DOCUMENTOS
133

ISSN 1516-8247
Dezembro / 2018

Eletroforese Capilar para Iniciantes

Embrapa

ISSN 1516-8247
Dezembro / 2018

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroindústria de Alimentos
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

DOCUMENTOS 133

Eletroforese Capilar para Iniciantes

Jeane Santos da Rosa
Caroline Mellinger-Silva
Marília Penteado Stephan
Tatiana de Lima Azevedo
Alexsandro Araújo dos Santos

Embrapa Agroindústria de Alimentos
Rio de Janeiro, RJ
2018

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroindústria de Alimentos
Avenida das Américas, 29.501 - Guaratiba
CEP 23.020-470, Rio de Janeiro, RJ
Fone: +55 (21) 3622-9600
Fax: +55 (21) 3622-9713
www.embrapa.br/agroindustria-de-alimentos/
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Agroindústria de Alimentos

Presidente
Virgínia Martins da Matta

Membros
André Luis do Nascimento Gomes, Celma Rivanda Machado de Araujo, Daniela De Grandi Castro Freitas de Sá, Elizabete Alves de Almeida Soares, Janine Passos Lima da Silva, Leda Maria Fortes Gottschalk, Marcos de Oliveira Moulin, Otniel Freitas Silva e Rogério Germani

Supervisão editorial
Virgínia Martins da Matta

Revisão de texto
Virgínia Martins da Matta

Normalização bibliográfica
Celma Rivanda Machado de Araujo

Tratamento das Figuras e ilustrações
Marcos de Oliveira Moulin

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Marcos de Oliveira Moulin

Foto da capa
Tomas May

1ª edição
Publicação digitalizada (2018)

Todos os direitos reservados.
A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Nome da unidade catalogadora

Eletroforese Capilar para Iniciantes / Jeane Santos da Rosa ... [et al.]. – Rio de Janeiro : Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2018.
22 p. ; 21 cm. – (Documentos / Embrapa Agroindústria de Alimentos, ISSN 1516-8247 ; 133).

1. Análise Química. 2. Cromatografia. 3. Perfil de proteínas. 4. Fluxo eletrosmótico. 5. Solução tampão. 4. Eletrólito de fundo. I. Rosa, Jeane Santos da. II. Mellinger-Silva, Caroline. III. Stephan, Marília Penteado. IV. Azevedo, Tatiana de Lima. V.Santos, Alessandro Araújo dos. VI. Série.

CDD 543.9 (23. ed.)

© Embrapa, 2018

Autores

Jeane Santos da Rosa

Química, DSc. em Ciência de Alimentos, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

Caroline Mellinger-Silva

Farmacêutica, DSc. em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

Marília Penteado Stephan

Farmacêutica, DSc. em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

Tatiana de Lima Azevedo

Química, Pós-Graduada em Ciências Ambientais, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

Alexsandro Araújo dos Santos

Técnico em alimentos, assistente da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ

Apresentação

Este documento tem como objetivo fornecer informações objetivas sobre a utilização da técnica de eletroforese capilar, com a apresentação de conceitos básicos e aplicações práticas no manuseio do equipamento, em uma sequência lógica de eventos na programação da análise, geralmente não encontrada nos manuais de usuário. Apresenta um conteúdo teórico sucinto, mas imprescindível para a compreensão dos vários parâmetros utilizados para otimizar uma separação via eletroforese capilar.

Se destina a pesquisadores, técnicos, analistas, estudantes, ou seja, a todos que desejem conhecer e aplicar a técnica, particularmente a quem esteja implantando a análise de proteínas em alimentos por meio da eletroforese capilar, sendo fornecidas, inclusive, dicas de problemas encontrados e rotinas a serem aplicadas em um laboratório de Bioquímica.

Lourdes Maria Correa Cabral
Chefe-geral da Embrapa Agroindústria de Alimentos

Sumário

Visão Geral 9

Detalhamento do sistema 11

O tubo capilar – cobertura e condicionamento 11

O eletrólito de fundo e o fluxo eletrosmótico 14

Voltagem e corrente máximas 18

Tempo e modo de injeção 20

Célula de detecção e sensibilidade 23

Proteínas – aderência e recobrimento do capilar 23

Referências 27

Visão geral

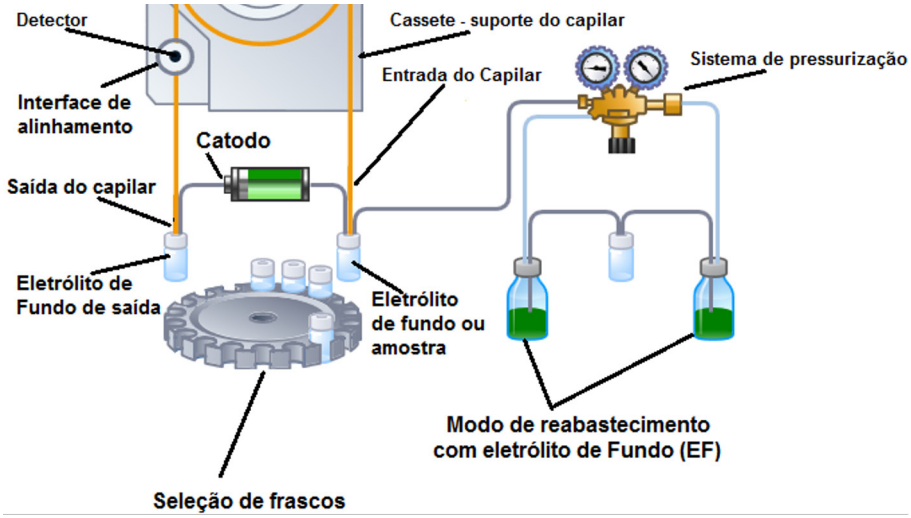
A eletroforese capilar (EC) é uma técnica de separação analítica que foi introduzida por Jorgenson e Lukacs (1981). Possui a grande vantagem de ser compatível com os conceitos de química verde, sendo capaz de separar vários analitos de origem biológica como ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos, lipídeos e metabólitos secundários (Kostal et al., 2008). A eletroforese capilar, entretanto, não é uma técnica de separação trivial. Há vários parâmetros que precisam ser otimizados a fim de se ajustar a separação. Esta técnica é ainda mais complexa do que a cromatografia liquida de alta eficiência (CLAE). Na verdade, a complexidade da CLAE advém das várias tecnologias que compõem o instrumental, porém, uma vez o equipamento ajustado, o processo cromatográfico flui sem requerer modificações subsequentes (Jager e Tavares, 2001).

Os fundamentos da EC baseiam-se na aplicação de uma diferença de potencial entre dois eletrodos em uma solução iônica que provoca o transporte de corrente elétrica realizada por meio dos íons formados. Este transporte de corrente, então, é sempre acompanhado de um transporte de matéria e porções diferentes de corrente são transportadas em função da carga, massa e raio efetivo dos íons. Ou seja, espécies menores e com maiores cargas possuem mobilidades elevadas e o transporte de corrente é maior (Spudeit et al., 2012).

