



Eletoforese Capilar

Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz *

sonia@cnpma.embrapa.br

Isabel Cristina Sales Fontes Jardim*

Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química

Informações do Artigo

Histórico do Artigo
Criado em Agosto de 2001

Palavras-Chaves
Eletoforese capilar
Capilares
Detectores
Fluxo eletroosmótico
Difusão molecular

Resumo

O fenômeno denominado eletroforese é definido como sendo a migração de espécies carregadas eletricamente, que ocorre quando as mesmas são dissolvidas ou suspensas em um eletrólito, através do qual uma corrente elétrica é aplicada [1]. Esta técnica de separação foi desenvolvida pelo químico Arne Tiselius para o estudo de proteínas em soro [2] e por este trabalho ele ganhou o prêmio Nobel em 1948.

Este método, denominado solução livre, era bastante limitado devido à instabilidade do aparelho, e mais significativamente, pelos efeitos de difusão e aquecimento gerados pelo campo elétrico, os quais comprometiam a resolução (a separação) dos compostos. Estes efeitos foram minimizados com a introdução de suporte (gel ou papel) que ajudou a conter o movimento livre dos analitos, de forma que o efeito da difusão fosse diminuído. Entretanto este sistema oferecia um baixo nível de automação, tempos de análise longos e após a separação a detecção era feita visualmente.

A eletroforese capilar (EC) é uma técnica que foi introduzida em 1981, por Jorgenson e Lukacs [3] e tem sido aceita cada vez mais, como um importante método analítico. Em sua forma mais simples a EC é uma aproximação da técnica original, descrita por Tiselius, porém emprega-se um tubo capilar, preenchido com um eletrólito, conforme o próprio nome sugere.

Chemkeys. Licenciado sob Creative Commons (BY-NC-SA)

Aplicações

A eletroforese capilar (EC) é uma técnica aplicável na determinação de uma grande variedade de amostras, incluindo hidrocarbonetos aromáticos, vitaminas hidro e lipossolúveis, amino ácidos, íons inorgânicos, ácidos orgânicos, fármacos, catecolaminas, substâncias quirais, proteínas, peptídeos e muitos outros. Uma característica que difere a EC das outras técnicas é a sua capacidade única para separar macromoléculas carregadas eletricamente de interesse tanto em indústrias de biotecnologia quanto

em pesquisas biológicas. Por exemplo, o projeto Genoma Humano, que foi concluído recentemente, teve como meta obter a seqüência completa do DNA humano e para isso foi necessário distinguir os diversos polinucleotídeos, com massas molares, por volta de 200 a 500 Daltons (Dalton = u.m.a.) que diferiam entre si por um único nucleotídeo. Somente a EC tem resolução suficiente para este tipo de separação. Além disso, o DNA humano contém cerca de 3 bilhões de nucleotídeos e as altas velocidades de análises, obtidas pela EC, permitiram que milhares de nucleotídeos fossem seqüenciados em um único dia [4].

Instrumentação

Geralmente o funcionamento de um equipamento de eletroforese capilar - EC (Figura 1), envolve a aplicação de alta voltagem, tipicamente 5 a 30 kV em um capilar de diâmetro reduzido gerando correntes na faixa de 10 a 100 mA. O uso do capilar apresenta várias vantagens, particularmente com respeito ao aquecimento Joule.

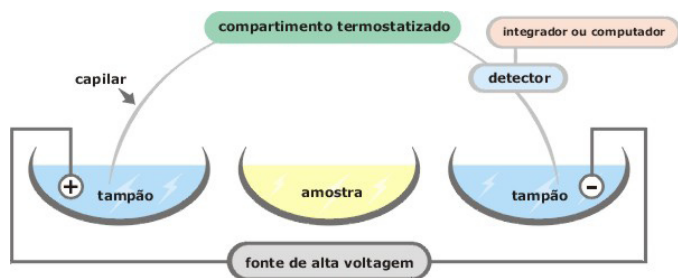


Figura 1 - Esquema de um equipamento de eletroforese capilar

A alta resistência elétrica do capilar permite a aplicação de campos elétricos altos pois gera um aquecimento mínimo, além disso o formato de capilar propicia uma dissipação eficiente do calor gerado. O uso de campos elétricos altos resulta em tempo de análise curto, alta eficiência e resolução.

