TM com o campo elétrico aplicado durante o aquecimento. O campo elétrico aplicado durante a geração das TMs e para a migração dos picos até o detector foram iguais, variando de 0 a 514 V cm⁻¹.

4.3.5. Efeito do diâmetro do capilar na intensidade das TMs

Nessa etapa do trabalho estudou-se o efeito do diâmetro do capilar no perfil e na intensidade das TMs (figura 25). Não houve alteração no perfil (vale-pico ou pico-vale) das TMs, uma vez que sua natureza independe do volume de solução. Além disso, observou-se um aumento na intensidade do sinal das marcas em função do aumento do diâmetro do capilar devido ao aumento no volume de solução na região do detector em diâmetros maiores, ocasionando aumento na sensibilidade.

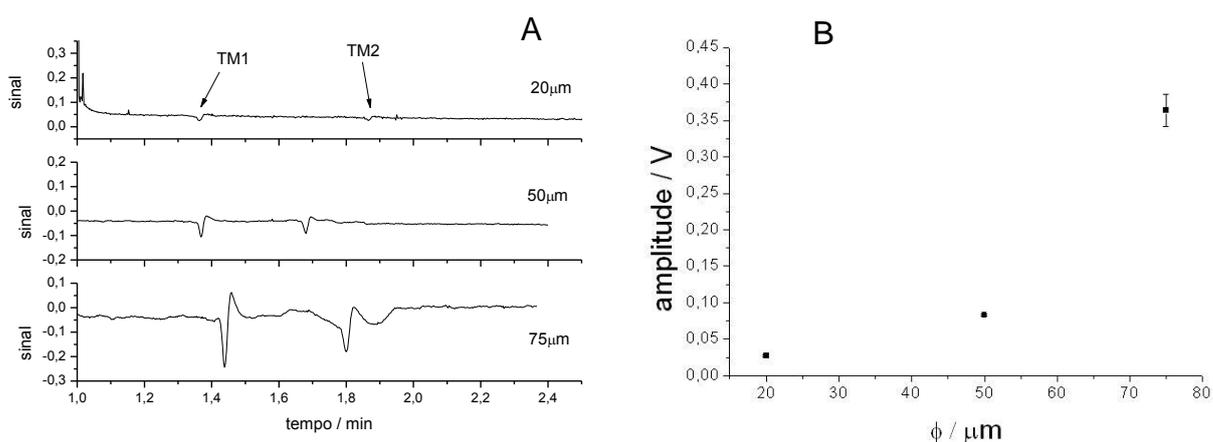


Figura 25. Eletroferogramas (A) e amplitude (B) da TM em capilares de 20 μm , 50 μm e 75 μm i.d. com 40 cm de comprimento. Condições experimentais: tampão MES/Na 20 mmol L^{-1} (pH 6,0), +20 kV, TM duplo baseado em resistor acionados com pulsos de 584 ms.

4.4. Conclusões Parciais

Devido à sua instrumentação simples, as TMs se mostraram como uma boa opção quando se deseja utilizar uma referência de tempo de migração nos eletroferogramas, podendo ser empregadas como uma espécie de padrão interno sem a necessidade de adição de um reagente. Assim como qualquer outra técnica que provoque uma perturbação que se propaga até o detector, as TM não possuem exatamente a mesma mobilidade do EOF, embora possam fornecer uma boa estimativa de seu valor. Entretanto, elas se revelaram bastante adequadas ao monitoramento do EOF, principalmente quando se deseja obter informações sobre o condicionamento do capilar. A boa correlação entre as mobilidades da TM e do EOF não pode ser generalizada. No entanto, nos casos em que as duas mobilidades sejam muito diferentes, ainda pode-se usá-la como padrão interno na correção de mobilidades aparentes de analitos.

Baseado nos perfis dos sinais e nos valores de número de transporte de algumas espécies, adotou-se como modelo que explicasse a causa do surgimento das TM aquele que considera que as marcas são decorrentes de uma alteração

diferenciada nos números de transporte de cátion e ânion presente na solução, decorrente do aquecimento aplicado sob a ação do campo elétrico.

Foi demonstrada que a perturbação na concentração da solução causada pelas marcações térmicas pode ser facilmente registrada pelo C⁴D. Entretanto, outros métodos de detecção que consigam registrar esse tipo de fenômeno possuem potencial de utilização, como, por exemplo, detecção indireta UV-Vis. Modos de detecção específicos diretos, como absorção na região UV-Vis ou fluorescência não poderiam ser empregados, pois, neste caso, o eletrólito de corrida não fornece sinal, logo, não seria possível observar as diferenças de concentrações produzidas pelas TMs.

Capítulo 5
Injeção Térmica

5. Injeção Térmica

5.1. Introdução

Neste capítulo é apresentada uma nova estratégia para realização de experimentos de eletroforese baseada em marcas térmicas, que foi denominada injeção térmica. Nela, o capilar é totalmente preenchido com a amostra, diluída no eletrólito de corrida, e a injeção ocorre através da geração de uma marca térmica. Além disso, também é mostrada uma estratégia de multiplexação baseada em um novo algoritmo. As técnicas multiplexadas empregam modelamentos matemáticos para decodificar sinais lidos simultaneamente, com o objetivo de se aumentar a relação sinal/ruído. Ou seja, em CE, uma série de picos referentes à injeção sequencial de uma mesma amostra é registrada de forma sobreposta e, através da aplicação de um algoritmo matemático, as informações são decodificadas, dando origem a um eletroferograma de uma única injeção com a relação sinal/ruído aumentada.

5.1.1. Sistemas de injeção em CE e μ CE

A injeção da amostra é uma etapa crítica nas análises por CE. A reprodutibilidade na área (ou altura) do pico reflete a precisão na técnica de injeção utilizada. As formas mais utilizadas de introdução de amostra são as injeções eletrocinética e hidrodinâmica. Na injeção eletrocinética, é aplicado um gradiente de potencial ao longo do capilar, por um determinado tempo. Na injeção hidrodinâmica, aplica-se um gradiente de pressão, que pode ser efetuado por pressurização ou vácuo de um dos reservatórios de solução ou por gravidade, no qual as duas

extremidades do capilar são colocadas em desnível e a amostra é introduzida por sifonamento [15].

Na injeção hidrodinâmica, um determinado volume com composição representativa da amostra é introduzido no capilar. O volume injetado é dependente da geometria do capilar, da viscosidade da amostra, do tempo de injeção e da pressão aplicada.

Na injeção eletrocinética, as espécies introduzidas são resultado da soma das mobilidades efetiva e eletrosmótica, portanto, é dependente da composição da solução, como força iônica e viscosidade. Dessa forma, nesse tipo de injeção, ocorre uma discriminação das espécies injetadas, pois as espécies mais rápidas são introduzidas em maior quantidade que as mais lentas. Assim, a injeção eletrocinética é geralmente utilizada quando há impossibilidade de se realizar a injeção hidrodinâmica, como, por exemplo, em eletroforese em gel [15]. Existem ainda relatadas na literatura algumas outras estratégias mais específicas de injeção. Na injeção opticamente ativada (*Optically Gated Injection*), o capilar é totalmente preenchido com uma amostra fluorescente, que é continuamente fotodegradada por um laser. No momento da injeção, cessa-se a incidência do laser por um curto período de tempo, criando uma região com composição diferente do restante da solução em que a amostra está presente [78, 79]. Outra modalidade de injeção, chamada de *Optically Gated Vacancy* (injeção por vacâncias opticamente ativada), é baseada na anteriormente descrita, porém somente na região de injeção a amostra é degradada. Isso gera uma vacância que migra em direção ao detector, originando picos referentes aos componentes da amostra [80].

Quando se trabalha com μ CE, a estratégia mais utilizada para introdução de amostra é a injeção eletrocinética. Embora sejam possíveis diversas configurações

de canais nesses tipos de dispositivos, costuma-se confeccioná-los em forma de cruz, um dos layouts mais simples, que é mostrado na figura 26, onde se podem observar dois canais, o de amostragem e o de separação. Para realizar a injeção, primeiramente a amostra é adicionada a um dos reservatórios e aplica-se uma diferença de potencial para que a amostra migre e preencha o canal de amostragem (canal 1 na figura 26). No momento que se deseja realizar a injeção propriamente dita, o campo elétrico na direção do canal de amostragem é cessado e aplica-se, agora, uma diferença de potencial na direção do canal de separação (canal 2 na figura 26). Entretanto, a contínua introdução de amostra para o canal de separação durante a análise devido à difusão (*leakage*), pode levar a problemas de instabilidade da linha base e redução da eficiência de separação [81] (figura 27).

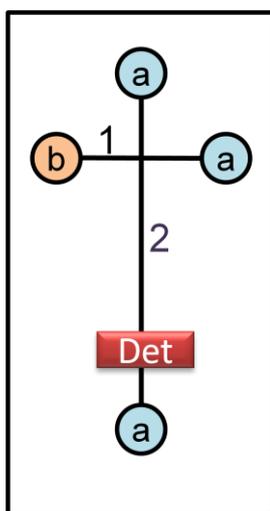


Figura 26. *Layout* em forma de cruz de um μ CE: 1 e 2 são os canais de injeção e separação, respectivamente; a e b são os reservatórios contendo eletrólito de corrida e amostra, respectivamente e Det simboliza o detector.

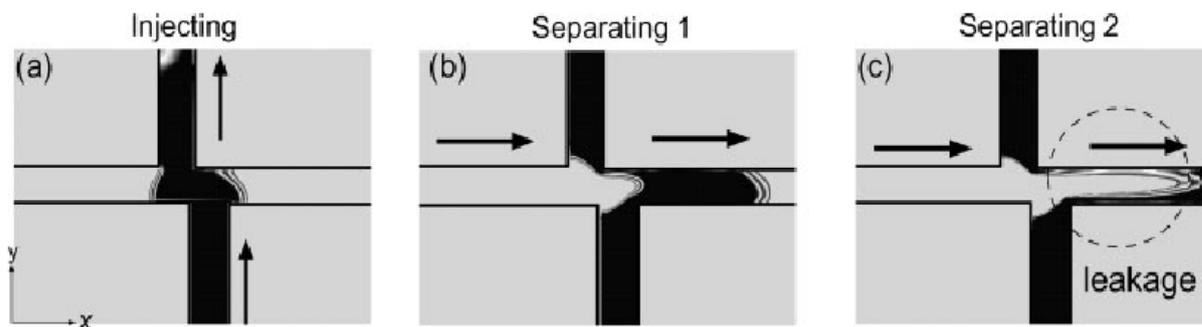


Figura 27. Difusão da amostra para o canal de separação em μ CE. Reproduzido da referência [81].

5.1.2. Multiplexação e Transformada de Hadamard

A eletroforese capilar possui diversas vantagens como alto poder de resolução e versatilidade, por exemplo. Entretanto, devido aos pequenos volumes de amostras injetados, muitas vezes ela ainda padece de baixos limites de detecção quando comparados às técnicas cromatográficas. Uma das formas de se aumentar a sensibilidade é empregando técnicas multiplexadas, que codificam sinais analíticos, em que diversos deles podem ser lidos simultaneamente. Empregando um modelamento matemático, os sinais são decodificados, obtendo-se aumento na relação sinal/ruído [82-92]. A Transformada de Fourier pode ser citada como um exemplo de multiplexação. Esse tipo de estratégia é comumente empregado em métodos espectroscópicos na análise de amostras muito diluídas. Nas técnicas de separação, as técnicas multiplexadas não costumam ser utilizadas com frequência, podendo ser citadas como exemplo a correlação cruzada [93-95], Transformada de Shah [84, 90-92] e Transformada de Hadamard [83, 85-89].

A Transformada de Hadamard é uma técnica baseada na Transformada de Fourier, que foi desenvolvida inicialmente para ser aplicada às técnicas espectroscópicas, mas cuja adaptação permitiu sua utilização nas técnicas de separação. Enquanto a Transformada de Fourier é baseada em diversas funções

seno e cosseno, a Transformada de Hadamard emprega apenas funções de adição e multiplicação, tornando os cálculos matemáticos mais simples.

De forma simplificada, a Transformada de Hadamard aplicada à eletroforese capilar é composta pelas seguintes etapas: (i) é efetuada uma série de injeções seguidas da mesma amostra, gerando um eletroferograma único contendo os diversos picos sobrepostos correspondentes aos sinais analíticos codificados; (ii) é aplicado um modelamento matemático capaz de decodificar essas informações em um eletroferograma de uma única injeção. Como as injeções devem ser realizadas sequencialmente, é necessário o emprego de uma técnica de injeção específica, que permita que as diversas injeções sejam realizadas continuamente sem que a corrida seja interrompida. Assim, a maior parte dos trabalhos relatados na literatura emprega a injeção opticamente ativada, que é melhor explicada na seção 5.1.1.

Na Transformada de Hadamard, um dos elementos principais é o vetor de injeção, que é composto somente pelos elementos 0 e 1, e que indica uma sequência pseudo-aleatória de injeção. Na prática, o vetor de injeção funciona da seguinte forma: supondo um intervalo entre injeções de z segundos, a cada z segundos é lido um elemento desse vetor de injeção, sendo que se o elemento da matriz de injeção for 1, a amostra é injetada no capilar e se ele for 0, a amostra não é injetada. A partir do vetor de injeção, é obtida uma matriz de decodificação $[S]$, que é uma matriz cíclica, onde sua primeira coluna é o vetor de injeção, a segunda coluna é o mesmo vetor deslocado de uma linha e cujo último elemento é inserido na primeira linha da matriz e assim sucessivamente, até que se obtenha uma matriz quadrada.

A figura 28 mostra um esquema de como funciona a Transformada de Hadamard. Nela, $[y]$ representa o conjunto de dados do eletroferograma

experimental, com os vários picos sobrepostos resultantes das múltiplas injeções, [S] é a matriz de injeções e [x] é o conjunto de dados do eletroferograma decodificado correspondente a uma única injeção, ou seja, o objetivo final do modelamento. Nesse esquema, o retângulo em vermelho indica que somente a parte central do eletroferograma experimental é modelada.

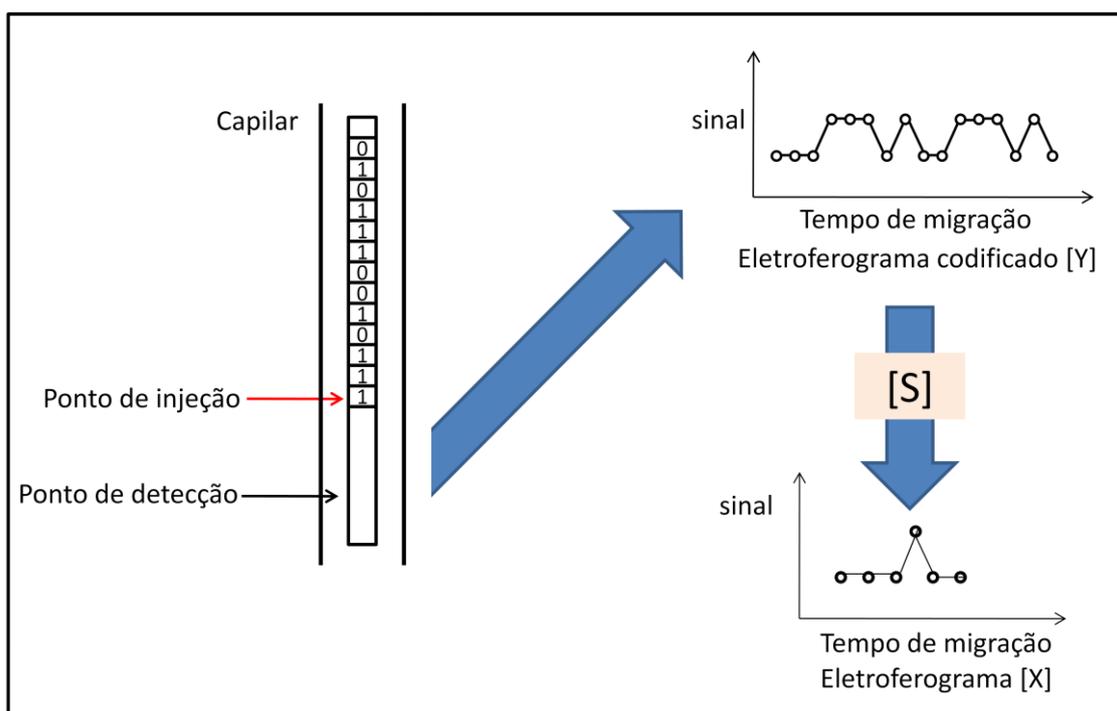


Figura 28. Esquema do modelamento matemático da Transformada de Hadamard. (Adaptado da referência [82])

O seguinte modelamento matemático é então aplicado:

$$[y] = [S] \cdot [x]$$

Equação 30

Multiplicando ambos os lados da equação pela matriz inversa de [S], a matriz que exprime o conjunto de dados do eletroferograma modelado pode ser expressa como:

$$[x] = [S]^{-1} \cdot [y]$$

Equação 31

O aumento da relação sinal/ruído (S/R) pode ser expresso, então, em função do número de injeções n , sendo que quanto maior o número de injeções, maior o aumento na relação [82]:

$$\frac{S}{R} = \frac{\left(\frac{n+1}{2}\right) + 1}{2\sqrt{\left(\frac{n+1}{2}\right)}}$$

Equação 32

Assim, como vantagens das estratégias de multiplexação, há a possibilidade de análises de espécies em baixas concentrações, além da diminuição de problemas de linha base ruidosa, ambas decorrentes do aumento da relação sinal/ruído que essas estratégias proporcionam. Entretanto, como desvantagem, pode-se citar a maior complexidade no processo e no tempo de análise, além de requerer um método de injeção específico.