A técnica de eletroforese capilar baseia-se, então, no conceito de mobilidade iônica (eletroforética) e na produção de um fluxo eletrosmótico que é mantido através da interação de um eletrólito (Eletrólito de Fundo - EF) com a diferença de potencial aplicada nos eletrodos (e ao longo de todo capilar) e também com superfície de carga formada no interior do capilar. Este fluxo deve ser capaz de promover uma migração adequada dos analitos até o detector em um determinado tempo. O sinal gerado no detector é plotado sob forma de eletroferograma (gráfico de tempo versus intensidade dos componentes de uma mistura separados por eletroforese em um meio de suporte, neste caso, o capilar de sílica fundida) (Beckers e Boček, 2003).

O instrumental consiste basicamente de um equipamento não modular (Figura 1) onde encontra-se o cassete, um suporte plástico que contém o tubo capilar

enrolado e que funciona também como guia para as extremidades de entrada e de saída deste tubo; o detector, em geral um arranjo de diodos, e o sistema de seleção/injeção de frascos de amostras e de soluções. Todo o sistema é mantido sob pressão negativa.



Fonte: Adaptado do diagrama de tela do equipamento Agilent 7100

Figura 1. Esquema de um equipamento de eletroforese capilar.

A extremidade de entrada do capilar é o ponto de introdução da amostra, e também um dos pontos de entrada do eletrólito de fundo, e se encontra no lado oposto ao detector (Figura 1). A extremidade de saída do capilar, situada logo após o detector, também deve ficar em contato com um frasco contendo eletrólito de fundo para facilitar o preenchimento deste e a manutenção do fluxo eletrosmótico.

Os capilares comerciais possuem uma guia, geralmente colorida, que facilita a introdução da extremidade de saída na interface de alinhamento do detector (Figura 1). Ou seja, a parte transparente do tubo de sílica (que funciona como uma célula de detecção) fica perfeitamente ajustada com o feixe de luz do detector de arranjo de diodos. A detecção, portanto, é feita *on-column*.

Eletroforese capilar é, na verdade, um termo genérico para uma série de métodos de separação envolvendo o sistema-base descrito acima. A Figura 2 representa, de forma geral, os princípios da técnica e os possíveis modos de

separação, além dos tipos de detectores compatíveis com a técnica. O modo de separação mais utilizado em EC é a Eletroforese Capilar em Solução Livre ou Eletroforese Capilar de Zona (ECZ). Neste modo, a amostra é inserida dentro do tubo capilar preenchido com eletrólito de fundo. Um campo elétrico é, então, gerado pela aplicação de um potencial e desta forma os solutos migram dentro do capilar em zonas distintas de mobilidade. A mobilidade efetiva de um soluto no sistema capilar-EF é resultante da composição entre as mobilidades eletroforética e a mobilidade eletrosmótica (Vaza, 2015).

Fonte: Adaptado de Vaza, 2015

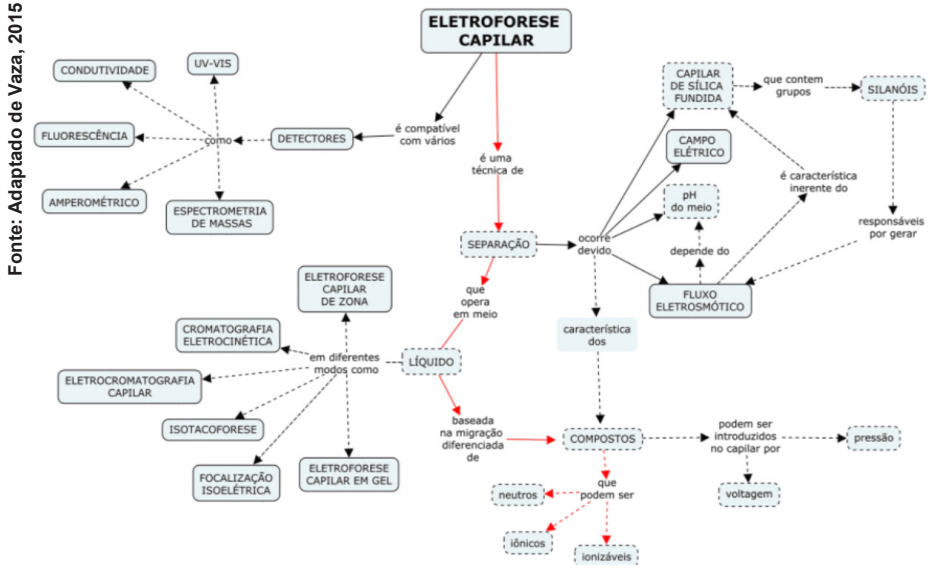


Figura 2. Mapa conceitual da técnica de eletroforese capilar.

Detalhamento do sistema

O tubo capilar – Cobertura e condicionamento

O capilar de sílica fundida é o canal de migração eletroforética mais utilizado em EC. O tubo é tratado externamente com uma camada de poliamida que lhe confere uma cor castanha, além de maior resistência e mobilidade. De

forma geral, é um tubo vazio, sem fase quimicamente ligada. A interação do EF é feita diretamente com os grupos silanóis (desprotonados) na superfície interna do capilar (Spudeit et al., 2012).

Há disponíveis comercialmente capilares com polímeros adsorvidos permanentemente como Poli Vinil Álcool (PVA), *Capillary Eectrophoresis Phase* (CEP–poliacrilamida linear) e até polímero flúor-carbono (FC), utilizados para Eletroforese Capilar em Gel, onde o fluxo eletrosmótico é praticamente suprimido, existindo basicamente o fluxo eletroforético.

Há também capilares preenchidos com fase estacionárias como C18, C8 e fenil, utilizados no modo de separação por Cromatografia Eletrocinética Capilar (ECC) (Kostal et al., 2008).

O comprimento efetivo de um capilar é a medida desde o ponto de injeção até a entrada da janela para o detector. Existem disponíveis comercialmente capilares com uma região transparente mais alargada com a finalidade de aumento da sensibilidade no detector, mas uma interface de alinhamento compatível é necessária. Em geral, os capilares disponíveis comercialmente são apresentados em tamanhos que variam de 25 – 100 cm de comprimento e de 10 – 100 µm de diâmetro interno. Antes de tentar reproduzir um método da literatura, principalmente em termos da concentração do eletrólito de fundo, é importante verificar as diferenças de medidas do capilar utilizado na referência bibliográfica e o disponível para ser utilizado. A Figura 3 mostra a foto de um capilar quebrado devido a entupimento provocado por um eletrólito de fundo muito concentrado (Kok, 2013).