Na eletroforese capilar, o capilar é preenchido com uma solução tampão e suas extremidades são mergulhadas em recipientes, que contém a solução tampão, e onde é aplicado um campo elétrico, que gera uma corrente no interior do capilar. Os eletrodos são feitos de um material inerte, tal como, platina, e são também mergulhados na solução para fechar o circuito. O capilar passa através de um detector, usualmente um detector espectrofotométrico de absorção no UV/Vis.

Uma pequena quantidade de amostra é introduzida em uma das extremidades do capilar. A aplicação do campo elétrico provoca o movimento dos analitos em direção aos eletrodos. As separações em EC são baseadas na presença de um fluxo eletricamente induzido, denominado fluxo eletroosmótico (FEO), um fenômeno eletroforético que gera o fluxo da solução dentro do capilar, que faz com que os solutos se movimentem em direção ao detector. Este fluxo pode reduzir significativamente o tempo de análise ou forçar um íon a reverter a sua tendência de migração em direção a um eletrodo, pelo qual está sendo atraído, devido ao sinal de sua carga. Outros detalhes sobre o FEO serão discutidos mais adiante, em outro item.

O gráfico, gerado pelo detector, tempo em função de resposta do detector é denominado eletroferograma (Figura 2).

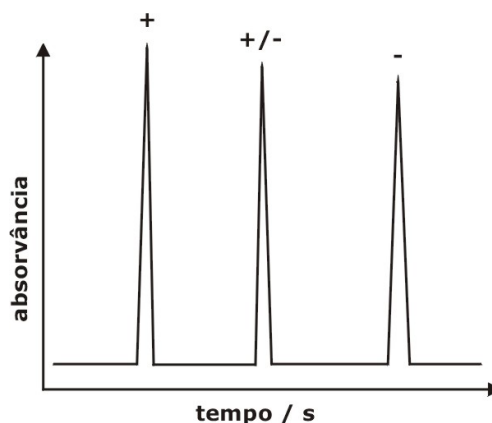


Figura 2 - Exemplo de um eletroferograma

Capilares

Os capilares podem ser de vidro (para $l > 280$ nm), teflon (flexível, transparente no UV, porém não pode ser usado com alta voltagem), ou sílica fundida, normalmente recoberta externamente com uma camada de proteção de poliamida, que produz uma melhora na resistência mecânica, uma vez que é extremamente frágil e se quebra com facilidade. Uma pequena porção deste recobrimento é removida a fim de se formar uma janela para a detecção. A janela é então alinhada ao centro óptico do detector.

Os capilares são, tipicamente, de 25 a 100 cm de comprimento com 15 a 100 μ m de diâmetro interno. Nos instrumentos disponíveis comercialmente, os capilares são mantidos dentro de um dispositivo, denominado cassete, que facilita a inserção no instrumento e protege a janela delicada de detecção. A superfície interna do capilar pode ser quimicamente modificada por meio de ligação covalente com diferentes substâncias. Estes recobrimentos são utilizados para uma grande variedade de propósitos, tais como, reduzir a adsorção da amostra ou mudar a carga iônica da parede do capilar.

O controle de temperatura ao redor do capilar é muito importante para assegurar separações reprodutíveis. O controle é feito geralmente por ar ou líquido refrigerante, os quais são forçados a passar através do cassete, onde se encontra o capilar.

Introdução da amostra

Na EC, diferentemente das técnicas cromatográficas (Cromatografia Gasosa-CG e Cromatografia Líquida

de Alta Eficiência-CLAE), a amostra não é injetada e sim introduzida no capilar pelo lado mais distante do detector [5]. Mesmo não sendo adequada a expressão “injeção”, este termo será empregado neste texto por ser o mais frequentemente utilizado.

Volumes típicos de injeção são de 10 a 100 nL. O modo de injeção mais empregado em EC é o denominado hidrodinâmico, onde o capilar é mergulhado em um frasco contendo a amostra o qual é em seguida pressurizado, submetido ao vácuo ou erguido (efeito sifão) provocando a entrada de um certo volume de amostra no capilar.