5.1.3. Injeção térmica e injeção térmica multiplexada

No capítulo 4 foi demonstrado que, em amostras com composição complexa, pode surgir mais de um sinal oriundo de apenas uma marcação térmica. Por exemplo, utilizando como eletrólito de corrida solução de KCl em pH 4, observa-se o surgimento de dois sinais, um com mobilidade próxima à do EOF e outro com mobilidade próxima à do H^+ (figura 13-f). Assim, de uma forma genérica, pode-se dizer que, na análise de cátions, por exemplo, se o eletrólito de corrida contém n espécies catiônicas ($n > 1$), a cada marcação térmica serão gerados $n-1$ sinais

transientes com mobilidade próxima a dos cátions minoritários e um único sinal com mobilidade aproximadamente igual à do EOF [96].

A figura 29 exemplifica essa regra, onde se observam quatro TMs em tampão MES/His 10 mmol L⁻¹ (pH 6,0) contendo NaCl, KCl e LiCl 333 μmol L⁻¹ cada. Nesse exemplo, os sinais referentes ao K⁺, Na⁺ e Li⁺ podem ser identificados, além do sinal com mobilidade do EOF. Como a histidina é o cátion majoritário, não se observa sinal referente a essa espécie.

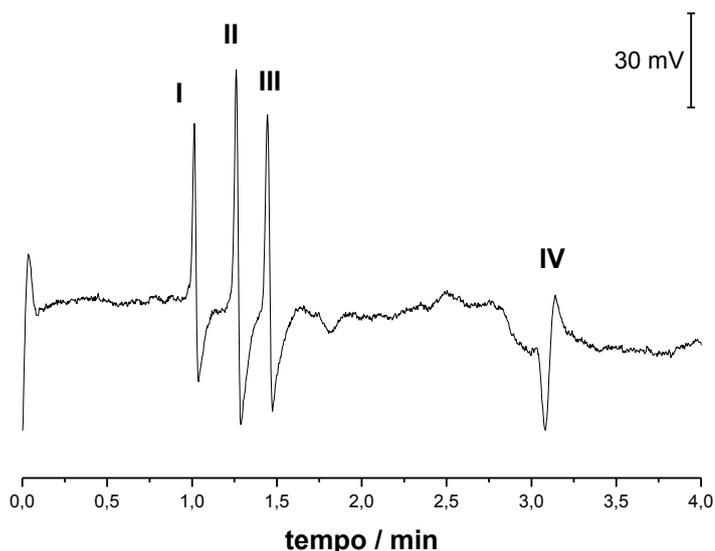


Figura 29. Eletroferograma de TMs em tampão MES/His 10 mmol L⁻¹ (pH 6,0) contendo NaCl, KCl e LiCl 333 μmol L⁻¹ cada. Marcador térmico: filamento de tungstênio; 500 ms de largura de pulso após 5 s do início da corrida. Potencial de corrida: +10 kV. Capilar: sílica fundida, 75 μm d.i., 59,3 cm de comprimento. Distância do marcador térmico até o detector: 10,5 cm. TMs: (I) K⁺, (II) Na⁺, (III) Li⁺ e (IV) EOF.

Tomando essa propriedade como base, surgiu a ideia de utilizar as marcações térmicas como forma de gerar sinais das espécies presentes em uma solução, ou seja, de efetuar uma forma de injeção. Esse novo sistema foi denominado injeção térmica. Nele, a rigor, não existe a injeção da amostra. O capilar é preenchido com a própria amostra diluída no eletrólito de corrida e, durante a

aplicação do potencial de separação, geram-se pequenos pulsos de aquecimento. Esse aumento da temperatura localizado ocasiona perturbações na concentração da solução que preenche o capilar, gerando vacâncias referentes a cada um dos analitos, que migram em direção ao detector.

Mikkers [97] estudou separações eletroforéticas por vacâncias. Nessa modalidade, o capilar é preenchido com a amostra e uma vacância é gerada através da injeção de um pequeno *plug* do eletrólito de corrida, que não contém nenhum dos analitos. Os eletroferogramas resultantes contêm picos negativos, que são os picos das vacâncias, que migram com a mesma mobilidade das espécies que compõem a amostra.

Gilman e colaboradores [80] propuseram um sistema de separação eletroforética por vacâncias com injeção opticamente ativada para dispositivos microfluídicos. Nesse caso, o canal de separação é preenchido com a solução de amostra contendo um fluoróforo. O acionamento de um feixe de laser durante um curto período de tempo degrada uma pequena porção do fluoróforo, formando vacâncias. Essas vacâncias, então, migram com mobilidade igual à das espécies que compõem a amostra e são detectadas por LIF (*Laser-Induced Fluorescence*).

A injeção térmica apresenta-se particularmente interessante nas análises por μ CE. Sistemas miniaturizados vêm ganhando cada vez mais destaque nas análises de compostos químicos e biológicos devido aos reduzidos volumes de resíduos gerados e, principalmente, à grande eficiência e rapidez das análises. No entanto, a injeção da amostra no canal de separação constitui um dos principais desafios das análises em μ CE. Dentre os vários tipos de injeção de amostra existentes, a eletrocinética é a mais empregada, devido a sua simplicidade instrumental e facilidade de adaptação aos microsistemas. Entretanto, nesse tipo de injeção

ocorre uma contínua introdução da amostra no canal de separação durante a corrida devido à difusão, que acarreta em alterações na linha base e redução da eficiência da separação [81]. Sendo assim, a injeção térmica se mostra, então, como uma possível alternativa para contornar este problema.

Finalmente, a possibilidade de se efetuar "injeções" sem necessidade de interrupção da corrida chamou a atenção, então, para a utilização da injeção térmica para a realização de técnicas multiplexadas em CE. Conforme mencionado anteriormente, para se executar a multiplexação é necessário um sistema de introdução de amostra que permita a injeção sequencial de uma mesma amostra, característica presente na injeção térmica.

5.2. Parte experimental

5.2.1. Reagentes e soluções

Histidina e MES foram obtidos da Sigma. Cloreto de sódio, cloreto de potássio e hidróxido de sódio foram adquiridos da Merck. Todos os reagentes eram de grau analítico e foram usados sem tratamento adicional. Água deionizada foi usada para preparar as soluções.

Tampão MES/Na 20 mmol L⁻¹ (pH 6,0) foi preparada conforme descrito na seção 4.2.2.5, adicionando-se solução de NaOH a 20 mmol L⁻¹ de ácido morfolinoetanosulfônico até atingir pH 6,0.

5.2.2. Materiais e Métodos

5.2.2.1. Marcador térmico para injeção multiplexada

Na figura 30 é apresentado o circuito para geração da TM utilizado na injeção térmica multiplexada. O marcador térmico utilizado foi o mesmo descrito anteriormente, no qual um resistor SMD de $15\ \Omega$ foi utilizado para o aquecimento. A passagem de corrente por este resistor foi controlada por meio de um transistor NPN do tipo TIP122, que recebeu em sua base um resistor de $4,7\ \text{k}\Omega$ para que o transistor funcionasse como uma chave. A temporização e a largura dos pulsos elétricos aplicados ao transistor para geração do aquecimento (acionamento da "chave") foram realizados com um auxílio de uma microcontroladora (Arduino), de forma semelhante ao utilizado no marcador eletrotérmico. Descrições mais detalhadas podem ser encontradas na seção 3.1.3.3.

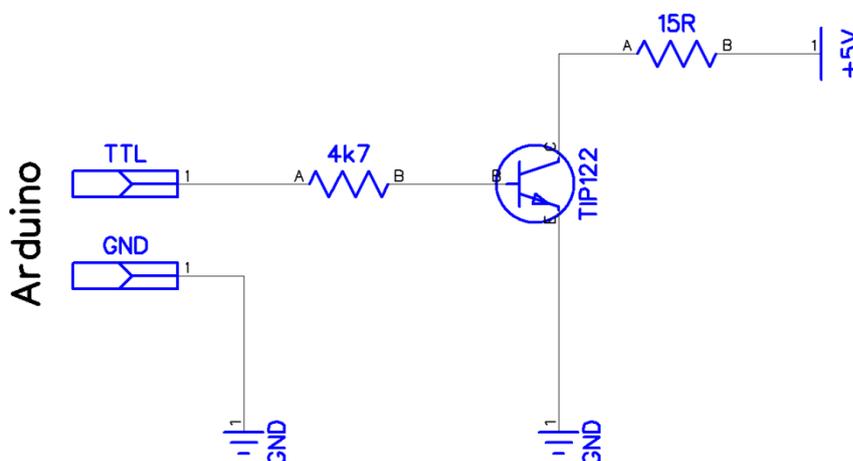


Figura 30. Esquema do circuito para geração das TMs utilizado na injeção térmica multiplexada.

5.2.2.2. Eletroforese capilar

O equipamento de CE com detecção condutométrica sem contato utilizado foi o mesmo descrito no capítulo 3.

Utilizou-se capilar de sílica fundida de 75 μm d.i, 360 μm d.e., tipicamente com 50 cm de comprimento. Previamente ao dia de análise, o capilar era condicionado com NaOH 0,1 mol L⁻¹, água e tampão de corrida (*flush* de 10 min entre etapas) e posteriormente era aplicado o potencial de corrida até estabilização da linha base (aproximadamente 10 min).

5.2.2.3. Injeção térmica

Para a realização das injeções térmicas, o capilar era preenchido com a própria amostra diluída no eletrólito de corrida. No momento em que se desejasse realizar a "injeção", era aplicada uma marcação térmica, que geraria os sinais referentes aos analitos, os quais eram registrados pelo C⁴D.

As mobilidades das espécies foram calculadas a partir dos valores de comprimento do capilar, potencial de corrida e tempo de migração das espécies, utilizando a equação 28. A intensidade dos sinais foi baseada na sua amplitude (diferença de altura entre o vale e o pico), que foi calculada utilizando o software Origin 8.0.

O modelamento matemático para multiplexação foi realizado com o auxílio do software Mathcad 2001 Professional (MathSoft, Cambridge, MA, EUA).

5.3. Resultados e Discussão

5.3.1. Potencialidade analítica da técnica de injeção térmica

Com o objetivo de avaliar a potencialidade de uma aplicação analítica para a injeção térmica, primeiramente foi estudado um sistema químico relativamente simples, composto por NaCl em tampão MES/His. A figura 31 mostra o

eletroferograma de duas marcações térmicas executadas simultaneamente por dois resistores distanciados 5,0 cm entre si.

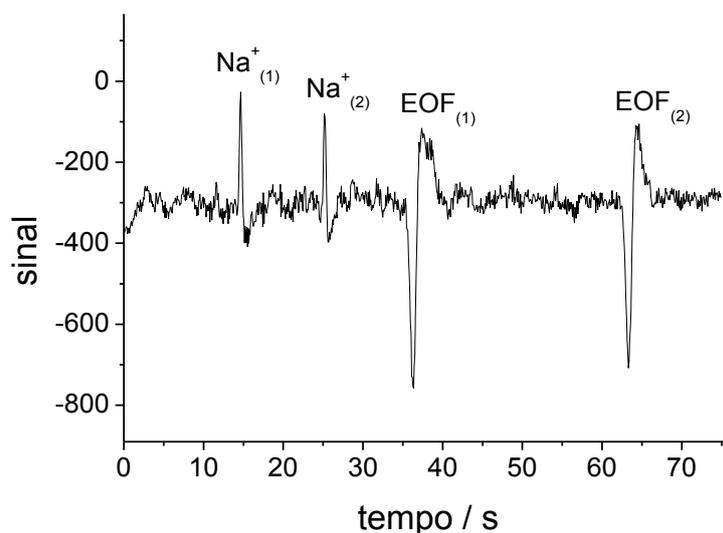


Figura 31. Eletroferograma de TMs em solução de MES/His 20 mmol L^{-1} e NaCl $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. Potencial de corrida: +28 kV. Índices 1 e 2 referem-se aos sinais gerados pelos marcadores térmicos 1 e 2, respectivamente.

Assim, foi avaliado o comportamento do sinal das TMs em função da concentração dos analitos. Dessa forma, foram efetuadas marcações em soluções de MES/His contendo NaCl em concentrações variáveis (de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ a 1 mmol L^{-1}). Os eletroferogramas de algumas dessas amostras são mostradas na figura 32. A curva analítica correlacionando a área do sinal referente ao sódio com a sua concentração pode ser observada na figura 33, cujo gráfico apresentou faixa de resposta linear na região estudada ($R = 0,9975$; $N = 11$).

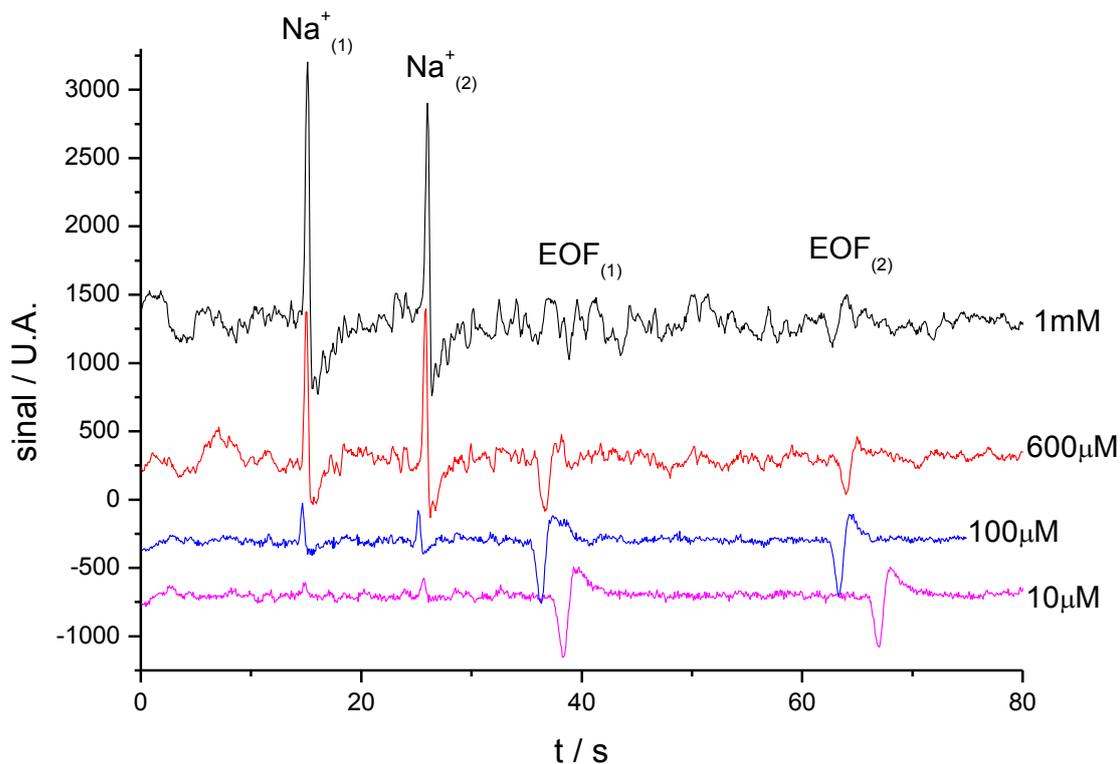


Figura 32. Eletroferogramas provenientes de injeções térmicas de amostras de NaCl em diferentes concentrações (de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a 1 mmol L^{-1}) em tampão MES/His 20 mmol L^{-1} . Os índices (1) e (2) referem-se a cada um dos resistores do marcador térmico duplo, os quais foram acionados simultaneamente por 312 ms de largura de pulso de aquecimento. Potencial de corrida: +28 kV.

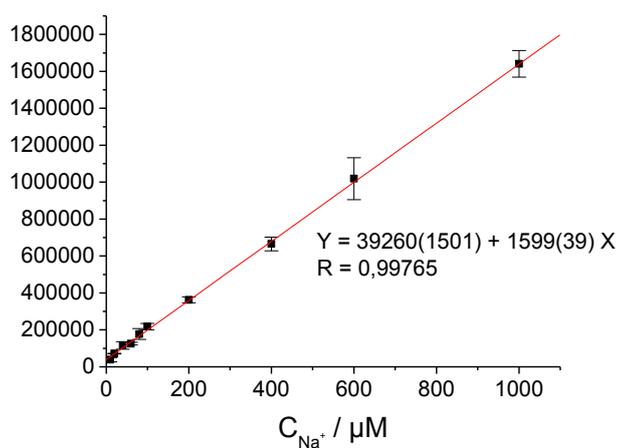


Figura 33. Intensidade da TM referente ao Na^+ em função de sua concentração. Eletrólito de corrida: MES/His 20 mmol L^{-1} (pH 6,0) e NaCl 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Potencial de corrida: +28 kV.

Outro parâmetro estudado foi a correlação da mobilidade do pico do analito com sua concentração. A figura 34 mostra o gráfico da mobilidade do Na^+ em função da sua concentração na amostra. Para baixas concentrações, até $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NaCl , a mobilidade da zona referente ao Na^+ se mantém praticamente constante. No entanto, acima desse valor, a zona começa a se deslocar mais lentamente na medida em que a concentração de NaCl aumenta. De fato, a interface de duas soluções com concentrações diferentes do mesmo sal forma uma fronteira que possui mobilidade dependente do número de transporte das espécies naquela concentração. Segundo Stockmayer [77], o movimento estacionário de uma fronteira entre duas soluções de diferentes concentrações submetidas à ação de um campo elétrico está relacionado com a diferença entre os números de transporte dessas espécies nessas determinadas concentrações (equação 21). Essa mudança de mobilidade em função da concentração do analito é prejudicial à análise, uma vez que dificultaria a identificação dos picos nos eletroferogramas.