Foto: Jeane Santos da Rosa

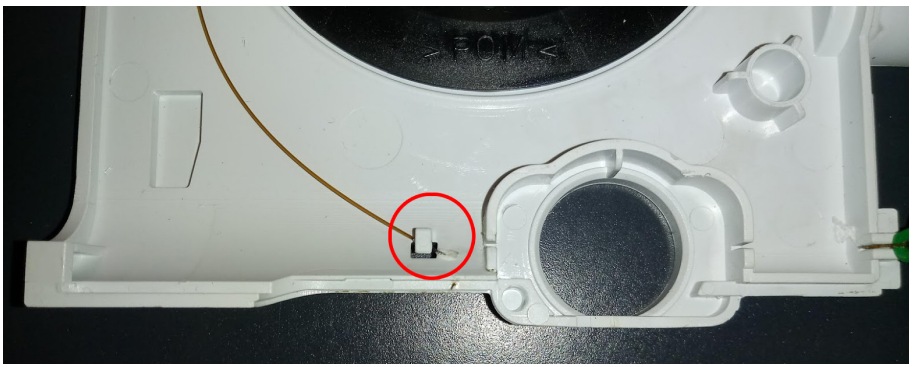


Figura 3. Capilar quebrado antes da entrada do detector (em destaque) sem produção de sinal.

Os capilares quebram com certa facilidade, dependendo da passagem de corrente, concentração do EF e até mesmo concentração da amostra. Por esse motivo, existem equipes que optam por produzir seus próprios capilares, diminuindo, significativamente, o custo do capilar. Recomenda-se dedicar um capilar para cada tipo de tampão utilizado como eletrólito de fundo (Whatley, 2001).

Os capilares de sílica fundida necessitam ser condicionados diariamente, enquanto estiverem em uso. O condicionamento inicial recomendado para haver repetibilidade de separação consiste primeiramente na passagem de ácido clorídrico 0,1 M, por aproximadamente 10 minutos, para eliminar traços de metais na superfície interna do capilar. Após este processo de lixiviação é necessária passagem de água ultrapura por 10 minutos para retirada de todo o ácido (Farina-Gomez et al., 2016).

A passagem de hidróxido de sódio 0,1 M deve ser feita diariamente antes das análises propriamente ditas, para que ocorra uma decapagem e a restauração dos grupos silanóis originais (hidrólise dos grupos silanoatos). Somente após estes procedimentos o capilar deve ser condicionado com o EF a ser utilizado. Este procedimento pode ser repetido ao longo do dia, caso haja perda de repetibilidade de perfil no eletroferograma. Alguns autores recomendam inclusive repetir o processo de lixiviação com ácido clorídrico 0,1 M (Farina-Gomez et al., 2016).

Para acondicionar o capilar, mesmo que durante um curto intervalo de uso, como o período de uma noite somente, é necessário realizar um procedimento de lavagem deste com água ultrapura e logo a seguir fazer passagem de ar, através de um *flush* de ar (frasco vazio) para secagem.

O controle de temperatura do capilar também é importante, pois é responsável pela mudança de viscosidade do EF, pois quanto maior a temperatura, menor a viscosidade deste e, portanto, maior é o fluxo eletrosmótico. Quando o controle de temperatura torna-se difícil (efeito Joule), a alternativa é usar capilares com menor diâmetro interno, pois a menor passagem de corrente diminui o aquecimento ou, ainda, usar capilares com maior comprimento, pois a superfície maior dissipa melhor o calor (Graef, 2007).

O eletrólito de fundo e o fluxo eletrosmótico

CO fluxo eletrosmótico (FEO) é gerado através da aplicação da alta voltagem a um capilar preenchido por um eletrólito, no caso da EC, chamado de eletrólito de fundo (EF). Esse fluxo ocorre quando o EF passa através da superfície interna do capilar em pH maior que 3 e os grupos silanóis (SiOH) perdem um próton, tornando-se grupos silanoatos (SiO-). A Figura 4 representa a parede interna do capilar, já com a carga negativa, que desenvolve uma camada dupla de cátions ao seu redor, produzidos pelo EF. A camada interna (fixa) de cátions é estacionária, enquanto a camada mais externa (móvel), menos atraída pela carga negativa, é livre para se mover ao longo do capilar. O campo elétrico aplicado faz com que os cátions livres se movam em direção ao cátodo, criando um fluxo de íons (Whatley, 2001).

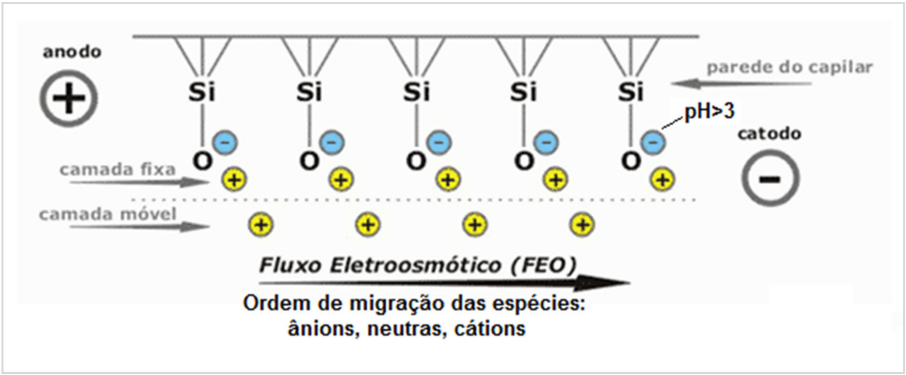


Figura 4. Esquema do fluxo eletrosmótico no interior de um capilar de sílica fundida.

O fluxo de íons formado, então, tem um perfil plano uniformemente distribuído ao longo do tubo (é pouco afetado pelo atrito nas paredes do capilar), sendo não laminar (pressurizado). Conforme a Figura 5, no fluxo eletrosmótico não há gradiente de pressão interna a não ser em uma pequena região bem próxima à parede do capilar, onde a velocidade é próxima do zero. Desta forma, as moléculas de um analito movimentam-se em velocidades mais próximas umas das outras, melhorando a eficiência de separação (Introduction..., 1991).

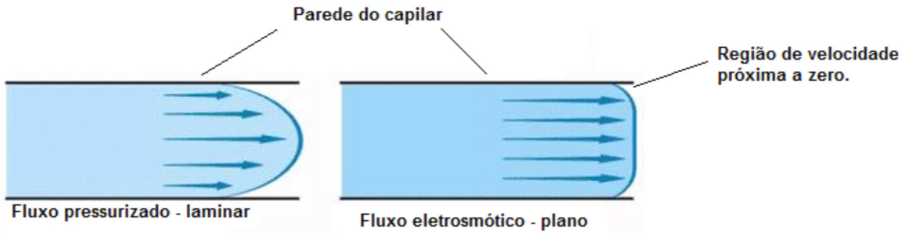


Figura 5. Diferença de uniformidade entre um fluxo pressurizado e um fluxo eletrosmótico.

Dessa forma, o fluxo eletrosmótico depende basicamente de alguns conceitos físico-químicos: a) do potencial Zeta, que é a carga desenvolvida na interface entre uma superfície sólida e um meio líquido (plano de cisalhamento); b) da constante dielétrica do EF, que é a capacidade de uma substância isolar e estabilizar cargas em um campo elétrico; e c) da viscosidade do EF (Xu, 1996).