Uma outra alternativa é obtida através da inserção do capilar e do eletrodo no frasco da amostra seguida da aplicação de uma voltagem, sendo que solutos neutros são arrastados pelo FEO, ao passo que solutos carregados irão migrar para dentro do capilar, por causa do FEO e também da migração eletroforética. Este tipo de injeção é denominado de injeção eletrocinética [6,7]. A Figura 3 mostra os esquemas para introdução de amostras.

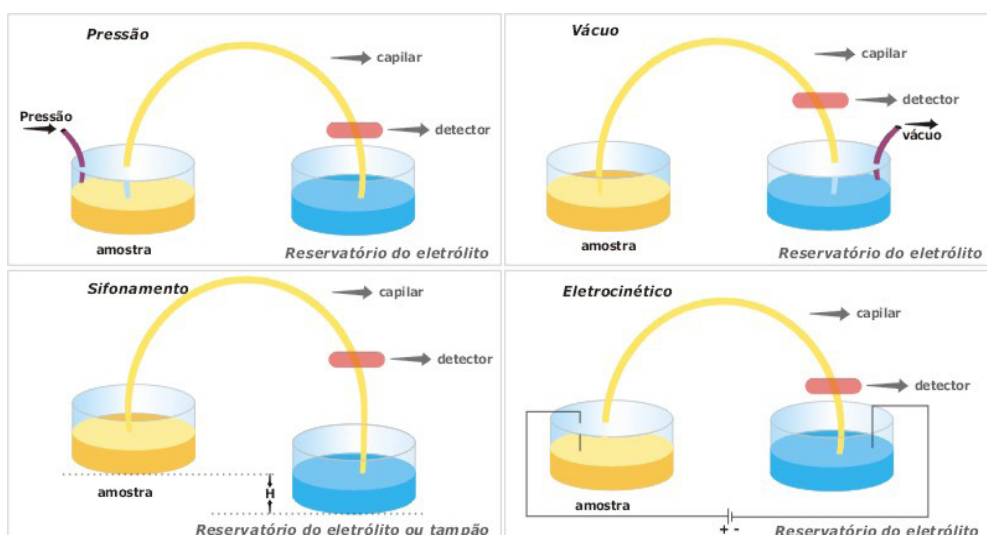


Figura 3 - Esquemas para a introdução de amostras

Fluorescência	10^{-3}
Fluorescência Indireta	10^{-2}
Fluorescência Induzida por Laser	10^{-6}
Espectrômetro de Massa	10^{-4}
Amperométrico	10^{-5}
Condutividade	10^{-3}

Detectores

O detector mais frequentemente utilizado em EC é o espectrofotométrico de absorção no UV/Vis devido à sua natureza quase universal, ou seja, pode ser aplicado na detecção de várias classes de substâncias.

A maioria dos instrumentos tem também detectores com arranjo de diodos disponíveis, o qual fornece um espectro de UV/Vis para cada substância detectada. Os detectores alternativos estão mostrados na Tabela 1. O acoplamento de EC com espectrômetro de massas é usualmente empregado para dar informações estruturais dos analitos [5].

Tabela 1. Detectores usados em eletroforese capilar e os seus limites de detecção aproximados

Detector	Limite de Detecção aproximado (mg L^{-1})
Absorção no UV-Visível	10^{-1}
Absorção Indireta no UV-Visível	1

Fluxo Eletroosmótico

A parede do capilar de sílica contém grupos silanóis (SiOH) os quais se ionizam ($\text{SiO}^- + \text{H}^+$) quando em contato com soluções tampão com pH altos. Esta dissociação produz uma superfície carregada negativamente. Uma camada de contra-íon (cátions) é então formada próxima à parede do capilar a fim de manter a eletroneutralidade. Isto forma a dupla camada e cria uma diferença de potencial muito próxima à parede e este fenômeno é conhecido como potencial zeta.

O potencial zeta é essencialmente determinado pela carga da superfície na parede do capilar (a carga é dependente do pH). Quando uma diferença de potencial (ddp) é aplicada, estes íons metálicos e suas moléculas associadas solvatadas com água migram em direção ao cátodo, Figura 4.