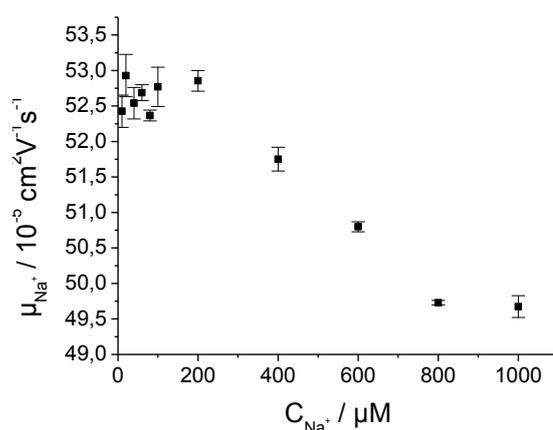


Figura 34. Mobilidade do Na^+ em função de sua concentração. Eletrólito de corrida: MES/His 20 mmol L^{-1} (pH 6,0) e $\text{NaCl } 100 \mu\text{mol L}^{-1}$. Potencial de corrida: +28 kV.

A separação de espécies utilizando a injeção térmica para geração dos sinais dos analitos foi estudada, tomando como exemplo solução de MES/His contendo NaCl e KCl. A figura 35 mostra o eletroferograma da separação de Na⁺ e K⁺. Novamente, existem dois sinais referentes ao Na⁺ e dois ao K⁺ pois foi utilizado um marcador térmico duplo.

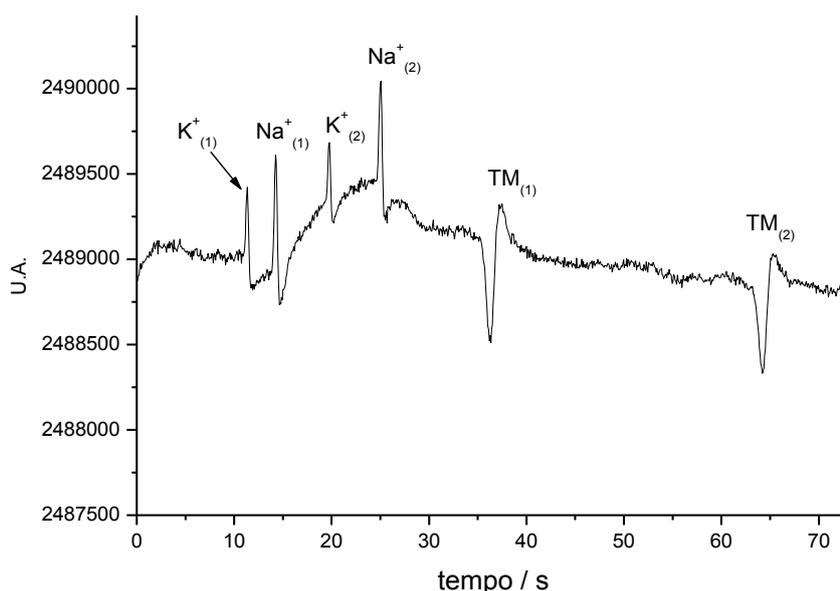


Figura 35. Eletroferograma de TMs de Na⁺ e K⁺. Eletrólito de corrida: tampão MES/His 20 mmol L⁻¹ (pH 6,0) contendo 0,2 mmol L⁻¹ de KCl e NaCl cada. Potencial de corrida: +28 kV. Índices (1) e (2) referem-se aos sinais gerados pelos marcadores térmicos 1 e 2, respectivamente.

Foram estudadas concentrações de NaCl e KCl variando de 0 a 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A figura 36 mostra as curvas analíticas para o K⁺ na presença de diferentes concentrações de NaCl (figura 36-A) e para o Na⁺ na presença de diferentes concentrações de KCl (figura 36-B). A resposta de cada curva para uma concentração fixa da outra espécie (por exemplo, concentrações variadas de K⁺ na presença de uma quantidade fixa de Na⁺) apresentou comportamento linear. Entretanto, quanto maior a concentração de NaCl, menor foi a sensibilidade do K⁺,

enquanto que, na análise do Na^+ , quanto maior a concentração de KCl, maior foi a sensibilidade do Na^+ . Ou seja, o Na^+ se revelou um interferente na análise do K^+ e vice e versa.

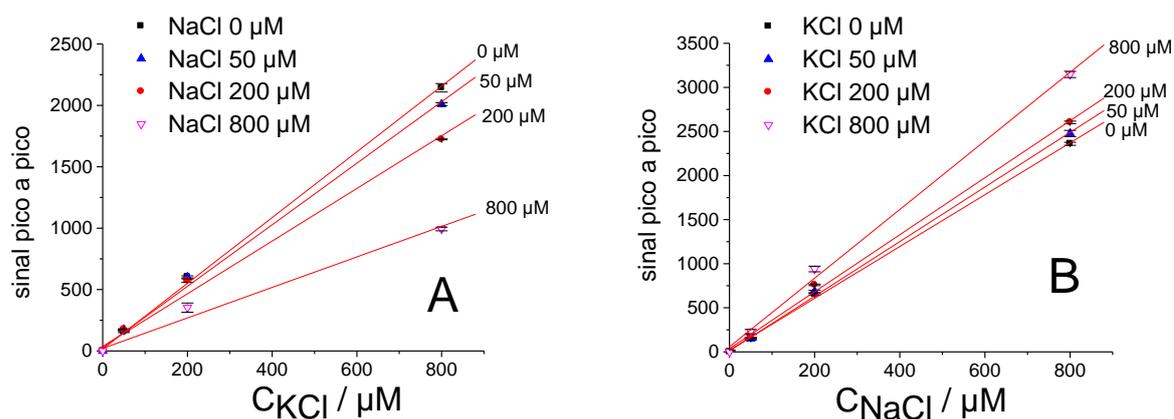


Figura 36. Sinal analítico de (A) K^+ em presença de Na^+ e (B) Na^+ em presença de K^+ . Eletrólito de corrida: tampão MES/His 20 mmol L^{-1} (pH 6,0) contendo KCl e NaCl em diferentes concentrações. Potencial de corrida: +28 kV.

Além disso, a presença de concomitantes também causou interferência na mobilidade da espécie de interesse. Como se pode observar no gráfico da figura 37, o aumento na concentração de NaCl causou um aumento na mobilidade do K^+ , enquanto, quanto maior o incremento na concentração de KCl, menor foi a mobilidade do Na^+ (figura 38). Novamente, esse fato está relacionado com o movimento estacionário da fronteira de concentração, cuja velocidade pode ser expressa pela equação 21.

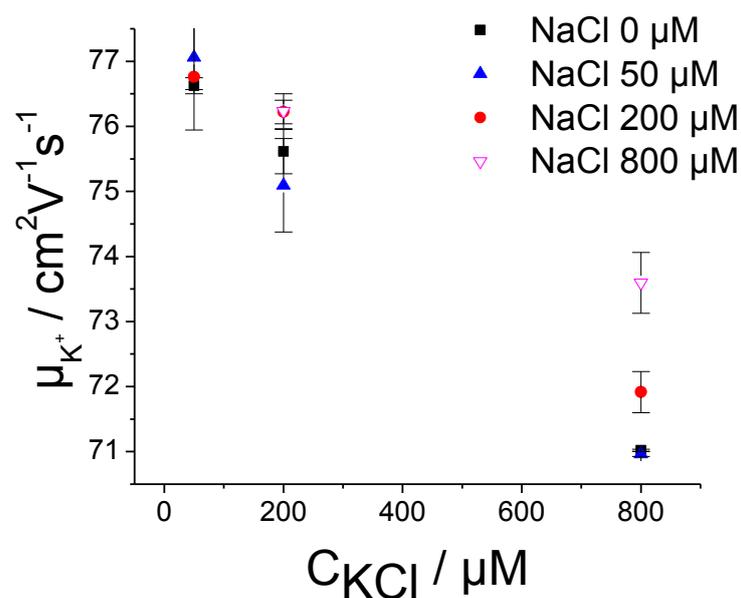


Figura 37. Mobilidade de K^+ em presença de NaCl. Eletrólito de corrida: tampão MES/His 20 mmol L^{-1} (pH 6,0) contendo KCl e NaCl em diferentes concentrações. Potencial de corrida: +28 kV.

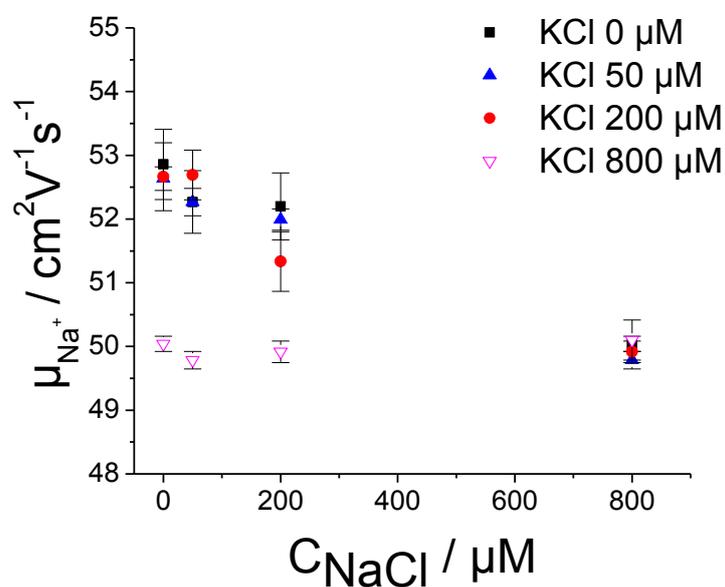


Figura 38. Mobilidade de Na^+ em presença de KCl. Eletrólito de corrida: tampão MES/His 20 mmol L^{-1} (pH 6,0) contendo KCl e NaCl em diferentes concentrações. Potencial de corrida: +28 kV.

As curvas analíticas e de mobilidade mostraram, então, um sério problema de interferência na técnica de injeção térmica. Uma vez que os problemas de alteração da mobilidade e de sensibilidade em função da concentração decorrem

principalmente de fenômenos relacionados às fronteiras de concentração e diante do fato de que resultados experimentais mostraram que para baixas diferenças de concentração esses problemas são atenuados (figura 34), então uma solução para esses problemas seria a geração de TMs mais sutis, ou seja, em que as diferenças de concentrações fossem menores. No entanto, outro problema decorreria: a redução da sensibilidade. Então, como gerar TMs mais sutis sem perda de sensibilidade?

5.3.2. Injeção térmica multiplexada

A multiplexação consiste em uma técnica que codifica uma série de sinais analíticos e através de um modelamento matemático, essas informações são decodificadas, obtendo-se um aumento na relação sinal/ruído.

Nesse trabalho, a estratégia de injeção térmica consistiu em gerar uma série de marcações térmicas idênticas de uma mesma amostra, em tempos pré-definidos. Quando esses vários eletroferogramas são somados, o ruído é reduzido, pois os diversos picos positivos e negativos aleatórios que originam o ruído da linha base são anulados durante o processo de soma. O resultado é, então, o aumento da relação sinal/ruído.

A utilização de TMs para a realização da multiplexação é muito conveniente, pois é preciso efetuar diversas injeções rápidas e seguidas, sem interrupção da corrida, característica que as marcações térmicas proporcionam. Em um trabalho anterior relatado na literatura que utiliza a Transformada de Haddamard, os autores utilizam a injeção opticamente ativada [78, 79]. De modo semelhante ao que ocorre na injeção térmica, o capilar é preenchido com a própria amostra, porém é necessária a presença de um fluoróforo no eletrólito de corrida. A injeção

propriamente dita ocorre quando um laser é direcionado em uma pequena região do capilar, degradando o fluoróforo e criando uma vacância que migra em direção ao detector, de forma semelhante ao que ocorre com as TMs.

A estratégia de multiplexação utilizada nesse trabalho foi baseada em um novo modelamento matemático, um caso mais genérico da Transformada de Hadamard. O modelamento leva em conta dois pressupostos: (i) os fenômenos geradores devem ser reprodutíveis, ou seja, para que uma nova injeção ocorra é necessário que todos os fenômenos envolvidos na injeção anterior tenham ocorrido completamente e que elas sejam sempre iguais, e (ii) todo o eletroferograma experimental é modelado, diferentemente do que ocorre na Transformada de Hadamard, onde somente a parte central do eletroferograma é modelada.

O modelamento possui três elementos principais: o eletroferograma experimental (resultado de várias injeções sequenciais que geram vários picos sobrepostos), a matriz de decodificação e o eletroferograma resultante de uma única injeção (eletroferograma de interesse).

A matriz de decodificação $[A]$ é gerada a partir de um vetor de injeção J , que é composto somente pelos elementos 0 e 1. Na prática, o vetor de injeção funciona da seguinte forma: supondo um intervalo entre injeções de x segundos, então a cada x segundos é lido um elemento desse vetor de injeção, sendo que se o elemento de J for 1, a injeção propriamente dita ocorre e se ele for 0, ocorre uma pseudo-injeção, ou seja, a injeção não ocorre. A partir desse vetor J , obtém-se a matriz $[A]$.

Obtidos esses elementos, utiliza-se o seguinte modelamento matemático:

$$[x] = ([A]^T [A])^{-1} [A]^T [y]$$

Equação 33

onde $[A]$ é a matriz de codificação, $[y]$ representa o vetor com o conjunto de dados do eletroferograma experimental e $[x]$ é o vetor que representa o conjunto de dados

do eletroferograma de uma injeção, que é obtido pela técnica de mínimos quadrados.

Esse modelamento foi implementado em software de manipulação matemática, o Mathcad 2001 Professional, cuja interface com o usuário é bastante simples, sendo que é necessário somente entrar com os dados do eletroferograma experimental, do vetor de injeção e o intervalo entre injeções. O tratamento matemático leva apenas alguns segundos.

Para que o modelamento funcione, é necessário que todas as injeções sejam exatamente iguais e reproduzíveis. Na primeira versão, o controle de acionamento das TMs era realizado por uma placa com interface do tipo ISA (PCL 711). Limitados por este tipo de interface, já não disponíveis em computadores atuais, utilizou-se um computador com capacidade de processamento reduzida, onde o gerenciamento era feito por um programa desenvolvido em Delphi 5.0. Além da capacidade reduzida de processamento, o único processador disponível nesta máquina se ocupava também das tarefas básicas de funcionamento do PC (controle de periféricos e softwares adicionais), ou seja, ao ser requisitado o acionamento de um dispositivo qualquer este PC poderia estar ocupado com outras atividades, tornando a temporização do processo de acionamento da TM pouco reproduzível. Assim, optou-se por adotar uma microcontroladora. Estes tipos de dispositivos são vantajosos quanto a compatibilidade com qualquer sistema operacional, possuem baixo custo de aquisição, facilidade de operação e dimensões reduzidas. Além destas vantagens o consumo em massa destes dispositivos os torna acessíveis a ponto de permitir o uso de um processador dedicado a cada tarefa necessária, que implica em maior precisão no processo de temporização. A descrição do circuito microcontrolado utilizado nesse trabalho encontra-se detalhada na seção 4.1.2.1.

Na figura 39, podem ser encontrados alguns resultados típicos obtidos utilizando a técnica de multiplexação anteriormente descrita. A figura 39-A mostra um eletroferograma experimental proveniente de uma única injeção térmica de uma amostra contendo $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NaCl e KCl em tampão MES/Na 20 mmol L^{-1} (pH 6,0). A figura 39-B mostra o eletroferograma experimental com múltiplas injeções térmicas da mesma amostra. Nesse caso, foi empregado um marcador térmico com resistência de 15Ω , que fornecia pulsos de aquecimento de 292 ms a cada 730 ms, segundo o vetor de injeção $J = (10110100101001)$, ou seja, foram feitas 7 injeções efetivamente (representadas pelo número 1 no vetor J) e 7 pseudo-injeções (representadas pelo número 0 no vetor J).