Na prática, o EF controla o fluxo eletrosmótico, principalmente através da viscosidade, da concentração e do pH do eletrólito (para que os grupos silanóis estejam ionizados ou não). Por exemplo, em valores de pH menores que 2 a maior parte dos grupos silanóis está protonado e, portanto, o fluxo eletrosmótico é bem reduzido. Para manter o FEO o uso de soluções tampão como eletrólito de fundo é mandatório em EC. Soluções tampão são formadas por ácidos ou bases fracas que podem aceitar ou doar prótons (H+) e, desta forma, permitem manter o pH do meio, caso haja a introdução de um ácido ou base adicional. De forma geral, os tampões mais comuns utilizados em EC são fosfato, borato, citrato, acetato e Tris (trishidroximetilamino metano) (Whatley, 2001).

O uso de tampões zwiteriônicos também tem sido recomendado na literatura. Estes tampões contêm uma substância com estrutura química capaz de possuir duas cargas opostas. São conhecidos como tampões dipolares ou tampões de Good (em homenagem ao cientista Norman Good que criou uma lista com tampões para área bioquímica, onde a maioria são tampões zwiteriônicos). Como exemplos destacam-se o Mes (ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico) e o Mops (ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico). Este tipo de solução tampão é capaz de transportar menor corrente quando comparados

aos tampões com somente uma carga (Good et al., 1966; Mohamed et al., 2007).

Outros fatores a serem considerados na escolha de uma solução tampão como eletrólito de fundo, além da faixa de pH desejada são a temperatura de estabilidade e a transparência no comprimento de onda de trabalho (*Solvent UV cut off*). Por exemplo, o limite de concentração de um tampão fosfato para 205 nm é 50 mM, acima disso já existe absorção de radiação UV por parte do tampão. Quanto à temperatura, sabe-se, por exemplo, que o Tris é sensível ao aumento da temperatura, produzindo variações de pH que podem afetar a seletividade de uma separação (Bradford, 1976; Applichem, 2008).

Outro fator que afeta o FEO é o efeito Joule, que ocorre quando correntes elétricas se deslocam por um determinado meio condutor (sólido, líquido ou gasoso) e provocam seu aquecimento. O efeito Joule também produz gradientes de temperatura que tornam as propriedades do fluido não uniformes e o transporte de massa também pode ser alterado. A mobilidade eletroforética e o fluxo eletrosmótico também são modificados pela viscosidade do eletrólito de fundo, que também varia em função da temperatura. Conforme a temperatura aumenta, a viscosidade diminui; portanto, a temperatura precisa ser homogênea no interior do capilar o suficiente para vencer o efeito Joule (Xuan e Li, 2005).

Embora a velocidade do fluxo eletrosmótico possa ser controlada por fatores como pH, concentração do EF e espécies iônicas no eletrólito de fundo, a ordem de migração será sempre a mesma: em direção ao cátodo. Ou seja, cátions, espécies neutras e, por último, ânions (Figura 4). Quando há a necessidade de mudar esta ordem de migração, podem ser utilizados surfactantes catiônicos como modificadores da FEO ou pode-se recobrir o capilar. Desta forma, os ânions serão os primeiros a migrarem do capilar. No entanto, nos equipamentos mais modernos, é possível inverter a polaridade do potencial aplicado, o que permite o mesmo efeito de inversão de ordem de migração (Zhang et al., 1997).

A utilização de modificadores orgânicos no EF tem diversas funções na EC. A principal delas é alterar a seletividade do meio em ECZ. Kenndler (2009) discute detalhadamente o uso de solventes orgânicos ou misturas destes

solventes e soluções aquosas formando o EF. A Tabela 1 resume alguns fatores associados à velocidade do fluxo eletrosmótico.

Tabela 1. Parâmetros que afetam o fluxo eletrostático

Aumento do parâmetro	Efeito na velocidade do FEO
Concentração do EF	Diminuição do FEO
Aumento na viscosidade do EF	Diminuição do FEO
Aumento no pH	Aumento do FEO
Aumento do potencial	Aumento da FEO
Aumento na Temperatura	Aumento da FEO

Fonte: Graef (2017).

Em EC ocorrem muitos problemas relacionados à degradação do eletrólito de fundo. O modo de reabastecimento utilizado no equipamento da Agilent CE7100 é considerado a solução para os problemas de reprodutibilidade gerados a partir da hidrólise da água e também devido à contaminação que ocorre nos frascos do EF ao longo do tempo. Há, inclusive, estudos indicando que se deve limitar o número de injeções por frasco de EF até a primeira observação de alteração de perfil do eletroferograma (Graef, 2007).

No modo de reabastecimento do EC7100 há dois frascos de 0,5 L, posicionados no painel frontal do equipamento. Um destes frascos é o coletor dos EFs retirados e o outro frasco é responsável pela reposição da nova solução (Figura 6).

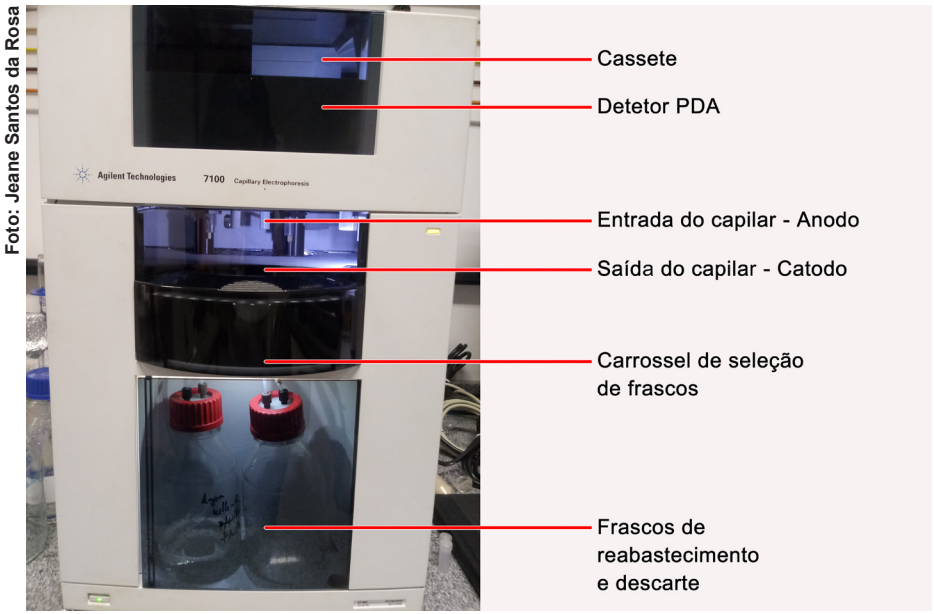


Figura 6. Vista Frontal do equipamento Agilent CE 7100.

Um cuidado prático muito importante na utilização do EF é a quantidade de solução nos frascos de entrada e saída, assim como nos frascos de amostra, que não podem estar muito cheios, pois quando são pressurizados pode ocorrer vazamento e o líquido fora do frasco pode gerar uma fuga de corrente.

