

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Programa de Pós-Graduação em Química**

**LUCAS BLANES**

**Inovações Instrumentais em Sistemas de Eletroforese Capilar  
com Detecção Eletroquímica e Aplicações em Análises de  
Mono e Oligossacarídeos, Aminoácidos e Proteínas**

**Claudimir Lucio do Lago**

Orientador

SÃO PAULO

Data do depósito na SPG

13/03/ 2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

## SUMÁRIO

<i>I-AGRADECIMENTOS</i> -----	10
<i>II- ABREVIACOES</i> -----	11
<i>III- RESUMO</i> -----	12
<i>IV- ABSTRACT</i> -----	13
<i>CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO e OBJETIVOS</i> -----	14
<i>1.1 - Introdução e importância da Eletroforese Capilar</i> -----	14
<i>1.2 - Colunas capilares e o fluxo eletrosmótico</i> -----	15
<i>1.3 - Princípios de funcionamento da CE e o módulo de eletrólise separada (MSE)</i> -----	17
<i>1.4 - A Detecção em CE e o detector condutométrico sem contato (C<sup>4</sup>D)</i> -----	20
<i>1.5 - Experiências prévias em instrumentação em Eletroforese Capilar</i> -----	22
<i>1.6 - Os equipamentos de eletroforese capilar H1 e B1: Uma abordagem geral</i> -----	22
<i>1.7 - Os Microchips</i> -----	24
<i>1.8 - Objetivos</i> -----	25
<i>CAPÍTULO 2 - A CONSTRUÇÃO DE H1</i> -----	26
<i>2.1 - Desenvolvimento de H1 com o MSE:</i> -----	26
<i>2.2 - Injeção de amostras em H1</i> -----	31
<i>2.3 - Fontes de alimentação e alta tensão</i> -----	34
<i>2.4 - Sistema de segurança do usuário</i> -----	34
<i>2.5 - Detecção condutométrica sem contato</i> -----	35
<i>2.6 - Controle de temperatura</i> -----	36
<i>2.7 - Softwares utilizados</i> -----	37
<i>2.8 - Interface</i> -----	37
<i>2.9 - Considerações finais sobre a construção de H1</i> -----	38

2.10 - As marcas térmicas (TMs) e a análise de cátions presentes em clara de ovos-----	39
2.11 - Análises de proteínas em HI-----	43
2.12 - Análises de quitoooligosacarídeos clivados enzimaticamente-----	48
2.12.1 - Introdução-----	48
2.12.2 - Materiais e métodos-----	49
2.12.3 - Ensaio enzimático e curvas de calibração-----	50
2.12.4 - Otimização do sistema de separação-----	50
2.12.5 - Clivagem enzimática-----	53
2.12.6 - Medidas de eficiência catalítica-----	56
2.12.7 - Conclusões-----	57
CAPÍTULO 3- O EQUIPAMENTO B1-----	58
3.1 - Considerações gerais sobre B1-----	58
3.2 - Interface-----	60
3.3 - O Equipamento B1-----	60
3.4 - Sistema MSE na região de alta tensão-----	61
3.5 - Sistema MSE na região de baixa tensão-----	63
3.6 - Sistema de posicionamento de reservatórios e controle de pressão-----	67
3.7 - Sistema de detecção $C^4D$ multicapilar-----	69
3.8 - Sistema de controle de temperatura-----	73
3.9 - Análises de aminoácidos em B1-----	75
3.9.1 - Introdução-----	75
3.9.2 - Reagentes e soluções-----	75
3.9.3 - Procedimento utilizado para identificação dos aminoácidos-----	76

3.9.4 – Separação de aminoácidos em BI-----	78
3.10 - Conclusões finais sobre BI e perspectivas-----	83
<i>CAPÍTULO 4- DESENVOLVIMENTO DE MICROCHIPS DE PDMS COM IMERs-----</i>	<i>85</i>
4.1- Introdução-----	85
4.2- Materiais e métodos-----	86
4.3- Fabricação do chip de PDMS-----	87
4.4 - Desenvolvimento do IMER-----	90
4.5 - Resultados e discussão-----	93
4.6 - Conclusões -----	94
<i>CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS-----</i>	<i>98</i>
<i>CAPÍTULO 6 - BIBLIOGRAFIA-----</i>	<i>100</i>
<i>CAPÍTULO 7 - CURRICULUM VITAE-----</i>	<i>113</i>



“Se você quer ser um profissional, comporte-se como um profissional”.

PCR, Florianópolis 2004

Dedico esta Tese aos meus queridos pais,  
José Blanes Coelho e Cícera Tertó França



Aos meus queridos irmãos,  
Lucília, Luiz, Laura e Leila Blanes

Ao amigo e professor,

Claudimir Lucio do Lago,

Ser orientado com liberdade é bom

Ser orientado com inteligência e incentivo diário é muito bom

Fazer ciência com bom humor e criar uma rica amizade foi bom demais!

Valeu Chefe!

(obs: ainda não desisti do PN!)

## **I - AGRADECIMENTOS**

*Ao professor Lúcio Angnes pela amizade, ensinamentos, incentivo, e constante bom humor! E claro, pela atuação como zagueiro número 1 do areião.*

*Ao professor Ivano Gutz por todo apoio e ensinamentos. Uma enciclopédia!*

*Ao professor e velho amigo Fernando Ariel Genta (Miguelito) por toda ajuda, colaborações, disk-amostra, bom humor, cafés, broncas, dicas, enfim.. uma pessoa fantástica.*

*Aos professores Dosil, Eduardo, Alberto, Walter, Clélia, André, Marina, Nina, Mari, Elisabeth, Maria Teresa, Mauro, Maurício, Carrilho, Luiz, Pio, Politi, Lurdinha, Aline e Bayardo, pelas mais variadas contribuições*

*Ao professor Carlos D. Garcia pela dedicada orientação durante meu estágio na UTSA (Universidade do Texas em San Antonio).*

*Aos amigos de laboratório: Fernandinho, Carlos, Caracol, Daniela, Fabiana, Heron, Vinny, Marlene, João, Marcos Wolverine, Lúcia (valeu pelo CTAB), Pillar, Osmar, Pedro, Pimentinha, Socorro, Wanderson, Willian, Wendel, Erika, Kléeston, Zé Geraldo, Marlene, Alexandre, Fábio, Cabelo, Maurício, Andrezinho.....*

*Aos meus queridos ex-estagiários que demonstraram muita capacidade e que me ajudaram a crescer bastante: Minoru, Juliana, Tati, Pop e Rei. Vocês são muito bons! Parabéns!*

*Em especial à Renata, Thiago (Baby Look) e Escobar pela amizade e diversos apoios que não sei descrever, mas sempre incondicionais e imediatos.*

*Aos amigos de todas as horas e momentos, muitos deles merecendo uma tese, mas como já tenho que escrever uma lá vai uma lembrança aos PDB's por essência, que compartilharam comigo momentos fantásticos durante a graduação e a pós: Sinistro, Pererê, Paulinho, Diego, Daniela Simoni, Luquito, Liliana Massis, Mineiro, Ricks, Savinho, Murilão, Julinho, Guilherme, PCR, Lelê, Tiago, Felipe, Feto, Rita, Mari, Camila, Camila Carioca, Julião, Dread, Monalisa, Júlio..... e acreditem, tem mais um monte... quantas histórias..hehe...*

*À todos da secretaria da pós-graduação, Cibele, Emiliano, Milton e Marcelo por todo auxílio e prontidão em todos momentos.*

*À Dona Maria e D. Miriam da copa, sem vocês a produtividade científica do IQ-USP estaria comprometida.*

*Aos demais amigos dos laboratórios vizinhos, funcionários e professores do IQ-USP.*

*À FAPESP e ao CNPq pelo suporte financeiro*

## II - ABREVIACOES

MSE - módulo de eletrólise separada

C<sup>4</sup>D - detecção condutométrica sem contato capacitivamente acoplada

EOF - fluxo eletrosmótico

PDMS - polidimetilsiloxano

BSA - albumina sérica bovina

CAPS - cido 3-ciclohexilamino-1-propanosulfnico

SMD - *surface mount device* (dispositivo de montagem superficial)

C1 - N-acetil-glicosamina

C2 - quitobiase

C3 - quitotriase

C4 - quitotetraase

C5 - quitopentaase

C6 - quitohexaase

IMER - Reator enzimático Imobilizado

HEC - hidroxietilcelulose

Tris - trishidroximetilaminometano

AAs - aminoácidos

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência

CE - eletroforese capilar

### III- RESUMO

A presente tese é o resultado de um complexo trabalho de instrumentação em Eletroforese Capilar (CE) com detecção condutométrica sem contato ( $C^4D$ ) visando à análise de biomoléculas. No que diz respeito à instrumentação, dois equipamentos de CE (H1 e B1), que possuem um sistema único de eletrólise separada (MSE), foram desenvolvidos. H1 possui apenas um capilar, e nele foi desenvolvida a maioria dos experimentos apresentados nesse trabalho. Neste equipamento, foi implementado um sistema de marcas térmicas, cuja aplicação foi demonstrada na correção de variações nos tempos de migração dos íons  $Na^+$  e  $K^+$  presentes em clara de ovos. Também realizamos a separação e detecção ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) de proteínas entre 12 e 66 kDa, comprovando que a detecção dessas moléculas é factível, desde que se use agentes que evitem a adsorção. Experimentos de separação e detecção de quitoooligossacarídeos produzidos enzimaticamente também foram desenvolvidos em H1. Com o uso de NaOH como eletrólito de corrida acrescido de acetonitrila como agente modificador, verificamos a separação completa de seis quitoooligossacarídeos (C1 a C6) com limites de detecção e quantificação inferiores a  $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  e  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente. Após ensaios enzimáticos dos substratos C2 a C6 com a quitinase purificada de um besouro *Tenebrio molitor* (TmChi), observamos que esta cliva com baixíssima eficiência tanto C2 como C3. A mesma é capaz de clivar C4 produzindo C2 e sua ação sobre C5 gera C2 e C3, sendo este o substrato de maior afinidade. C6 também é clivado por essa quitinase, gerando, contudo, C2 ou C3, o que indica que ela é uma endoquitinase. O equipamento B1 possui oito capilares e oito detectores condutométricos sem contato, possuindo a maior relação sinal/ruído a 1 MHz e  $4 V_{\text{pico-a-pico}}$ . O equipamento possibilita a separação simultânea de até oito amostras distintas com quatro possíveis eletrólitos e potenciais de trabalho. Nesse equipamento, foram desenvolvidas as separações dos vinte aminoácidos proteínogênicos, usando-se duas condições distintas de separação, ambas em meio ácido. Separações em meio básico e com potenciais de separação variados também foram avaliadas. Além dos sistemas H1 e B1, também foi desenvolvido um microchip em PDMS com um biorreator enzimático (IMER) para detecção de glicose. A detecção de peróxido formado pela ação da enzima glicose oxidase presente no IMER foi realizada por amperometria. O chip apresentou as melhores condições de separação e detecção desse açúcar usando-se eletrodo de trabalho a 0,9V, pH 8,5 e separação a 1100 V. Foi verificada uma relação linear entre as concentrações de 0,1 a  $6,2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de glicose injetada, com relação ao pico de corrente obtido. Com as condições otimizadas do chip, determinou-se a concentração de glicose em amostra de refrigerante, obtendo-se uma concentração de  $216 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , valor semelhante ao obtido em literatura.

#### IV- ABSTRACT

This work shows the development of two equipments (H1 and B1) of capillary electrophoresis (CE) with contactless conductivity detection ( $C^4D$ ) applied to the analysis of biomolecules. They have a system named MSE (module for separated electrolysis) that avoids the harmful effect of electrolysis. H1 have only one capillary and the majority of the experiments presented here were developed in this equipment. It also have a system of thermal marks (TM) used to correct the EOF effect on the migration of ions  $Na^+$  e  $K^+$  in egg white. We also developed the separation and detection of proteins ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) between 12 and 66 kDa, showing that  $C^4D$  can be used to detect these molecules using substances to avoid adsorption on the capillary wall. Experiments of separation and detection of chitooligosaccharides enzymatically produced were also developed in H1. By using NaOH and acetonitrile as the electrolyte, we did the complete separation of six chitooligosaccharides (C1 to C6) with limits of detection and quantification less than  $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively. After the enzymatic assays of C2 to C6 with the chitinase purified from the beetle *Tenebrio molitor* (TmChi), it is observed that this enzyme cut these substrates with very low efficiency, as expected. This enzyme also cut C4 producing C2 and cut C5 producing C2 and C3. C5 is the best substrate for this enzyme. C6 produces C2 and C3, showing that this enzyme is a endo-chitinase type.

The equipment B1 has eight capillaries and eight  $C^4D$  detectors with the best signal/noise ratio at  $1 \text{ MHz}$  e  $4 V_{\text{peak-to-peak}}$ . By using B1, it is possible run up to eight different samples with four different electrolytes and separation potentials. In this equipment, we develop the separation of 20 proteinogenic amino acids (AAs) using two different separation conditions at low pH. Separations of these molecules using high-pH electrolytes and with different potentials were also demonstrated.

The development of a microchip of PDMS with an immobilized enzyme reactor (IMER) to the glucose detection was also constructed. The detection of hydrogen peroxide produced by the enzyme glucose oxidase linked on the IMER was measured by amperometry. The performance of this chip was evaluated with glucose and peroxide injections. The best potential for the oxidation of the hydrogen peroxide was 0.9V, using electrolyte at pH 8.5 and 1100 V as the potential of separation. A linear curve was observed between peak current and glucose concentration in the range from 0.1 up to  $6.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Determinations in soda shows  $216 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  of glucose, that is a good agreement with other reports.

## **1- INTRODUÇÃO**

### **1.1 - Introdução e importância da Eletroforese Capilar**

Dentre as técnicas analíticas de separação, a Eletroforese Capilar (CE) é uma das mais recentes, sendo que a introdução do primeiro equipamento comercial data de aproximadamente 20 anos. No início da década de 80, a CE surgiu como uma alternativa à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), que ainda hoje é uma das técnicas mais utilizadas em análises qualitativas e quantitativas dos mais diversos compostos. Apesar de uma relativa demora da introdução da CE no mercado, possivelmente pela prevalência de outras técnicas analíticas mais consolidadas, as companhias e institutos de pesquisa continuaram aperfeiçoando os equipamentos e criando as mais variadas condições de separação em CE.

A CE é considerada uma ferramenta muito poderosa de análise, pois conta com baixo custo operacional, possui alta resolução e ainda tem reduzido volume de descartes. O consumo de amostras geralmente é da ordem de microlitros e a de reagentes, de mililitros, o que torna o equipamento econômico e pouco poluidor. Esta técnica é reconhecidamente versátil, e vem sendo utilizada com sucesso para a separação e quantificação dos mais variados tipos de compostos, sejam pequenos íons, moléculas neutras e até mesmo grandes biomoléculas.

O ano de 2003 ficou marcado no campo científico como um dos mais importantes devido à conclusão do Projeto Genoma, responsável pela realização do seqüenciamento completo de três bilhões de bases do DNA da espécie humana [1]. Esse notável feito só foi possível graças ao uso de equipamentos multicapilares de CE, tornando-se assim uma técnica muito mais conhecida. Graças ao advento destes equipamentos, o projeto pode ser concluído em pouco tempo, o que seria impossível através dos laboriosos géis feitos anteriormente. Este é apenas um exemplo do impacto que desenvolvimentos instrumentais em CE podem gerar. Porém, apesar do avançado

estágio de maturidade, ainda hoje, novas implementações vêm sendo realizadas para aperfeiçoar a técnica.

Além da já consagrada utilização da CE no seqüenciamento de DNA, a técnica já comprovou ser extremamente eficiente na análise das mais variadas moléculas em áreas como por exemplo, a química analítica, forense, orgânica, análises clínicas, de produtos naturais, na indústria farmacêutica e da biologia molecular [2-9]. Sua versatilidade é tamanha que também pode ser utilizada para responder a questões bastante complexas como, por exemplo, interações entre biomoléculas [10].

## **1.2 - Colunas capilares e o fluxo eletrosmótico**

As colunas capilares típicas utilizadas em CE são geralmente feitas de tubos de sílica fundida de diâmetro interno micrométrico (tipicamente inferiores a 100 µm) recoberta com um polímero de poliimida que lhe confere alta resistência e maleabilidade. Também existem colunas capilares de sílica revestidas interna ou externamente com outros polímeros, ou mesmo capilares constituídos de materiais poliméricos como polietileno ou teflon. Contudo, as colunas de sílica sem recobrimento interno e com recobrimento externo de poliimida são as mais comumente utilizadas.

Uma das características mais interessantes e atraentes em CE é que o “movimento” da solução no interior do capilar se dá através do Fluxo Eletrosmótico (EOF) [11]. A existência do EOF se deve à dupla camada elétrica que se desenvolve na interface sílica/solução. Em pH acima de 3, ocorre a dissociação dos grupos silanóis superficiais (Si-OH) que constituem a parede interna do capilar de sílica, conferindo à superfície interna um caráter negativo. Com isso, os cátions do eletrólito que preenchem o capilar tendem a se aproximar da parede e, sob um campo elétrico, são atraídos para o cátodo. Como estes estão solvatados arrastam o solvente,



proporcionando o “bombeamento” de solução no interior do capilar. Desta forma, a movimentação dos íons dentro do capilar passa a depender não somente da sua própria mobilidade, mas também da mobilidade do EOF, que conseqüentemente dependerá da composição do eletrólito utilizado.

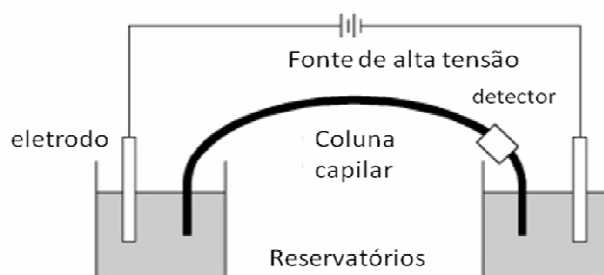
Assim, o tempo que uma espécie injetada levará para chegar até o detector (velocidade aparente) é representado pela velocidade efetiva (velocidade do íon) somada à velocidade do EOF. Em condições normais (polaridade normal), o EOF ocorre do ânodo (pólo positivo) para o cátodo (pólo negativo). No entanto, quando desejado, o EOF pode ser reduzido, suprimido ou mesmo ter o sentido invertido. A redução e/ou supressão do EOF no capilar é, na maioria dos casos, aplicada com o objetivo de reduzir a mobilidade aparente das espécies no interior do capilar, favorecendo, desta forma, a separação de espécies de mobilidades muito próximas. A redução ou supressão do fluxo também pode ser conseguidas com a diminuição do pH ( $\leq 3,0$ ), a adição de solventes orgânicos, ou aditivos para recobrir a parede interna do capilar, tais como, tensoativos catiônicos, álcool polivinílico, polímeros de celulose entre outros. A escolha adequada do tensoativo, assim como de sua concentração, permite o controle direto da magnitude do EOF e mesmo a sua inversão [12]. A inversão do EOF com a utilização de tensoativos catiônicos como o CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) é bastante comum e útil, especialmente na análise de ânions. Também existem capilares comerciais que já são revestidos internamente com polímeros, geralmente com o objetivo de evitar adsorção de biomoléculas nas paredes internas do capilar.

O EOF é caracterizado por um perfil planar de velocidade não contribuindo para o alargamento das bandas. Esse fato distingue a CE dos métodos cromatográficos em fase líquida (colunas não empacotadas) que apresentam perfil parabólico de velocidade dentro da coluna, característico do fluxo induzido por pressão [13]. Essa característica permite que se obtenha picos ainda mais estreitos e definidos.

Outro ponto a favor da CE é que sua instrumentação é relativamente simples, como será visto nos capítulos a seguir. Esse fato aliado à não necessidade de volumosas bombas propulsoras para o fluxo de solução no capilar possibilita a redução do tamanho do equipamento e também a construção de equipamentos multicapilares, que permite dezenas ou centenas de análises simultâneas.