Este movimento de íons resulta no movimento das espécies em direção ao detector e pode ser considerado como um fluxo eletricamente dirigido. O Nível do FEO é altamente dependente do pH do eletrólito, uma vez que o potencial zeta é governado pela ionização dos grupos silanóis (ácidos) da parede do capilar. Abaixo de pH 4,

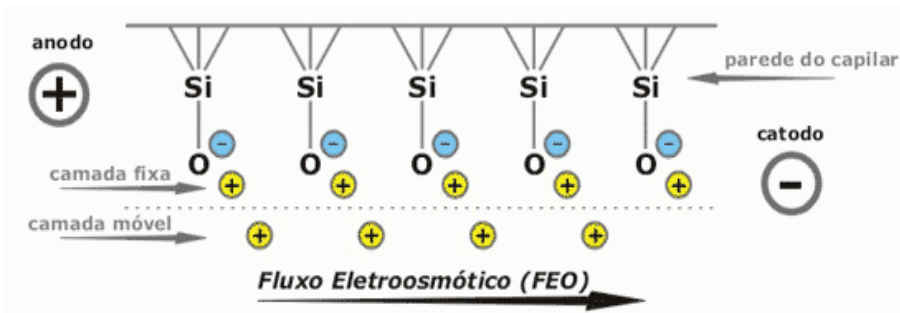


Figura 4 - Migração dos íons metálicos em direção ao cátodo

a ionização dos grupos silanóis é pequena e o FEO não é significativo, enquanto que acima de pH 9 os silanóis ficam completamente ionizados e portanto o FEO é alto (Figura 5).

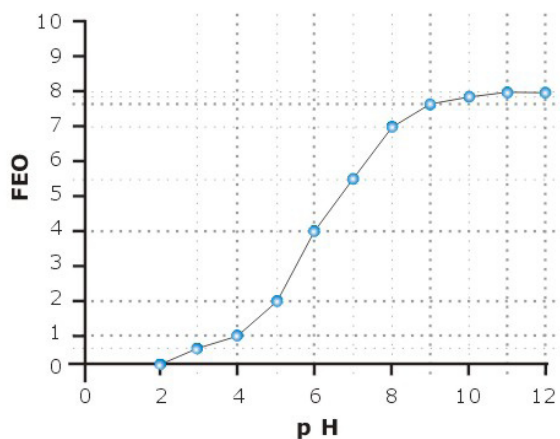


Figura 5 - A dependência do fluxo eletroosmótico em função do pH

A magnitude do fluxo eletroosmótico pode ser expressa em termos de velocidade ou mobilidade segundo as equações:

$$V_{\text{FEO}} = (\varepsilon \xi / \eta) E$$

$$\mu_{\text{FEO}} = \varepsilon \xi / \eta$$

Em que:

V_{FEO} = velocidade do FEO;

ε = constante dielétrica;

ξ = potencial zeta;

η = viscosidade;

E = potencial aplicado;

μ_{FEO} = mobilidade do FEO.

O potencial zeta é também dependente da força iônica da solução tampão. Um aumento da força iônica resulta na compressão da dupla camada e conseqüentemente uma redução do FEO.

O potencial zeta é gerado em todo o comprimento do capilar e portanto produz uma velocidade de fluxo uniforme sem gerar pressão. Se fizermos um corte no tubo capilar, como mostrado na Figura 6, verificamos que o perfil do FEO é do tipo plano (plug) e isto tem um efeito benéfico, uma vez que ele não contribui diretamente para o alargamento dos picos, pois as moléculas do soluto se moverão em velocidades muito próximas. Esta é

uma grande vantagem da EC quando comparada ao perfil parabólico (fluxo laminar) da CLAE, característico do fluxo induzido por pressão. A solução em fluxo laminar move mais lentamente próximo a parede da coluna e mais rapidamente no centro, resultando em diferentes velocidades do soluto ao longo da coluna. Assim, quanto maior o tempo que o soluto despende para percorrer o leito da coluna mais largo se tornará o perfil do pico.