Voltagem e corrente máximas

Tanto a velocidade eletrosmótica quanto a velocidade eletroforética são diretamente proporcionais ao potencial elétrico empregado em EC. Desta forma, o uso da maior voltagem possível permite os menores tempos de separação. O limite máximo de voltagem suportado pelas tecnologias atuais é de 30 kV. Na prática, no entanto, este limite é estabelecido em função do efeito Joule (que produz zonas de aquecimento diferencial no interior do capilar) e da resistência do eletrólito de fundo ao fluxo de corrente; efeitos que podem ter como resultado a perda de resolução e até mesmo a quebra indesejada do capilar. Recomenda-se, portanto, não trabalhar no limite

superior de voltagem (30kV) e procurar a voltagem mais adequada para o sistema capilar-EF (Operation..., 2013).

Os equipamentos, de forma geral, possuem uma tabela de programação, na qual podem ser construídos gradientes de voltagem que permitem uma separação mais adequada em função do tempo de migração desejado. Gradientes de corrente são menos usuais, mas também são possíveis de serem programados em função do tempo (Cattaneo et al., 1996).

Limitar a corrente é uma estratégia de modulação permitida nos equipamentos, que pode melhorar a separação. Este ajuste pode ser feito buscando-se um valor ótimo de corrente elétrica máxima dentro do menor tempo possível de migração e uma separação adequada. Quando um valor máximo de corrente é fixado, caso ocorra algum distúrbio no sistema, o próprio equipamento modulará a voltagem para que o limite máximo de corrente estabelecido seja mantido (Kok, 2013).

Outra saída para a diminuição do fluxo de corrente é a diminuição da concentração do EF, porém esta abordagem afeta mais diretamente a separação dos analitos devido à diminuição da velocidade do fluxo eletrosmótico que ela provoca (Beckers e Boček, 2003).

O monitoramento da corrente juntamente com o sinal do detector é fundamental, pois a corrente deve se manter constante durante toda a corrida. Em CLAE é usual monitorar a pressão ao longo da corrida cromatográfica. O mesmo ocorre em relação à corrente em EC. A Figura 7 mostra dois gráficos de monitoramento da corrente ao longo de separações distintas. Em (A) a corrente manteve-se constante após a estabilização do potencial, e em (B) o monitoramento mostra a presença de sinais tipo *spikes*, indicando fuga de corrente.

Vazamentos (fuga) de corrente podem ser gerados pela presença de ar nos frascos e amostra ou de eletrólito de fundo, altos níveis de umidade ou vazamento de EF no equipamento, condutividade alta na superfície do capilar ou mesmo um capilar quebrado. De forma geral, um vazamento de corrente devido ao capilar quebrado pode também resultar em uma descarga elétrica (o som da descarga é perceptível) e a parada total do equipamento até que o capilar seja trocado (Operation..., 2013).

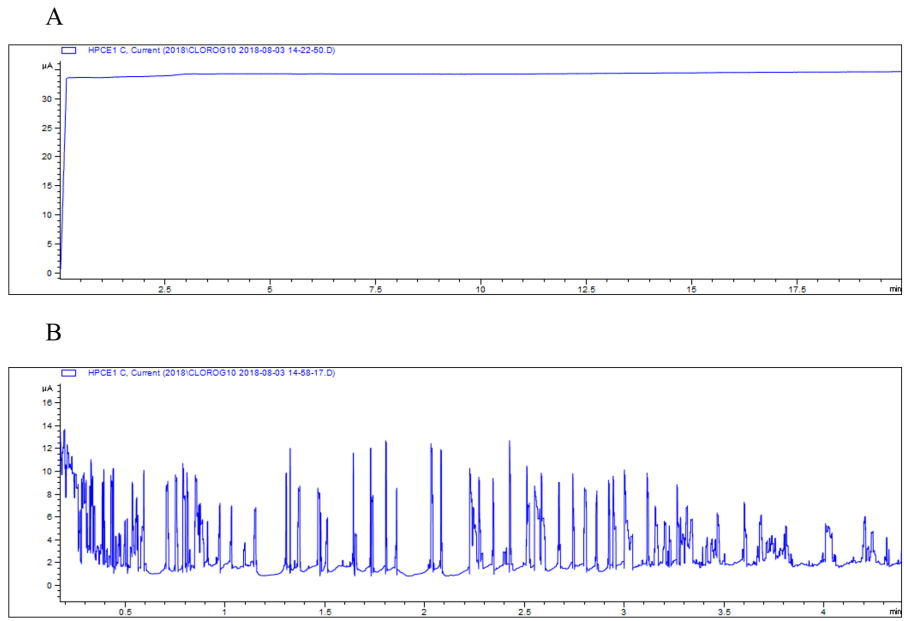


Figura 7. Monitoramento de corrente elétrica normal ao longo do tempo de migração. B: Monitoramento da corrente elétrica com a presença de *spikes* indicando fuga de corrente.

Tempo e modo de injeção

O modo e o volume de injeção influenciam diretamente na qualidade da separação em EC. De forma geral, o volume injetado deve corresponder a, no máximo, 1% do volume total do capilar (Breadmore, 2009).

O volume injetado é determinado pela equação de Poiseuille:

$$V = \frac{\Delta P \; d^4 \pi t}{128 n L}$$

Sendo: ΔP - pressão aplicada (mbar)

d – diâmetro interno do capilar (µm)

t – tempo de aplicação da pressão (s)

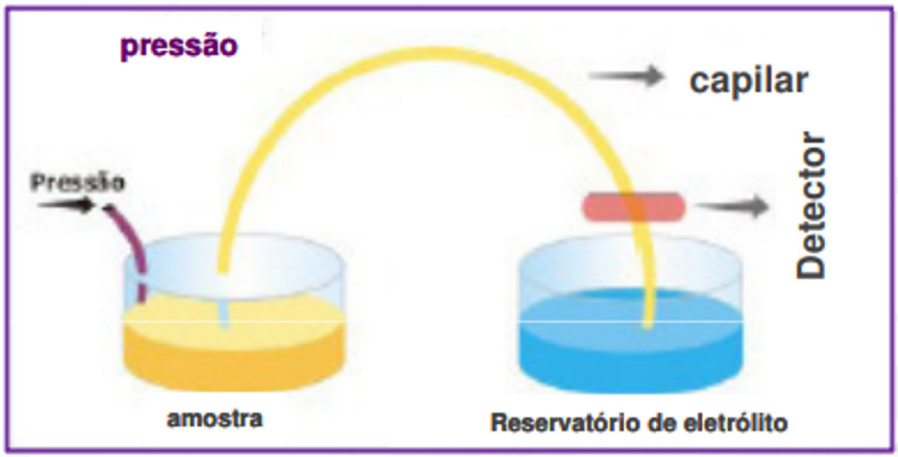
n – viscosidade do EF

L – comprimento do capilar (µm)

Considerando-se a viscosidade do EF igual a um (1), o volume V é calculado em nL. Este cálculo aproximado pode ser realizado através do site: https://sciex.com/ce-features-and-benefits/ce-expert-lite (Xu, 1996; Graef, 2007).

a) Injeção hidrodinâmica (é a mais comum em EC): O frasco de amostra substitui o frasco do EF temporariamente e a amostra é carregada para o interior do capilar por aplicação de pressão. Os equipamentos possuem algoritmos de correção da pressão em função da compressibilidade do meio a fim de permitir injeções precisas e reprodutíveis (Pande, 1992).
b) Injeção eletrocinética: O frasco de amostra substitui o frasco do EF temporariamente. O eletrodo e o capilar necessitam tocar a amostra que migra para o interior deste quando aplicada uma voltagem, corrente ou potência. Este tipo de injeção é empregado, principalmente, em caso de capilares recheados com gel ou material viscoso. Este método tem a possibilidade de produzir discriminação em substâncias com mobilidades muito diferentes, além de alterar a composição da amostra no frasco após injeções múltiplas (Operation..., 2013).