### 1.3 - Princípios de funcionamento da CE e o módulo de eletrólise separada (MSE).

De uma forma bastante geral, podemos dizer que as separações em CE são baseadas nas diferenças de mobilidade dos analitos em solução, devido à aplicação de um campo elétrico. Uma representação esquemática de um sistema de CE convencional pode ser visualizada na **Figura 1**.



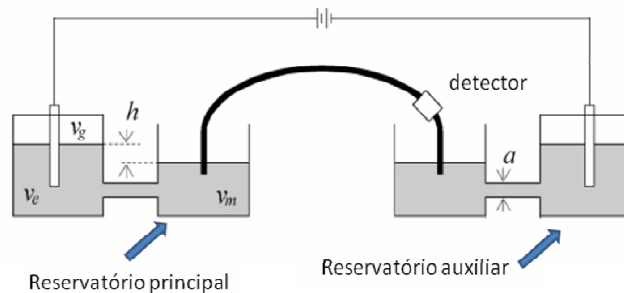
**Figura 1-** Representação esquemática de um equipamento de CE convencional

Como se pode observar na **Figura 1**, um equipamento de CE consiste de dois reservatórios conectados por um tubo capilar e preenchidos por um mesmo eletrólito. Esses reservatórios possuem eletrodos metálicos (geralmente de platina) onde é aplicada uma diferença de potencial (tipicamente variando de 10 a 30 kV). O campo elétrico formado promove a migração das espécies que são injetadas em uma das extremidades do capilar. O fato de o capilar possuir um diâmetro interno bastante reduzido (tipicamente 20 a 100 $\mu$ m) possibilita uma dissipação eficiente

do calor gerado pela passagem da corrente elétrica (efeito Joule) [11]. Os analitos injetados migram no interior do capilar e são detectados através de um detector que é disposto na extremidade oposta à da injeção, e que está ligado a um computador, responsável pela aquisição dos dados.

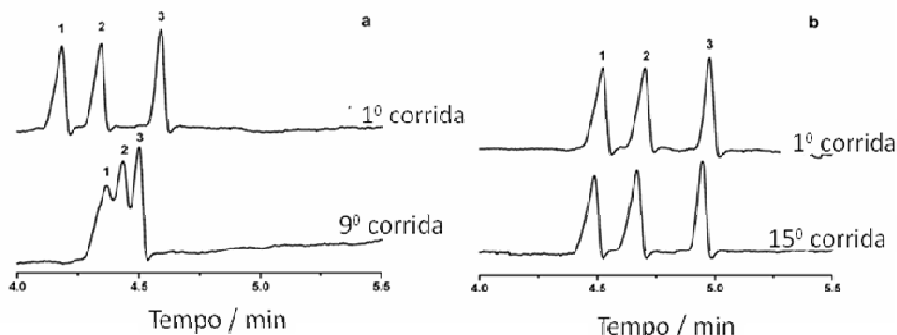
Todos os equipamentos de eletroforese capilar construídos até hoje possuem uma instrumentação básica semelhante à descrita acima. Sendo assim, sempre as duas extremidades do capilar estão inseridas nos reservatórios onde estão posicionados os eletrodos de alta tensão. No entanto, a aplicação da diferença de potencial que permite a separação das espécies também leva a processos eletrolíticos que acarretam em alterações na composição e no pH do eletrólito. Como as separações em CE geralmente são bastante dependentes desses dois fatores, em especial o pH, é praticamente uma necessidade a utilização de soluções tampão a fim de minimizar essas alterações. Mesmo com o uso de soluções tampão, após um certo número de corridas, se faz necessário a troca da solução dos reservatórios, e também a renovação da solução no capilar. Por esse motivo, é comum entre análises os usuários programarem os equipamentos para trocarem os eletrólitos e promoverem a limpeza entre corridas, obtendo-se assim resultados mais reprodutíveis.

No ano de 2005, um trabalho de nosso grupo de pesquisa publicado na revista *Analytical Chemistry* [14] demonstrou, com o uso de seringas e tubos capilares, que se os eletrodos de alta tensão fossem introduzidos em reservatórios distintos daqueles em que estão as extremidades do capilar, isso minimizaria os efeitos danosos decorrentes da eletrólise. Sendo assim, foi criado um sistema onde o contato elétrico se dá através de pontes salinas de pequeno diâmetro conectadas a reservatórios externos (**Figura 2**).



**Figura 2** - Representação esquemática de um equipamento de CE com sistema de eletrólise separada

Nesse trabalho, foi demonstrada a separação de tartarato, malato e succinato, utilizando-se como eletrólito ácido benzóico/benzoato de sódio  $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 5,5 com CTAB  $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  sob duas condições. Uma em um sistema convencional e a outra com o sistema de eletrólise separada. Pode-se observar na **Figura 3a** que na primeira corrida ocorreu a separação dos três analitos corretamente, no entanto, após a nona corrida subsequente observa-se uma clara sobreposição de picos, decorrente de alterações na composição do eletrólito. No entanto, com a utilização desse sistema de reservatórios acessórios ou MSE (*module for separated electrolysis*), mesmo após a décima quinta corrida, a reprodutibilidade das separações continuava a mesma, o que comprova o funcionamento do sistema (**Figura 3b**).

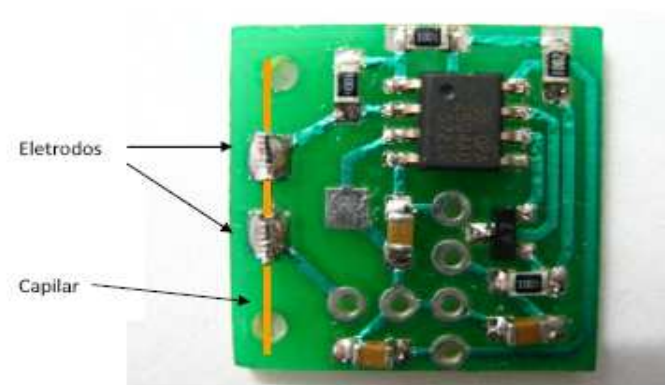


**Figura 3 a e b**- Eletroferogramas para a separação de uma mistura de tartarato (1), malato (2) e succinato (3)  $200 \mu \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Eletrólito de corrida  $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ácido benzóico/benzoato (pH 5,5) e  $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de CTAB. Potencial aplicado; 10KV, injeção hidrodinâmica 1 kPa, 20s. Capilar de sílica fundida  $75 \mu \text{ m}$  d.i. e 48 cm de comprimento (40 cm efetivos). Detector  $\text{C}^4\text{D}$  a 600KHz. **(a)** – Sem sistema de eletrólise separada, **(b)** com o sistema de eletrólise separada.

Esse trabalho foi fundamental para o desenvolvimento desta tese, já que os dois equipamentos que descreveremos adiante (H1 e B1) possuem tal sistema. As figuras 1, 2 e 3 foram adaptadas da referência [14].

#### **1.4 - A Detecção em CE e o detector condutométrico sem contato (C<sup>4</sup>D)**

Dentre os sistemas de detecção em CE, encontramos aqueles que empregam espectrofotometria no ultravioleta (UV), fluorescência induzida por laser (LIF), espectrometria de massas e sensores eletroquímicos, sendo que os sistemas ópticos ainda são os mais utilizados [15]. Em 1998, dois grupos de pesquisa introduziram simultaneamente uma nova estratégia de detecção que hoje é conhecida como detecção condutométrica sem contato (CCD), detecção condutométrica sem contato capacitivamente acoplada (C<sup>4</sup>D) ou como detecção oscilométrica. Nosso grupo de pesquisa – como um dos que introduziram este detector – também tem atuado no aprimoramento da instrumentação [16-19]. A configuração básica de um sistema C<sup>4</sup>D possui dois eletrodos cilíndricos posicionados externamente ao capilar, sendo que em um deles se aplica um sinal alternado de alta frequência produzido por um gerador de sinais. O sinal analítico é obtido pelo monitoramento da corrente que chega ao outro eletrodo, e que é proporcional à condutividade da solução presente da cela oscilométrica. A cela corresponde ao espaço entre os dois eletrodos. Devido aos eletrodos ficarem do lado externo do capilar, isto evita a contaminação dos mesmos e proporciona o desacoplamento do circuito detector dos altos valores aplicados para a separação eletroforética. A **Figura 4** apresenta um detector condutométrico sem contato.



**Figura 4** - Detector condutométrico sem contato

Já existem diversas variantes deste detector apresentado acima, e mesmo operando com diferentes circuitos eletrônicos e amplitude ou frequência de trabalho, o princípio de funcionamento é o mesmo. A troca de capilar também é simples e rápida, pois a camada de poliimida que reveste o capilar não precisa ser removida.

Uma tendência inicial que foi sendo reconsiderada ao longo do tempo diz respeito ao campo de aplicação da  $C^4D$ . No início, sua aplicação foi mais focada na detecção de pequenas espécies iônicas tais como metais alcalinos, alcalinos terrosos e ânions de ácidos fortes. De fato, a detecção condutométrica é bastante adequada nesses casos, porém hoje sabe-se que as mais variadas substâncias, como por exemplo mono e oligossacarídeos, aminoácidos e peptídeos também são facilmente detectáveis com a  $C^4D$  [20-24]. A utilização de um detector  $C^4D$  é uma alternativa relativamente barata e sensível comparado com aparatos ópticos de detecção, que dependem de lâmpadas, monocromadores e fotocélulas.

As respostas desse tipo de detector são dadas essencialmente pelas diferenças de condutividade entre o eletrólito e o analito, ou seja, a detecção é baseada na substituição do co-íon presente no eletrólito pelo analito. Nos casos em que o analito apresenta maior mobilidade que o co-íon do eletrólito ocorre um aumento da condutividade nessa região, o qual é registrado como

um sinal positivo. Por outro lado, quando o co-íon apresenta maior mobilidade que o analito, o pico é registrado como um sinal negativo. Portanto, quanto maior a diferença entre as mobilidades, maior a sensibilidade obtida [25].

### **1.5 - Experiências prévias em instrumentação em Eletroforese Capilar**

Em meados de 1997, foram construídos dois equipamentos de CE com detecção condutométrica sem contato em nosso laboratório, que foi o ponto principal da tese de doutorado do hoje professor da Unicamp Dr. José Alberto Fracassi da Silva. Esse feito possibilitou um grande aprendizado no desenvolvimento de instrumentação em CE, em especial na detecção  $C^4D$ . Com o tempo, esses equipamentos se tornaram ferramentas de trabalho para o desenvolvimento de dissertações de mestrado, teses de doutorado e de artigos publicados em diversas revistas nacionais e internacionais. Além disso, esses dois equipamentos serviram para o ensino dessa técnica para os alunos de graduação. Visto que nosso laboratório já possuía sólidos conhecimentos em instrumentação em CE e a demanda por novos equipamentos ao nosso laboratório e ao Instituto também era grande, surgiu o desafio da construção de novos equipamentos. Visto que eu possuía uma formação voltada à bioquímica e que também já possuía previamente conhecimentos em eletrônica e mecânica, o desenvolvimento de equipamentos para análise de biomoléculas se tornou o foco principal do meu doutorado.

### **1.6 - Os equipamentos de eletroforese capilar H1 e B1: Uma abordagem geral.**

No início de 2003 começamos a construir o novo equipamento que foi denominado H1. No entanto, já que iríamos construir um novo equipamento, nada mais interessante do que

implementar o sistema MSE definitivamente nesse equipamento, e com isso ampliarmos nossas possibilidades de análises.

Em capítulos adiante mostraremos a construção de H1, que conta com esse sistema e onde foram realizadas a grande maioria dos experimentos demonstrados nessa tese. O aprendizado adquirido em H1 nos auxiliou muito na construção de B1 que é um equipamento ainda mais complexo, e possui oito capilares. Como será visto, B1 pode trabalhar com até quatro diferentes potenciais de separação, quatro diferentes eletrólitos de corrida tamponados ou não, e injetar automaticamente até oito amostras diferentes.

O equipamento H1 foi construído por mim e por um técnico experiente (Fernando Silva Lopes) a partir de um projeto de meu orientador. Essa construção demandou meses para ser finalizada, e alguns outros para readequação do projeto, especialmente no sistema MSE, que não existe em nenhum outro equipamento construído até hoje. A construção de B1 contou com uma equipe ainda maior de desenvolvedores. Para se ter uma idéia das novas implicações desses equipamentos, uma aluna de mestrado do laboratório já concluiu sua dissertação de mestrado utilizando o equipamento H1, e cujos experimentos só poderiam ter sido realizados neste equipamento devido ao MSE. Esse trabalho resultou em um trabalho já publicado na revista *Analytical Chemistry*, que trata do uso de marcas térmicas (TMs) [26], que serão melhor descritas nas explicações sobre H1. Não iremos demonstrar todas as possibilidades das TMs, no entanto o entendimento da geração dessas marcas foram compreendidas com o uso de eletrólitos muito simples como NaCl ou KCl. Sendo assim, o MSE foi de fundamental importância para esses experimentos. Outros dois artigos que tratam da separação e quantificação de quitoooligossacarídeos [21-22] também foram realizados em H1 usando-se NaOH como eletrólito de corrida. Outro artigo que trata da detecção do íon  $H^+$  também está em fase final de escrita e só pôde ser desenvolvido devido a H1 possuir o MSE. Com o uso de B1, outro aluno está prestes a defender seu mestrado que trata da reversão do fluxo eletrosmótico através da aplicação de



potencial externo ao capilar. Visto que B1 possui quatro fontes bipolares de alta tensão, isto se torna relativamente simples, e resultados satisfatórios já foram obtidos. Estes são exemplos da importância desses novos equipamentos tanto para o desenvolvimento desta tese como para o grupo de pesquisa como um todo.

Como sugerido pela banca examinadora em meu exame de qualificação, uma grande utilidade para o equipamento B1 poderia ser a detecção de aminoácidos (AAs), pois existe uma grande demanda de análise dessas moléculas, e com um equipamento multicapilar poderíamos reduzir significativamente o tempo e o custo dessas análises. Como será visto adiante realizamos diversos experimentos neste sentido em H1 e B1, conseguindo-se separações bastante satisfatórias dos vinte AAs proteínogênicos.

## **1.7 - Os Microchips**

A partir da década de 60 houve uma grande revolução no campo da eletrônica e informática. O advento dos sistemas transistorizados e dos chips (microchips) possibilitou em poucas décadas a miniaturização de diversos equipamentos como televisões, rádios computadores e telefones celulares. Além de serem essenciais em nosso dia a dia, esses produtos também são responsáveis pela existência de um mercado que movimenta bilhões de dólares todos os anos [27].

No entanto, em Química, o termo microchip ou chip é utilizado para designar pequenos dispositivos que possuem canais utilizados para fazer predominantemente, eletroforese capilar miniaturizada. No início da década de 90, o termo  $\mu$ TAS (micro-sistemas para análises totais) proposto por Manz e colaboradores [28] se popularizou bastante, porém, com o tempo, diversos outros termos foram surgindo para designar os microchips.

Os microchips vêm sendo utilizados para resolver diversos problemas, entre eles os relacionados a análises de biomoléculas. Alguns exemplos são: diagnósticos clínicos [29-30],

imuno ensaios [31-32], análises de proteínas [33-34], análises e separações de DNA [35-36], reação da polimerase em cadeia (PCR) [37], seqüenciamento de DNA [38-40], detecção de glicose [41] e também análises de interesse ambiental [42-43].

Com o desenvolvimento dos microchips, diversas etapas do processamento analítico - como introdução e pré-tratamento de amostras, reações químicas, separações e detecção - puderam ser integradas com certa facilidade em um único dispositivo [44-46]. Por esse motivo os microchips também vieram a ser chamados de *Lab-on-a-chip*, cujo termo é uma alusão à compactação de diversas etapas desenvolvidas em um laboratório em um único chip. Existem chips construídos com os mais variados tipos de materiais como vidro, PDMS poli(dimetilsiloxano), PMMA poli(metilmetacrilato), *toner* sobre vidro ou poliéster, entre outros [41, 47-50].

Outra diferença básica entre a CE convencional e a realizada em microchips é que geralmente os canais de separação são mais curtos (tipicamente 3 a 5 cm) e os potenciais de separação aplicados também são menores (entre 1000 e 3000V). No entanto, existem diversos tipos de chips contendo as mais variadas configurações, e portanto esses valores são apenas alguns dos mais comumente encontrados. Os diâmetros dos canais são semelhantes aos usados em CE convencional.

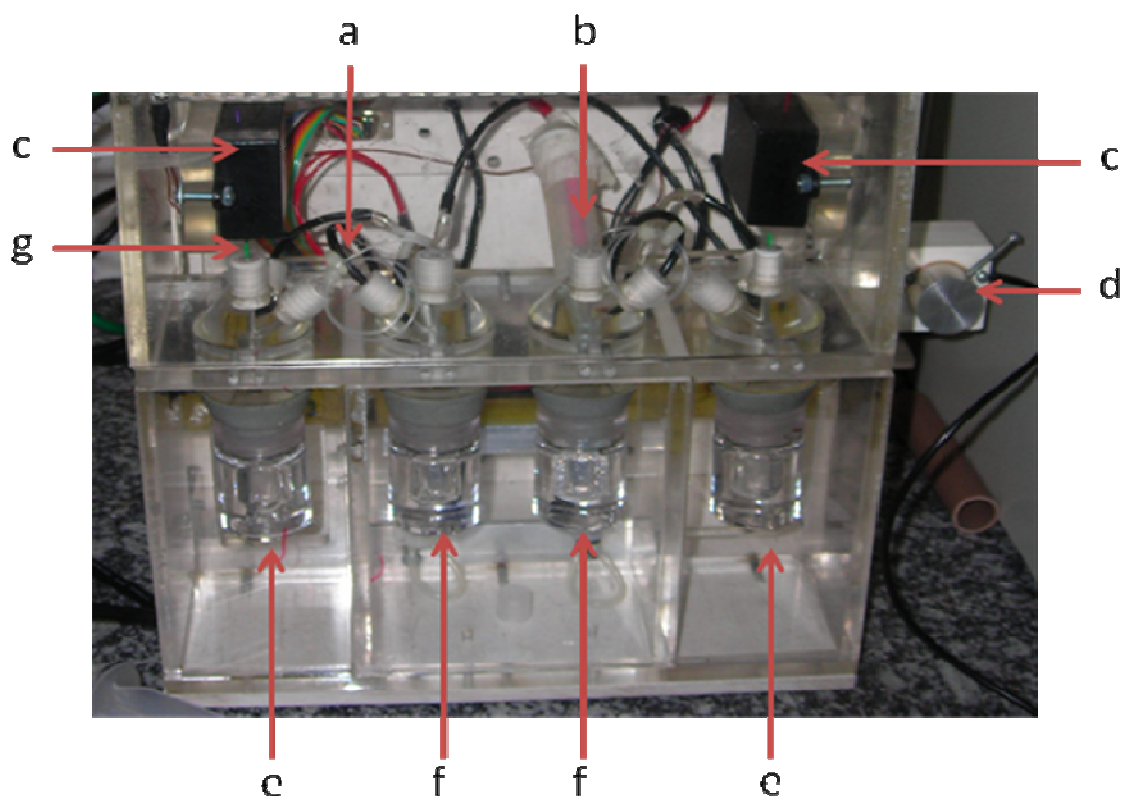
## **1.8 - Objetivos**

O objetivo deste trabalho foi desenvolver instrumentação baseada em eletroforese capilar com sistemas de detecção eletroquímica e aplicá-la a análise de biomoléculas, ampliando as demonstrações de que, com a instrumentação adequada, é possível aplicar esta técnica a diferentes problemas analíticos.