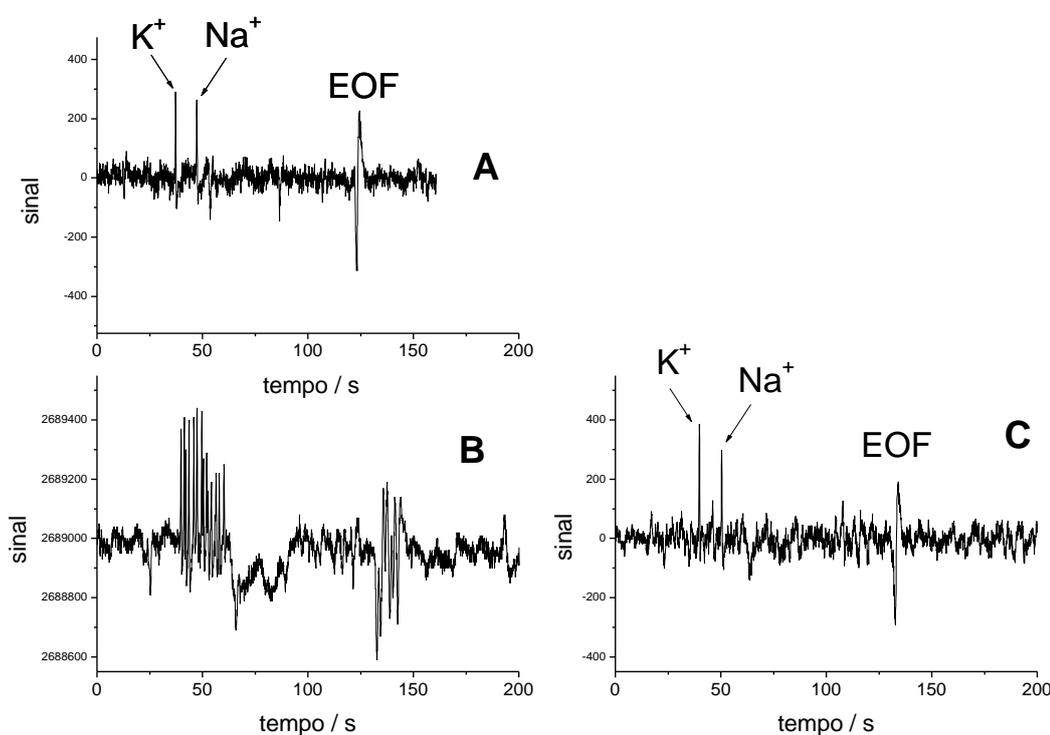


Figura 39. (A) Eletroferograma experimental de uma injeção de NaCl e KCl $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Eletroferograma experimental com múltiplas injeções térmicas de NaCl e KCl $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão MES/Na 20 mmol L^{-1} (pH 6). (C) Eletroferograma decodificado.

A figura 39-C mostra o eletroferograma obtido do modelamento matemático. Como se pode observar, o modelamento matemático foi capaz de decodificar as informações de múltiplas injeções sobrepostas, entretanto, não foi possível observar um aumento apreciável na relação sinal/ruído. Na verdade, o aumento dessa relação varia com o número de injeções, conforme mostra a equação 32, ou seja, quanto maior o número de injeções, maior a relação sinal/ruído. Entretanto, para se obter um aumento de 10 vezes na relação sinal/ruído, seria necessário realizar 800 pseudo-injeções, que no caso desse experimento, levaria aproximadamente 20 min, tornando o tempo de análise muito longo.

A TM é um fenômeno relativamente demorado, uma vez que elas ocorrem em três etapas: (i) aquecimento do capilar, (ii) aquecimento da solução e (iii) resfriamento do sistema. Assim, uma forma de contornar o problema seria a elaboração de um sistema de marcação térmica de alta velocidade. A ideia seria eliminar a etapa de aquecimento do capilar, para que fossem geradas TMs bem mais estreitas e assim, poder realizar um maior número de injeções em um intervalo de tempo relativamente curto e, logo, conseguir um aumento considerável na relação sinal/ruído. O marcador à laser e o eletrotérmico tiveram essa finalidade, no entanto, nenhum deles apresentou resultados satisfatórios. Dessa forma, existe uma demanda por novas estratégias de marcação térmica.

5.4. Conclusões Parciais

A injeção térmica demonstrou potencial como uma nova estratégia para análise por eletroforese capilar. A técnica apresentou extensa faixa de resposta linear (entre $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ e 1mmol L^{-1} para sódio). Entretanto, problemas de

interferência sobre a sensibilidade e a mobilidade dos analitos foram obstáculos enfrentados.

Embora não tenha sido possível alcançar o resultado almejado no aumento da relação sinal/ruído utilizando essa nova técnica de multiplexação, o modelamento matemático revelou-se capaz de decodificar as informações contidas nos vários eletroferogramas sobrepostos obtidos com as múltiplas injeções. Para contornar o problema, seria necessário realizar uma quantidade muito maior de injeções sucessivas, que tornaria o tempo de cada corrida extremamente longo. Logo, seria indispensável implementar um novo sistema mais rápido de marcação térmica.

Capítulo 6
Aplicações

6. Aplicações

6.1. Introdução

Diversas aplicações para o uso das TMs em eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato foram propostas ao longo do trabalho. Neste capítulo, são apresentadas seis aplicações diferentes, todas elas utilizando as TMs para a determinação do EOF, seja para a medida direta de sua mobilidade, ou para a correção de suas variações nos tempos de migração dos analitos.

Para uma melhor compreensão do leitor, é necessário ressaltar que cada uma das aplicações apresentadas neste capítulo pode ser considerada como um experimento distinto, com uma seção de materiais e métodos e outra de resultados e discussão próprias.

6.2. Parte experimental

6.2.1. Reagentes e soluções

Histidina, MES, DDAB e sulfato de cézio foram obtidos da Sigma. Cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de lítio, hidróxido de sódio, hidróxido de lítio, hidróxido de potássio, bicarbonato de sódio, ácido clorídrico 37%, o-fenantrolina, CTAB, etanol, metanol, 1-propanol e isopropanol foram adquiridos da Merck. Óxido de deutério 99,9 % D teve procedência Aldrich (Milwaukee, WI, EUA). Todos os reagentes eram de grau analítico e foram usados sem tratamento adicional. Água deionizada foi usada para preparar as soluções.

6.2.2. Materiais e Métodos

Foi utilizado um equipamento de eletroforese capilar construído no próprio laboratório com detecção condutométrica sem contato operando em 550 kHz e 2 Vpp. O equipamento contém um sistema de eletrólise separada, que permite a utilização de eletrólitos de corrida não tamponados sem que os mesmos sofram alteração do pH em função da eletrólise. A menos que especificado, o capilar foi previamente condicionado com solução de NaOH 0,1 mmol L⁻¹, água e eletrólito de corrida, cada etapa durando cerca de 10 min, seguida de aplicação do potencial de corrida até estabilização da linha base.

6.2.2.1. Medida da mobilidade do EOF em capilar de sílica

Foi empregado marcador térmico duplo baseado em resistores SMD, posicionados a 5,6 e 10,6 cm do ponto de detecção, os quais foram acionados simultaneamente com largura de pulso de aquecimento de 250 ms.

Utilizou-se capilar de sílica fundida de 75 µm d.i., 360 µm d.e. e 59,5 cm de comprimento. A mobilidade das TMs e, conseqüentemente, estimativa da mobilidade do EOF, foi calculada utilizando-se a equação 29. O potencial de corrida foi de +10 kV.

Os eletrólitos de corrida foram preparados a partir da mistura de soluções 10 mmol L⁻¹ de KOH, HCl e KCl em quantidades suficientes para atingir o pH desejado (pH variando entre 3 a 10) e força iônica de 10 mmol L⁻¹. A mudança do pH do eletrólito de corrida durante as corridas eletroforéticas devido à eletrólise foi evitada através da utilização do sistema de eletrólise separada [69].

6.2.2.2. Utilização da TM como padrão de correção de variações no EOF entre corridas

No experimento envolvendo a água de coco, a amostra foi diluída na proporção 1:100 (v/v) antes de ser injetada. Empregou-se capilar de sílica fundida de 75 μm d.i, 360 μm d.e., 60,3 cm de comprimento total (48,7 cm efetivo). O potencial de corrida utilizado foi +15 kV. A injeção foi realizada hidrodinamicamente por 10 s e 10 cm H_2O . O eletrólito de corrida foi MES/His 30 mmol L^{-1} (pH 6,0). Utilizou-se marcador térmico baseado em filamento de tungstênio, com 250 ms de largura de pulso acionados após 75, 115 e 160 s após o início da corrida.

No experimento envolvendo a amostra de clara de ovo, o capilar utilizado foi de 55,3 cm de comprimento total (46,2 cm efetivos). Utilizou-se como eletrólito de corrida solução de MES/His 20 mmol L^{-1} (pH 6,0). Empregou-se marcador térmico duplo baseado em resistores SMD posicionados a 4,2 e 7,2 cm do ponto de detecção e acionados simultaneamente com largura de pulso de aquecimento de 600 ms. A amostra de clara de ovo foi diluída 30 vezes e LiNO_3 333 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi utilizado como padrão interno. A injeção foi feita hidrodinamicamente por 3 s e 10 cm H_2O . O potencial de corrida foi de +25 kV. Após cada corrida, o capilar era lavado com solução de NaOH 1 mol L^{-1} .

A correção da mobilidade dos analitos foi feita partindo-se do valor da mobilidade aparente de cada espécie (μ_{ap}) e subtraindo-se a mobilidade da TM (μ_{TM}), calculadas a partir da equação 28:

$$\mu_s = \mu_{ap} - \mu_{TM} = \frac{l-d}{t_s - t_m} \frac{L}{V} \quad \text{Equação 34}$$

onde μ_s é a mobilidade corrigida da espécie s , t_s e t_{TM} são os tempos de migração da espécie s e da TM, respectivamente, l é a distância do ponto de injeção até o de detecção, d é a distância entre os marcadores, L é o comprimento total do capilar e V é o potencial de corrida.

6.2.2.3. Avaliação da resposta de um C^4D

Utilizou-se como eletrólito de corrida tampão MES/His 20 mmol L⁻¹ (pH 6,0). Foi empregado capilar de sílica fundida de 75 μ m i.d, 360 μ m d.e. e aplicou-se um potencial de corrida de +10 kV. Um gerador de funções FG 2002C (Goldstar, Seul, Coréia) foi utilizado para aplicação do sinal do detector. A cada corrida, foi gerada uma TM gerado por um marcador a base de filamento de tungstênio (250 ms de largura de pulso de aquecimento). Os sinais das TMs foram quantificados nos eletroferogramas através da medida da amplitude dos sinais (diferença de altura entre pico e vale), utilizando o software Origin 8.0. Foi traçado um gráfico de altura pico a pico das TMs em função do sinal de detecção aplicado utilizando o mesmo software mencionado.

6.2.2.4. Estudo da estabilidade de revestimentos de CTAB e DDAB sobre a superfície de capilares de sílica utilizando TMs

Utilizou-se capilar de sílica fundida de 75 μ m d.i., 360 μ m d.e. e 50 cm de comprimento total e marcador térmico duplo com resistores SMD distanciados por 5,0 cm entre si, aos quais aplicou-se pulsos de aquecimento de 600 ms. O potencial de corrida aplicado foi de -20 kV. A mobilidade do EOF foi calculada utilizando a equação 29.

Nessa etapa do trabalho, foram empregados três eletrólitos de corrida diferentes: (i) tampão MES/Na 20 mmol L⁻¹ (pH 6,0), (ii) tampão MES/Na 20 mmol L⁻¹ (pH 6,0) contendo CTAB 0,2 mmol L⁻¹ e (iii) tampão MES/Na 20 mmol L⁻¹ (pH 6,0) contendo DDAB 0,2 mmol L⁻¹.

Após limpeza do capilar, para cada um dos tensoativos, adotou-se o seguinte procedimento:

- I - o capilar foi preenchido com o tampão MES/Na (i);
- II - aplicou-se um potencial de corrida de -20 kV e foram geradas TMs a cada 3 min até que fosse observada estabilização do EOF.
- III - o capilar foi preenchido com os eletrólitos contendo CTAB (ii) ou DDAB (iii);
- IV - repetiu-se a etapa II. Essa etapa foi chamada de ADSORÇÃO do tensoativo;
- V - as etapas I e II foram repetidas. Essa etapa foi chamada de DESSORÇÃO do tensoativo;

Tampão MES/Na foi preparado conforme descrito na seção 4.2.2.5.

6.2.2.5. Medida da mobilidade do EOF para determinação de constantes físico-químicas de monoalquilcarbonatos

Em ambos os experimentos, um marcador térmico duplo baseado em resistor SMD (resistores distanciados de 5,0 cm, largura de pulso de aquecimento de 700 ms) foi utilizado para calcular o EOF. A correção da mobilidade dos analitos foi feita partindo-se do valor da mobilidade aparente de cada espécie subtraindo-se a mobilidade da TM (equação 34).

Acidez dos MACs

Utilizou-se eletrólito de corrida preparado a partir de mistura de soluções aquosas de LiOH, HCl e LiCl em quantidades suficientes para obter força iônica igual a 10 mM e pH entre 3 e 9. Foi utilizado capilar de sílica fundida de 50 μm d.i. e 360 μm d.e. com comprimento total de 40 cm (11 cm e 29 cm de distância até o primeiro e segundo detector, respectivamente). O potencial de corrida aplicado foi -10 kV. O capilar foi pré-condicionado antes de cada dia de experimento através de *flush* com: (i) NaOH 0,1 mol L⁻¹, (ii) água, (iii) DDAB 20 mM, que foi utilizado como inversor de EOF, (iv) eletrólito de corrida. Os experimentos foram realizados a 20 °C. As amostras injetadas consistiram de solução 1:1 (v/v) de água e álcool em tampão 5 mM HCO₃⁻/CO₃⁻², sendo que os álcoois utilizados foram o etanol e o 1-propanol.

Mobilidade iônica, coeficiente de difusão e raio hidrodinâmico

Utilizou-se como eletrólito de corrida solução de bicarbonato de sódio 10 mmol L⁻¹ (pH 8,3) e capilar de sílica fundida de 50 μm d.i., 360 μm d.e. com 50 cm de comprimento (10 cm e 40 cm de comprimento efetivo até o primeiro e segundo detectores, respectivamente). As corridas foram efetuadas a +30 kV e 25 °C, com os analitos migrando no contra-fluxo. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente por 4 s a 3,5 psi.

As amostras foram preparados através da mistura de 5% (v/v) de propanol ou isopropanol em solução de NaHCO₃ 2,5 mmol L⁻¹, deixadas em repouso por 24 h antes das análises. Utilizou-se como padrão interno MES 100 μmol L⁻¹, propionato de sódio 100 μmol L⁻¹ e acetato de sódio 150 μmol L⁻¹.

6.2.2.6. Utilização das TMs no estudo da mobilidade iônica de íons hidrônio

No experimento sobre bases fracas, utilizou-se como eletrólito de corrida solução de o-fenantrolina contendo mistura de LiOH, HCl e LiCl em quantidade suficiente para obter força iônica igual a 10 mmol L^{-1} e pH 5. O capilar utilizado foi de sílica fundida de $75 \mu\text{m}$ d.i., $360 \mu\text{m}$ d.e., $57,3 \text{ cm}$ de comprimento, $11,3$ e $45,9 \text{ cm}$ de distância entre o 1° e o 2° detectores, respectivamente. Empregou-se marcador térmico duplo, com resistores posicionados a $35,4$ e $40,4 \text{ cm}$ a partir do ponto de injeção. As marcações térmicas foram aplicadas a partir de aquecimentos com largura de pulso de 300 ms . O equipamento de CE foi termostatizado a $26 \text{ }^\circ\text{C}$. A amostra foi uma mistura de HCl $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ e LiCl $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, injetada hidrodinamicamente por 30 s e $10 \text{ cmH}_2\text{O}$.

No experimento envolvendo o cloroacetato, foram utilizadas as seguintes condições experimentais: o eletrólito de corrida foi uma mistura de ácido cloroacético e mistura de LiOH, HCl e LiCl em quantidades suficientes para obter força iônica igual a 10 mmol L^{-1} e pH 5. O potencial de corrida aplicado foi de $+26 \text{ kV}$. O capilar foi o de sílica fundida de $75 \mu\text{m}$ d.i., $360 \mu\text{m}$ d.e., $67,4 \text{ cm}$ de comprimento, $11,7$ e $55,6 \text{ cm}$ de distância entre o 1° e o 2° detectores, respectivamente. Empregou-se marcador térmico duplo, com resistores posicionados a $35,4$ e $40,4 \text{ cm}$ a partir do ponto de injeção. As marcações térmicas foram aplicadas a partir de aquecimentos com largura de pulso de 300 ms . O equipamento de CE foi termostatizado a $26 \text{ }^\circ\text{C}$. A amostra foi uma mistura de HCl $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ e LiCl $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, injetada hidrodinamicamente por 20 s e $10 \text{ cmH}_2\text{O}$.

No experimento com água deuterada, a amostra foi uma mistura de Cs_2SO_4 $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ e HCl $90 \mu\text{mol L}^{-1}$, utilizando solução de LiCl 10 mmol L^{-1} como eletrólito de corrida (pH 4,95) em mistura de $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 (v/v) como solvente. O potencial de

corrida aplicado foi de +15 kV. Utilizou-se capilar de sílica fundida de 75 μm d.i., 360 μm d.e. e 56,0 cm de comprimento total (11,7 e 44,6 cm de comprimento efetivo até o primeiro e segundo detectores, respectivamente). As amostras foram injetadas hidrodinamicamente (20 s, 17 cm de H_2O). Utilizou-se marcador térmico duplo baseado em resistor SMD, com resistores distanciados de 5,0 cm (300 ms de pulso de aquecimento).

Em ambos os experimentos, a mobilidade do pico do H^+ foi calculada com o auxílio das TMs, utilizando-se a equação 34.

6.3. Resultados e Discussão

6.3.1. Medida da mobilidade do EOF em capilar de sílica

A caracterização do EOF em função do pH é de fundamental importância nas análises por eletroforese capilar. Dependendo do material utilizado na confecção do capilar ou o mesmo se ele sofreu algum processo de modificação de superfície, pode haver diferenciação no perfil do EOF em função do pH.

A utilização das TMs nesse tipo de estudo oferece como vantagem frente aos métodos tradicionais a praticidade e a rapidez. Diversas marcações podem ser efetuadas em seguida, sem interrupção do potencial de corrida, possibilitando o monitoramento em tempo real até estabilização do EOF.

A figura 40 mostra o perfil de variação do EOF em função do pH em capilar de sílica fundida, utilizando soluções de KCl como eletrólito de corrida. Em pH baixo, os grupos Si-OH da superfície do capilar estão parcialmente protonados, conferindo baixos valores de mobilidade ao EOF. Conforme o pH aumenta, esses grupos sofrem desprotonação, causando aumento do EOF.