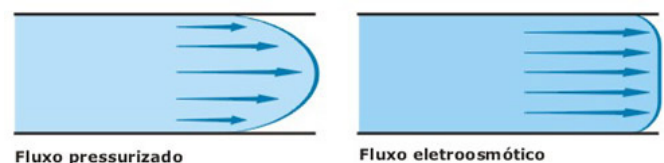


Figura 6 - Perfil do fluxo eletroosmótico, comparado com o do fluxo pressurizado

Um outro benefício do FEO é que ele gera o movimento de quase todas as espécies, apesar das cargas, na mesma direção. Sob condições normais (superfície carregada negativamente), o fluxo é do ânodo para o cátodo. Ânions serão conduzidos em direção ao cátodo uma vez que o fluxo gerado pode ser mais que uma ordem de magnitude maior que as mobilidades eletroforéticas. Assim, cátions, neutros e ânions serão eletroferografados em uma mesma corrida, uma vez que eles migram na mesma direção. A Figura 2 mostra este processo. Cátions migram mais rápido, pois sofrem atração pelo cátodo, neutros são arrastados na mesma velocidade do FEO e não são separados e ânions migram mais lentamente uma vez que são atraídos para o ânodo, mas são arrastados pelo FEO em direção ao cátodo.

Tempo de Migração e Mobilidade

O tempo requerido para um composto migrar do início do capilar para o ponto de detecção é chamado tempo de migração, e é dado pelo quociente entre a distância de

migração e a velocidade. O tempo de migração e outros parâmetros experimentais podem ser usados para calcular a mobilidade aparente (μ_a) do soluto usando:

$$\mu_a = l / tE = lL/tV$$

$$\mu_a = \mu_e + \mu_{FEO}$$

em que:

V = voltagem aplicada;
L = comprimento total do capilar;
t = tempo de migração;
E = campo elétrico;
l = comprimento efetivo.

Na presença do FEO, a medida da mobilidade é chamada de mobilidade aparente, μ_a . A mobilidade efetiva, μ_e , pode ser extraída da mobilidade aparente pela medida do FEO usando um marcador neutro que move com a velocidade igual ao FEO. Exemplos de marcadores neutros incluem dimetilsulfóxido e acetona.

Há duas medidas de comprimento no capilar, uma é denominada efetiva e a outra total. O comprimento efetivo é a medida do ponto de injeção até ponto de detecção. Para detecção espectroscópica *on-capillary*, este comprimento é tipicamente de 5 a 10 cm mais curto que o comprimento total. Para detecção *off-capillary*, por exemplo por espectrometria de massas, os dois comprimentos são equivalentes.

O conhecimento de ambos os comprimentos é importante, uma vez que a mobilidade e o tempo de migração são definidos pelo comprimento efetivo, ao passo que o campo elétrico é definido pelo comprimento total.

Fontes de Alargamento dos Picos

A separação na eletroforese é baseada nas diferenças nas mobilidades dos solutos. A diferença necessária para resolver dois solutos é dependente da distância entre os dois solutos. A dispersão, alargamento do pico do soluto, resulta das diferenças na velocidade do soluto, e pode ser definida como a largura do pico na linha de base, w_b . Para um pico gaussiano:

$$w_b = 4\sigma$$

em que:

σ é o desvio padrão do pico (no tempo, comprimento ou volume).

A eficiência, expressa pelo número de pratos, N, pode ser obtida por:

$$N = (l/\sigma)^2$$

em que:

l = comprimento efetivo do capilar.

$$\sigma_{tot}^2 = w^2/5,545$$

Pode, também, ser relacionado à altura de prato, H, por:

$$H = 1/N$$

Difusão molecular

O efeito que mais contribui para o alargamento do pico é causado pela difusão molecular do soluto ao passar ao longo do capilar (difusão longitudinal). Assim, a eficiência pode ser relacionada à difusão molecular em termos de cromatografia, que é:

$$\sigma^2 = 2Dt = 2DlL/\mu_e V$$

sendo:

D = coeficiente de difusão do soluto.