## 2 - A CONSTRUÇÃO DE H1

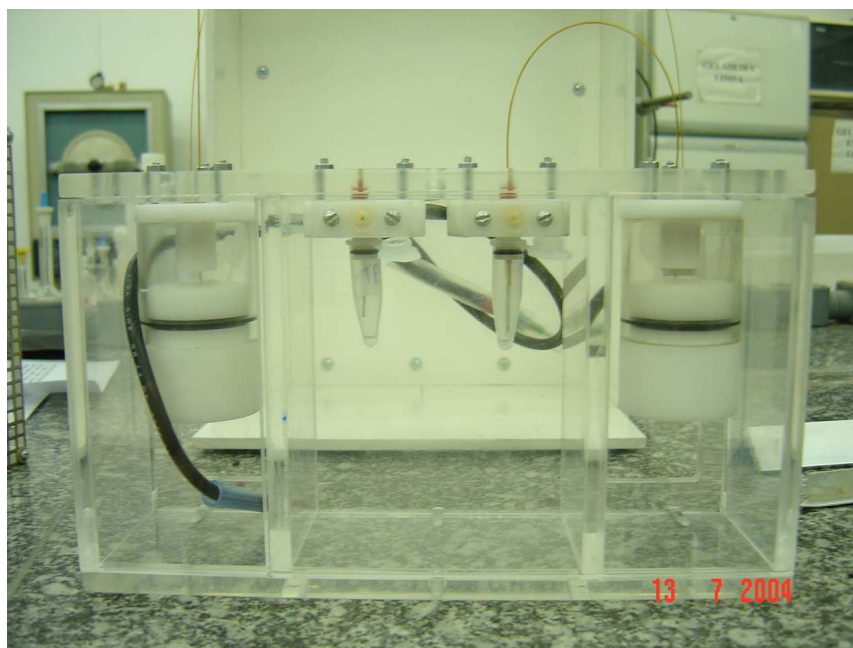
### 2.1 - Desenvolvimento de H1 com o MSE

O início da construção deste equipamento se deu pelo módulo de acrílico que fica na frente do mesmo, que possui duas portas nas extremidades, onde ficam os reservatórios de amostra. No centro existe uma porta de acesso aos reservatórios de eletrólise, onde está o reservatório de alta tensão (direita) e o outro, contendo o terra (esquerda) (**Figura 5**). Todas as três portas possuem sensores ópticos de segurança que, ao serem abertas, desabilitam a alta tensão do equipamento, evitando choques elétricos. Todos os quatro reservatórios do equipamento são de acrílico, onde vials de 1,5 a 2 mL com os eletrólitos são introduzidos na parte inferior destes e rosqueados na parte superior. A vedação se dá através de *o-rings* encaixados nesses reservatórios.



**Figura 5** - Módulo Frontal de H1 – (a) ponte salina (b) cabo de alta tensão (c) detectores (d) válvula (e) reservatórios para injeção de amostras (f) reservatórios para eletrólise (MSE) (g) capilar

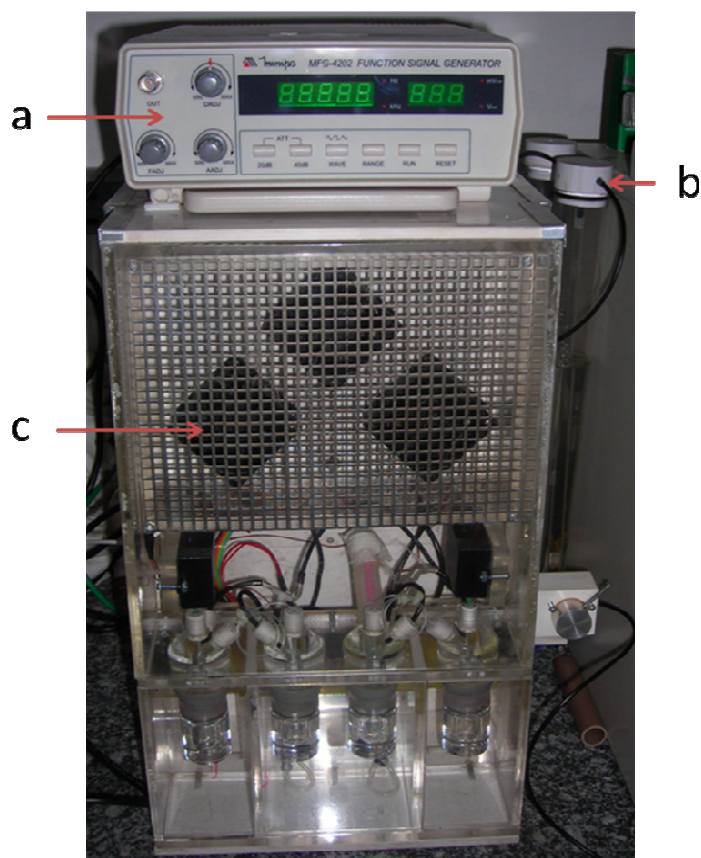
Na parte superior dos reservatórios de amostra (os dois externos) existem os encaixes do capilar, a tubulação de pressurização e a entrada das pontes salinas. Tanto os *flushs* para limpeza das tubulações quanto para renovação do eletrólito do capilar são feitos com o uso de uma seringa, que produz vácuo nos reservatórios direito e esquerdo. Esse sistema demonstrou ser bastante robusto e eficiente. No entanto, antes de chegarmos a um projeto confiável desse módulo, como o apresentado acima, diversos testes e protótipos foram desenvolvidos. A **Figura 6** apresenta a primeira versão desse módulo, para se fazer uma pequena comparação com o projeto final (Figura 5).



**Figura 6-** Versão inicial do módulo frontal de H1

A versão apresentada nessa **Figura 6** apresentou muitos problemas decorrentes da vedação entre os reservatórios, e os *o-rings* de vedação. Outro problema era o preenchimento das pontes salinas realizadas através de vácuo realizado nos reservatórios internos. O capilar de sílica (500  $\mu\text{m}$ ) usado como ponte salina também se rompia facilmente devido à curvatura acentuada a que

ele era submetido. Outro problema encontrado foi decorrente de fugas de alta tensão devido à proximidade entre os eletrodos e um insuficiente sistema de isolamento. Pequenos problemas de ordem eletrônica também foram constatados e reformulados. Essas explicações tem por objetivo demonstrar que muitas vezes mesmo um projeto bastante adequado pode apresentar diversos imprevistos. Somente os testes que muitas vezes demoram meses podem prover informações acerca da eficiência de um sistema e o uso é o melhor instrumento para se detectar fragilidades e levar a readequações para tornar o equipamento confiável a um usuário comum. A **Figura 7** mostra uma visão frontal completa de H1.



**Figura 7** – Vista frontal de H1- (a) gerador de frequências, (b) coluna d'água (c) ventoinhas

A **Figura 8** mostra um diagrama de blocos do equipamento H1. Nele pode-se visualizar de que forma os subsistemas estão integrados e também os tipos de sinais que são responsáveis pelo controle do equipamento.

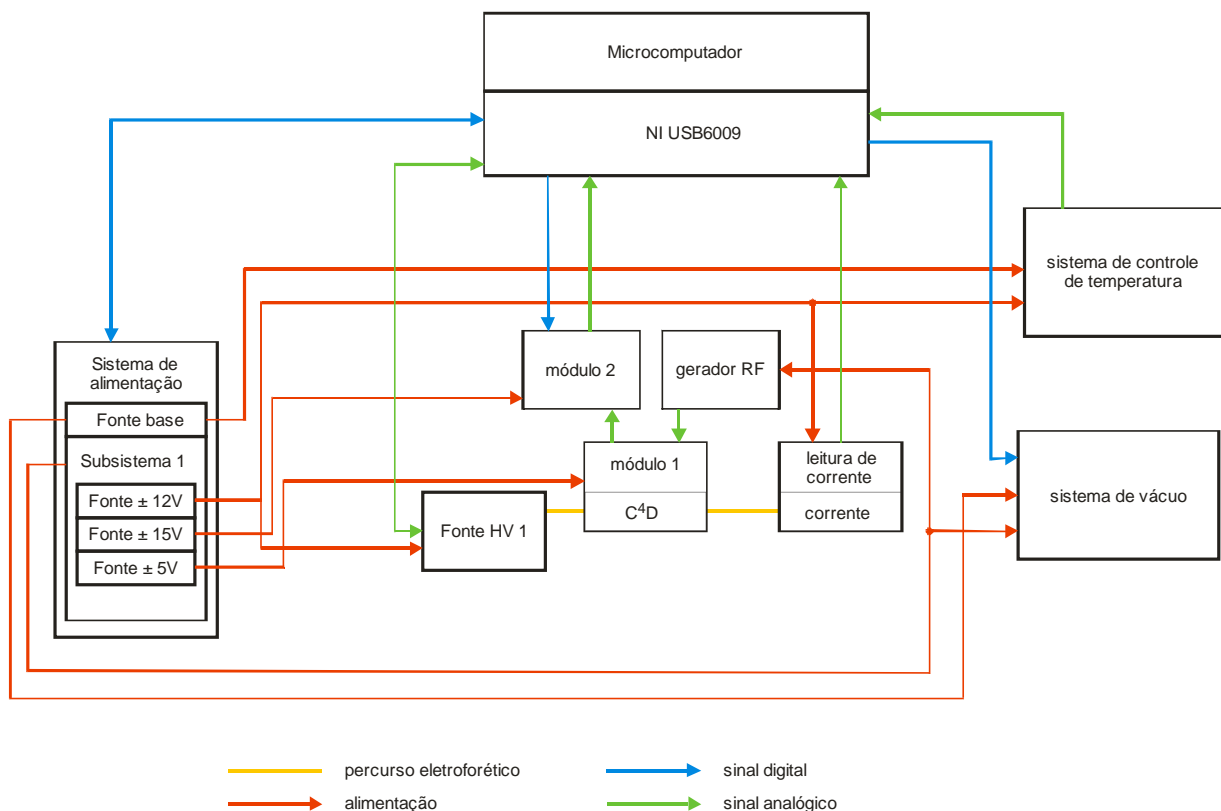
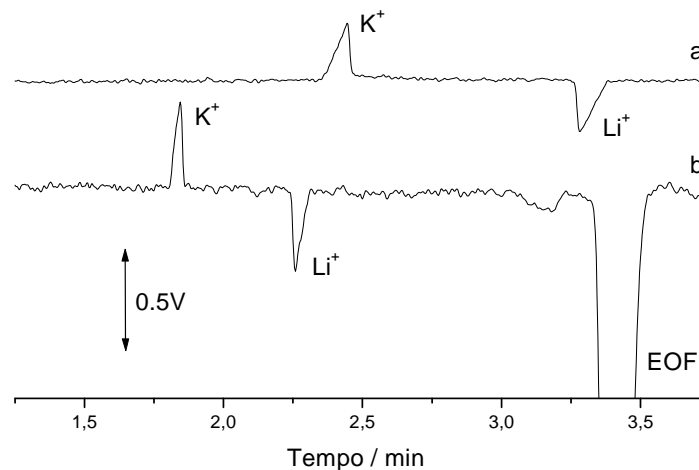


Figura 8 – Diagrama de Blocos do equipamento H1.

O funcionamento de H1 e também do sistema MSE será demonstrado através de diversos experimentos que serão apresentados ao longo da tese. Logo abaixo temos um primeiro eletroferograma (**Figura 9**) que mostra a separação dos cátions  $K^+$  e  $Li^+$  em dois diferentes eletrólitos não tamponados:  $NaCl\ 10\ mmol\cdot L^{-1}$  (**a**) e  $NaOH\ 10\ mmol\cdot L^{-1}$  (**b**), demonstrando o funcionamento do equipamento H1 com o sistema de eletrólise separada (MSE).



**Figura 9** – Injeção de uma mistura contendo KCl e LiCl ( $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) em dois diferentes eletrólitos (a) NaCl  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  e (b) NaOH  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Comprimento do capilar- 65 cm (53 cm efetivos). Diâmetro interno do capilar  $50 \text{ }\mu\text{m}$ . Injeção por pressão  $1 \text{ kPa}$ ,  $30 \text{ s}$ ,  $28,2 \text{ KV}$ . Detector  $\text{C}^4\text{D}$  operando a  $560 \text{ kHz}$ .

Como pode ser visto na **Figura 9**, e como predito por uma simulação feita no programa Peakmaster 5.1, o pico do potássio é positivo e o do lítio negativo [51]. Uma regra normalmente utilizada quando se trabalha com detecção condutométrica é a de se escolher um eletrólito contendo um co-íon cuja mobilidade seja significativamente diferente daquela do analito. Esta diferença se reflete em uma maior sensibilidade, pois a condutividade irá variar significativamente na zona onde está o analito. Por exemplo, se uma amostra contém analitos catiônicos de alta mobilidade, é preferível se utilizar um eletrólito contendo um cátion com a menor mobilidade possível. Em geral, a baixa mobilidade do co-íon é selecionada visando reduzir a condutividade do eletrólito de corrida, diminuindo a condutividade e aquecimento do eletrólito, aumentando-se assim a relação sinal/ruído [20]. Contudo, como previsto e comprovado teórica e experimentalmente, a alta mobilidade do contra-íon também é responsável por um incremento no sinal obtido, apesar deste fator geralmente não ser levado em consideração na escolha do

eletrólito. Utilizando-se o valor das alturas dos picos obtidos na **Figura 9** (para 18 corridas), o potássio aumentou em um fator de  $1,72 \pm 0,15$  e a sensibilidade do lítio em  $1,55 \pm 0,10$ , devido à mudança do ânion do eletrólito de cloreto para hidroxila. Estes valores são próximos dos previstos, que eram de 1,85 e 2,05 respectivamente [17]. Este experimento comprova que a escolha do contra-íon do eletrólito também pode e deve ser levado em consideração para uma maior sensibilidade.

## **2.2 - Injeção de amostra em H1**

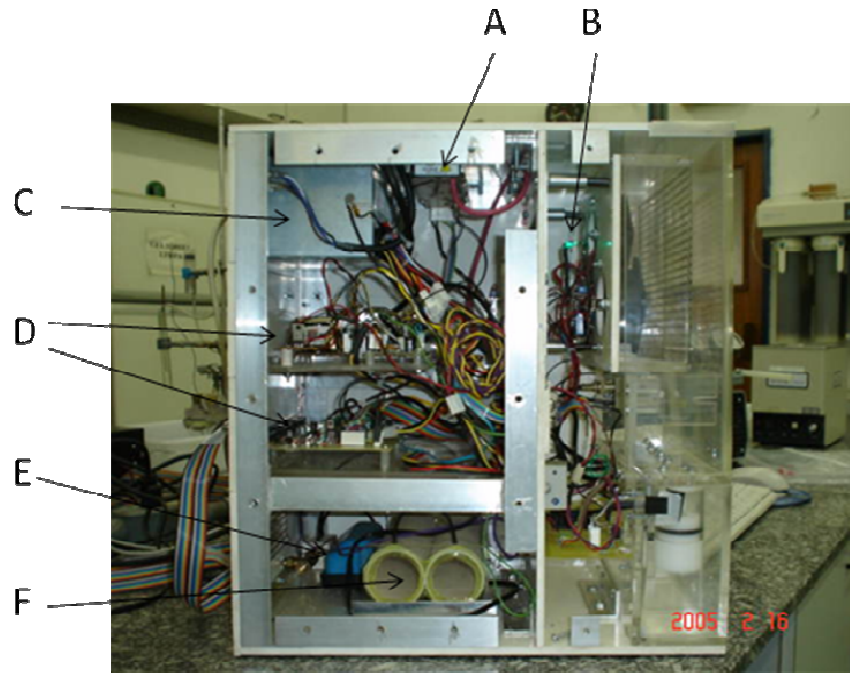
A injeção de amostras pode ser realizada de duas formas nesse equipamento. Para injeções eletrocinéticas o usuário pode selecionar no software a voltagem até o limite de 30 kV, que é a voltagem máxima que a fonte de alta tensão utilizada fornece. Neste tipo de injeção, as espécies com carga de mesmo sinal do eletrodo do reservatório de amostra migram, para o interior do capilar com uma velocidade que depende da mobilidade da espécie e da velocidade do fluxo eletroosmótico. Assim, dependendo da mobilidade da espécie, existe uma discriminação do material injetado eletrocineticamente, já que os íons de maior mobilidade migram preferencialmente para o interior do capilar.

O outro mecanismo, que é o mais utilizado, é a injeção por pressão. Para este fim utilizamos em H1 uma simples bomba de aquários domésticos 110V (indicada para 50 litros). O funcionamento dessa bomba se baseia em um diafragma acoplado a um solenóide que opera na frequência da rede elétrica, produzindo um fluxo de ar. Para evitar as pulsações características desse tipo de bomba esta foi acoplada a uma câmara que consiste de dois tubos de PVC interligados (17 cm de comprimento por 5cm de diâmetro) com as laterais vedadas com lâminas

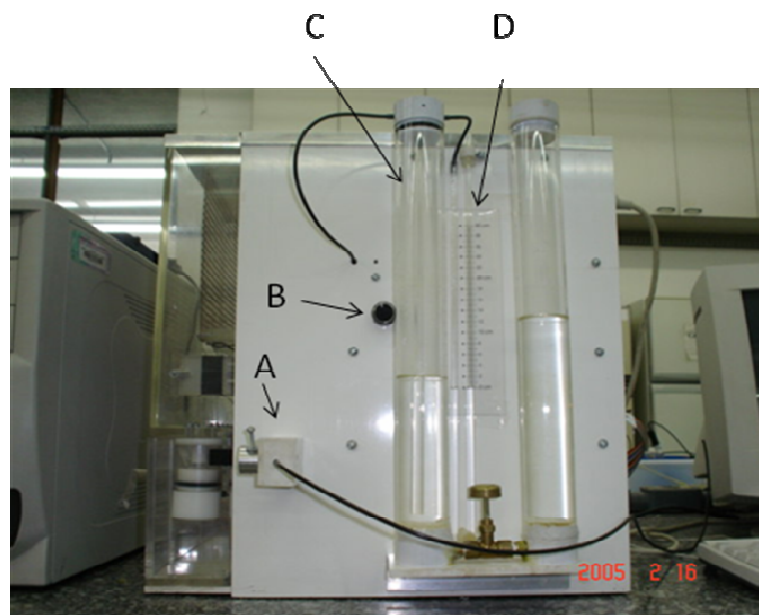


de acrílico, funcionando como um amortecedor para evitar estas flutuações, e assim tornar a injeção constante (**Figura 10**). Do lado externo do aparelho construímos dois tubos de vidro de trinta centímetros de altura interligados através de um registro na parte inferior. Este permite aumentar ou diminuir a pressão a ser injetada nos reservatórios pelo aumento ou diminuição da altura do reservatório principal que contém água. A pressão produzida pelo sistema é controlada pelo volume da água no reservatório onde o ar é borbulhado. O controle fino do borbulhamento é feito por uma válvula que fica na parte de trás do equipamento. A pressão máxima exercida por esse sistema é de ~2,4 kPa, que corresponde aos 25 cm de coluna d'água que cabem no reservatório. A pressão exercida pode ser conferida através de um marcador na lateral direita do equipamento (**Figura 11**).

Como esse equipamento foi desenvolvido com uma fonte de alta tensão de polaridade única (positiva) a análise de cátions é realizada injetando-se a amostra no reservatório direito e as amostras contendo ânions do lado esquerdo. Sendo assim, foi construída uma válvula em PVC, com furos posicionados adequadamente e com uma manta de borracha cujos sulcos direcionam a passagem do ar, que direciona a pressão da bomba para o reservatório da esquerda ou direita. Este equipamento foi construído com dois detectores, próximos à cada uma das extremidades



**Figura 10-** Visão lateral do equipamento H1- (A) fonte de alta tensão (B) sistema de termostatização, (C) Fonte de alimentação, (D) circuitos eletrônicos, (E) bomba de aquário, (F) amortecedor



**Figura 11-** Sistema de controle de pressão com o uso de coluna de água. (A) válvula de injeção (B) potenciômetro de controle de linha base (C) coluna d'água (D) tubo em U.