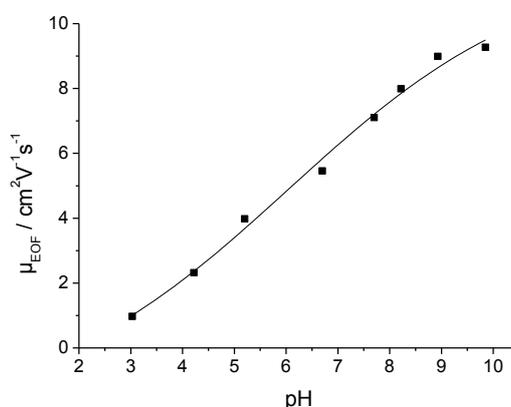


Figura 40. Medida da mobilidade do EOF utilizando TMs. Eletrólitos em diferentes pHs foram obtidos misturando-se soluções de KOH e de HCl e foi usado KCl para corrigir a força iônica em 10 mmol L^{-1} . Capilar: $75 \mu\text{m}$ d.i. Temperatura: 32°C .

6.3.2. Utilização da TM como padrão de correção de variações do EOF entre corridas

Em eletroforese capilar, variações na mobilidade do EOF entre corridas são frequentes, principalmente se a amostra contiver espécies que adsorvam na superfície do capilar, podendo causar problemas de reprodutibilidade e de identificação dos picos. Para contornar esse problema, algumas vezes são utilizados padrões internos como fator de correção. Entretanto, a escolha de um padrão interno nem sempre é trivial, principalmente se a amostra for complexa.

A utilização da TM nesse tipo de tarefa implica em maior versatilidade e flexibilidade, uma vez que as marcas podem ser posicionadas em qualquer local do eletroferograma, apenas controlando o tempo de acionamento dos pulsos de aquecimento, além de poderem ser geradas quantas marcas se desejarem em uma mesma corrida. Esse aspecto é exemplificado na figura 41, que mostra um eletroferograma da injeção de uma amostra de água de coco contendo três TMs posicionadas em diferentes locais do eletroferograma. As marcas térmicas TM1,

TM2 e TM3 foram geradas 1,25 min, 1,92 min e 2,67 min após o início da corrida, respectivamente.

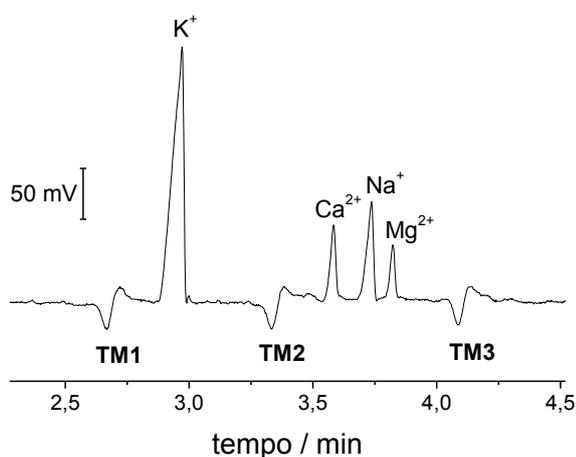


Figura 41. TMs em análise de alguns cátions em amostra de água de coco. Condições – amostra: água de coco diluída 100 vezes; eletrólito de corrida: tampão MES/His 30 mmol L⁻¹ (pH 6,0); capilar: 75 μm d.i., 60,3 cm de comprimento, 48,7 cm efetivo; potencial de corrida: +15 kV; injeção: hidrodinâmica por 10 s e 10 cmH₂O; marcador térmico: filamento, 250 ms de pulso de aquecimento disparado após 75 s, 115 s e 160 s após início da corrida.

A figura 42 ilustra a utilização da TM como um padrão de correção do EOF na análise de Na⁺ e K⁺ em amostra de clara de ovo, utilizando Li⁺ como padrão interno. A análise desse tipo de amostra encontra alguns problemas relacionados à grande quantidade de proteínas, no caso a albumina, que é adsorvida pela parede do capilar. Nesse experimento, para um capilar previamente lavado com NaOH 1 mol L⁻¹ e após condicionamento com o eletrólito de corrida, a mobilidade do EOF medida foi de $27 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, enquanto que após 11 corridas ela decaiu para $5,5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, ou seja, houve queda de 80% no valor do EOF.

Dois marcadores térmicos foram posicionados a 4,2 e 7,2 cm do detector. Nas primeiras 6 corridas, o marcador foi disparado no momento em que se iniciava a corrida eletroforética e as TMs eram registradas anteriormente aos analitos. A partir da sétima corrida, os picos dos analitos e da TM começaram a se sobrepor devido ao decréscimo na mobilidade do EOF. Assim, as TMs passaram a ser acionadas

após 180 s após início da corrida e as TMs passaram então a ser registradas após os sinais dos analitos. Esse exemplo ilustra novamente a flexibilidade no uso da TM, uma vez que é possível controlar o momento em que se deseja gerar sinais de marcação.

A figura 42-B apresenta as mobilidades corrigidas do K^+ , Na^+ e Li^+ para várias corridas. Os valores corrigidos foram obtidos através da subtração da mobilidade aparente de cada espécie pela mobilidade da TM para cada corrida (equação 34). O baixo desvio padrão relativo obtido para as mobilidades corrigidas (menor que 1%) sugerem que a identificação dos picos dos analitos dentre os diversos eletroferogramas pode ser feito com confiança.

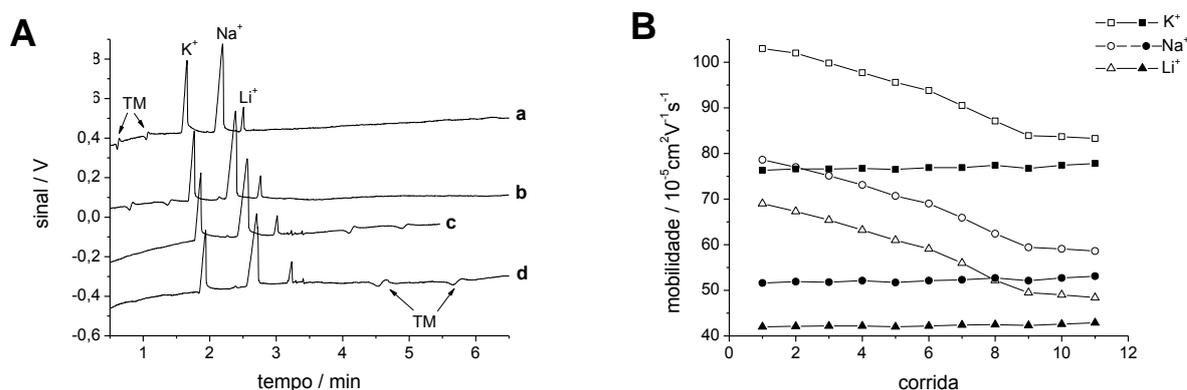


Figura 42. Eletroferogramas de amostra de clara de ovo: **a**, **b**, **c** e **d** são, respectivamente, a 2ª, 5ª, 7ª e 9ª corrida consecutiva. Capilar: 75 μm i.d., 553 cm de comprimento total, 46,2 cm efetivo. Marcadores térmicos posicionados a 4,2 cm e 7,2 cm do detector. Eletrólito de corrida: MES/His 20 mmol L^{-1} (pH 6.0). Potencial de corrida: +25 kV. Amostra: clara de ovo diluída (30 vezes, após centrifugação a 10000 rpm por 5 min) com LiNO_3 333 $\mu\text{mol L}^{-1}$ como padrão interno. Injeção: hidrodinâmica por 3s e 10 $\text{cm}^3 \text{H}_2\text{O}$. B – Evolução das mobilidades aparente (símbolos abertos) e corrigida (símbolos fechados) de K^+ , Na^+ , e Li^+ em eletroferogramas consecutivos de clara de ovo.

6.3.3. Avaliação da resposta de um C^4D

Em CE- C^4D , para cada eletrólito de corrida e diâmetros de capilar diferentes, a amplitude e a frequência do sinal do detector devem ser otimizadas. Entretanto, essa otimização muitas vezes é um trabalho árduo e com consumo considerável de

tempo, já que a realização desta tarefa consiste na execução de uma série de injeções de uma espécie qualquer, registrando seu sinal utilizando amplitude e frequência do C⁴D distintas. A utilização das TMs em substituição à injeção de uma espécie implica em praticidade e economia de tempo, uma vez que os marcadores podem ser posicionados bem próximos ao detector.

A figura 43 ilustra a otimização dos parâmetros de detecção do C⁴D, na qual foi avaliado o melhor sinal de potencial e frequência aplicado entre os eletrodos do detector, utilizando capilar de sílica fundida de 75 µm de diâmetro interno e solução 20 mmol L⁻¹ de MES/His (pH 6,0). Nesse caso, o sinal mais intenso foi registrado utilizando 8 Vpp e 450 kHz.

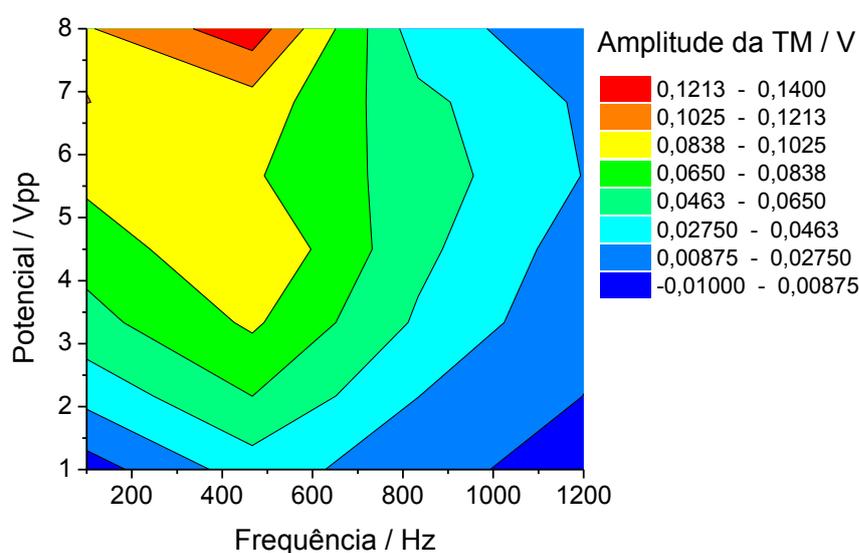


Figura 43. Intensidade do sinal das TMs em função do sinal do C⁴D. Condições experimentais: MES/His 20 mmol L⁻¹. Capilar de sílica fundida de 75 µm d.i.

6.3.4. Estudo sobre a estabilidade de revestimentos de CTAB e DDAB sobre a superfície de capilares de sílica

As análises de ânions em eletroforese capilar são geralmente conduzidas com EOF invertido. Para isso, tensoativos são frequentemente utilizados, os quais,

após adsorção na parede do capilar, conferem carga positiva a ela. Um dos tensoativos mais utilizados é o CTAB. Mais recentemente, o DDAB também passou a ser utilizado. Na figura 44, encontram-se as fórmulas estruturais desses dois compostos.

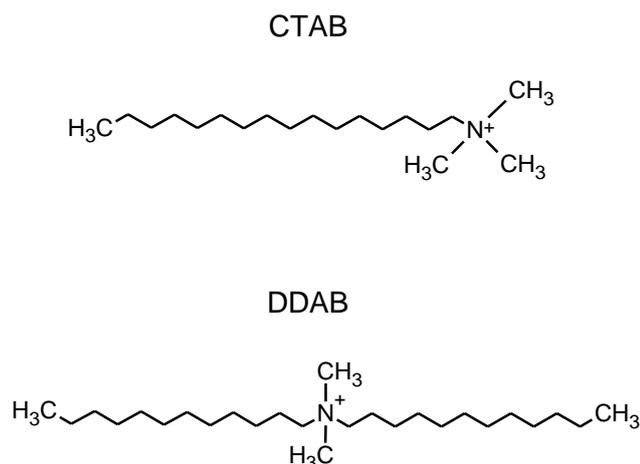


Figura 44. Estruras químicas do CTAB e DDAB.

Nesta etapa do trabalho, foi estudada a cinética de adsorção e a estabilidade do recobrimento desses dois tensoativos. Primeiramente, o capilar foi condicionado apenas com o eletrólito 20 mmol L⁻¹ MES/Na (pH 6,1). Nessa etapa, o EOF foi monitorado utilizando TMs. Após estabilização do EOF, o capilar foi preenchido com o eletrólito contendo um dos tensoativos, diluído no tampão MES/Na e voltou-se a monitorar o EOF, cujos registros da mobilidade em função do tempo para cada um dos tensoativos são mostrados na figura 45. Essa etapa foi denominada como adsorção do tensoativo. Comparando-se os dois casos, percebe-se que a adsorção do DDAB atinge o equilíbrio em tempos mais curtos que o CTAB. Enquanto o primeiro se estabiliza quase que imediatamente após a introdução do tensoativo, o segundo levou quase 4 horas para atingir o equilíbrio.

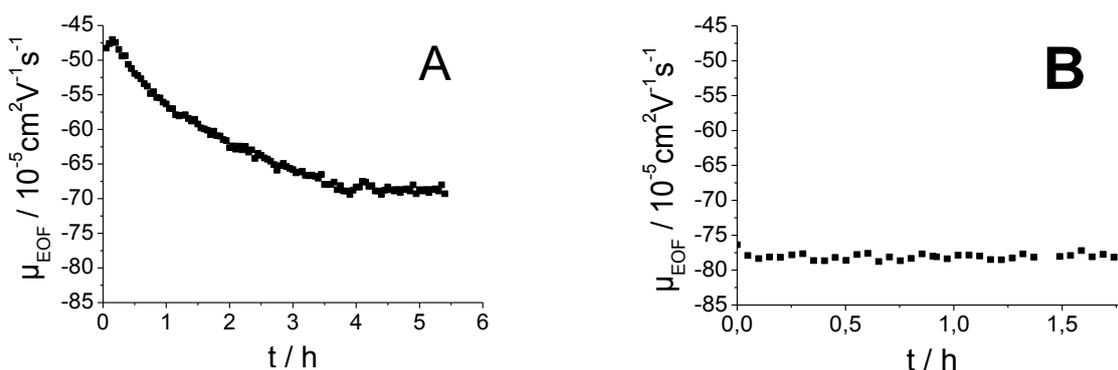


Figura 45. Efeito da adsorção de CTAB (A) e DDAB (B) sobre a superfície do capilar. Tampão MES/Na 20 mmol L^{-1} (pH 6,1) contendo $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de CTAB ou DDAB; $25 \text{ }^\circ\text{C}$; -20 kV .

A figura 46 mostra a etapa de desorção dos tensoativos. Nesse caso, os tensoativos foram retirados do eletrólito de corrida, ou seja, o capilar foi preenchido com uma solução contendo apenas o tampão MES/Na. O gráfico da figura 46-A mostra a reversão do EOF para o sentido normal (do ânodo para o cátodo) na ausência de CTAB, fato que não ocorre quando o capilar foi previamente condicionado com DDAB (figura 46-B). Esses resultados mostram que o recobrimento de DDAB é mais estável que o de CTAB, pois esse último é facilmente removido do capilar.

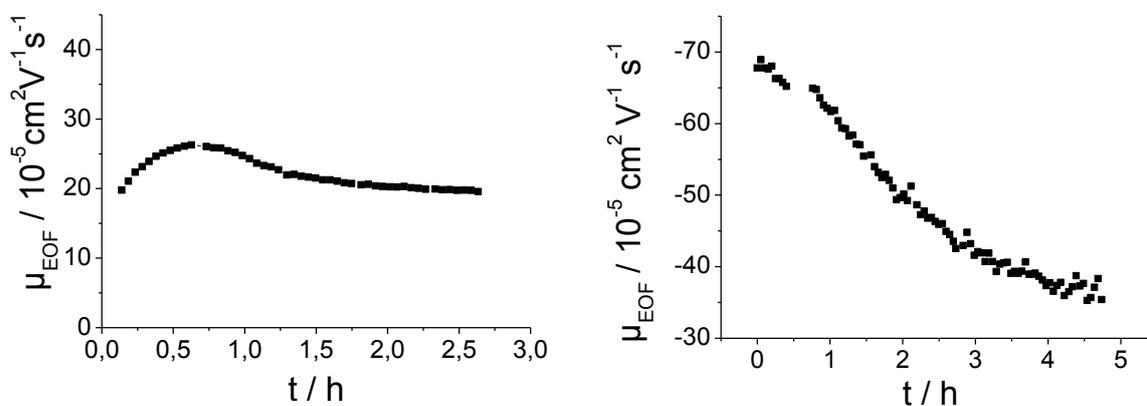


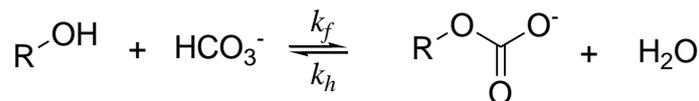
Figura 46. Estabilidade do CTAB (A) e do DDAB (B) após dessorção sobre o capilar de sílica fundida. Tampão MES/Na 20 mmol L⁻¹ (pH 6,1) contendo 0,2 mmol L⁻¹ de CTAB ou DDAB; 25 °C; -20 kV.