A



B

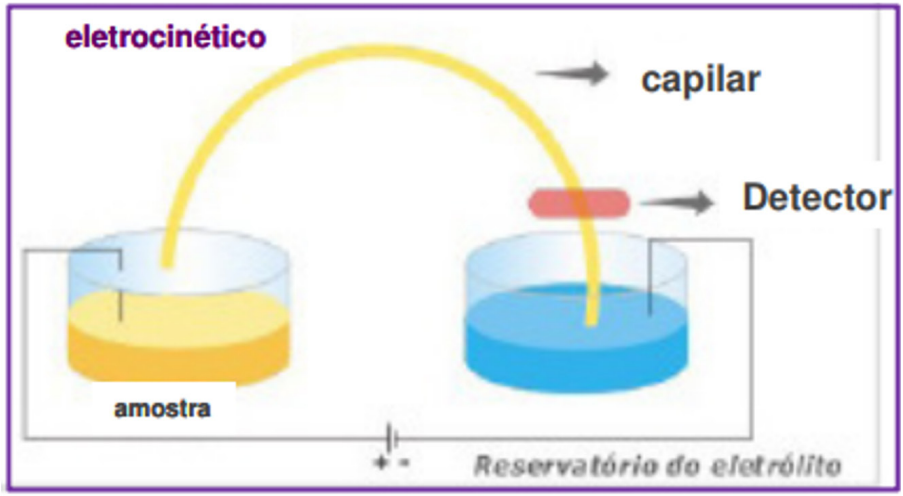


Figura 8. A: Esquema do modo de injeção hidrodinâmica. B: Esquema do modo de injeção eletrocinético.

Célula de detecção e sensibilidade

A detecção no EC apresenta algumas dificuldades devido ao comprimento óptico curto e ao pequeno diâmetro interno dos capilares empregados, que usualmente variam de 25 a 100 µm. Além disso, a natureza *on capillary* (*on column*) do sistema de detecção torna imperativo empregar um detector projetado especificamente para uso em EC. Outro problema é coincidir a fenda óptica da interface de alinhamento com o diâmetro da janela de detecção do capilar. Estas interfaces, geralmente, contêm diferentes fendas para os diversos tamanhos de diâmetros internos de capilares (Marina, 2005).

Uma solução para melhorar a detecção em EC é usar um capilar com caminho óptico estendido, denominado célula bolha. O diâmetro interno deste capilar é expandido de três a cinco vezes no ponto de detecção. Os capilares com este caminho óptico maior são identificados como BF3 ou BF5 (*Bubble Factor*) (Diode-array..., 2009). Outras tentativas de aumentar a sensibilidade na detecção em EC são o caminho óptico/interface em forma de Z e a detecção ao longo de todo capilar (*Whole Column Imaging Detection* - WCID) (Pawliszyn e 1999; Omar, 2016).

Proteínas – aderência e recobrimento do capilar

A separação e quantificação de proteínas em alimentos via EC é uma tarefa bastante complexa devido às possíveis alterações no perfil que advêm de desnaturação ou proteólise por aquecimento e a produção de novos compostos como peptídeos menores, aminoácidos e até substâncias complexas e insolúveis como, por exemplo, produtos da reação de Maillard. A maior dificuldade analítica para proteínas, no entanto, advém da aderência destas nas paredes do capilar, o que pode causar grande alargamento das bandas e produção de cauda acentuada (Ghosal, 2002).

Proteínas podem possuir carga líquida negativa quando o pH do eletrólito de fundo está pelo menos duas unidades acima do ponto isoelétrico destas. Esta carga negativa deveria repelir a carga negativa da parede do capilar e a adsorção da proteína no capilar seria minimizada (Pande, 1992.). Uso de pH elevado, aditivos zwitteriônicos e aumento da força iônica no meio são, então, abordagens para tentar reduzir este fenômeno (Lucy, 2008). Outra

abordagem é a utilização de pH ácido (2-3) que elimina a ionização dos grupos silanóis (Olivieri, 2000).

Na prática, entretanto, a aderência das proteínas depende também da distribuição do potencial Zeta ao longo do capilar e da orientação das cargas positivas e negativas da molécula. Ou seja, se os sítios positivos da proteína estiverem expostos para o capilar, então a adsorção pode acontecer (Anderson, 1985; Ghosal, 2002). Lucy (2008) discute este mecanismo de adsorção também em nível de interações hidrofóbicas e discorre sobre métodos para determinar o percentual de recuperação das proteínas após a adsorção irreversível.

Na prática, o uso de recobrimentos para o capilar tem sido a solução para tentar eliminar este problema de aderência (e também reduzir o FEO). O recobrimento pode ser dividido em dois tipos: Dinâmico e Estático.

a) Recobrimento dinâmico – Adição de um polímero, detergente ou qualquer outra substância que interrompa a interação do analito com o capilar no eletrólito de fundo. Exemplos de recobrimentos dinâmicos adicionados ao EF são Tween 20 ou Tween 80, derivados de celulose, aminas (algumas já usadas para capeamento dinâmico em CLAE) e poliaminas (Thorne, 1996; Recio, 1997; Olmo, 2008; Maier, 2006).

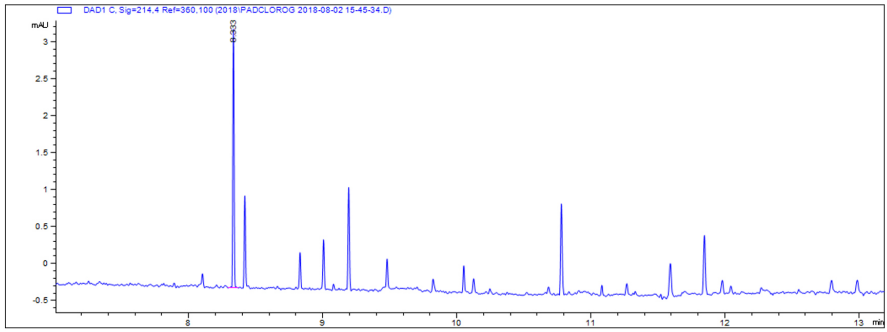
b) Recobrimento estático – Passagem (*flush*) de compostos que se liguem covalentemente às paredes do capilar antes do processo de separação ter início. Exemplos de recobrimentos estáticos utilizados são derivados da piperazina (Q-Pip), polimetacrilatos e polímeros epóxi da acrilamida (Hutterer, 2003; Lucy, 2008).