### **2.3 - Fontes de alimentação e alta tensão**

O equipamento H1 possui duas fontes de alimentação. Uma fonte simétrica foi construída utilizando os reguladores de tensão 7812 e 7912, fornecendo  $\pm 12 V_{reg}$ , que alimenta diversos circuitos do equipamento. A outra fonte, que fornece tensão para o restante do aparelho  $\pm 12 V$  e  $+5 V$ , provém de uma fonte comercial para computador 110/220 V.

A fonte de alta tensão é uma das partes mais importantes do equipamento e certamente a peça mais cara. Foi utilizada a fonte de alta tensão 30A12-P4-STD (Ultravolt, Ronkonkoma, NY) que pode fornecer um potencial de até  $+30 kV$ . A aplicação de uma tensão de  $0$  a  $+5 V$  fornecida pela PCL711-S na entrada *remote* da fonte varia na saída ( $HV_{out}$ ) uma voltagem de  $0$  a  $+30 kV$ . Assim, através do controle via software podemos selecionar a voltagem de trabalho. Essa fonte possui apenas polaridade positiva. Dessa forma, a análise de cátions é feita pela aplicação da amostra no reservatório da direita, observando-se o gráfico gerado pelo detector da esquerda. O inverso é verdadeiro para a análise de ânions.

Para evitar algum tipo de fuga de radiofrequência a fonte foi blindada com uma chapa metálica, o que também serviu para sua fixação na parte superior do equipamento. Devido à fonte de alta tensão possuir polaridade única, esta é economicamente mais barata do que uma bipolar, o que tornou o equipamento ainda menos dispendioso.

### **2.4 - Sistema de segurança do usuário**

Toda vez que qualquer uma das três portas de H1 é aberta, automaticamente a alta tensão é desabilitada, para evitar qualquer risco de choque elétrico. Essas possuem sensores ópticos que são monitorados constantemente, e que cortam a alta tensão caso algum sensor seja ativado. Este

circuito eletrônico foi desenvolvido com o uso do circuito integrado 74HC688 que é um comparador bit a bit que recebe sinais dos sensores, comparando níveis lógicos alto ou baixo, habilitando ou desabilitando a fonte de alta tensão. Ao mesmo tempo acendem-se leds vermelhos de alerta. Esse controle é independente do uso do software, pois caso ocorra algum problema de software não há perigo para o usuário. Quando a fonte de alta tensão está ligada, dois leds azuis permanecem ligados indicando seu funcionamento.

## **2.5 - Detecção condutométrica sem contato.**

O detector  $C^4D$  utilizado em H1 foi o mesmo utilizado nos equipamentos previamente construídos em nosso laboratório e igual ao apresentado no início da tese. Para seu funcionamento utilizamos um sinal alternado de alta frequência da ordem de 580 kHz, 2V pico a pico. O circuito do detector é bem pequeno, desenvolvido a partir do circuito integrado (CI) OPA 2604 AU, que possui internamente dois amplificadores operacionais. Todo detector possui montagem completa do tipo SMD (*surface mount device*) que permite a criação de detectores muito pequenos. Este detector foi montado em uma caixa plástica blindada internamente e com o circuito revestido por silicone, visando à diminuição de interferências por radiofrequência e ruídos mecânicos e térmicos. O sinal que sai do detector é então conduzido através de um cabo blindado até um outro circuito eletrônico denominado módulo 2. Neste módulo, é feita a compensação de linha base e a amplificação do sinal analítico e sua saída é ligada a uma interface PCL711 que está conectada ao computador. Esta recebe esses sinais e os transforma em valores digitais de 12 bits, os quais são apresentados em gráficos.

## 2.6 - Controle de temperatura

O controle da temperatura do capilar é fundamental devido à dependência da mobilidade com a viscosidade do eletrólito. Em equipamentos comerciais, normalmente o capilar é envolto por um sistema de refrigeração forçada, para evitar esse aquecimento, que além de alterar propriedades como a viscosidade do eletrólito, também é comumente responsável pela formação de micro bolhas que interrompem o fluxo de solução e comprometendo a separação. Visto que nosso sistema é mais simples que os comerciais e o detector usado em H1 é similar aos já utilizados nos outros dois equipamentos, optamos por uma melhora no sistema de controle de temperatura do equipamento. A estabilidade da temperatura é um parâmetro fundamental em C<sup>4</sup>D. Assim, para a manutenção da temperatura no sistema, desenvolvemos um sistema de troca de calor por convecção forçada em fase gasosa. O controle de temperatura foi conseguido usando-se um circuito eletrônico que liga resistências de aquecimento a partir dos sinais gerados pelo diodo sensor 1N4148. Tanto o sensor de temperatura quanto as resistências de aquecimento e as ventoinhas ficam muito próximas, de forma que o ar aquecido circule por todo compartimento a ser termostatizado. Para a redistribuição de ar, foram acopladas três ventoinhas que puxam o ar, de forma a prender o capilar contra uma tela metálica perfurada (**Figura 7**). Na placa de controle de segurança, que fica na parte da frente do equipamento, acoplamos uma ventoinha, que gera uma corrente de ar no sentido vertical. A temperatura de trabalho pode ser regulada através de um potenciômetro que está disposto atrás do equipamento.

Optamos por uma termostatização por volta de 30° C, no interior do equipamento. Assim, visto que a temperatura externa ao equipamento geralmente é de 25° C, quando a temperatura está prestes a passar dos 30° C automaticamente as resistências são desligadas e a temperatura começa a diminuir. Esse balanço entre o ligar e o desligar dos resistores possibilita um fino controle da temperatura do sistema sem a necessidade de um sistema de refrigeração. Neste equipamento,

decidimos dar especial atenção a este parâmetro, pois como já citado anteriormente, a experiência adquirida nos equipamentos anteriores demonstrou que uma boa detecção C<sup>4</sup>D é 50% advinda da eletrônica do detector e outros 50% do sistema de termostatização. O sistema se apresentou bastante eficaz como poderá ser visualizado mais à frente em outras análises.

## **2.7 - Softwares utilizados**

O software de controle e aquisição de dados, que é basicamente uma adaptação daquele utilizado por Fracassi da Silva [124] foi escrito em Delphi 5.0 sob plataforma Windows 98. Os dados foram tratados com o uso dos programas Microsoft Excel 2000 e Microcal Origin 5.0. A maioria das peças construídas foi previamente desenhada no programa Corel Draw e os desenhos dos circuitos impressos foram feitos usando o programa Eagle 4.11 (Easily Applicable Graphical Layout Editor).

## **2.8 - Interface**

Foi usada a placa de interface PCL711-S (Advantech, Taiwan) que possui oito canais de entrada para conversão A/D (analógica / digital) e um canal de saída D/A (digital / analógica), sendo os dois conversores de 12 bits. Apesar de ser uma placa bastante simples sua utilização foi bastante apropriada, permitindo um amplo controle e monitoramento do equipamento via software.

## 2.9 - Considerações finais sobre a construção de H1

Toda região frontal do equipamento foi construída em acrílico, tanto para conferir segurança ao usuário contra choques elétricos como também para deixar visível o capilar, sistema de termostatização, detector e cabo de alta tensão. Essa visibilidade teve uma finalidade didática, de facilitar o ensino da técnica a novos estudantes, facilitando o ensino dos princípios de funcionamento da CE.

A grande inovação presente em H1 é o sistema MSE, que inexistia em qualquer equipamento descrito até hoje. Aliado a ele, um sistema de controle de temperatura mais preciso também auxiliou para a obtenção de resultados satisfatórios neste equipamento. Além dessas características, esse equipamento também pode ser usado se necessário em trabalhos de campo, pois tem o tamanho ligeiramente maior que uma CPU de computador e pode operar até mesmo com uma bateria de carro de 12 V, com o uso de um pequeno transformador. Essa característica também é interessante de se levar em consideração no que diz respeito à portabilidade.

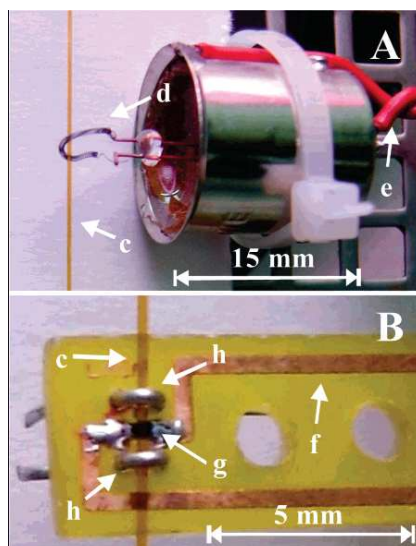
O desenvolvimento do H1 foi um grande passo para nosso grupo de pesquisa. A utilização desse sistema que aparentemente é bastante simples já possibilitou a publicação de cinco artigos científicos em renomadas revistas internacionais [17, 18, 21, 22, 26], além de outros dois que estão em pleno desenvolvimento. Devido a seu sistema único, H1 também possibilitou o desenvolvimento de uma dissertação de mestrado cujas conclusões só poderiam ser obtidas com o uso de H1 devido ao MSE. Outras análises inovadoras vêm sendo desenvolvidas na determinação de íons  $H^+$  em CE. O uso de marcas térmicas também foram desenvolvidas e implementadas nesse equipamento [26]. Todos esses comentários acerca do equipamento e dos frutos que estes vêm gerando têm como objetivo ressaltar a importância da instrumentação, que em um primeiro momento normalmente não se reflete em resultados palpáveis, mas, no entanto, acabam se tornando fundamentais para todo o grupo de pesquisa.

## 2.10 – As marcas térmicas (TMs) e a análise de cátions presentes em clara de ovos.

Um dos maiores problemas encontrados em CE são as indesejáveis variações nos tempos de migração dos analitos após corridas consecutivas. Essas variações são geralmente decorrentes de alterações na composição do eletrólito ou de processos adsorptivos na parede interna do capilar. Como forma de se monitorar essas mudanças, que se refletem como consequência de alterações no EOF, foi desenvolvido um sistema de marcas térmicas (TMs) que será descrito resumidamente adiante, e que foi implementado em H1.

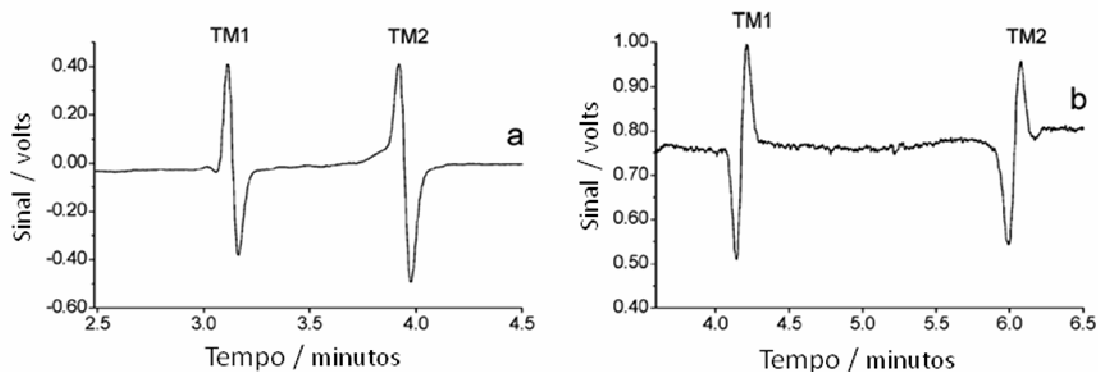
A TM é um sinal transiente produzido por um aquecimento localizado externamente à coluna capilar, por um curto período de tempo de dezenas a centenas de milissegundos, que gera uma perturbação permanente da composição do eletrólito de corrida. Esta perturbação apresenta-se como um pico que se propaga, sob condições favoráveis, com a velocidade do EOF. Esta marca pode ser utilizada para se determinar a mobilidade do EOF e para corrigir tempos de migração de analitos. A primeira versão do marcador térmico foi implementada utilizando-se uma lâmpada de 12 V, cujo bulbo foi removido para permitir o contato térmico do filamento de tungstênio com a superfície externa do capilar (**Figura 12 A**). Com a remoção do bulbo, a atmosfera de argônio mantida em seu interior foi desfeita. Para evitar a queima do filamento, uma tensão de 5 V foi utilizada em pulsos da ordem de dezenas a centenas de milissegundos, controlados pelo programa de aquisição de dados de H1. Em uma outra versão, resistores do tipo SMD foram utilizados para o aquecimento da coluna (**Figura 12 B**). Com isso o tamanho do marcador pôde ser significativamente reduzido.





**Figuras 12 A e B** - Marcadores térmicos baseados em: (A) filamento de uma lâmpada e (B) resistor SMD: (c) capilar de sílica (d) filamento de tungstênio (e) contatos elétricos (f) circuito impresso com as conexões elétricas (g) resistor SMD e (h) alças para manter o capilar contra o resistor.

O uso do MSE presente em H1 permitiu a utilização de diversos tipos de eletrólitos não tamponados nos estudos de TMs. Nesse trabalho pode-se concluir que a forma do sinal produzido pela TM depende fundamentalmente da composição do eletrólito. Já a intensidade da TM depende também do tempo de duração do pulso térmico (tempo em que o capilar é aquecido) e do potencial de separação aplicado. Ficou também demonstrado que o fenômeno ocorre em diversos sistemas químicos, incluindo-se em meios não-aquosos e em ambiente micelar, apresentando comportamentos distintos [26]. As **Figuras 13 a** e **13 b** apresentam duas marcas térmicas formadas com o capilar preenchido com dois eletrólitos bastante simples não tamponados: **(a)** NaCl e **(b)** KCl.



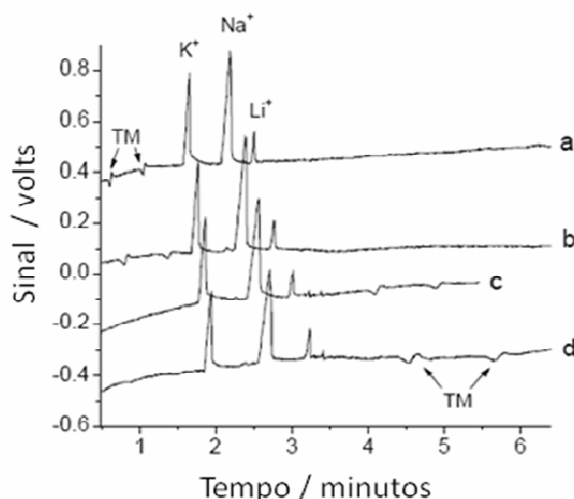
**Figura 13 a e b** - Eletroferogramas das TMs em duas corridas distintas com os eletrólitos (a)  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de NaCl e (b)  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de KCl. Não houve injeção de nenhuma amostra, apenas a aplicação simultânea de dois pulsos de calor que geram as marcas térmicas. Equipamento utilizado H1 com o sistema MSE e detector  $\text{C}^4\text{D}$  a 580 kHz. Figuras adaptadas da referência **26**.

Como se pode observar, dependendo do tipo de sal utilizado, o perfil da marca térmica pode variar bastante, neste caso alterando-se de pico-vale em NaCl para vale-pico em KCl. O uso do MSE permitiu o desenvolvimento de um trabalho aprofundado acerca desse assunto com o uso de soluções tão simples como as citadas acima [26].

Normalmente, quando se trabalha com amostras que contenham proteínas é necessário o uso de estratégias para se evitar problemas de adsorção que levam a modificações nos perfis eletroforéticos. O uso de capilares revestidos internamente, eletrólitos de baixo valor de pH ou lavagens constantes com o eletrólito de corrida e hidróxido de sódio são estratégias normalmente utilizadas para evitar adsorção de biomoléculas evitando-se variações bruscas do EOF.

Para se verificar o uso das TMs em uma matriz biológica real, decidimos analisar cátions em clara de ovos. Devido à alta concentração de sódio e potássio nessa amostra houve a necessidade de uma diluição de 30X da amostra em água deionizada. Nessa condição, a albumina presente na amostra altera moderadamente o EOF a cada corrida. Essa separação foi realizada

com o uso do tampão MES/His  $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 6. Nesse experimento, utilizamos duas marcas térmicas posicionadas a 4,2 e 7,2 cm do detector. Estas foram disparadas simultaneamente antes (**Figura 14 a e 14 b**) ou após os picos dos analitos passarem pelo detector (**Figura 14 c e 14 d**). Para isso, bastou programar via software o tempo em que as marcas eram disparadas. Assim, vemos uma aplicação simples e eficiente da CE para a análise dos cátions  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  com o uso de  $\text{C}^4\text{D}$  em clara de ovos.  $\text{Li}^+$  foi utilizado como um padrão interno. Os picos gerados pelas TMs também estão representados na figura e foram feitos com aquecimentos da ordem de 600 ms. Tempos muito prolongados de aquecimento, apesar de gerarem TMs mais visíveis, podem acarretar na formação de bolhas, interrompendo a corrida.



**Figura 14** - Eletroferograma de uma amostra de clara de ovo: **a**, **b**, **c**, & **d** são, respectivamente, a 2<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, e 9<sup>o</sup> corrida consecutiva. Capilar:  $75 \mu\text{m}$  d.i.;  $55,3 \text{ cm}$  comprimento total,  $46,2 \text{ cm}$  efetivos. Marcas térmicas posicionadas a 4,2 e 7,2 cm do detector (600ms). Eletrólito de corrida: MES/His  $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (pH 6,0). Potencial aplicado: 25,2 kV. Amostra: Clara de ovo diluída 30X acrescida de  $333 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{LiNO}_3$  como padrão interno. Injeção por pressão 1 kPa, 3 seg. Detecção  $\text{C}^4\text{D}$  a 580 kHz.

O tempo de migração pôde ser calculado através da distância dentre as duas marcas (3cm) e a diferença entre os tempos de migração das duas TMs, que varia a cada corrida. Assim, com o uso das TMs, observou-se uma variação nos tempos de migração dos analitos em cerca de 20% para onze corridas consecutivas. No entanto, usando-se as TMs é possível determinar os três picos

através de suas mobilidades com desvios relativos de 1%. Isto mostra que a identificação destes picos através de suas mobilidades após diversas corridas pode ser feito com confiabilidade usando as TMs [26].

Assim, demonstramos novamente que o equipamento H1 se portou satisfatoriamente na análise de pequenos íons, em uma amostra real. O sistema MSE por sua vez permitiu análises aprofundadas do efeito das TMs em ambientes não tamponados.

### **2.11 - Análises de proteínas em H1.**

A análise de proteínas em CE já foi muito estudada e existem diversos livros e trabalhos de separações das mais variadas proteínas, sendo a detecção óptica (UV ou fluorescência) as mais utilizadas [52-59]. A detecção condutométrica sem contato ( $C^4D$ ) de peptídeos e proteínas, por outro lado, possui pouquíssimas referências bibliográficas. Esse fato deve-se especialmente por se tratar de uma aplicação relativamente recente [60-61]. Os resultados apresentados a seguir são os primeiros experimentos de separações de proteínas em CE com  $C^4D$  em nosso laboratório. Estes experimentos também foram realizados no equipamento H1, com o detector operando a 580 kHz. O estudo de proteínas em CE tem diversas peculiaridades que devem ser levadas em consideração. A primeira delas diz respeito a alta adsorção devido a interações eletrostáticas das proteínas com a parede interna do capilar. Por esse motivo, geralmente utiliza-se capilares que sejam recobertos internamente com algum tipo de polímero, como por exemplo, álcool polivinílico ou poliacrilamida [62]. Esses recobrimentos neutralizam a carga negativa da sílica, evitando a adsorção e praticamente anulando o EOF. Existem também procedimentos que permitem a separação de proteínas em capilares não revestidos, com o uso de polímeros que evitam adsorção, tampões com pH baixo ou o uso de soluções desnaturantes.