Lucy e colaboradores estudaram previamente a utilização desses dois tensoativos como inversores de EOF [46]. Em um dos trabalhos, são mostradas imagens de AFM do recobrimento de ambos os compostos sobre lâminas de sílica que revelam maior uniformidade no recobrimento de DDAB, que está relacionado à forma de agregação dessas estruturas; o CTAB forma estruturas micelares, enquanto o DDAB forma bicamadas, fato que explicaria a maior estabilidade do recobrimento de DDAB frente ao CTAB.

6.3.5. Medida da mobilidade do EOF para determinação de constantes físico-químicas de monoalquilcarbonatos

Essa etapa do trabalho foi fruto de uma parceria com o aluno de doutorado Denis Tadeu Rajh Vidal. O objetivo desse trabalho foi estudar algumas propriedades dos monoalquilcarbonatos (MAC) em meio aquoso utilizando a eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato [98].

Os monoalquilcarbonatos podem ser formados através da reação de um álcool com bicarbonato (esquema 1). Devido ao fato dessas espécies reagirem prontamente com água no sentido da formação do álcool correspondente, trabalhos reportando MACs em meio aquoso são escassos na literatura. Richardson e colaboradores reportaram a formação do monoetilcarbonato na presença de água durante um estudo por RMN de carbono 13 sobre o mecanismo da ativação do peróxido de hidrogênio por bicarbonato [99].



Esquema 1. Formação do monoalquicarbonato

A presença de bicarbonato e um dos diversos tipos de álcoois é frequente em vários tipos de ambientes, como em alimentos, no meio ambiente e até no corpo humano, revelando a importância no estudo dessas espécies. Constantes físico-químicas dessas espécies são raramente relatadas na literatura e, em alguns casos, sob condições não predominantemente aquosas [99-102].

Acidez dos MACs

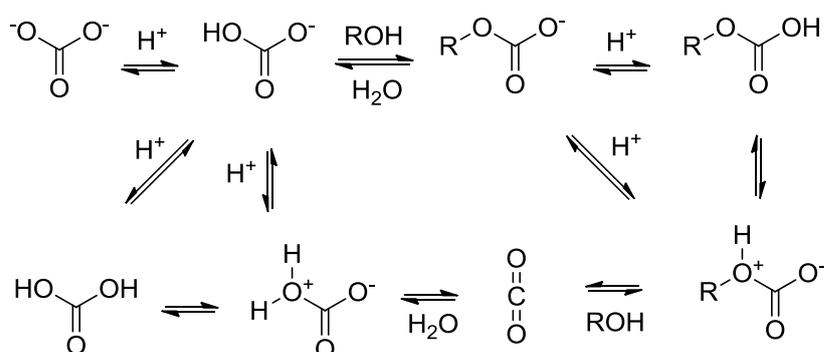
Diversos trabalhos na literatura reportam a utilização da eletroforese capilar para a determinação de pK_a de ácidos e bases [103, 104]. A estratégia consiste em medir a mobilidade efetiva da espécie de interesse utilizando eletrólitos com diferentes valores de pH que englobem o real valor do pK_a a ser determinado. A determinação do pK_a pode, então, ser obtida matematicamente através do ajuste da função expressa na equação 35 que relaciona a mobilidade efetiva com o pH:

$$\log\left(\frac{\mu_{pH}}{\mu_A - \mu_{pH}}\right) = \text{pH} - pK_a \quad \text{Equação 35}$$

onde μ_A é a mobilidade do ânion totalmente dissociado e μ_{pH} é a mobilidade efetiva da espécie em um pH específico. Utilizando essa função, o pK_a corresponde ao ponto de inflexão da curva.

Embora o pK_a de diversos ácidos possa ser obtido dessa maneira, a aplicação dessa metodologia para os MACs não é muito trivial, uma vez que a decomposição dessas espécies é catalisada em meio ácido. Assim, ocorre uma limitação em

relação ao pH das soluções utilizadas, pois não é possível observar nenhum pico correspondente aos MACs nos eletroferogramas em pHs muito baixos. O esquema 2 mostra as diferentes reações que ocorrem com os MACs em função do pH do meio.



Esquema 2. Protonação e decomposição do MAC.

As figuras 47-A e 47-B apresentam, respectivamente, os valores de mobilidade obtidos para o monometilcarbonato (MMC) e o monopropilcarbonato (MPC) na faixa de pH entre 4,5 e 9,0 (pontos) e as curvas simuladas para $pK_a = 3,0$ (linha sólida) e 5,7 (linha pontilhada). Abaixo de pH 4,5 não foi possível observar os picos do MMC e do MPC, devido à sua decomposição. Os resultados mostram que praticamente não houve variação nas mobilidades nessa faixa de pH, sugerindo que o pK_a dessas espécies está abaixo de 4,5.

O primeiro relato da determinação de pK_a de um MAC surgiu com Gattow e Beherendt, que determinaram o pK_a do monometilcarbonato de sódio através de hidrólise, obtendo o valor de 5,6 a 25 °C [101]. Entretanto, esse é apenas um valor aparente, devido à decomposição do ácido. Eckert obteve pK_a de 5,7 em álcool anidro, no entanto, esse meio tende a diminuir a acidez [102].

Embora não tenha sido possível calcular um valor exato esses resultados apontam na mesma direção daqueles encontrados na literatura, corroborando-os experimentalmente.

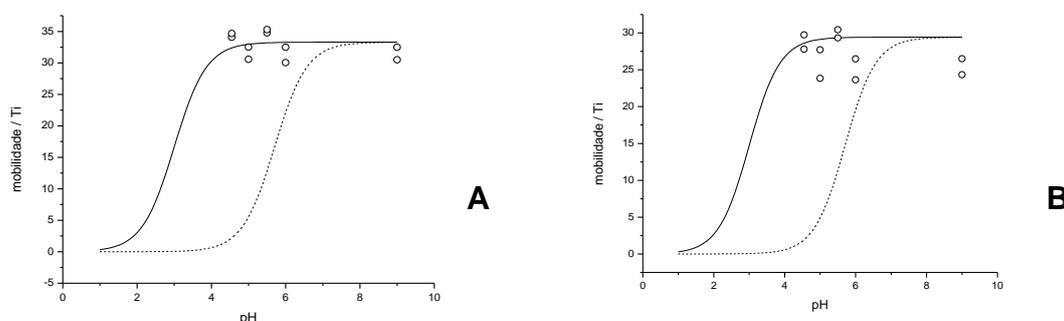


Figura 47. Mobilidade efetiva do (A) monoetil e (B) monopropil carbonatos em diferentes valores de pH, a 20°C. Para efeito de comparação, são mostradas as curvas simuladas para $pK_a = 3,0$ (sólido) e $5,7$ (pontilhado).

Mobilidade iônica, constante de difusão e raio hidrodinâmico

O parâmetro primordial obtido através da eletroforese capilar com detecção condutométrica que serve como base para o cálculo das outras constantes é a mobilidade iônica, que pode ser calculada através da equação 34.

Considerando que os pK_a dos MACs está abaixo de 7, pode-se concluir que em solução de bicarbonato de sódio 10 mmol L^{-1} (pH 8,3) eles estão completamente dissociados e que são espécies monovalentes. Logo, o coeficiente de difusão (D) dos íons pode ser obtido através da relação de Einstein:

$$D = \frac{\mu RT}{zF} \quad \text{Equação 36}$$

onde R é a constante universal dos gases, T é a temperatura absoluta, z a carga do íon e F é a constante de Faraday.

O raio hidrodinâmico das espécies pode ser calculado através da equação de Einstein-Stokes:

$$r = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}$$

Equação 37

onde k_B é a constante de Boltzmann e η a viscosidade da solução.

As figuras 48 e 49 mostram eletroferogramas de monopropilcarbonato (MPC) e monoisopropilcarbonato (MIPC), respectivamente, obtidos através da reação de propanol e isopropanol com bicarbonato, respectivamente. Acetato $150 \mu\text{mol L}^{-1}$, propionato $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ e MES $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ foram utilizados como padrão interno.

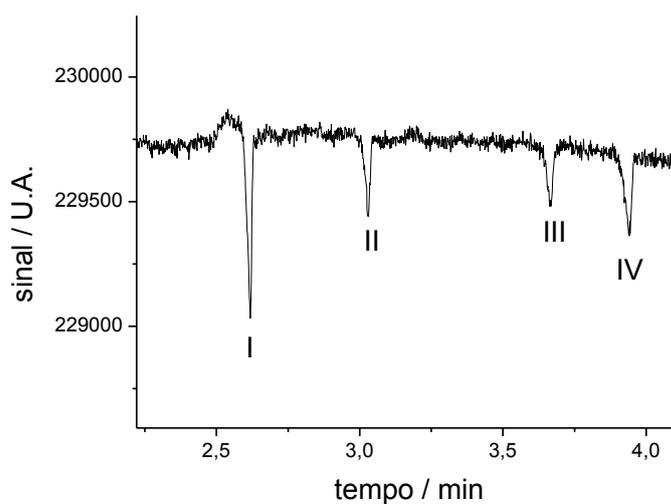


Figura 48. Eletroferograma de monopropilcarbonato. Picos: (I) MES, (II) MPC, (III) propionato, (IV) acetato. Condições experimentais: eletrólito de corrida: NaHCO_3 10 mmol L^{-1} (pH 8,3); capilar de sílica: $50 \mu\text{m}$ d.i., 50 cm de comprimento (40 cm efetivos); $+30 \text{ kV}$; $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

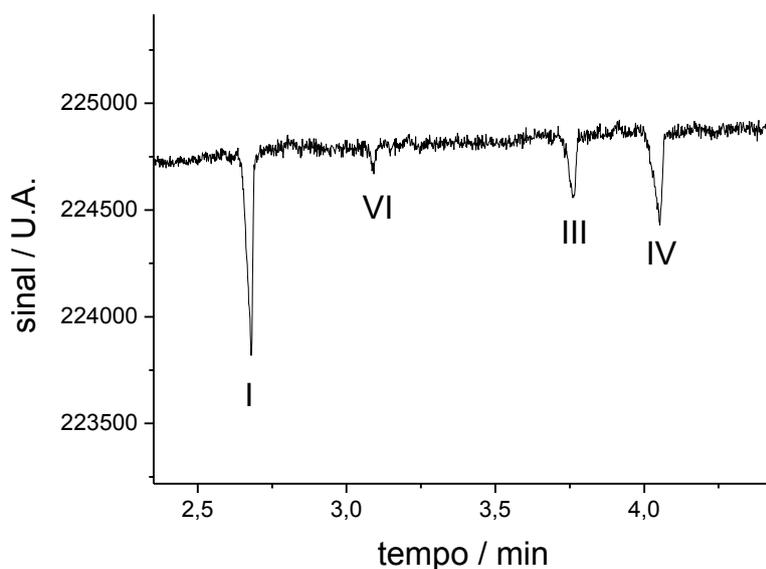


Figura 49. Eletroferograma de monoisopropilcarbonato (B). Picos: (I) MES, (III) propionato, (IV) acetato, (VI) MIPC. Condições experimentais: eletrólito de corrida: NaHCO_3 10 mmol L^{-1} (pH 8,3); capilar de sílica: $50 \mu\text{m}$ d.i., 50 cm de comprimento (40 cm efetivos); $+30 \text{ kV}$; $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Utilizando as TMs para obtenção do EOF, foi possível calcular a mobilidade do MPC e do MIPC e, conseqüentemente, os valores de coeficiente de difusão e raio hidrodinâmico para essas espécies, os quais são mostrados na tabela 3. A utilização dos marcadores térmicos para cálculo do EOF foi, nesse caso, adequada, conforme mostram os dados da tabela 2, que revelam uma diferença de apenas 0,1% entre os valores de mobilidade de EOF calculados utilizando o pico da água e da TM.

Tabela 3. Constantes físico-químicas de alguns MACs a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

MAC	Mobilidade iônica ($10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	Coefficiente de difusão ($10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)	Raio hidrodinâmico (μm)
MPC	36,20 (0,07)	9,25 (0,02)	263,5 (0,2)
MIPC	35,90 (0,10)	9,22 (0,01)	265,7 (0,5)

6.3.6. Utilização das TMs no estudo da mobilidade iônica do íon hidrônio

Essa etapa do trabalho fez parte de um estudo sobre a mobilidade do íon hidrônio em meio aquoso, utilizando eletroforese capilar com detecção

condutométrica sem contato. Esse estudo só foi possível devido à utilização do sistema de eletrólise separada descrito na seção 3.1.3, que permitiu o emprego de eletrólitos de corrida não tamponados. Novamente, as TMs tiveram o papel na medida do EOF, possibilitando assim o cálculo das mobilidades iônicas da espécie de interesse.

A figura 50 mostra a influência de bases fracas sobre a migração do íon hidrônio. Tanto o cloroacetato (base negativamente carregada) quanto a o-fenantrolina (base neutra) retardou a mobilidade do íon hidrônio. Esse comportamento pode ser explicado considerando o equilíbrio dinâmico de dissociação do íon hidrônio: o H^+ livre (dissociado) tem mobilidade maior que sua base protonada. Quanto maior a força da base, o íon H^+ estará preferencialmente na sua forma associada. Dessa forma, o íon hidrônio é menos retardado pelo cloroacetato ($pK_b = 11,1$) devido ao fato dele ser uma base mais fraca que a o-fenantrolina ($pK_b = 9,1$). Assim, é possível observar que o efeito da o-fenantrolina na redução da mobilidade do íon hidrônio é dez vezes maior se comparado ao cloroacetato.

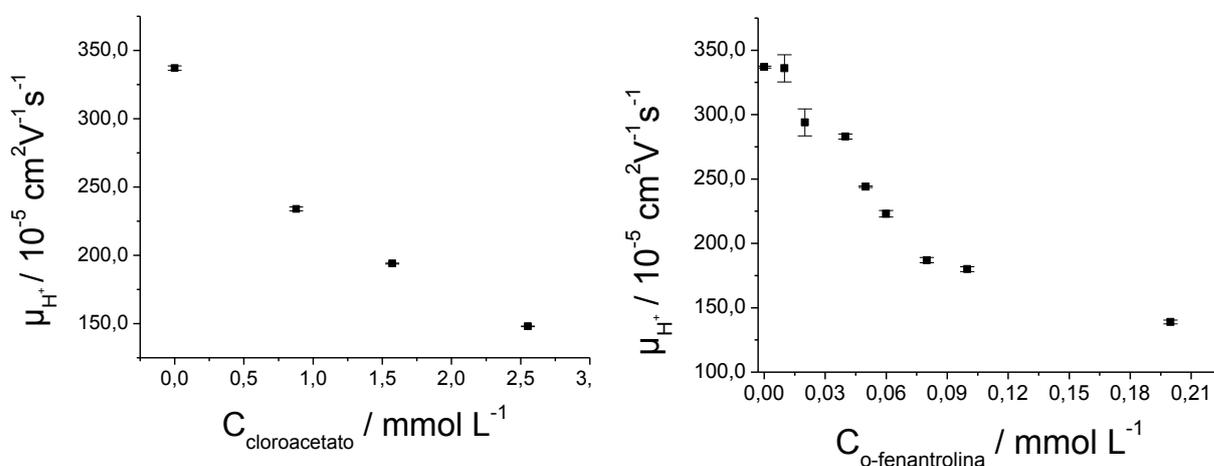


Figura 50. Efeito do cloroacetato e da o-fenantrolina na mobilidade do íon hidrônio em solução aquosa ($\text{LiCl } 10 \text{ mmol L}^{-1}$, $\text{pH } 5,0$, $26 \text{ }^\circ\text{C}$).

Em seguida, foi feito um estudo sobre a mobilidade do íon hidrônio na presença de deutério. A figura 51 apresenta o eletroferograma de uma amostra contendo H^+ e Cs^+ utilizando como eletrólito de corrida solução de LiCl preparada a partir de uma mistura de água e óxido de deutério. No primeiro detector, observam-se dois picos positivos relativos aos íons H^+ e Cs^+ , conforme esperado. No segundo detector, são observados dois picos adicionais referentes a TMs.

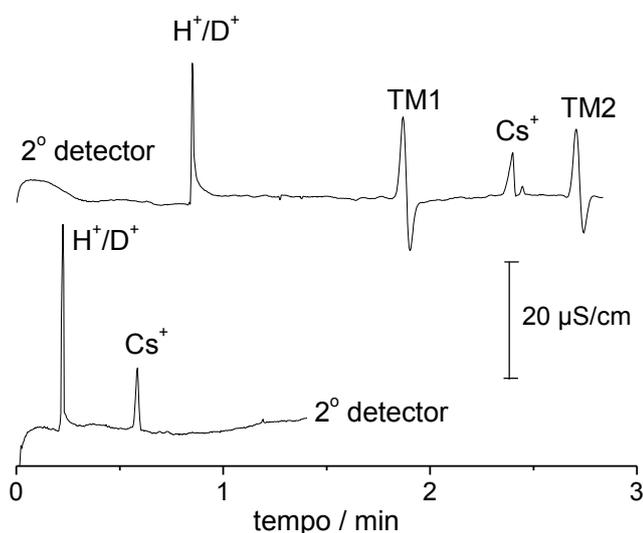


Figura 51. Eletroferogramas de Cs_2SO_4 $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ e HCl $90 \mu\text{mol L}^{-1}$ em LiCl 10 mmol L^{-1} como eletrólito de corrida (pH 4,95), utilizando mistura de $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 (v/v) como solvente. Potencial de corrida: +15 kV. As TMs ($tm1$ e $tm2$) foram registrados somente no segundo detector, considerando a posição do marcador térmico e a direção do EOF.