De forma geral o recobrimento estático é mais eficiente na tarefa de eliminar as interações do analito com a parede do capilar, porém são recobrimentos mais difíceis de serem produzidos e também regenerados (Hutterer, 2003). Há também a categoria de recobrimentos fisicamente adsorvidos como quitosana, derivados da celulose, fosfolipídios polimerizados e até mesmo quitina, que tem a vantagem de ser um polímero natural não solúvel em água e solventes polares (Guo, 2015).

A Figura 9 mostra a diferença de separação entre um padrão de ácidos clorogênicos e padrão de β-lactoglobulina e α-lactoalbumina. Os

eletroferogramas foram gerados no mesmo capilar e sem qualquer tipo de recobrimento, ilustrando as dificuldades na separação de proteínas, mesmo usando o recurso de gradiente de voltagem. A separação, ainda pobre para as duas proteínas, foi a melhor encontrada, empregando-se, inclusive, o recurso de gradiente de voltagem. É possível concluir, então, que sem o recobrimento (capeamento) do capilar a separação de proteínas é uma técnica de difícil execução.

A



B

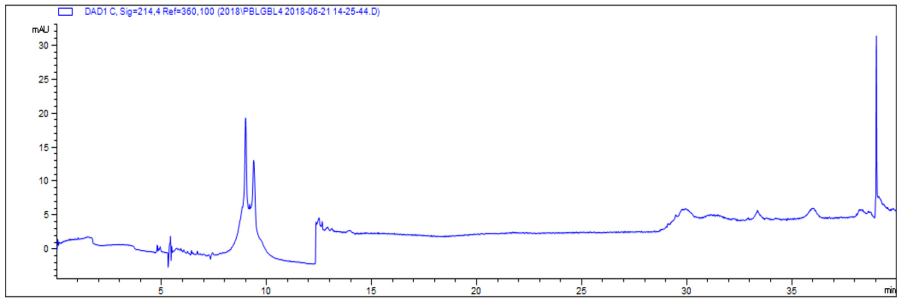


Figura 9. Eletroferograma obtido para uma mistura de padrões de ácidos clorogênicos (ácidos cinâmicos). B: Eletroferograma obtido para uma mistura de padrões de β-lactoglobulina e α-lactoalbumina.

A técnica EC, entretanto, apresenta vantagens interessantes frente a outras técnicas analíticas, como a CLAE, como a possibilidade de maior resolução na separação, menores tempo de corrida por amostra, economia de solventes e geração de volumes menores de resíduos. Fazendo uma comparação com a cromatografia líquida de ultraperformance (UPLC) diversos aspectos devem ser observados. De forma geral, apesar do melhoramento das partículas que recheiam uma coluna apropriada para UPLC e suas altas pressões, ainda se trata de partículas de sílica (de núcleo poroso ou não). Estas partículas possuem recobrimento de carbono que pode oferecer caminhos preferenciais e dificuldade na transferência de massa, se comparados a um tubo aberto de sílica fundida e ao fluxo eletrosmótico, que não é laminar. Em teoria, a EC permite, então, resoluções menores que as da cromatografia gasosa de alta resolução, mas ainda melhores que a UPLC. Nesta comparação devemos avaliar também o custo dos sistemas de UPLC e seu uso quase que dedicado à espectrometria de massas. Na literatura há poucas comparações entre as técnicas de EC e UPLC e estas são específicas para analitos como proteínas e glicanas, além de dependentes da concentração destes. De forma geral, ambas as técnicas oferecem vantagens e desvantagens e são consideradas ortogonais, isto é, sistemas de utilização complementar que diferem significativamente em termos de seletividade (Roza et al., 2016; Sun et al., 2016; Aich et al., 2016; Tallini et al., 2015).

Diante dos aspectos práticos e teóricos discutidos neste documento, de abordagem extremamente sucinta, espera-se que o objetivo de compartilhar conceitos e aplicações para principiantes na técnica tenha sido atingido. A partir deste material pode-se concluir, também, que a Eletroforese Capilar é uma técnica complexa, que demanda não apenas um treinamento especializado do operador, mas também de tempo de prática no equipamento para que a junção de parâmetros disponíveis possa ser conjugada, de modo a se obter a separação e detecção de analitos em uma amostra. No entanto, acredita-se que a EC mereça ainda um novo olhar do mundo analítico.

Referências

AICH, U.; LAKBUB, J.; LIU, A. State-of-the-art technologies for rapid and high-throughput sample preparation and analysis of N-glycans from antibodies. **Electrophoresis**, v. 37, n. 11, p. 1468-1488, 2016.

ANDERSON, J. L.; IDOL, W. K. Electroosmosis through pores with nonuniformly charged walls. **Chemical Engineering Communications**, v. 38, n. 3/6, p. 93-106, 1985.

APPLICHEM. Bilogical Buffers. 2008. Disponível em: < https://www.applichem.com/fileadmin/Broschueren/BioBuffer.pdf >. Acesso em: Agosto de 2018.

BECKERS, J. L.; BOČEK, P. The preparation of background electrolytes in capillary zone electrophoresis: Golden rules and pitfalls. **Electrophoresis**, v. 24, n. 3, p. 518-535, 2003. ISSN 0173-0835.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976. ISSN 0003-2697.

BREADMORE, M. C. Electrokinetic and hydrodynamic injection: making the right choice for capillary electrophoresis. . **Bioanalysis**, v. 1, n. 5, p. 889-894, 2009.

CATTANEO, T. M.; NIGRO, F.; TOPPINO, P. M.; DENTI, V. Characterization of ewe's milk by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 721, n. 2, p. 345-349, 1996. ISSN 0021-9673.

DIODE-ARRAY detection in capillary electrophoresis using Agilent Extended Light Path capillaries: Technical Note. California: Agilent Technologies, 2009. 8 p. Disponível em: https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/5990-3410EN.pdf. Acesso em 10 dez. 2018.

FARINA-GOMEZ, N. et al. Impact of capillary conditioning and background electrolyte composition on capillary electrophoresis analysis of prostate specific antigen isoforms. **Journal of Chromatography A**, v. 1443, p. 254-261, 2016. ISSN 0021-9673.

GHOSAL, S. Effect of analyte adsorption on the electroosmotic flow in microfluidic channels. **Analytical chemistry**, v. 74, n. 4, p. 771-775, 2002.

GOOD, N. E.; WINGET, G. D.; WINTR, W.; CONNOLLY, T. N.; IZAWA, S.; SING, R. M. M. Hydrogen ion buffers for biological research. **Biochemistry**, v. 5, n. 2, p. 467-477, 1966. ISSN 0006-2960

GRAEF, L. E. **Desenvolvimento e validação de um método analítico quantitativo por eletroforese capilar para tuberculostáticos de primeira escolha**. Orientador: Roberto Pontarolo. 2007. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

GUO, X. F.; GUO, X. M.; WANG, H.; ZHANG, H. S. One step physically adsorbed coating of silica capillary with excellent stability for the separation of basic proteins by capillary zone electrophoresis. **Talanta**, v. 144, p. 110-114, 2015.