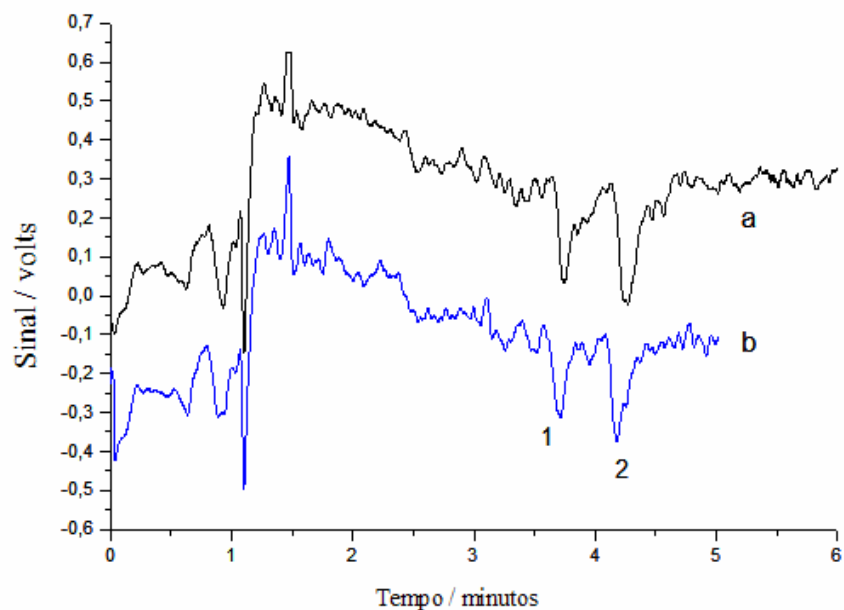
Como esses foram os primeiros estudos de separações de proteínas em nosso laboratório, não contávamos com capilares revestidos nem com experiência de trabalho dessas moléculas. Assim, desenvolvemos as primeiras separações de proteínas com capilares convencionais e tendo como base uma quase inexistente literatura do comportamento dessas moléculas em relação a C<sup>4</sup>D. Dessa forma, tivemos dificuldades iniciais para determinar quais seriam as melhores condições de injeção, tipo de eletrólito, concentração de amostras entre outros problemas.

Devido a C<sup>4</sup>D não discriminar qual analito está detectando, também tivemos problemas para determinar quais picos correspondiam a proteínas, visto que resíduos salinos provenientes do processo de purificação desses padrões também se apresentam como picos. Passados esses contratempos, começamos a obter nossos primeiros dados de separações dessas moléculas.

As separações relatadas abaixo foram desenvolvidas para a separação de proteínas de caráter básico, como lisozima, citocromo c,  $\alpha$ -quimotripsinogênio e BSA (albumina sérica bovina), que são mais susceptíveis à adsorção do que proteínas de caráter ácido.

As separações foram feitas em 20 mmol·L<sup>-1</sup> de tampão fosfato de sódio, pH 3 com alguns aditivos que serão relatados adiante, sendo usado um capilar de sílica fundida de 75  $\mu$ m I.D, 46 cm, 11 cm (efetivo). Nesse pH, as proteínas migram como cátions, pois o pH do tampão é menor que o ponto isoelétrico (pI) dessas proteínas.

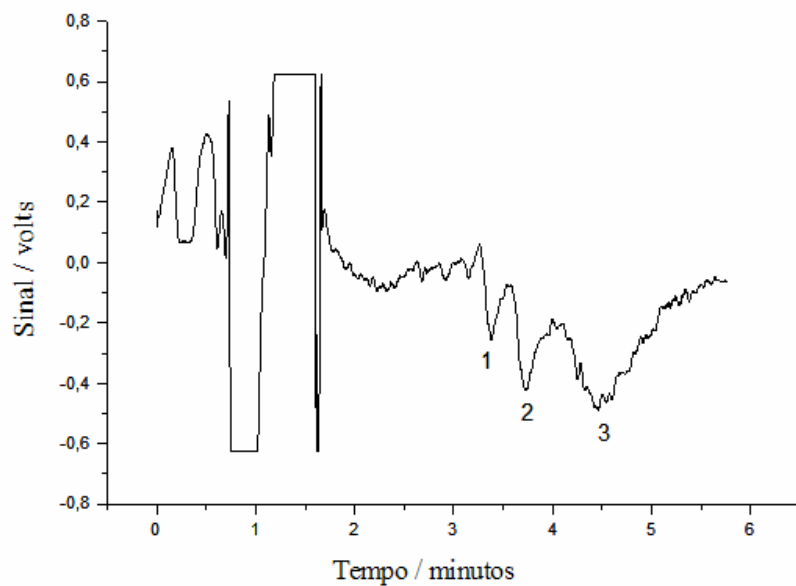
A **Figura 15** mostra a separação de uma mistura de citocromo c (12,4 kDa) e lisozima (14 kDa) 10  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>, usando apenas o tampão citado acima, sem nenhum tipo de aditivo. Como podemos ver, o eletroferograma é bastante ruidoso, porém é possível identificar os picos correspondentes a essas proteínas. Isso já era esperado, pois é bem conhecido que, em condições de baixo EOF a linha base é freqüentemente ruidosa, com o uso de C<sup>4</sup>D.



**Figuras 15** - Separação de proteínas  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (1) lisozima; (2) citocromo c: Eletrólito:  $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de fosfato de sódio, pH 3. Capilar;  $75 \mu\text{m}$ ;  $46 \text{ cm}$  ( $11 \text{ cm}$  efetivos). a e b – injeções distintas de  $30 \text{ s}$  dessa mistura a  $1 \text{ kPa}$ . Potencial aplicado:  $10 \text{ kV}$ . Detecção  $\text{C}^{4}\text{D}$  a  $580 \text{ kHz}$ .

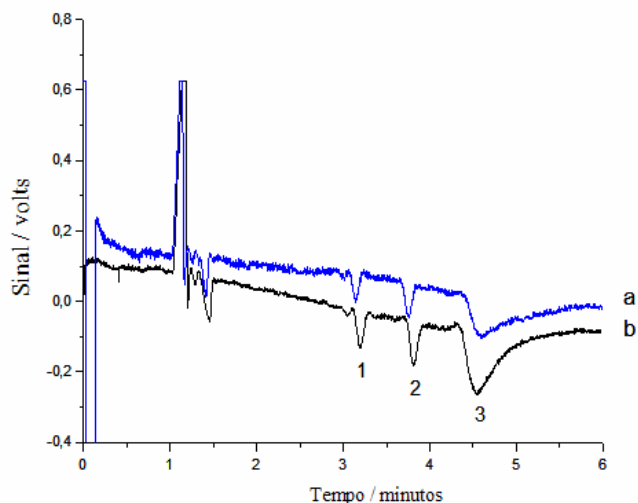
Diversos aditivos podem ser utilizados em separações de proteínas em CE com o intuito de diminuir adsorção [59] sendo um deles é a metilcelulose. A **Figura 16** mostra a separação de  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de (1) lisozima, (2) citocromo c e (3) BSA (albumina sérica bovina).

Este eletroferograma também apresenta um perfil bastante ruidoso, no entanto a adição de  $0,1\%$  de metilcelulose ao tampão reduziu significativamente a adsorção de BSA ( $66 \text{ kDa}$ ), cujo pico nem mesmo era identificado na ausência desse polímero.

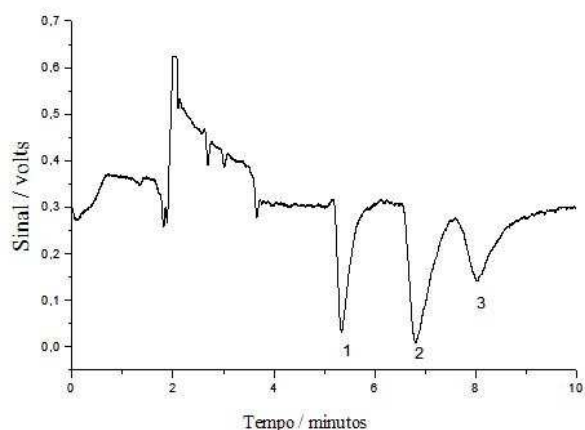


**Figura 16** - Separação de proteínas –  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de (1) lisozima; (2) citocromo c, (3) BSA : Eletrólito:  $20 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de fosfato de sódio, pH 3, metilcelulose 0,1%. Capilar:  $75 \mu\text{m}$ , 46 cm; (11 cm efetivos). Injeção: 60 s, 1 kPa. Potencial aplicado: 10 kV. Detecção  $\text{C}^{4}\text{D}$  a 580 kHz.

Com o intuito de minimizar a adsorção, acrescentamos uma grande quantidade de uréia ( $4 \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) no tampão de corrida, pois, em altas concentrações, uréia é um desnaturante bastante efetivo, prevenindo assim a agregação protéica no capilar (**Figura 17**). Um fato bastante interessante foi uma significativa estabilização da linha base com a adição de uréia ao eletrólito. Assim, picos mais simétricos puderam ser observados nos eletroferogramas, principalmente para proteínas de menor massa molecular como lisozima e citocromo c. Nessas mesmas condições, também conseguimos uma separação bastante adequada de misturas contendo também  $\alpha$ -quimotripsinogênio (25 kDa) (**Figura 18**).



**Figura 17** - Separação de proteínas –  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de (1) lisozima; (2) citocromo c, (3) BSA: Eletrólito: 20 mM de fosfato de sódio, pH 3, uréia  $4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , metilcelulose 0,1%. Capilar:  $75 \mu\text{m}$ , 50 cm; (10 cm efetivos). Injeção: a) 20 s b) 30 s a 1 kPa. Potencial aplicado: 12kV.



**Figura 18** - Separação de proteínas  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de (1) lisozima; (2) citocromo c, (3)  $\alpha$ -quimotripsinogênio: Eletrólito:  $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  fosfato de sódio, pH 3, uréia  $4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , metilcelulose 0,1%. Capilar:  $75 \mu\text{m}$ : 46 cm; (11cm efetivos). Injeção: 60 s a 1 kPa. Potencial aplicado: 10 kV. Detecção  $\text{C}^{4}\text{D}$  a 580 kHz.

É interessante atentar que nesses experimentos usamos apenas o detector posicionado próximo (11 cm) ao ponto de injeção da amostra. A resolução entre picos pode ser aumentada consideravelmente com o detector posicionado no final do capilar. Sendo assim, fica claro que



estratégias que evitem adsorção e que levem a estabilização da linha base são de fundamental importância na análise de proteínas com o uso de  $C^4D$ .

Com esses experimentos de separações de proteínas citados acima, podemos concluir que o uso de H1 é apropriado para a detecção de proteínas entre 12 a 66 kDa. Variações na composição do eletrólito, frequência de trabalho, tipo e tamanho do capilar e posição do detector podem ser otimizados para aumentar a resolução e sensibilidade na detecção dessas biomoléculas.

Em um primeiro momento pretendíamos seguir num estudo mais aprofundado dessas moléculas. No entanto, ao mesmo tempo em que estávamos conseguindo diversos resultados de detecção de proteínas com  $C^4D$ , outros grupos estavam publicando artigos no mesmo sentido. Isso também nos levou à procura de experimentos diferenciados, como o que veremos a seguir.

## **2.12 - Análises de quitooligossacarídeos clivados enzimaticamente**

### **2.12.1 - Introdução**

Quitina é um 1,4-homopolissacarídeo de N-acetil-glicosamina e é um dos mais importantes biopolímeros naturais. É o principal polissacarídeo encontrado na maioria dos organismos como artrópodes e fungos [63]. Quitina também é um componente essencial presente na cutícula e no tubo digestivo dos insetos. Enzimas quitinolíticas têm um papel crucial para a metamorfose e digestão dos insetos [64]. Estas enzimas incluem a família das quitinases (E.C. 3.2.1.14) que catalisam a hidrólise de ligações internas da quitina, produzindo quitooligossacarídeos menores [65]. Essas enzimas têm sido consideradas há anos como possíveis alvos de novas estratégias de controle de insetos [66]. Apesar disso, apenas um pequeno número de enzimas quitinolíticas foram cineticamente caracterizadas utilizando substratos naturais. A principal razão para isto foi a

ausência de técnicas analíticas simples para separação e detecção de quitooligossacarídeos em concentrações sub-micromolar. Os quitooligossacarídeos são frequentemente analisados usando cromatografia em camada delgada (TLC), que não permite uma quantificação precisa, ou cromatografia líquida de alta performance (HPLC) [67], que não é muito utilizada.

A CE tem sido utilizada para a determinação de diversos tipos de açúcares através das mais variadas estratégias [68]. Sua utilização para a determinação de quitooligossacarídeos também já foi realizada, no entanto, após laboriosos processos de derivatização, e com o uso de detecção por fluorescência [69]. Os experimentos que iremos apresentar adiante dizem respeito à determinação do padrão de ação da quitinase do besouro *Tenebrio molitor* na hidrólise de cinco diferentes quitooligossacarídeos contendo de dois a seis resíduos de n-acetil-glicosamina, com o uso de H1 [21-22]. Não houve a necessidade de qualquer processo de derivatização dos açúcares, porque os experimentos foram desenvolvidos com eletrólito de pH extremamente elevado e C<sup>4</sup>D. Em pH fortemente alcalino (pH>10) os açúcares se tornam espécies aniônicas, permitindo sua migração em CE [68]. A detecção por C<sup>4</sup>D também é possível, porque a forma aniônica dos açúcares possui mobilidade menor do que a do hidróxido (o principal ânion do eletrólito utilizado), resultando em picos negativos [20]. O uso da C<sup>4</sup>D para análise de oligossacarídeos é particularmente interessante, porque em geral, açúcares não possuem boa absorvidade molar.

### **2.12.2 - Materiais e métodos**

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. N-acetil-glicosamina (C1); quitobiase (C2), quitotriose (C3), quitotetraose (C4), quitopentaose (C5) e quitohexaose (C6) foram obtidos da Calbiochem (Darmstadt, Germany). L-metionina foi obtida da Sigma (St. Louis, MO, USA). Hidróxido de sódio, cetil trimetil amônio brometo (CTAB), fosfato de sódio e acetonitrila foram

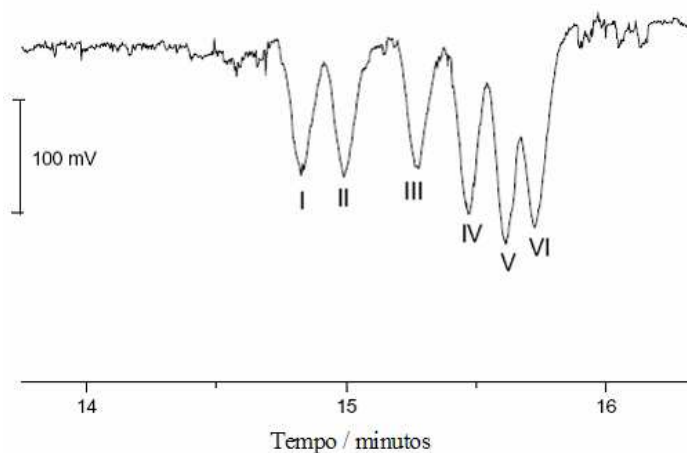
obtidos da Merck (Darmstadt, Germany). Todos os eletrólitos foram previamente degaseificados 15 min com um banho de ultra-som. Todos os padrões foram preparados dissolvendo os reagentes ou diluindo soluções estoque em água deionizada (Barnstead/Thermolyne, Dubuque, IA, USA). Os experimentos foram realizados a 30°C usando uma capilar de 50 µm d.i. da J&W Scientific (Folsom, CA, USA). As injeções foram efetuadas a 2,1 kPa cm de colH<sub>2</sub>O. A coluna capilar foi condicionada com 0,1 mol·L<sup>-1</sup> de NaOH (10 min), água deionizada (5 min) e com o eletrólito de corrida por (20 min). Antes da primeira injeção, foi aplicado o potencial de 15 kV por 20 min. Entre as corridas, o capilar foi lavado com o eletrólito de corrida por 2 minutos.

### **2.12.3 - Ensaios enzimáticos e curvas de calibração**

Amostras contendo a quitinase do besouro *Tenebrio molitor* (TmChi) (0,37 nmol·L<sup>-1</sup>) foram adicionadas a 10 µmol·L<sup>-1</sup> de cada quitoooligossacarídeo (C2 a C6) a 30 °C em 100 µmol·L<sup>-1</sup> de tampão citrato pH 5. A reação foi interrompida por aquecimento a 100 °C por 3 min e após esse procedimento a solução foi concentrada 100 vezes usando um Speed-Vac (Heto Lab Equipment - VR-1). Os produtos clivados pela TmChi foram separados por CE utilizando-se 1 mmol·L<sup>-1</sup> de metionina como padrão interno. Curvas de calibração foram feitas em concentrações que variavam de 50 a 250 µmol·L<sup>-1</sup> de uma mistura de C1 a C6. Essas soluções foram obtidas pela diluição de soluções concentradas desses quitoooligossacarídeos. A área dos picos obtidos foram determinadas com o uso do software Origin 5.0 (Microcal Software, Inc.; Northampton, MA). Em baixas concentrações de substratos a eficiência catalítica de uma enzima (*k*<sub>cat</sub>/*K*<sub>m</sub>) pode ser medida diretamente pela velocidade com que os produtos são formados [21].

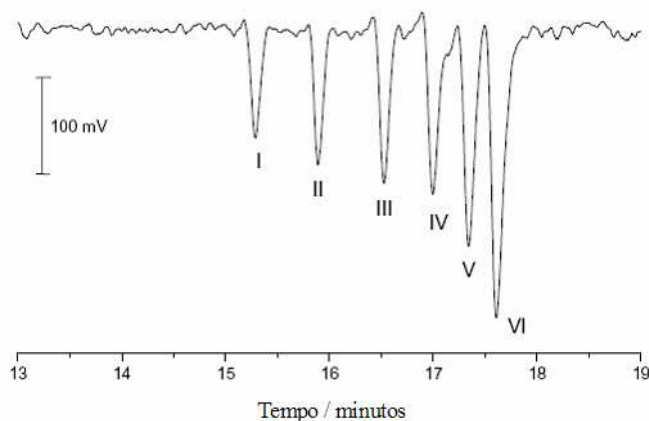
### **2.12.4 - Otimização do sistema de separação**

A **Figura 19** mostra a separação de misturas contendo C1 a C6 ( $166 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) usando  $\text{NaOH } 10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{CTAB } 200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  e  $4,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  como eletrólito de corrida. Utilizando essa condição pode-se observar uma clara sobreposição de C4 a C6.



**Figura 19** - Eletroferograma de uma mistura de C1 a C6 ( $166 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Os picos de I a VI correspondem a: C1, C2, C3, C4, C5 e C6. Eletrólito de corrida:  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{NaOH}$ ,  $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{CTAB}$  e  $4,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Capilar ( $50 \mu\text{m}$ ),  $72,5 \text{ cm}$  ( $62,5 \text{ cm}$  efetivos). Detector  $\text{C}^4\text{D}$  operando a  $600 \text{ KHz}$ . Separação a  $15 \text{ kV}$ . Injeção:  $30\text{s}$ ,  $2,1 \text{ kPa}$ .

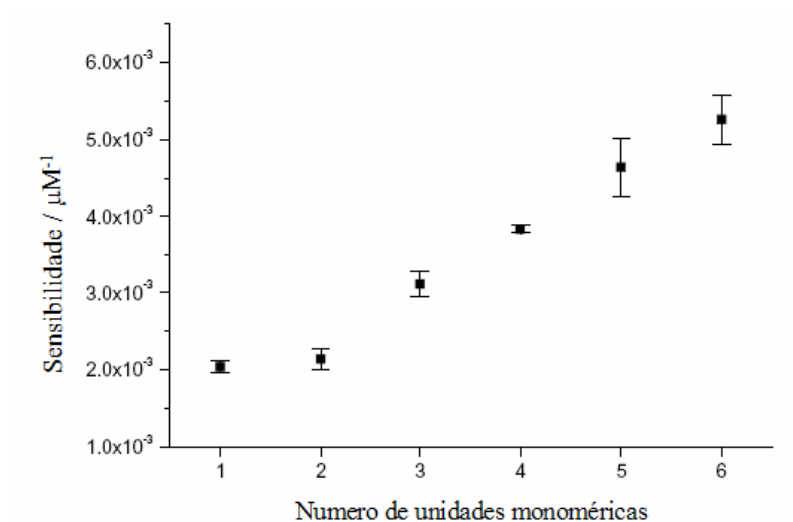
A **Figura 20** mostra uma significativa melhora na separação desses açúcares com a adição de  $10\%$  (v/v) de acetonitrila ao eletrólito utilizado anteriormente.