A partir das equações anteriores, obtém-se uma expressão eletroforética fundamental para o número de pratos:

$$N = \mu_e V l / 2Dl = \mu_e l / 2D$$

Da equação acima, a razão para a aplicação de campo elétrico alto é evidente. Isto é devido ao fato que o soluto gasta menos tempo no capilar, quando campo elétrico alto é aplicado, as moléculas têm menos tempo para difundir. Além disso esta equação mostra que moléculas grandes, tais como proteínas e DNA, as quais têm baixo coeficiente de difusão, irão exibir menos dispersão que moléculas pequenas. Os valores de coeficiente de difusão de algumas substâncias estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Coeficientes de difusão de algumas substâncias, em água (25° C)

Substância	D x 10 ⁻⁵ (cm s ⁻¹)
HCl	3,05
NaCl	1,48
Glicina	1,06
Citrato	0,66

Citocromo C	0,11
Hemoglobina (Humana)	0,069

O número de pratos pode ser determinado diretamente no eletroferograma, usando por exemplo:

$$N = 5,54(t/w_{1/2})^2$$

sendo:

t = tempo de migração;

$w_{1/2}$ = largura temporal do pico à meia altura

Aquecimento Joule

Durante a aplicação da voltagem, e portanto a passagem de corrente pelo capilar, pode ocorrer o aquecimento Joule (formação de gradiente de temperatura). Este aquecimento Joule causa a formação de correntes de convecção dentro do capilar, causando uma mistura das bandas já separadas, resultando na dispersão do pico. Este efeito pode ser minimizado pela aplicação de voltagens adequadas e uso de tampão com concentração mais baixa, aliado a um bom controle de temperatura.

Fluxo eletrosmótico

O FEO, já foi descrito anteriormente, e, em princípio, o perfil plano resulta em um benefício, uma vez que não contribui diretamente para a dispersão das zonas. Entretanto se a amostra interage com a parede do capilar, a eficiência pode ser diminuída devido à deformação do perfil do pico. Para contornar este problema podem ser adicionados modificadores no tampão ou modificar quimicamente a parede do capilar.

Detecção on-column

Uma das causas do alargamento do pico em CLAE é o volume morto nas conexões, desse modo picos já separados na coluna tornam-se mais dispersos, chegando ao detector mais alargados, se houver volume morto nas conexões, ocorre uma re-mistura dos picos. Isto, não ocorre em EC pois a cela de detecção é localizada no próprio capilar (região sem revestimento).

Injeção da amostra

Em adição à difusão molecular, uma outra fonte de alargamento do pico é o comprimento do volume de injeção. Um comprimento de poucos milímetros é bastante significativo dado que o comprimento de um capilar pode ser de 25 cm e a janela de detecção de 0,1 mm. Uma maneira de minimizar este problema é dissolver a amostra em um solvente de força iônica menor que a do tampão. Sob estas condições, o campo elétrico é maior na zona da amostra que no resto do capilar. Assim os íons se movem mais rapidamente até atingirem o tampão, onde o campo elétrico é menor, diminuindo portanto a velocidade. Este processo é facilitado quando a amostra é dissolvida em água pura ou em uma solução tampão diluída cerca de 10 vezes.

Modos de Separação

Hoje em dia a eletroforese é um nome genérico dado para uma série de técnicas de separação que envolvem a aplicação de um campo elétrico em um capilar preenchido com uma solução tampão. As bases destas separações estão descritas a seguir [8].

Eletroforese Capilar em Solução Livre (ECSL)

A separação de íons é a forma mais simples de EC e é denominada eletroforese capilar em solução livre. Muitos compostos podem ser separados rapidamente e facilmente por esta técnica. A separação em ECSL é baseada nas diferenças nas mobilidades eletroforéticas resultantes das diferentes velocidades de migrações de espécies iônicas no tampão, contido dentro do capilar.

O mecanismo de separação é baseado nas diferenças na razão massa/carga dos solutos em um dado pH. Na ECSL espécies neutras não são separadas, porém permite a separação de cátions e ânions na mesma corrida.