Considerando o campo elétrico aplicado, as distâncias entre os detectores e os marcadores térmicos, foi possível calcular a mobilidade das espécies utilizando a equação 34. Nesse caso, a mobilidade do EOF foi $38,4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Quando somente água foi utilizada como solvente, os valores de mobilidade ($\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) obtidos foram 306 ± 2 para o hidrônio e $75,1 \pm 0,3$ para o íon céσιο. Entretanto, quando o solvente utilizado foi uma mistura $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1 v/v), as

mobilidades calculadas caíram para $289,6 \pm 0,5$ para o hidrônio e $74,4 \pm 0,3$ para o céσιο. A pequena variação da mobilidade do céσιο pode ser explicada por alterações da viscosidade do meio e na solvatação. No entanto, a variação de 5% na mobilidade do H^+ foi bem mais significativa.

A significativa redução na mobilidade do hidrônio se deve ao mecanismo diferenciado de migração desse íon frente aos demais, que são conduzidos segundo o modelo stokesiano, que considera a carga, o tamanho do íon e as propriedades do solvente (equação 11). Existem diversas teorias que explicam a altíssima mobilidade do íon hidrônio em meio aquoso. O modelo mais utilizado para explicar tal fenômeno é o mecanismo de Grotthuss [105], também chamado de mecanismo de “difusão estrutural” para diferenciar da “difusão hidrodinâmica”, que descreve a migração dos demais íons em meio aquoso. Segundo esse mecanismo, o próton é capaz de se transportar de uma molécula de água para outra, através do rearranjo das ligações de hidrogênio e da reorientação das moléculas de água.

Teoria mais recente propõe que a condução de prótons ocorre como resultado da isomerização entre as estruturas de Zundel e Eigen [106-108]. Nesse caso, a espécie estável $H_3O(3H_2O)^+$ (estrutura de Eigen) é convertida em $H_2O-H-OH_2^+$ (estrutura de Zundel), que depois é novamente convertida na estrutura de Eigen. Esse mecanismo é chamado de Eigen-Zundel-Eigen (EZE). Além disso, ocorrem outras transferências de ligações de hidrogênio que não foram citadas, formando estruturas ainda mais complexas. O resultado é a propagação do próton no sentido do campo elétrico.

6.4. Conclusões Parciais

As TMs mostraram-se eficientes na correção de variações nos tempos de migração dos analitos devido a alterações no EOF entre corridas, que é particularmente interessante quando espécies que adsorvem no capilar estão presentes na amostra. A versatilidade na introdução dos picos nos eletroferogramas torna a TM vantajosa frente à utilização de um padrão interno, cuja escolha pode ser muitas vezes árdua, principalmente se a amostra for complexa.

A praticidade e rapidez em sua geração tornam as TM eficientes para caracterizações do EOF e para otimização de um C⁴D. Dentro desse contexto, o estudo sobre alguns inversores de EOF revelou que o DDAB é mais eficiente que o CTAB, devido ao fato de formar um recobrimento mais estável e com tempo de condicionamento mais curto. Esse fato possibilita que o DDAB seja utilizado somente na etapa de pré-condicionamento, não necessitando estar presente no eletrólito de corrida, reduzindo problemas de interação da amostra com o tensoativo.

O cálculo da mobilidade do EOF utilizando TMs possibilitou a determinação de diversas constantes físico-químicas de MACs. Embora não tenha sido possível a determinação exata do pK_a do MEC e do MPC, seu valor foi estimado como sendo menor que 4,0.

Finalmente, a determinação da mobilidade do EOF utilizando TM possibilitou o estudo sobre a condução de íons H⁺ em meio aquoso utilizando CE-C⁴D, que teve o propósito de: (i) introduzir uma técnica não espectroscópica para avaliar o comportamento na mobilidade dos íons hidrônio e deutério em meio aquoso e (ii) fornecer uma prova de conceito para a determinação isotópica da água utilizando uma técnica eletroforética, embora estudos mais elaborados necessitem ser posteriormente executados.

Capítulo 7

Conclusões e Perspectivas

7. Conclusões e Perspectivas

Devido à sua simplicidade, marcadores térmicos podem facilmente ser implementados em equipamentos de eletroforese capilar e ser utilizados como marcadores de EOF. Alguns modelos de marcadores foram propostos no presente trabalho, dentre os quais aquele baseado em resistor SMD foi o que se mostrou mais adequado devido à sua facilidade de construção, robustez, baixo custo e desempenho. Embora, nesse trabalho, tenham sido mostradas TMs utilizando apenas a detecção condutométrica sem contato, em teoria qualquer tipo de detecção universal poderia ter sido empregada, como detecção UV/Vis indireta, por exemplo.

O modelo escolhido para explicar o surgimento das TMs se baseou na formação de uma zona com composição distinta oriunda de uma alteração diferenciada no número de transporte do cátion e do ânion que compõe a solução, que é provocada pelo aumento de temperatura sob a ação do campo elétrico. Isso faz com que a velocidade relativa das espécies seja diferente em um curto período de tempo e assim uma pequena região do capilar adquira composição ligeiramente diferente do restante da solução, que migra impulsionada pelo EOF até o detector, como se fosse um *plug* de amostra. Da mesma forma que outras estratégias que provocam uma perturbação que se propaga até o detector, a mobilidade da TM não é exatamente igual à do EOF. No entanto, em muitos casos, ela fornece uma boa estimativa do valor. Além disso, como regra geral, ela pode ser utilizada para monitorar ou compensar variações do EOF no tempo de migração dos analitos.

A injeção térmica demonstrou potencial como nova estratégia de análise em eletroforese capilar, que seria vantajosa principalmente para sistemas microfluídicos, no qual o processo de substituição das amostras é mais fácil em relação aos

equipamentos de CE convencionais e onde se enfrentam problemas de *leakage*. Para solução de NaCl, a resposta apresentou extensa faixa de resposta linear (entre $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ e 1mmol L^{-1} com $R = 0,9975$ para $N = 11$). No entanto, um dos obstáculos enfrentados foi o problema de interferentes sobre a sensibilidade e a mobilidade do analito. Conforme mencionado anteriormente, uma forma de se contornar esse problema seria a geração de TMs mais sutis, em que as diferenças de concentrações fossem menores. Assim, a pesquisa de diferentes sistemas químicos, bem como a elaboração de estratégias quimiométricas e/ou instrumentais para aumento de sensibilidade poderiam ser mencionadas como perspectivas para essa etapa do trabalho.

Além disso, a injeção térmica mostrou-se como uma boa alternativa à injeção opticamente ativada para realização de técnicas multiplexadas para aumento da relação sinal/ruído. Embora o modelamento matemático para deconvolução de picos tenha sido capaz de decodificar as informações das múltiplas injeções sobrepostas, não foi possível observar um aumento apreciável na relação sinal/ruído devido a uma limitação temporal que tornaria proibitivo o tempo de análise. Dessa forma, o conceito de injeção térmica foi introduzido. Entretanto, uma limitação instrumental impediu o sucesso analítico dessa nova estratégia de realização de experimento em CE. Assim, novas estratégias para marcações térmicas rápidas se mostram essenciais para o sucesso da injeção térmica.

O monitoramento de variações do EOF mostrou-se bastante adequado para a técnica em questão, uma vez que existe uma grande flexibilidade quanto ao número de marcações e ao local do eletroferograma que os marcadores podem ser posicionados, além de não ser necessário interromper a corrida. Ao longo dos anos, a eletroforese capilar vem se mostrando não somente uma técnica de separação

para identificação e quantificação, mas também uma poderosa ferramenta de análise para obtenção de parâmetros físico-químicos, como pK_a de ácidos e bases e mobilidade, constante de difusão e raio hidrodinâmico [98, 109-115]. Dentro desse contexto, uma vez que as TMs possibilitam compensar o efeito do EOF sobre a velocidade das espécies de interesse, elas encontram ampla perspectiva de aplicação nessa área.

Capítulo 8

Referências Bibliográficas

8. Referências Bibliográficas

1. TISELIUS, A. **Nova Acta Regiae Societatis Scientiarum Uppsaliensis**, Ser. IV. v. 7, p. 1-107, 1930. Apud TAVARES, M. F. M. **Química Nova**, v. 19, p. 173-181, 1996.
2. TISELIUS, A. **Transactions of the Faraday Society**, v. 33, n. 524. Apud TAVARES, M. F. M. **Química Nova**, v. 19, p. 173-181, 1996.
3. HJERTÉN, S. Free zone electrophoresis. **Chromatographic Reviews**, v. 9, n. 122-219, 1967.
4. VIRTANEN, R. Zone Electrophoresis in a Narrow-Bore Tube Employing Potentiometric Detection - Theoretical and Experimental Study. **Acta Polytechnica Scandinavica-Chemical Technology Series**, v. 123, p. 1-67. Apud TAVARES, M. F. M. **Química Nova**, v. 19, p. 173-181, 1996.
5. MIKKERS, F.E.P.; EVERAERTS, F.M.; VERHEGGEN, T.P.E.M. Concentration Distributions in Free Zone Electrophoresis. **Journal of Chromatography**, v. 169, n. Feb, p. 1-10, 1979.
6. JORGENSON, J.W.; LUKACS, K.D. Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass-Capillaries. **Analytical Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 1298-1302, 1981.
7. TERABE, S. et al. Electrokinetic Separations with Micellar Solutions and Open-Tubular Capillaries. **Analytical Chemistry**, v. 56, n. 1, p. 111-113, 1984.
8. COHEN, A.S.; KARGER, B.L. High-Performance Sodium Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide-Gel Capillary Electrophoresis of Peptides and Proteins. **Journal of Chromatography**, v. 397, n. 409-417, 1987.
9. COHEN, A.S.; PAULUS, A.; KARGER, B.L. High-Performance Capillary Electrophoresis Using Open Tubes and Gels. **Chromatographia**, v. 24, n. 15-24, 1987.
10. LANDER, E.S. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 860-921, 2001.
11. VENTER, J.C. et al. The sequence of the human genome. **Science**, v. 291, n. 5507, p. 1304-+, 2001.
12. COLLINS, F.S. et al. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. **Nature**, v. 431, n. 7011, p. 931-945, 2004.
13. DA SILVA, J.A.F. et al. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 740-744, 2007.
14. TAVARES, M.F.M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.
15. TAVARES, M.F.M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1996.
16. RAMAUTAR, R. et al. CE-MS for metabolomics: Developments and applications in the period 2008-2010. **Electrophoresis**, v. 32, n. 1, p. 52-65, 2011.
17. OH, E. et al. Growing trend of CE at the omics level: The frontier of systems biology. **Electrophoresis**, v. 31, n. 1, p. 74-92, 2010.
18. HOU, C.; HERR, A.E. Clinically relevant advances in on-chip affinity-based electrophoresis and electrochromatography. **Electrophoresis**, v. 29, n. 16, p. 3306-3319, 2008.

19. HERRERO, M. et al. Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis and Foodomics. **Electrophoresis**, v. 31, n. 1, p. 205-228, 2010.
20. ROBLEDO, V.R.; SMYTH, W.F. The application of CE-MS in the trace analysis of environmental pollutants and food contaminants. **Electrophoresis**, v. 30, n. 10, p. 1647-1660, 2009.
21. GARCIA-CAMPANA, A.M. et al. Applications of capillary electrophoresis to the determination of antibiotics in food and environmental samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, n. 4, p. 967-986, 2009.
22. FROST, N.W.; JING, M.; BOWSER, M.T. Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 12, p. 4682-4698, 2010.
23. AUROUX, P.A. et al. Micro total analysis systems. 2. Analytical standard operations and applications. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 12, p. 2637-2652, 2002.
24. MANZ, A.; GRABER, N.; WIDMER, H.M. Miniaturized Total Chemical-Analysis Systems - a Novel Concept for Chemical Sensing. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 1, n. 1-6, p. 244-248, 1990.
25. REYES, D.R. et al. Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 12, p. 2623-2636, 2002.
26. DA SILVA, J.A.F.; DO LAGO, C.L. An oscillometric detector for capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 20, p. 4339-4343, 1998.
27. ZEMANN, A.J. et al. Contactless conductivity detection for capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 3, p. 563-567, 1998.
28. KUBAN, P.; HAUSER, P.C. Ten years of axial capacitively coupled contactless conductivity detection for CZE - a review. **Electrophoresis**, v. 30, n. 1, p. 176-188, 2009.
29. KUBAN, P.; HAUSER, P.C. A review of the recent achievements in capacitively coupled contactless conductivity detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 607, n. 1, p. 15-29, 2008.
30. Edaq. Disponível em: <http://www.edaq.com/C4D_intro.php>. Acesso em: 26 mai. 2011.
31. TraceDec[®] Contactless Conductivity Detector . Disponível em: <<http://www.istech.at/product.htm>> . Acesso em: 26 mai. 2011.
32. Open Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detector - openC4D. 2011.
33. BRITO-NETO, J.G.A. et al. Understanding capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary and microchip electrophoresis. Part 1. Fundamentals. **Electroanalysis**, v. 17, n. 13, p. 1198-1206, 2005.
34. BRITO-NETO, J.G.A. et al. Understanding capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary and microchip electrophoresis. Part 2. Peak shape, stray capacitance, noise, and actual electronics. **Electroanalysis**, v. 17, n. 13, p. 1207-1214, 2005.
35. KENNDLER, E.; FRIEDL, W. Adjustment of Resolution and Analysis Time in Capillary Zone Electrophoresis by Varying the pH of the Buffer. **Journal of Chromatography**, v. 608, n. 1-2, p. 161-170, 1992.
36. Arduino. Disponível em: <<http://www.arduino.cc/>>. Acesso em: 28 set. 2009.
37. DO LAGO, C.L. et al. Monitoring the electroosmotic flow in capillary electrophoresis using contactless conductivity detection and thermal marks. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 1, p. 215-223, 2007.

38. SEIMAN, A.; VAHER, M.; KALJURAND, M. Monitoring of the electroosmotic flow of ionic liquid solutions in non-aqueous media using thermal marks. **Journal of Chromatography A**, v. 1189, n. 1-2, p. 266-273, 2008.
39. SEIMAN, A.; VAHER, M.; KALJURAND, M. Thermal marks as a signal processing aid for a portable capillary electropherograph. **Electrophoresis**, v. 32, n. 9, p. 1006-1014, 2011.
40. HARAKUWE, A.H.; HADDAD, P.R. Control of separation selectivity in capillary zone electrophoresis of inorganic anions. **Journal of Chromatography A**, v. 834, n. 1-2, p. 213-232, 1999.
41. LIU, C.Y. Stationary phases for capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. **Electrophoresis**, v. 22, n. 4, p. 612-628, 2001.
42. HORVATH, J.; DOLNIK, V. Polymer wall coatings for capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 22, n. 4, p. 644-655, 2001.
43. HAYES, M.A.; EWING, A.G. Electroosmotic Flow-Control and Monitoring with an Applied Radial Voltage for Capillary Zone Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 64, n. 5, p. 512-516, 1992.
44. CULBERTSON, C.T.; JORGENSON, J.W. Increasing the resolving power of capillary electrophoresis through electroosmotic flow control using radial fields. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 11, n. 3, p. 167-174, 1999.
45. TAVARES, M.F.M.; COLOMBARA, R.; MASSARO, S. Modified electroosmotic flow by cationic surfactant additives in capillary electrophoresis - Evaluation of electrolyte systems for anion analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 772, n. 1-2, p. 171-178, 1997.
46. BARYLA, N.E. et al. Characterization of surfactant coatings in capillary electrophoresis by atomic force microscopy. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 19, p. 4558-4565, 2001.
47. KATAYAMA, H.; ISHIHAMA, Y.; ASAKAWA, N. Stable cationic capillary coating with successive multiple ionic polymer layers for capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 24, p. 5272-5277, 1998.
48. HUANG, T.L. et al. Mechanistic Studies of Electroosmotic Control at the Capillary Solution Interface. **Analytical Chemistry**, v. 65, n. 20, p. 2887-2893, 1993.
49. SCHRUM, K.F. et al. Monitoring electroosmotic flow by periodic photobleaching of a dilute, neutral fluorophore. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 18, p. 4317-4321, 2000.
50. STCLAIRE, J.C.; HAYES, M.A. Heat index flow monitoring in capillaries with interferometric backscatter detection. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 19, p. 4726-4730, 2000.
51. PITTMAN, J.L.; SCHRUM, K.F.; GILMAN, S.D. On-line monitoring of electroosmotic flow for capillary electrophoretic separations. **Analyst**, v. 126, n. 8, p. 1240-1247, 2001.
52. MUZIKAR, J. et al. Determination of electroosmotic flow mobility with a pressure-mediated dual-ion technique for capillary electrophoresis with conductivity detection using organic solvents. **Journal of Chromatography A**, v. 960, n. 1-2, p. 199-208, 2002.
53. KIRBY, B.J.; HASSELBRINK, E.F. Zeta potential of microfluidic substrates: 2. Data for polymers. **Electrophoresis**, v. 25, n. 2, p. 203-213, 2004.
54. SZEKELY, L.; FREITAG, R. Module for real time non-invasive control of the electroosmotic flow in microfluidic systems. **Analytica Chimica Acta**, v. 539, n. 1-2, p. 165-171, 2005.