**Figura 20** - Eletroferograma de uma mistura de C1 a C6 ( $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Os picos de I a VI correspondem a: C1, C2, C3, C4, C5 e C6. Eletrólito de corrida:  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{NaOH}$ ,  $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{CTAB}$ ,  $4,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e  $10\%$  (v/v) de acetonitrila. Capilar ( $50 \mu\text{m}$ ),  $72,5 \text{ cm}$  ( $62,5 \text{ cm}$  efetivos). Detector  $\text{C}^4\text{D}$  operando a  $600 \text{ kHz}$ . Separação a  $15 \text{ kV}$ . Injeção:  $30\text{s}$ ,  $2,1 \text{ kPa}$ .

A adição de modificadores orgânicos no eletrólito de corrida é uma prática comum para melhorar a seletividade e resolução de picos adjacentes [70]. Uma importante observação é que na ausência de acetonitrila, a concentração de NaOH, precisa ser superior a  $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  para separar esses mesmos quitoooligossacarídeos, com uma linha base muito ruidosa. O uso de acetonitrila também é importante para aumentar a relação sinal/ruído devido à diminuição da condutividade do eletrólito. Além de NaOH, também tentamos realizar essas separações com o uso de tampão borato ou CAPS, porém sem sucesso. Também testamos usar metanol como modificador orgânico. No entanto, apesar da já esperada diminuição da condutividade do eletrólito, não houve alterações no perfil de separação desses quitoooligossacarídeos. Nestas separações, a manutenção do pH do eletrólito é crítica, visto que pequenas alterações nesse parâmetro podem acarretar em uma ineficiente ionização dos açúcares, com conseqüente sobreposição de picos. Como o eletrólito utilizado em nossas separações não é tamponado, há uma contínua variação em sua composição causada por sua eletrólise. Assim, o MSE auxiliou na realização desses experimentos, evitando essas variações.

A **Figura 21** mostra que o sinal obtido pelo detector  $\text{C}^4\text{D}$  aumenta de acordo com o tamanho do açúcar analisado. Esta característica é atribuída a diferença entre as mobilidades dos analitos e do co-íon do eletrólito que é o íon hidróxido. Assim, quanto maior o quitoooligossacarídeo, menor é sua mobilidade e maior a diferença com relação à mobilidade do hidróxido.

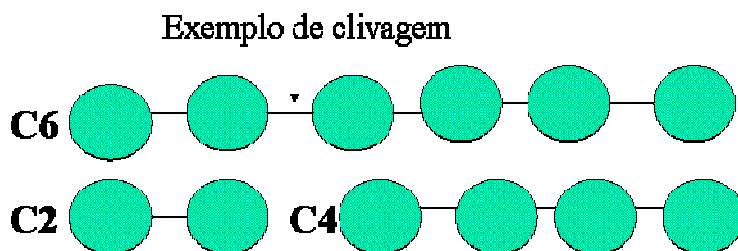
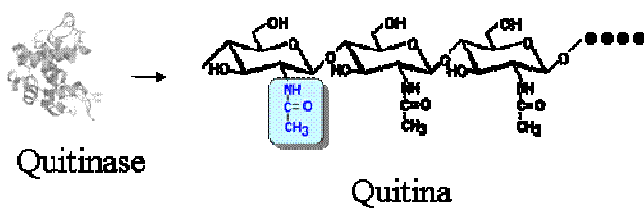


**Figura 21** - Sensibilidade do detector  $\text{C}^4\text{D}$  (parâmetro B da **Tabela 1**) em função do número de unidades monoméricas (C1 a C6).

Assim, a injeção de C1 e C5 nas mesmas concentrações, resultam em um sinal pequeno para C1 e maior para C5, como pode ser observado também nas **Figuras 19 e 20**. Outro fato bastante interessante de nossa metodologia de separação é que esses quitooligossacarídeos são completamente separados, não resultando em sobreposições de picos como observado em HPLC [67].

### 2.12.5 - Clivagem enzimática

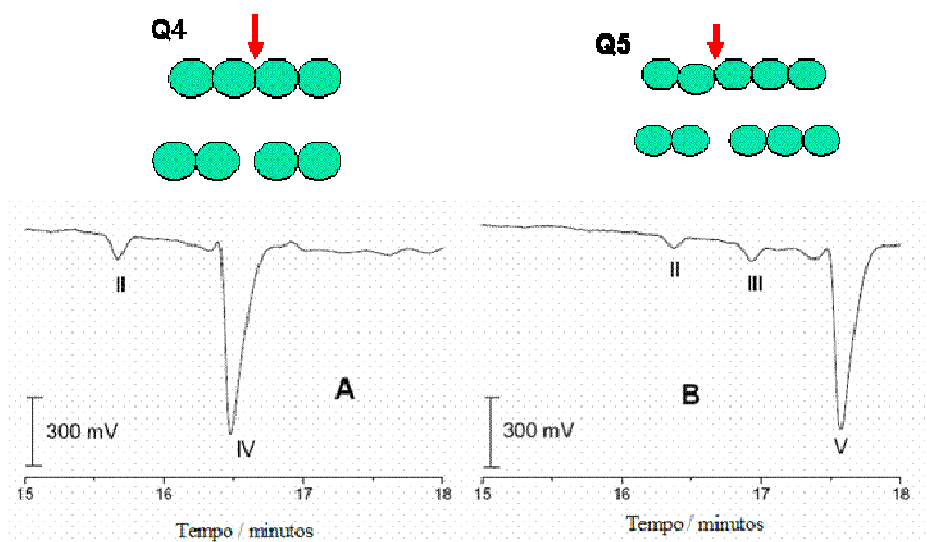
A **Figura 22** é apenas um exemplo de como a quitinase poderia atuar sobre o substrato C6, produzindo uma molécula de C2 e outra de C4.



**Figura 22** – Modelo demonstrando uma possível clivagem de TmChi sobre C6

Dependendo de onde a enzima se ligar no substrato, o produto final será diferente. No exemplo acima, a enzima clivando C6 produziria C2 e C4. Contudo, se a enzima se ligasse no meio do substrato, seriam geradas duas moléculas de C3.

Após a incubação de C2, C3, C4, C5 e C6 com TmChi, os produtos de reação foram analisados por CE usando as mesmas condições obtidas na **Figura 20**. Após a incubação de C2 com TmChi, o eletroferograma demonstrou apenas o pico de C2, demonstrando que este não é hidrolisado por esta enzima. Já clivagem de C3 resultou na formação de C1 e C2 com baixa eficiência (resultados não apresentados). Estes produtos puderam ser detectados somente após 12 horas de incubação com C3 ( $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Esses resultados já eram esperados visto que quitinases não são especializadas em hidrolisar pequenos chitooligossacarídeos. A **Figura 23 A** mostra que a hidrólise de C4 produz somente C2, e a **Figura 23 B** mostra que TmChi tem alta atividade contra C5, produzindo C2 e C3. Este mesmo resultado também é observado quando C6 é substrato (resultado não apresentado). Assim, quando TmChi cliva C6 ela gera ou três moléculas de C2 ou duas de C3.



**Figura 23** - Eletroferogramas mostrando os produtos do ensaio enzimático de TmChi contra os substratos ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ): **(A)** - C4 (IV) produzindo C2 (II). **(B)** - C5 (V) produzindo C2 (II) e C3 (III). Foram usadas as mesmas condições de separação da **Figura 19**.

Os produtos formados nos ensaios enzimáticos citados acima foram quantificados usando uma curva analítica cujos parâmetros estão apresentados na **Tabela 1**.

**Tabela 1** - Curva analítica dos chitooligossacarídeos C1 a C6.

QUITOOLIGOSSACARÍDEO	<i>A</i>	<i>B</i> ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	<i>R</i>	LOD ( $\mu\text{M}$ )	LOQ ( $\mu\text{M}$ )
C1	0.02 (0.02)	0.00294 (0.00015)	0.99483	3	10
C2	0.005 (0.012)	0.00302 (0.00008)	0.99854	3	10
C3	-0.005 (0.048)	0.0047 (0.0003)	0.99099	2	6
C4	-0.02 (0.04)	0.0061 (0.0003)	0.99547	2	5
C5	-0.01 (0.04)	0.0063 (0.0003)	0.99570	2	5
C6	-0.03 (0.04)	0.0072 (0.0002)	0.99756	2	5

Observação: *A* e *B* são os parâmetros da equação de reta  $Y = A + Bc$ , onde *Y* é a relação entre as áreas dos analitos e do padrão interno (metionina) e *c* é a concentração do chitooligossacarídeo. Os números entre parênteses são os desvios. *R* é o coeficiente de correlação. LOD e LOQ são os limites de detecção e quantificação, respectivamente. Cada curva contém seis pontos ( $0$  a  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) em duplicata.



### 2.12.6 - Medidas de eficiência catalítica

A eficiência catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ) de uma enzima pode ser calculada diretamente utilizando-se a concentração dos produtos gerados no começo da reação enzimática. Contudo, as concentrações de substrato utilizadas nesses ensaios devem ser baixas para que esta possa ser calculada corretamente [71]. Dessa forma, tivemos que utilizar uma concentração de substrato muito baixa ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) para o correto funcionamento do experimento. Visto que nosso sistema de detecção não consegue detectar concentrações tão baixas, contornamos este problema com uma simples concentração (100X) da amostra. Esta foi feita através de liofilização do ensaio, seguido de redissolução em água.

A **Tabela 2** mostra os produtos e as concentrações dos açúcares produzidos para diferentes substratos. Estes dados foram usados para determinar a eficiência catalítica da enzima TmChi [21].

**Tabela 2** - Resultados para 30 minutos de incubação de TmChi ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) com diferentes quitoooligossacarídeos.

SUBSTRATO	PRODUTO	CONCENTRAÇÃO <sup>a</sup> ( $\mu\text{M}$ )
C4	C2	$1.22 \pm 0.08$
C5	C2 + C3	$0.50 \pm 0.03$
C6	C2	$0.71 \pm 0.09$
C6	C3	$0.8 \pm 0.1$

<sup>a</sup> A concentração obtida por CE é 100 vezes maior devido a etapa de pré concentração.

Como mostrado na **Tabela 2**, TmChi não produz C1 durante a hidrólise de C4, C5, ou C6, mostrando que esta enzima não é uma exo-quitinase, ou seja, ela não ataca o substrato por suas pontas. O melhor substrato para TmChi com o maior  $k_{cat}/K_m$  é C5 [21]. Quando o substrato é C6, também é observado que essa enzima produz mais C3 do que C2. Como TmChi não produz

C4 a partir de C6 é provável que essa enzima tenha um comportamento de processividade (ataque múltiplo) contra C6 produzindo três moléculas de C2. Processividade ocorre quando a enzima se liga ao substrato realizando vários cortes seqüenciais. Este mesmo comportamento foi verificado nas quitinases Chi A e Chi B de *Serratia marcescens* [72].

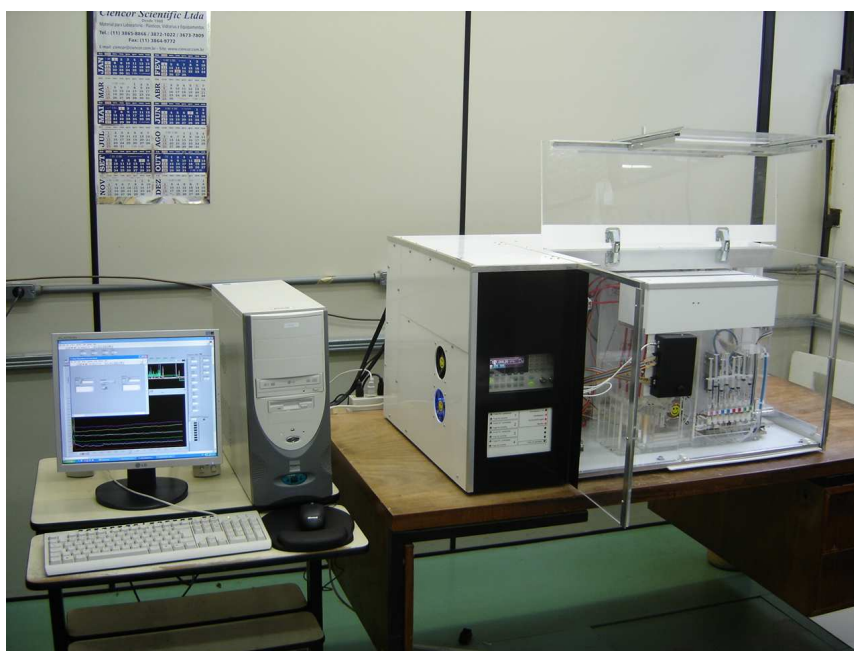
### **2.12.7 - Conclusões**

Este trabalho mostra um método simplificado de separação e detecção de quitooligossacarídeos produzidos através de ensaios enzimáticos, sem a necessidade da derivatização dessas moléculas. Três aspectos importantes a serem levados em consideração com relação às vantagens de se usar H1 nesses experimentos foram: O MSE evita alterações na composição do eletrólito que não é tamponado; com uso de C<sup>4</sup>D evitam-se os laboriosos processos de derivatização dessas moléculas e as condições aqui apresentadas podem servir para a determinação de padrões de ação de outras quitinases.

### 3 - O EQUIPAMENTO B1

#### 3.1 - Considerações gerais sobre B1

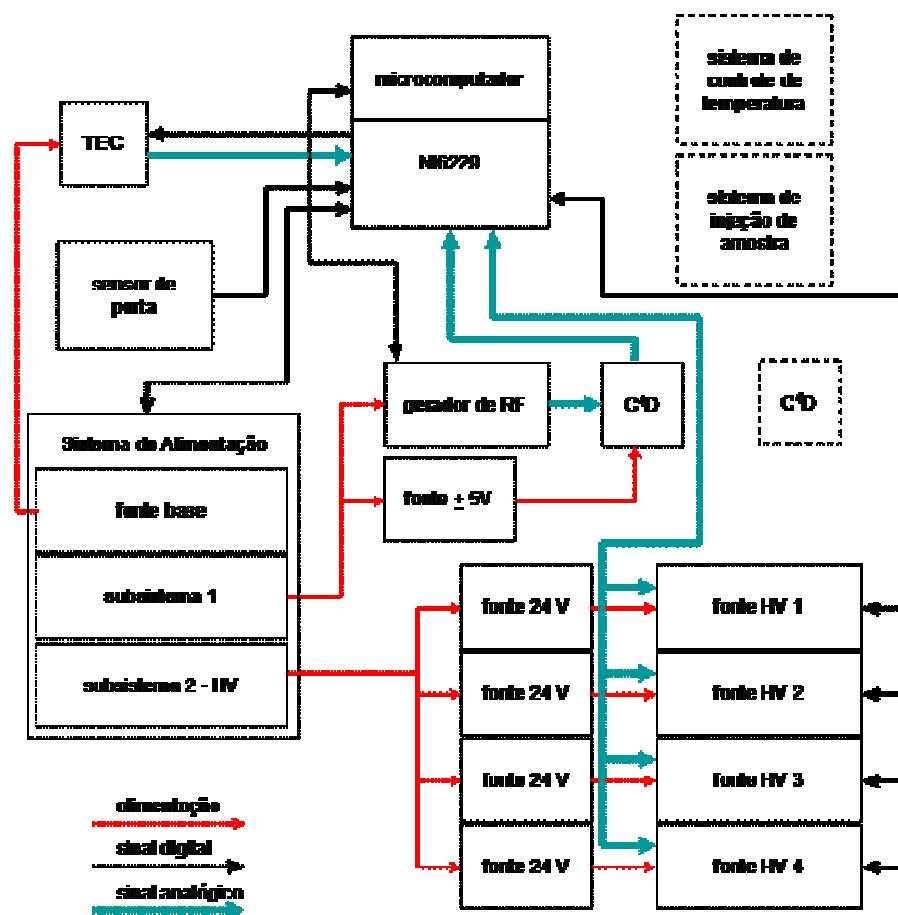
Como citado anteriormente, após a construção do equipamento H1, partimos para a construção do equipamento B1 (**Figura 24**), que é um equipamento multicapilar. O mesmo foi criado com um conceito diferenciado e será descrito em detalhes adiante. Nele é possível desenvolver aplicações voltadas para a análise simultânea de até 8 amostras ao mesmo tempo sob condições diferentes. Para isso, o equipamento conta com 4 fontes bipolares de alta tensão e também possui o módulo de eletrólise separada (MSE).



**Figura 24** - Equipamento de eletroforese capilar B1. Porta superior, central e lateral abertas.

Como se pode observar na **Figura 24**, o equipamento B1 é de grande porte. Por esse motivo sua construção também foi bastante complexa e demorada. B1 possui características que não existem em nenhum equipamento comercial multicapilar. Toda a mecânica e eletrônica foi

exclusivamente desenvolvida por nós. As centenas de partes mecânicas tiveram que ser desenvolvidas uma a uma sob a forma de projeto. Na realização de um equipamento desse porte, muitos detalhes devem ser considerados, e cada problema foi solucionado gradativamente. Entre alguns deles temos: posicionamento das fontes de alta tensão, componentes do detector e blindagem, sistema de segurança do usuário, visibilidade, praticidade para operação e manutenção, leds indicativos, vedação de possível fuga de alta tensão ou vazamento de solução, sistema de injeção de amostras entre muitos outros. Enfim, uma grande gama de fatores devem e foram levados em consideração para que o projeto final fosse durável, seguro de fácil utilização por qualquer usuário. A **Figura 25** mostra um diagrama de blocos do equipamento H1. Nele pode-se visualizar de que forma os subsistemas estão integrados e também os tipos de sinais que são responsáveis pelo controle do equipamento.



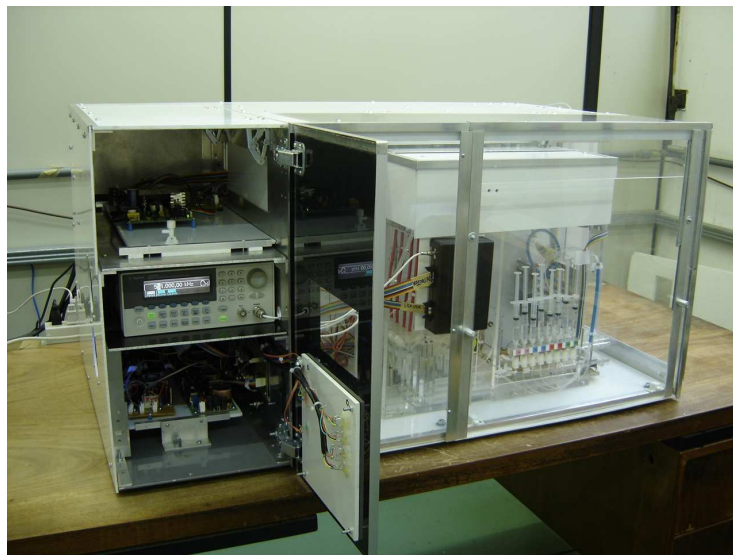
**Figura 25** - Diagrama de blocos do equipamento B1.

### 3.2 - Interface

O controle do equipamento e a aquisição de dados foi realizada com um programa desenvolvido em LabVIEW (National Instruments) com o uso da interface NI-6229. O software permite o controle de todas as operações realizadas por B1.