Eletroforese Capilar em Gel (ECG)

A separação de biomoléculas grandes, tais como DNA, por ECSL, às vezes é muito difícil de se obter devido à similaridade nas razões massa/carga. Assim ECSL muitas vezes não é suficiente para separar estes tipos de substâncias. Uma alternativa é preencher o capilar com um gel, onde o principal mecanismo de separação está

baseado nas diferenças nos tamanhos dos solutos que migram através dos poros do polímero. Esta técnica é denominada eletroforese capilar em gel.

Íons menores migram mais rapidamente enquanto que solutos maiores ficam mais tempo retidos. Além disso, o gel serve como um meio anticonvectivo, minimizando a difusão dos solutos. Ele também previne a adsorção do soluto nas paredes do capilar e ajuda a eliminar a eletrosmose. Entretanto, o gel deve possuir certas características, tais como, ser estável termicamente e ter uma faixa de tamanho de poros apropriada (dependendo das massas molares dos solutos da amostra), para poder ser um meio eletroforético adequado. Esta técnica está sujeita à limitação de que espécies neutras não migram através do gel, uma vez que o FEO é suprimido.

Eletrocromatografia Capilar Micelar (ECCM)

A ECCM foi inicialmente desenvolvida para a resolução de compostos neutros, os quais não podem ser separados usando simplesmente a ECSL.

As condições de separação envolvem o uso de eletrólitos contendo níveis relativamente altos de surfactantes, tal como dodecilssulfato de sódio (SDS). Acima de uma determinada concentração, denominada de concentração micelar crítica (CMC), as moléculas de surfactante começam a agregar-se, formando micelas. A separação é baseada na partição das moléculas entre a fase micelar (pseudo-fase estacionária) e o tampão aquoso. As micelas de SDS têm carga negativa e migram contra o FEO.

Entretanto, o FEO é suficientemente forte para forçar as micelas passarem pelo detector. Espécies carregadas positivamente são retardadas pela associação com micelas carregadas negativamente, moléculas neutras têm uma partição entre as fases micelar e aquosa do tampão e têm uma mobilidade intermediária, enquanto que moléculas carregadas negativamente são repelidas pelas micelas. As separações são conduzidas em pH onde há um FEO apreciável.

Solventes orgânicos e reagentes par-iônicos também podem ser adicionados no tampão para ajustar o fator de retenção e seletividade, exatamente como em fase reversa por CLAE. ECCM é especialmente útil para a resolução de solutos neutros insolúveis em água, como por exemplo os esteróides.

Eletroforese Capilar com Focalização Isoelétrica (ECFI)

Na focalização isoelétrica capilar substâncias anfóteras são separadas com base em seus pontos isoelétricos (pH onde o número de moléculas que migra para o ânodo é igual ao número de moléculas que migra para o cátodo).

Esta técnica é baseada na formação de um gradiente de pH, obtido pelo uso de substâncias conhecidas como anfólitos, que são geralmente ácidos poliméricos sintéticos (e.g., poliaminoácidos, ácidos policarboxílicos ou ácidos polissulfônicos).

A aplicação de um campo elétrico na mistura de anfólitos gera a formação de um gradiente de pH. Os anfólitos são mantidos em um meio onde se usa um cátodo com pH alto, tipicamente hidróxido de sódio e um ânodo com pH baixo, tipicamente ácido fosfórico. As proteínas, que são anfóteras, irão se comportar de maneira idêntica e serão focalizadas em uma dada posição ditada pelo seu ponto isoelétrico (PI).

Neste tipo de separação é necessário um passo adicional, pois os solutos não podem ser detectados *in situ*, pois quando eles atingem o seu PI eles param de se movimentar dentro do capilar e, portanto não atingem a cela do detector. Este passo pode ser feito de diferentes maneiras. Após a focalização, as zonas podem ser movidas no capilar, em direção ao detector, por meio de pressão, que pode ser obtida por exemplo, elevando-se uma das extremidades do capilar.

Alternativamente, após a focalização, a corrente do sistema é baixa pois somente íons OH⁻ e H⁺ contribuem para a condutividade. Quando um sal, por exemplo cloreto de sódio, é adicionado ao anólito (reservatório ácido) ou ao católito, os íons cloreto irão predominar e irão aumentar a condutividade. Pelo princípio da eletroneutralidade, íons sódio podem ser trocados por prótons no tubo, gerando um gradiente desbalanceado. Isso causa a migração dos íons em direção ao detector.