55. ZHOU, M.X.; FOLEY, J.P. Quantitative theory of electroosmotic flow in fused-silica capillaries using an extended site-dissociation-site-binding model. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 6, p. 1849-1858, 2006.
56. TAVARES, M.F.M.; MCGUFFIN, V.L. Theoretical-Model of Electroosmotic Flow for Capillary Zone Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 20, p. 3687-3696, 1995.
57. ERMAKOV, S.V.; CAPELLI, L.; RIGHETTI, P.G. Method for measuring very weak, residual electroosmotic flow in coated capillaries. **Journal of Chromatography A**, v. 744, n. 1-2, p. 55-61, 1996.
58. MAMMEN, M. et al. Treating electrostatic shielding at the surface of silica as discrete siloxide center dot cation interactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, n. 15, p. 3469-3476, 1997.
59. DEARIE, H.S. et al. Characterisation of electroosmotic flow in capillary electrochromatography columns. **Journal of Chromatography A**, v. 929, n. 1-2, p. 123-131, 2001.
60. WILLIAMS, B.A.; VIGH, C. Fast, accurate mobility determination method for capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 7, p. 1174-1180, 1996.
61. WANG, W. et al. Improved Current-Monitoring Method for Low Electroosmotic Flow Measurement in Modified Microchip. **Chromatographia**, v. 69, n. 9-10, p. 897-901, 2009.
62. DA SILVA, J.A.F. et al. Visible LED-Based Instrumentation for Photometric Determination of Electroosmotic Flow in Microchannels. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 4, p. 736-740, 2011.
63. GEBAUER, P.; BOCEK, P. System peaks in capillary zone electrophoresis .1. Simple model of vacancy electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 772, n. 1-2, p. 73-79, 1997.
64. DESIDERIO, C. et al. System peaks in capillary zone electrophoresis .2. Experimental study of vacancy peaks. **Journal of Chromatography A**, v. 772, n. 1-2, p. 81-89, 1997.
65. STEDRY, M. et al. Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: III Linear theory of electromigration. **Electrophoresis**, v. 25, n. 18-19, p. 3071-3079, 2004.
66. JAROS, M. et al. Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: IV. Computer program PeakMaster. **Electrophoresis**, v. 25, n. 18-19, p. 3080-3085, 2004.
67. STEDRY, M. et al. Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: II. Eigenpeaks in univalent weak electrolytes. **Electrophoresis**, v. 24, n. 3, p. 536-547, 2003.
68. BECKERS, J.L.; BOCEK, P. Multiple effect of surfactants used as additives in background electrolytes in capillary zone electrophoresis: Cetyltrimethylammonium bromide as example of model surfactant. **Electrophoresis**, v. 23, n. 12, p. 1947-1952, 2002.
69. DE JESUS, D.P. et al. Extending the lifetime of the running electrolyte in capillary electrophoresis by using additional compartments for external electrolysis. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 2, p. 607-614, 2005.
70. Group of electromigration separation processes. Disponível em: <<http://web.natur.cuni.cz/~gas/>>. Acesso em: 16 jun. 2011.
71. CE dsDNA 1000 Fluorescent Detection and Analysis Kit Instruction Manual. Disponível em:

- <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_9582.pdf>.
Acesso em: 13 jun. 2011.
72. HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**. 6 ed. Rio de Janeiro, RJ: LTC, 2005.
 73. CONWAY, B.E. **Electrochemical Data**. Netherlands: Elsevier, 1952.
 74. ERDEY-GRUZ, T. **Transport phenomena in aqueous solutions**. Londres: Adam Hilger, 1974.
 75. ATKINS, P.W. **Physical Chemistry**. 4 ed. Oxford: Oxford University Press, 1990.
 76. KENNDLER-BLACHKOLM, K. et al. Apparent baseline irregularities for neutral markers in capillary zone electrophoresis with electroosmotic flow. **Journal of Chromatography A**, v. 734, n. 2, p. 351-356, 1996.
 77. STOCKMAYER, W.H. Theory of Moving Concentration Boundaries. **Transactions of the New York Academy of Sciences**, v. 13, n. 7, p. 266-269, 1951.
 78. MONNIG, C.A.; JORGENSON, J.W. On-Column Sample Gating for High-Speed Capillary Zone Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 63, n. 8, p. 802-807, 1991.
 79. KENNEDY, R.T. Bioanalytical applications of fast capillary electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 400, n. 163-180, 1999.
 80. PITTMAN, J.L. et al. Optically gated vacancy electrophoresis in microfluidic devices. **Analytica Chimica Acta**, v. 496, n. 1-2, p. 195-204, 2003.
 81. TSAI, C.H. et al. Numerical simulation of electrokinetic injection techniques in capillary electrophoresis microchips. **Electrophoresis**, v. 26, n. 3, p. 674-686, 2005.
 82. KANETA, T. Hadamard transform capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 19, p. 540a-547a, 2001.
 83. BRAUN, K.L. et al. Fast Hadamard transform capillary electrophoresis for on-line, time-resolved chemical monitoring. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 5, p. 1628-1635, 2006.
 84. CRABTREE, H.J.; KOPP, M.U.; MANZ, A. Shah convolution Fourier transform detection. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 11, p. 2130-2138, 1999.
 85. GAO, L.; PATTERSON, E.E.; SHIPPY, S.A. Multiplexed detection of nitrate and nitrite for capillary electrophoresis with an automated device for high injection efficiency. **Analyst**, v. 131, n. 2, p. 222-228, 2006.
 86. GUCHARDI, R.; SCHWARZ, M.A. Modified Hadamard transform microchip electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 26, n. 16, p. 3151-3159, 2005.
 87. HATA, K.; KANETA, T.; IMASAKA, T. Hadamard transform capillary electrophoresis combined with laser-induced fluorometry using electrokinetic injection. **Analytica Chimica Acta**, v. 556, n. 1, p. 178-182, 2006.
 88. HATA, K. et al. Hadamard transform microchip electrophoresis combined with diode laser fluorometry. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 7, p. 1765-1768, 2003.
 89. KANETA, T.; YAMAGUCHI, Y.; IMASAKA, T. Hadamard transform capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 23, p. 5444-5446, 1999.
 90. KWOK, Y.C.; MANZ, A. Shah convolution Fourier transform detection: Multiple-sample injection technique. **Electrophoresis**, v. 22, n. 2, p. 222-229, 2001.
 91. KWOK, Y.C.; MANZ, A. Shah convolution differentiation Fourier transform for rear analysis in microchip capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 924, n. 1-2, p. 177-186, 2001.

92. McREYNOLDS, J.A.; EDIRISINGHE, P.; SHIPPY, S.A. Shah and sine convolution Fourier transform detection for microchannel electrophoresis with a charge coupled device. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 19, p. 5063-5070, 2002.
93. VANDER-MOOLEN, J.N.; POPPE, H.; SMIT, H.C. A micromachined injection device for CZE: Application to correlation CZE. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 20, p. 4220-4225, 1997.
94. FISTER, J.C.; JACOBSON, S.C.; RAMSEY, J.M. Ultrasensitive cross correlation electrophoresis on microchip devices. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 20, p. 4460-4464, 1999.
95. SCHIMPF, M.E.; SEMENOV, S.N. Cross-correlation continuous capillary electrophoresis: Resolution, processing time, and concentration effects. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 19, p. 5062-5070, 2003.
96. GAS, B.; KENNDLER, E. System zones in capillary zone electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 23-24, p. 3901-3912, 2004.
97. MIKKERS, F.E.P. Vacancy capillary zone electrophoresis and differential capillary zone electrophoresis: Variations on a well-known theme. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 3, p. 333-337, 1997.
98. VIDAL, D.T.R. et al. Investigating the formation and the properties of monoalkyl carbonates in aqueous medium using capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. **Electrophoresis**, v. 32, n. 8, p. 850-856, 2011.
99. RICHARDSON, D.E. et al. Equilibria, kinetics, and mechanism in the bicarbonate activation of hydrogen peroxide: Oxidation of sulfides by peroxymonocarbonate. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 122, n. 8, p. 1729-1739, 2000.
100. SAUERS, C.K.; JENCKS, W.P.; GROH, S. Alcohol-Bicarbonate-Water System - Structure-Reactivity Studies on Equilibria for Formation of Alkyl Monocarbonates and on Rates of Their Decomposition in Aqueous Alkali. **Journal of the American Chemical Society**, v. 97, n. 19, p. 5546-5553, 1975.
101. GATTOW, G.; BEHRENDT, W. Methyl Hydrogen Carbonate. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 11, n. 6, p. 534-&, 1972.
102. GOHRES, J.L. et al. Spectroscopic Investigation of Alkylcarbonic Acid Formation and Dissociation in CO₂-Expanded Alcohols. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 3, p. 1302-1306, 2009.
103. POOLE, S.K. et al. Determination of acid dissociation constants by capillary electrophoresis. **J. Chromatogr. A**, v. 1037, n. 1-2, p. 445-454, 2004.
104. VCELAKOVA, K. et al. Determination of cationic mobilities and pK(a) values of 22 amino acids by capillary zone electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 2, p. 309-317, 2004.
105. VON GROTHUSS, C.T.D. **Ann. Chim.**, v. LVIII, n. 54-74. *Apud* Gileadi, E., Kirowa-Eisner, E. *Electrochim. Acta* 51 (2006) 6003-6011., 1806.
106. AGMON, N. The Grotthuss Mechanism. **Chemical Physics Letters**, v. 244, n. 5-6, p. 456-462, 1995.
107. MARX, D. et al. The nature of the hydrated excess proton in water. **Nature**, v. 397, n. 6720, p. 601-604, 1999.
108. MARKOVITCH, O. et al. Special pair dance and partner selection: Elementary steps in proton transport in liquid water. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, n. 31, p. 9456-9466, 2008.

-
109. POSPICHAL, J.; GEBAUER, P.; BOCEK, P. Measurement of Mobilities and Dissociation-Constants by Capillary Isotachopheresis. **Chemical Reviews**, v. 89, n. 2, p. 419-430, 1989.
 110. HIROKAWA, T.; GOJO, T.; KISO, Y. Isotachophoretic Determination of Mobility and Pka by Means of Computer-Simulation .5. Evaluation of Mo and pK_a of 28 Dipeptides and Assessment of Separability. **Journal of Chromatography**, v. 390, n. 1, p. 201-223, 1987.
 111. HIROKAWA, T.; GOJO, T.; KISO, Y. Isotachophoretic Determination of Mobility and Pka by Means of Computer-Simulation .4. Evaluation of Mo and pK_a of 26 Amino-Acids and Assessment of the Separability. **Journal of Chromatography**, v. 369, n. 1, p. 59-81, 1986.
 112. HIROKAWA, T.; KOBAYASHI, S.; KISO, Y. Isotachophoretic Determination of Mobility and pK_a by Means of Computer-Simulation .3. Evaluation Mobility and pK_a of 15 Nucleotides and 7 Phosphorus Oxoacids and Their Isotachophoretic Separation. **Journal of Chromatography**, v. 318, n. 2, p. 195-210, 1985.
 113. POOLE, S.K. et al. Determination of acid dissociation constants by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1037, n. 1-2, p. 445-454, 2004.
 114. JIMENEZ-LOZANO, E. et al. Determination of $pK(a)$ values of quinolones from mobility and spectroscopic data obtained by capillary electrophoresis and a diode array detector. **Analytica Chimica Acta**, v. 464, n. 1, p. 37-45, 2002.
 115. ISHIHAMA, Y. et al. A rapid method for $pK(a)$ determination of drugs using pressure-assisted capillary electrophoresis with photodiode array detection in drug discovery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 4, p. 933-942, 2002.

Anexo

Súmula Curricular

Dados Pessoais

Renata Mayumi Saito

e-mail: rmsaito@iq.usp.br

Local e data de nascimento: São Paulo, 19 de novembro de 1979

Formação Acadêmica/Titulação

- 2007** Doutorado em Química (Química Analítica)
Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil
Título: Marcas térmicas em eletroforese capilar: fundamentos e aplicações
Orientador: Claudimir Lucio do Lago
Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
(07/2007 - 06/2011)
- 2005 - 2007** Mestrado em Química (Química Analítica)
Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil
Título: Utilização da eletroforese capilar com eletrólito não-tamponado para o estudo do comportamento dos íons hidrônio e hidroxila e seu desdobramento analítico.
Orientador: Claudimir Lucio do Lago
Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (09/2005 - 08/2007)
- 2001 - 2005** Graduação em Química (Bacharelado)
Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil
- 1986 - 1997** Ensino fundamental e ensino médio
Colégio São José, São Paulo, Brasil
-

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Atividades

02/2010 - 07/2010 Estágio, Instituto de Química

Estágio supervisionado em docência junto à disciplina Princípios de Análise Química, ministrada aos alunos de graduação do curso de Química do Instituto de Química da Universidade de São Paulo

02/2009 - 06/2009 Estágio, Instituto de Química

Estágio supervisionado em docência junto à disciplina Química Analítica Instrumental, ministrada aos alunos do curso de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo

02/2008 - 07/2008 Estágio, Instituto de Química

Estágio supervisionado em docência junto à disciplina Química Geral, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

07/2005 - 12/2005 Estágio, Instituto de Química

Estágio supervisionado em docência junto à disciplina Química Analítica Instrumental, ministrada aos alunos de graduação do curso de Química do Instituto de Química da Universidade de São Paulo

2. Clariant S. A.

Atividades

07/2004 - 11/2004 Estágio, Clariant S.A.

Pesquisa e desenvolvimento na área de cosméticos

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. VIDAL, D.T.R.; NOGUEIRA, T.; SAITO, R.M.; DO LAGO, C.L. Investigating the formation and the properties of monoalkyl carbonates in aqueous medium using capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. **Electrophoresis**. v. 32, n. 8, p. 850-856, 2011.
2. SAITO, R. M.; BRITO-NETO, J.G.A.; LOPES, F.S.; BLANES, L.; DA COSTA, E.T.; VIDAL, D.T.; HOTTA, G.M.; DO LAGO, C.L. Ionic mobility of the solvated proton and acid base titration in a four-compartment capillary electrophoresis system. **Analytical Methods**. v.2, pp.164-170, 2010.
3. BLANES, L.; SAITO, R.M.; GENTA, F.; DONEGA, J; TERRA, W.; FERREIRA, C.; DO LAGO, C.L. Direct detection of underivatized chitooligosaccharides produced through chitinase action using capillary zone electrophoresis. **Analytical Biochemistry**. v.373, pp. 99-103, 2008.
4. SAITO, R.M.; NEVES, C.A.; LOPES, F.S.; BLANES, L.; BRITO-NETO, J.G.A.; DO LAGO, C.L. Monitoring the electroosmotic flow in capillary electrophoresis using contactless conductivity detection and thermal marks. **Analytical Chemistry**. v.79, pp. 215-223, 2007.
5. DE JESUS, D.P.; SAITO, R.M.; DO LAGO, C.L. Determination of boron in natural water and products derived from grape using an automated flow injection analysis system with piezoelectric detection. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v.15, pp. 714-718, 2004.

Capítulos de Livro

1. BLANES, L.; COLTRO, W.K.T.; SAITO, R.M.; DO LAGO, C.L.; ROUX, C.; DOBLES, P. Practical considerations for the design and implementation of high voltage power supplies for capillary electrophoresis and microchip capillary electrophoresis. In: GARCIA, C.D.; CARRILHO, E. (Orgs.) **Fundamental concepts, practical applications, and limitations of capillary electrophoresis and microchip capillary electrophoresis**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2011.

Trabalhos publicados em anais de eventos

1. SAITO, R.M.; NOGUEIRA, T.; VIDAL, D.T.R.; DO LAGO, C.L. Determination of ethanol percentage in alcohol fuel by monitoring of monoethyl carbonate using capillary zone electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. In: 16th LACE - Latin-American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical, and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology, 2010, Florianópolis - SC.
2. SAITO, R. M.; DO LAGO, C.L. Estudo da estabilidade de revestimentos de CTAB e DDAB sobre a superfície de capilares de sílica em eletroforese capilar utilizando marcas térmicas. In: 33^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia - SP.
3. SAITO, R. M.; DO LAGO, C.L. Injeção térmica: uma nova proposta para introdução de amostra em eletroforese capilar. In: 32^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza - CE.
4. VIDAL, D. T. R.; NOGUEIRA, T.; SAITO, R. M.; DO LAGO, C.L. Separação de álcoois por eletroforese capilar em zona (CZE) pela formação de monoalquilcarbonato. In: 15^o Encontro Nacional de Química Analítica, 2009, Salvador - BA.

5. SAITO, R. M.; DO LAGO, C.L. Análise de íons hidroxila utilizando eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato. In: 31^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia - SP.
6. SAITO, R. M.; DO LAGO, C.L. Estudo do comportamento do íon hidrônio em eletroforese capilar com eletrólito não-tamponado. In: 14^o Encontro Nacional de Química Analítica, 2007, João Pessoa - PB.
7. SAITO, R. M.; NEVES, C. A.; BLANES, L.; LOPES, F. S.; DO LAGO, C.L. Estudo da dependência da marca térmica com o campo elétrico em eletroforese capilar. In: 29^o Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindóia - SP.
8. NOGUEIRA, T.; SAITO, R. M.; DO LAGO, C.L. Determinação de cafeína em café solúvel por eletroforese capilar em solução livre. In: 13^o Encontro Nacional de Química Analítica, 2005, Niterói - RJ.
9. SAITO, R. M.; DO LAGO, C.L. Determinação de íons hidrônio por eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato. In: 13^o Encontro Nacional de Química Analítica, 2005, Niterói - RJ.
10. SAITO, R. M.; NEVES, C. A.; LOPES, F. S.; DO LAGO, C.L. Generation and use of thermal marks in capillary electrophoresis. In: 11th LACE - Latin-American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology, 2005, Guarujá - SP.