### 3.3 - O Equipamento B1

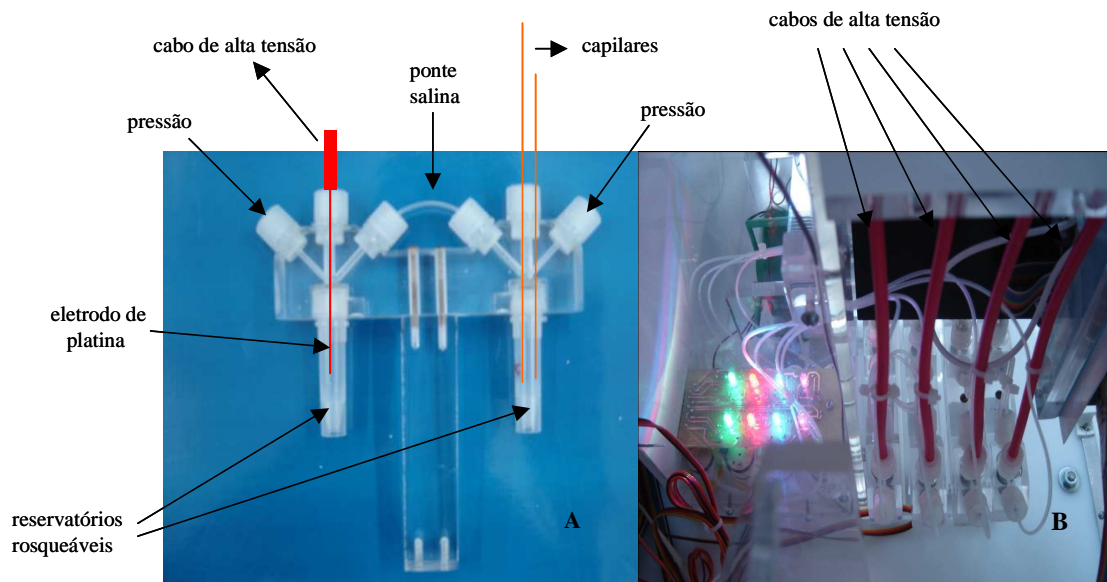
O equipamento B1 foi montado sobre uma base de alumínio de 3 mm de espessura e com chapas de PVC, acrílico e alumínio. A **Figura 26** mostra uma segunda visão geral do equipamento que possui 50 × 100 × 62 cm (altura × largura × profundidade). A maior parte da eletrônica está instalada na região esquerda do equipamento. Ali se encontra as fontes de alimentação, sistemas de controle de válvulas, as placas de comunicação entre o software e o equipamento e o gerador de funções.



**Figura 26** - Equipamento de eletroforese capilar B1, com a porta do lado esquerdo aberta, onde no interior está a maioria dos circuitos eletrônicos.

### 3.4 - Sistema MSE na região de alta tensão

Como citado anteriormente, B1 também possui o sistema MSE, cuja construção demandou muito tempo e criatividade. A **Figura 27** mostra detalhes do MSE na região de alta tensão, com seus reservatórios, tubulações e cabos de alta tensão. A **Figura 27 A** mostra em detalhe o reservatório de eletrólise separada. Deve-se notar que a conexão entre os dois reservatórios é feita na região mediana com o uso de uma ponte salina. Todas essas conexões possuem septos de borracha de silicone que foram construídos exclusivamente para vedação. A vedação é dada com o rosqueamento das tampas desses reservatórios, que comprimem os septos, levando à vedação. A **Figura 27 B** mostra detalhes desses reservatórios no equipamento com as diversas tubulações, e os quatro cabos de alta tensão. Os pequenos tubos são provenientes de válvulas que controlam a pressurização do sistema, e tem como função coordenar a injeção e a troca de soluções desses reservatórios.

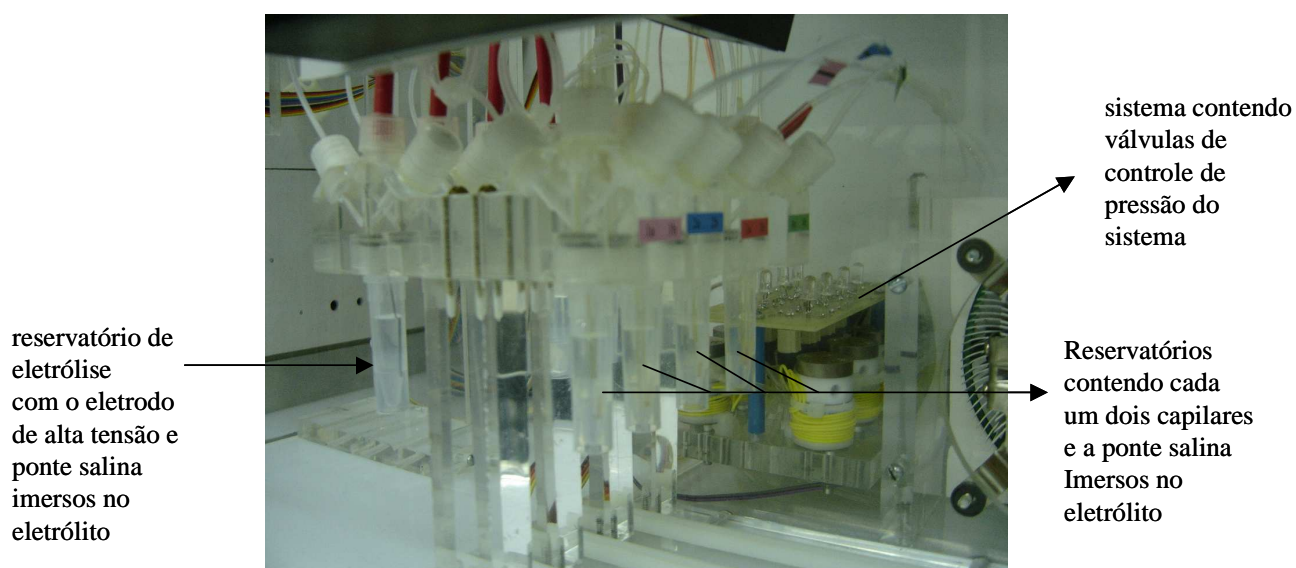


**Figura 27** - (A) visão frontal dos reservatórios de alta tensão ligados através de ponte salina. (B) visão geral dos quatro reservatórios com cabos de alta tensão e tubulações de pressurização. Ledes acesos são indicativos do posicionamento das válvulas que controlam o fluxo de ar no sistema.

Como já mencionado anteriormente, esse equipamento possui quatro fontes bipolares de alta tensão, que correspondem aos quatro cabos espessos observados na **Figura 27 B**. Com esse sistema, podemos trabalhar em até quatro potenciais distintos, pois cada fonte fornece energia para cada um dos quatro pares de capilares.

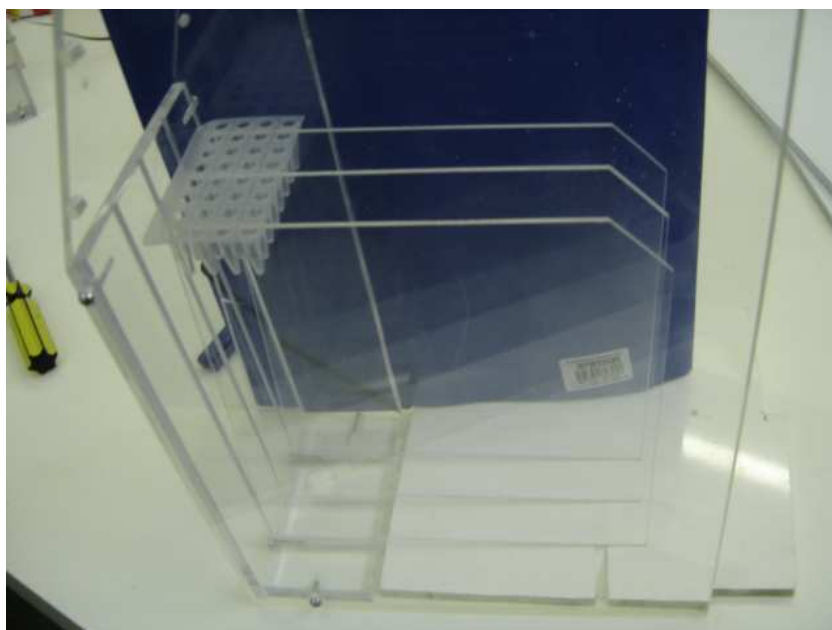
Sendo assim, se tivermos por exemplo, uma amostra hipotética de padrões e quisermos determinar a melhor condição de separação podemos variar diversos parâmetros em uma única corrida como concentração da amostra (oito possíveis), concentração ou composição do eletrólito (4 possíveis) e ainda o potencial de separação (4 possíveis). Assim, podemos otimizar com muita facilidade a separação de determinada amostra, evitando o desperdício de reagentes e tempo. Além disso, com o controle das válvulas também é possível trabalhar apenas com qualquer um dos quatro conjuntos de capilares, mantendo os outros sem o fluxo de qualquer solução se isso for desejado.

A **Figura 28** demonstra a complexidade de todos os reservatórios de alta tensão (esquerda) e os outros reservatórios onde estão inseridos os capilares (direita), com todas suas respectivas tubulações.



**Figura 28** - Visão geral do sistema de eletrólise separada da região da alta tensão.

O sistema MSE do lado da alta tensão é crítico devido ao risco de fuga de alta tensão. Para se evitar ainda mais qualquer tipo de fuga, criamos uma tampa móvel contendo camadas de acrílico que são encaixadas entre os reservatórios (**Figura 29**).



**Figura 29** - Conjunto de placas acrílicas que isolam os reservatórios de alta tensão.

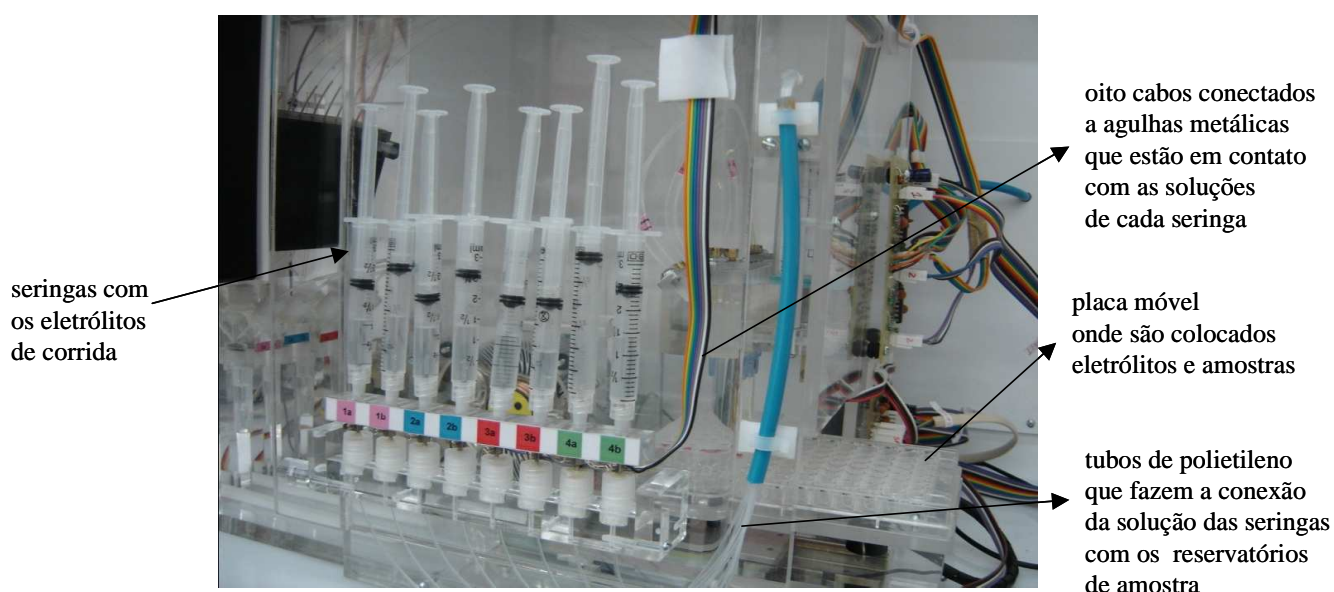
### **3.5 - Sistema MSE na região de baixa tensão**

Apesar de os reservatórios de alta tensão terem sido desenvolvidos com elevada preocupação para se evitar qualquer tipo de fuga de alta tensão, este ainda foi mais fácil de ser implementado do que na região de baixa tensão. Isso porque o sistema MSE na região de alta tensão é fixo, enquanto na região de baixa ele tem que ser móvel. Além disso, na região de alta tensão, cada dois capilares são conectados a um reservatório comum enquanto do lado de baixa



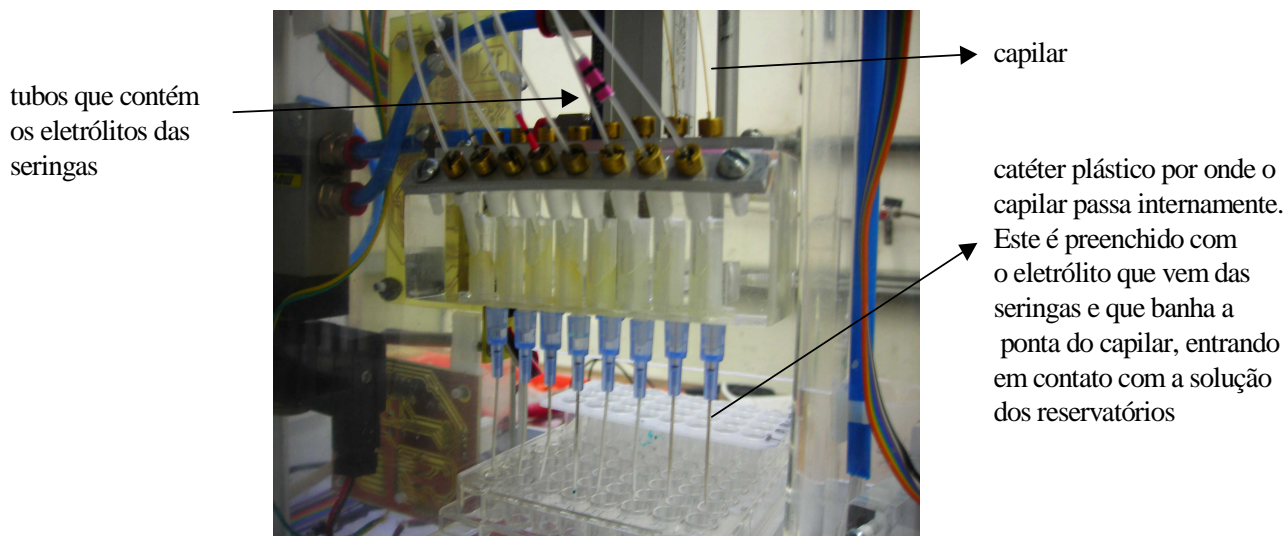
tensão houve a necessidade de se desenvolver oito reservatórios para a apropriada medição da corrente de cada um deles.

A **Figura 30** apresenta o MSE na região de baixa tensão. A ponta metálica existente na parte inferior da seringa está sempre em contato com a solução. Nesse ponto o fio terra é conectado, fechando assim o contato elétrico com o eletrólito.



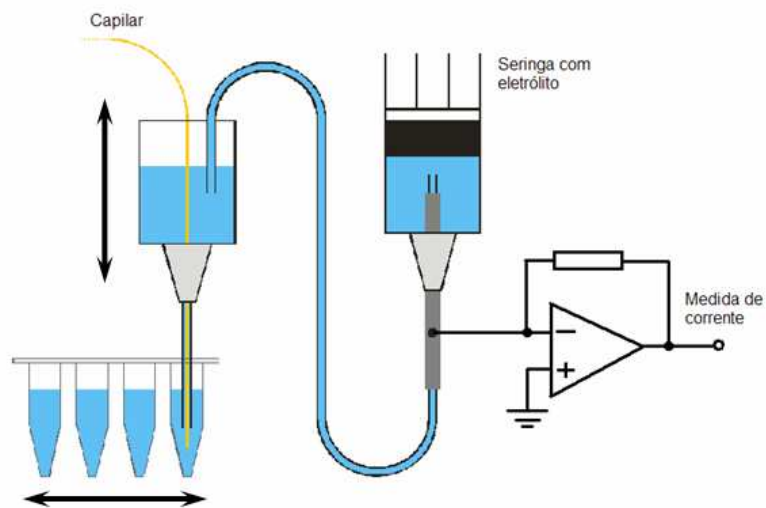
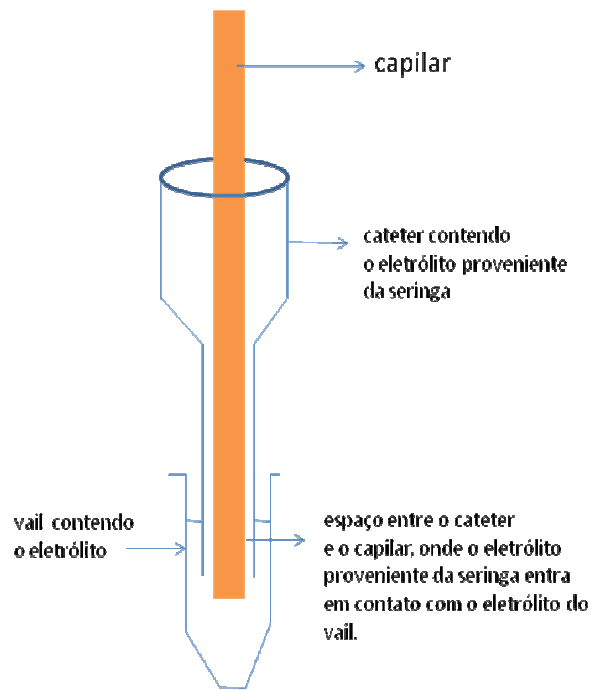
**Figura 30** – Sistema MSE contendo as oito seringas e tubulações que leva os eletrólitos até os reservatórios principais, fechando-se o circuito elétrico.

Ao pressionarmos as seringas, a solução entra em contato com sua parte metálica e percorre toda a tubulação até chegar no bloco contendo os cateteres (**Figura 31**), e em seguida com a ponta do capilar (**Figura 32**). A **Figura 31** mostra detalhes do sistema contendo os oito capilares na região de injeção de amostras. Todo sistema apresentado a seguir se movimenta para cima e para baixo através de um pistão, para a troca dos reservatórios. Este funciona através de comandos elétricos que acionam válvulas que redirecionam fluxo de nitrogênio que chega ao pistão para que este suba ou desça.



**Figura 31** - Sistema contendo os oito capilares e cateteres provenientes do sistema MSE na região de baixa tensão.

**Figura 32** é uma representação esquemática de como se dá o contato elétrico da ponta do capilar e a solução presente nos catéteres e reservatórios. Os catéteres (que possuem diâmetro ligeiramente maior que o do capilar) estão preenchidos com o eletrólito de corrida que vem das seringas. Ao ser inserido no reservatório, automaticamente o contato elétrico é feito entre essa solução que está no espaço entre o catéter e o capilar e o eletrólito presente no vial.