HUTTERER, K.; DOLNIK, V. Capillary electrophoresis of proteins 2001-2003. **Electrophoresis**, v. 24, n. 22/23, p. 3998-4012, 2003.

INTRODUCTION to capillary electrophoresis. California: Beckman Coulter, 1991. Disponível em: https://ls.beckmancoulter.co.jp/files/appli_note/CEPrimer1.pdf . Acesso em: 10 dez. 2018.

JAGER, A. V.; TAVARES, M. F. Determinação simultânea de cátions por eletroforese capilar: Fundamentos e aplicações. **Química Nova**, v. 24, n. 3, p. 363-373, 2001.

JORGENSON, J. W.; LUKACS, K. D. Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries. **Analytical Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 1298-1302, 1981. ISSN 0003-2700.

KENNDLER, E. Organic solvents in CE. **Electrophoresis**, v. 30, n. S1, p. S101-S111, 2009. ISSN 0173-0835.

KOK, W. **Capillary electrophoresis**: instrumentation and operation. Springer Science & Business Media, 2013. 89 p. ISBN 3322831337. (Chromatographia CE-Series, 4).

KOSTAL, V.; KATZENMEYER, J.; ARRIAGA, E. A. Capillary electrophoresis in bioanalysis. **Analytical chemistry**, v. 80, n. 12, p. 4533-4550, 2008. ISSN 0003-2700.

LUCY, C. A. M.; AMY, M.; GULCEV, MAKEDONKA D. Non-covalent capillary coatings for protein separations in capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, n. 1, p. 81-105, 2008.

MAIER, I.; OKUN, V. M.; PITTNER, F.; LINDNER, W. Changes in peptic digestibility of bovine β-lactoglobulin as a result of food processing studied by capillary electrophoresis and immunochemical methods. **Journal of Chromatography B**, v. 841, n. 1/2, p. 160-167, 2006.

MARINA, M. L.; RÍOS, A.; VALCÁRCEL, M. (Ed.). **Analysis and detection by capillary electrophoresis**. Elsevier, 2005. 796 p. (Comprehensive Analytical Chemistry, v. 45)

MOHAMED, M. M.; ABD-ALLA, E. M.; EL-BADAWY, A. E.-S. Dimethyltin (IV) complexes with zwitterionic buffers (Mes and Mops). **Journal of organometallic chemistry**, v. 692, n. 8, p. 1735-1747, 2007. ISSN 0022-328X.

OLIVIERI, E.; SEBASTIANO, R.; CITTERIO, A.; GELFI, C.; RIGHETTI, P. G. Quantitation of protein binding to the capillary wall in acidic, isoelectric buffers and means for minimizing the phenomenon. . **Journal of Chromatography A**, v. 894, n. 1/2, p. 273-280, 2000.

OLMO, S. **Capillary coatings in Capillary Electrophoresis (CE) analysis of Biomolecules**. 2008. Tese de (Dotourado). Ciências Farmacêuticas, Universidade da Bologna, Bologna, 2008.

OMAR, A. H., NIAMH; ORUNA-CONCHA, MARIA JOSE. . uantification of major camel milk proteins by capillary electrophoresis. . **QInternational Dairy Journal**, v. 58, p. 31-35, 2016.

OPERATION Manual CE 7100. California: Agilent, 2013.

PANDE, P. G.; NELLORE, R. V.; BHAGAT, H. R. Optimization and validation of analytical conditions for bovine serum albumin using capillary electrophoresis. **Analytical biochemistry**, v. 204 n. 1, p. 103-106, 1992.

PAWLISZYN, Q. M. E. J. Capillary isoelectric focusing with whole column imaging detection for analysis of proteins and peptides. **Journal of Biochemical and. Biophysical Methods**, v.

39, p. 93-110, 1999. Disponível em: < https://uwaterloo.ca/pawliszyn-group/research/imaging-detection >. Acesso em: 10 dez. 2018.

RECIO, I.; AMIGO, L.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Assessment of the quality of dairy products by capillary electrophoresis of milk proteins. **Journal of Chromatography B**: Biomedical Sciences and Applications, v. 697, n. 1/2, p. 231-242, 1997.

SPUDEIT, D. A.; DOLZAN, M. D.; MICKE, G. A. Conceitos básicos em eletroforese capilar. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 4, p. 287-297, 2012.

SUN, L.; ZHU, G.; YAN, X.; ZHANG, Z.; WOJCIK, R.; CHAMPION, M. M.; DOVICHI, N. J. Capillary zone electrophoresis for bottom-up analysis of complex proteomes. **Proteomics**, v. 16, n. 2, p. 188-196, 2016.

TALLINI, L. R.; PEDRAZZA, G. P.; BORDIGNON, S. A. D. L.; COSTA, A. C.; STEPPE, M.; FUENTEFRIA, A.; ZUANAZZI, J. A. Analysis of flavonoids in Rubus erythrocladus and Morus nigra leaves extracts by liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 3, p. 219-227, 2015.

THORNE, J. M.; GOETZINGER, W. K.; CHEN, A. B.; MOORHOUSE, K. G.; KARGER, B. L. Examination of capillary zone electrophoresis, capillary isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate capillary electrophoresis for the analysis of recombinant tissue plasminogen activator. **Journal of Chromatography A**, v. 744, n. 1-2, p. 155-165, 1996.

VAZA, A. S.; OLIVEIRA, C. L. M. de; OLIVEIRA, M. A. L. de. Fundamentos de eletroforese capilar: uma abordagem por animações. **Química Nova**, v. 38, n. 5, p. 732-737, 2015.

WOJCIK, R.; ZHU, G.; ZHANG, Z.; YAN, X.; ZHAO, Y.; SUN, L.; DOVICHI, N. J. Capillary zone electrophoresis as a tool for bottom-up protein analysis. **Bioanalysis** v. 82, n. 2, p.89-92 2016.

WHATLEY, H. Basic principles and modes of capillary electrophoresis. In: PETERSEN, J. R; MORRAMED, A. A. (Ed.). **Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis**. New York: Springer, 2001. p. 21-58. DOI: 10.1007/978-1-59259-120-6_2.

XU, Y. Tutorial: capillary electrophoresis. **The Chemical Educator**, v. 1, n. 2, p. 1-14, 1996. ISSN 1430-4171.

XUAN, X.; LI, D. Analytical study of Joule heating effects on electrokinetic transportation in capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1064, n. 2, p. 227-237, 2005. ISSN 0021-9673.

ZHANG, H.; YANG, G.; SUN, H.; HU, Z. Application of reversed electroosmotic flow capillary electrophoresis in determination of chlorogenic acid in Eucommia ulmoides olive leaf and its cortex cell culture. **Analytical letters**, v. 30, n. 7, p. 1293-1304, 1997. ISSN 0003-2719.

Embrapa

Agroindústria de Alimentos

Embrapa MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO BRASIL GOVERNO FEDERAL

CGPE 15106