Isotacoforese Capilar (IC)

A principal diferença entre a isotacoforese e as outras técnicas em CE é que ela é realizada em um sistema de tampão descontínuo. A amostra é condensada entre dois tampões diferentes, um deles possui íons com a mais alta mobilidade no sistema e é denominado dianteiro, e um outro com íons com a mais baixa mobilidade no sistema, que é denominado terminador.

Na prática, o reservatório de tampão do lado mais próximo ao detector e o capilar são preenchidos com o eletrólito dianteiro, o outro reservatório é preenchido com o outro eletrólito terminador e a amostra é injetada entre eles.

Quando um campo elétrico é aplicado, os componentes da amostra começam a se separar em zonas de acordo com suas mobilidades. Quando um estado de equilíbrio é atingido, os componentes da amostra são separados em zonas que estão em contato umas com as outras, pois não há eletrólito carreador, e todas se movem na mesma velocidade.

Nesta técnica o eletroferograma obtido contém uma série de patamares (degraus), onde cada degrau representa uma zona de um analito. Ao contrário dos outros modos de EC, onde a quantidade de amostra presente pode ser determinada pela área do pico, como também em cromatografia, a quantificação em isotacoforese está baseada principalmente na medida do comprimento da zona, que é proporcional à quantidade de substância presente.

Análises Quantitativas e Qualitativas

A análise qualitativa é feita através da comparação dos tempos de migração dos padrões com os tempos de migração das substâncias presentes na amostra e/ou através de espectros de UV/Vis (detector por arranjo de diodos) ou do espectro de massas (detector espectrômetro de massas).

A quantificação das substâncias, com concentrações desconhecidas, presentes na amostra, é feita através do procedimento usual de calibração:

1. injeção de soluções dos padrões de concentrações conhecidas;
2. obtenção das respostas do detector para cada composto, em função da altura, área ou área dividida pelo tempo de migração;
3. construção da curva analítica (resposta do detector versus concentração);
4. injeção das amostras;
5. obtenção das respostas do detector para as amostras;
6. quantificação das substâncias através das curvas analíticas.

Vantagens e Limitações

A técnica de eletroforese capilar possui uma série de vantagens, tais como,

- rapidez,
- versatilidade,
- baixo custo por análise, alto poder de separação (resolução) e
- consumo mínimo de amostras, reagentes e solventes.

Além disso, oferece a possibilidade de automação e detecção on-line.

Entretanto esta técnica oferece algumas limitações, pois não é adequada para a determinação de compostos voláteis, não-polares e de massa molar baixa, os quais são melhores determinados por cromatografia gasosa.

Também não é muito adequada para a análise de polímeros não iônicos de massa molar alta e não é tão sensível quanto a cromatografia líquida de alta eficiência.

Referências Bibliográficas

1. **Heiger, D. N.**, "High Performance Capillary Electrophoresis", Hewlett Packard Company, Publication Number 12-5091-6199E, 1997.
2. **Tiselius, A.**, "The Moving-Boundary Method of Studying the Electrophoresis of Proteins", Tese de Doutorado, University of Uppsala, Suécia, 1930.
3. **Jorgenson, J. W.; Lukacs K. D.**, "Zone Electrophoresis in Open-tubular Glass Capillaries", *Anal. Chem.*, 1981, 53:1298.
4. **Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman T. A.**, "Principles of Instrumental Analysis", Saunders College Publishing, Philadelphia, 1998.
5. **Settle, F.**, "Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry", Prentice-Hall International Inc., New Jersey, 1997.
6. **Li, S. F. Y.**, "Capillary Electrophoresis. Principles, Practice and Applications". *J Chrom Libr*, 1992, 52:1.

7. **Grossman, P. D.; Colburn. J. C.**, “Capillary Electrophoresis. Theory and Practice”, Academic Press Inc., San Diego - California, 1992.
8. **Tavares, M. F. M.**, “Mecanismos de Separação em Eletroforese Capilar”, *Quím. Nova*, 1997, 20: 493-511.