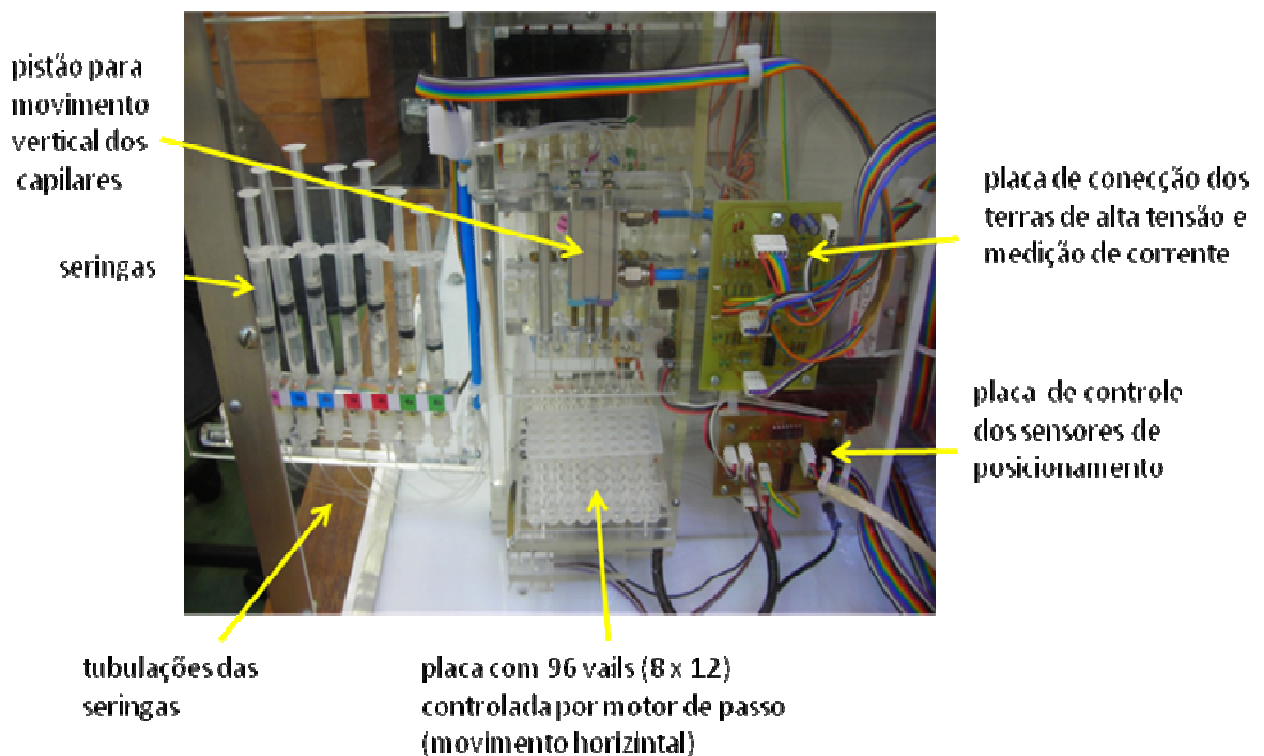


**Figura 32** – Representação esquemática do sistema de eletrólise separada na região de baixa tensão.

Utilizando-se esse sistema, os produtos de eletrólise na região de baixa tensão ficam nas seringas, evitando contaminação de amostra e eletrólito dos vails.

### 3.6 - Sistema de posicionamento de reservatórios e controle de pressão

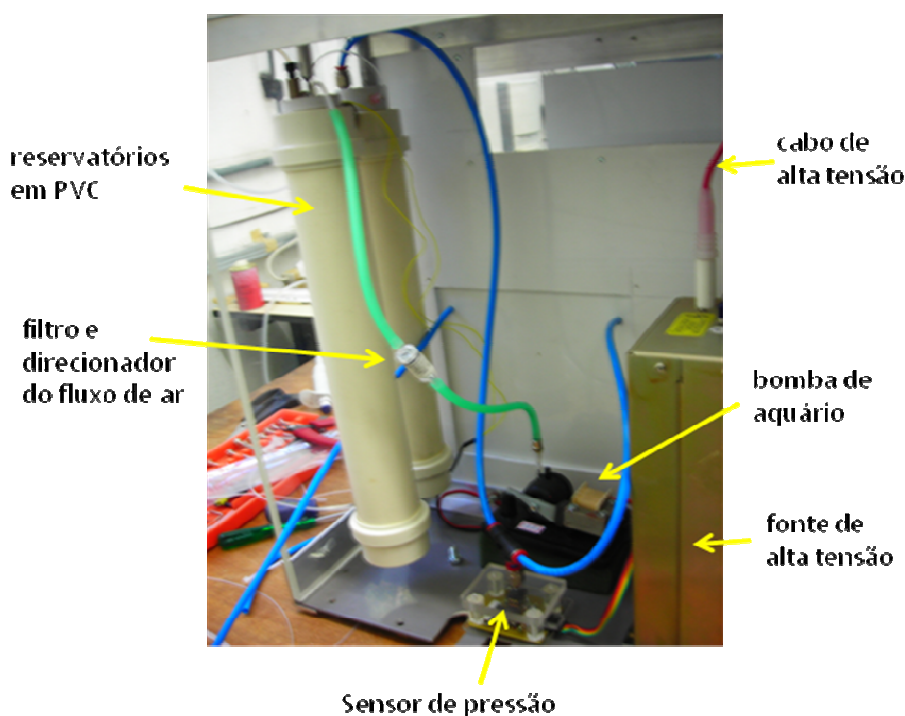
A **Figura 33** mostra a visão lateral do equipamento B1, onde pode-se observar tanto as seringas que contém os eletrólitos de corrida, como suas tubulações. Do lado direito também pode-se observar dois circuitos eletrônicos. Um deles é responsável pelo posicionamento do pistão e da placa onde são introduzidas amostras e eletrólitos. Esse recebe sinais de diversos sensores ópticos que indicam o posicionamento exato do pistão ou do carrinho das amostras. O outro é responsável pela informação da corrente dos capilares. Essa informação é fundamental para se identificar se algum dos oito capilares está entupido ou se há alguma bolha em toda tubulação do MSE.



**Figura 33-** Visão lateral do equipamento B1

A **Figura 34** mostra o sistema de pressurização em B1 cujo sistema é semelhante ao utilizado em nossos outros equipamentos. No entanto, esse não possui uma coluna d'água, pois a

pressão é determinada por um sensor eletrônico. Para a injeção da amostra, um leve e controlado vácuo deve ser realizado nos reservatórios da região de baixa tensão.



**Figura 34** - Sistema de controle de pressão do equipamento B1

Visto que usamos uma bomba de aquário potente para esta função, também foi necessária a construção de câmaras para amortecer as flutuações de pressão desta bomba. Em uma das câmaras a bomba é conectada. Existe, no entanto, uma válvula de controle do fluxo de ar desta câmara para uma outra câmara. Esta válvula solenóide abre ou fecha conforme o sensor de pressão indica, mantendo uma pressão controlada nessa segunda câmara. Esta pressão controlada é usada para a injeção das amostras, apenas com o comando via software. Como o sistema possui grandes câmaras, é necessário antes da injeção de uma mostra um período prévio em que a bomba é ligada (cerca de 20 segundos) para que a pressão de todo sistema seja estabilizada. Esta mesma bomba é ativada em potência máxima (válvula entre câmaras aberta) para que haja o processo de troca de eletrólito ou de condicionamento do capilar.

### 3.7 - Sistema de detecção C<sup>4</sup>D multicapilar

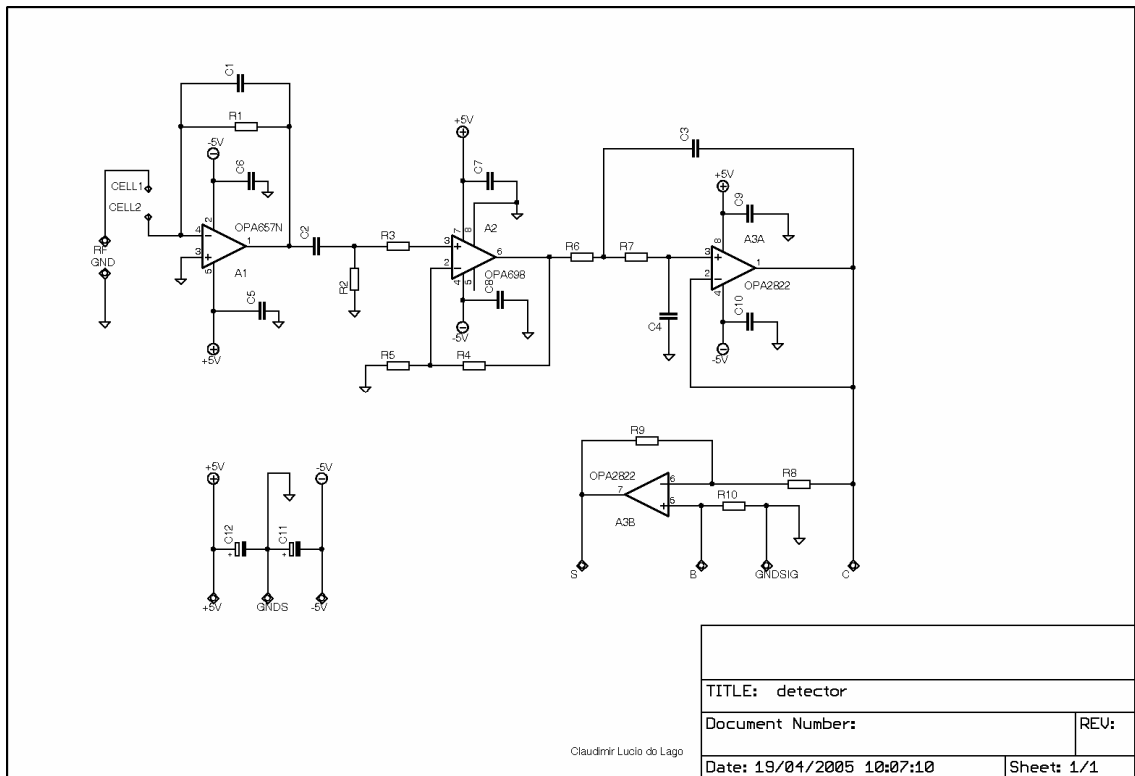
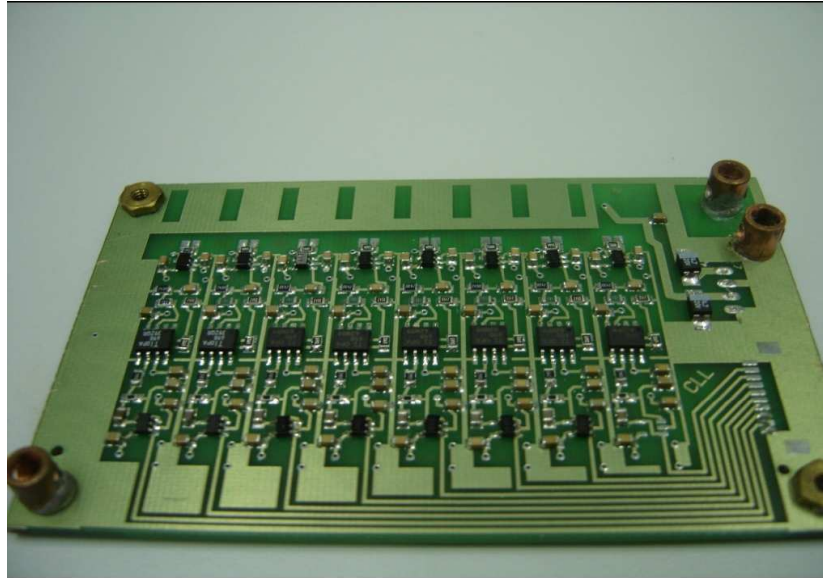
O circuito eletrônico desenvolvido para o detector de oito canais possui o mesmo princípio de funcionamento dos detectores para um capilar. Desde a primeira publicação, na qual o C<sup>4</sup>D foi proposto, pequenas inovações foram acrescentadas. No entanto, o circuito eletrônico continua basicamente o mesmo; apenas com pequenas modificações na escolha dos componentes eletrônicos. A idéia original era – e continua sendo – a aplicação de um campo elétrico alternado sobre uma pequena região do capilar e o monitoramento da corrente que flui por esta, a qual pode ser relacionada à condutividade da solução no ponto de detecção. O circuito consiste de um gerador de RF que aplica o sinal sobre um dos dois eletrodos, sendo o segundo conectado a um circuito conversor corrente/tensão. O sinal é retificado e amplificado de modo a permitir o registro de pequenas modificações da admitância da cela e, por conseguinte, da condutividade da solução.

Nossa versão do detector tem permanecido basicamente a mesma desde 2001. A caracterização do mesmo foi realizada e demonstrou que, embora seja possível obter resposta mesmo a 1,5 MHz, a sensibilidade mantém-se estável até 600 kHz. Acima desta frequência de operação, a sensibilidade é reduzida devido à limitação natural dos componentes empregados, principalmente ao amplificador operacional (AmpOp) do conversor corrente/tensão. Este estágio é crítico porque a corrente medida é simultaneamente de baixa intensidade e de alta frequência. Felizmente, para a geometria e dimensões da cela de detecção utilizada, a operação abaixo de 600 kHz é suficiente para obter boa sensibilidade. No entanto, nossos estudos recentes [17-18] demonstram ser possível obter maior sensibilidade e linearidade para um dado conjunto de eletrólito e capilar tendo flexibilidade para trabalhar a maiores valores de frequência.

Assim desenvolvemos um novo detector com uma eletrônica diferenciada e com novos componentes eletrônicos, todos do tipo SMD. Isso tornou o detector relativamente pequeno, porém, para a implementação de oito detectores em uma única placa com distanciamento entre cada cela de detecção de nove milímetros, houve a necessidade de uma placa de circuito impresso de 6,5 x 10 cm. Enquanto o detector utilizado em H1 possuía um ótimo funcionamento entre 550 e 600 kHz com  $2V_{pp}$ , o novo circuito eletrônico mostrou uma maior relação sinal / ruído em 1 MHz, com  $4 V_{pp}$ . O fato deste detector possuir uma frequência ótima de trabalho por volta de 1 MHz é muito interessante pois a grande maioria dos trabalhos relatados com  $C^4D$  a maior frequência utilizada é geralmente de 600kHz.

Todo o circuito detector foi cuidadosamente inserido em uma caixa plástica blindada internamente para proteção contra choques e interferências por radiofrequências. Além dessas características, o controle de linha base neste equipamento é feito via software, pois seria pouco prático corrigir oito linhas bases ao mesmo tempo com o uso de potenciômetros.

A **Figura 35** mostra uma fotografia da placa de circuito impresso produzida industrialmente com recursos de furos metalizados, mascara verde de solda e *pads* banhados com estanho e o circuito eletrônico do mesmo.



**Figura 35 – A-** Placa contendo os oito detectores C<sup>4</sup>D. **B –** Circuito eletrônico de um dos detectores

Comparando-o com a versão anterior [124], observa-se a primeira modificação no Amplificador peracional (AmpOp) utilizado: o OPA657N da Texas Instruments. Este componente



representa o que há de melhor na linha daquela empresa para a finalidade pretendida. O segundo estágio foi significativamente modificado, isto é, o retificador, que originalmente era implementado com o uso de diodos de silício, foi substituído por uma versão baseada em um novo AmpOp da Texas: o OPA698. Este é um amplificador cujo estágio final permite a limitação do potencial de saída numa janela definida pelo usuário. Desta forma, limitando-se a saída somente a potenciais positivos, tem-se um circuito retificador, sem a inclusão de diodos. Embora conceitualmente o circuito fique mais simples, a verdadeira razão para sua utilização é a garantia do fabricante de que o retificador iria funcionar satisfatoriamente, mesmo a frequências tão elevadas quanto 100 MHz.

O terceiro estágio consiste em um filtro passa-baixas que também sofreu modificações. Na versão original, um simples filtro RC de primeira ordem era empregado. Nesta nova versão, um filtro Butterworth de segunda ordem com topologia Salen-Key foi utilizado com a preocupação de estabelecer uma frequência de transição tal que o pico eletroforético não fosse deformado, mantendo-se, ao mesmo tempo, suficientemente baixa para a maior supressão possível do sinal de RF. Desta forma, o sinal de RF não compromete a qualidade da aquisição do sinal analítico, sendo esta limitada pelo ruído branco inerente ao circuito eletrônico e pelo sistema químico em análise.

Os componentes eletrônicos do detector estão distribuídos dos dois lados da placa de circuito impresso, de forma a se evitar o conflito espacial entre os componentes e a coluna capilar. É importante notar que o layout foi desenvolvido para que a distância entre colunas ficasse em nove milímetros, distância padrão entre os poços de placas de ELISA e PCR, comercialmente disponíveis e bastante apropriadas para acomodar diversas amostras. Devido a essas características, uma placa de ELISA foi presa permanentemente sobre o trilho que se move através de um motor de passo. Sobre esta placa, uma placa usada para reações de PCR, que é móvel, é encaixada com os eletrólitos e amostras desejados. A placa de circuito impresso possui

espessura máxima de 9 mm, pois se em um segundo momento quiséssemos, diversos detectores poderiam ser dispostos lado a lado, para formar um equipamento com até 96 capilares.

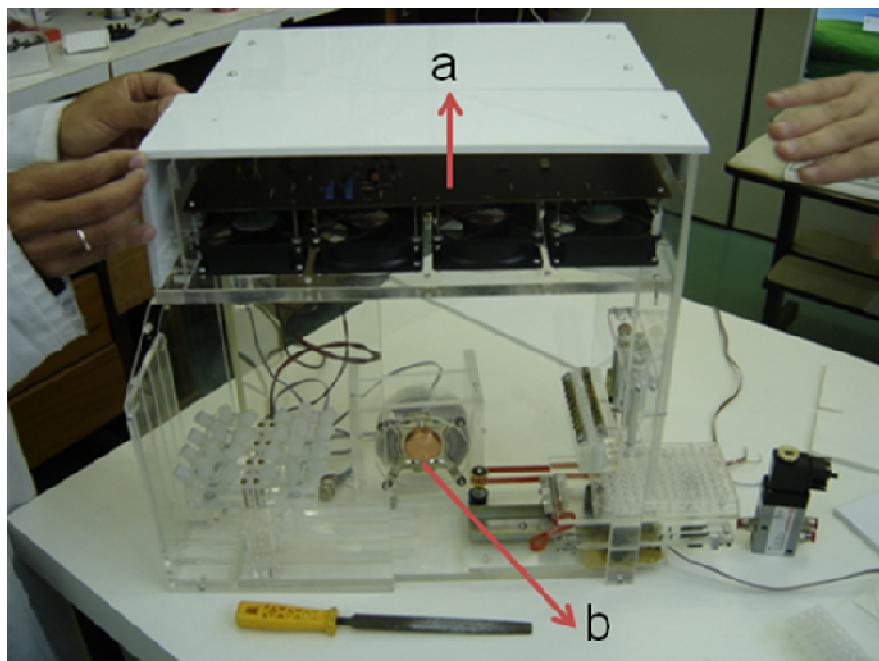
Apesar deste detector funcionar adequadamente, como veremos mais adiante, alguns pontos negativos foram detectados e pretende-se modificar em um futuro próximo. O primeiro dele diz respeito a seu tamanho. Apesar do conjunto detector possuir uma altura de apenas seis centímetros, este tamanho é ainda muito grande, pois sua caixa de blindagem acaba ocupando mais espaço e ainda é necessário um espaço para poder se encaixar cada capilar nos reservatórios na parte inferior do detector. Somado a isso, ainda existe a distância do topo do conjunto até a solução. Sendo assim, qualquer amostra após passar pela cela de detecção ainda necessita percorrer ao menos 14 cm até sair do capilar. Além desse inconveniente, não foi incomum a quebra de capilares durante o posicionamento dos capilares no detector devido à falta de espaço, e ao longo percurso percorrido.

Por esse motivo, outro estudante vem desenvolvendo sua dissertação de mestrado construindo detectores ainda mais compactos. Protótipos muito bem sucedidos já foram construídos, possuindo menos de 1 cm de espessura. Testes iniciais já demonstraram que este sistema funciona e provavelmente será a tendência para os detectores futuros. Seu formato vem sendo desenvolvido para permitir seu acoplamento mesmo em cartuchos de equipamentos comerciais.

### **3.8 – Sistema de controle de temperatura**

Como já citado anteriormente, a detecção condutométrica sem contato é bastante sensível a oscilações de temperatura. Sendo assim, se o mecanismo de controle de temperatura para um único capilar deve ser preciso, um sistema contendo oito capilares gerando muito mais calor

necessita de muito mais atenção. A **Figura 36** mostra uma das etapas da construção do módulo que se encaixa em B1, e que contém todo o sistema dos oito capilares. Nesta figura é fácil de se visualizar o sistema de controle de temperatura de todo o módulo.



**Figura 36** – Módulo que se encaixa em B1 quando este ainda estava em fase de construção. (a) circuito eletrônico de controle de temperatura contendo quatro ventoinhas (b) ventoinha com amortecedor térmico.

Como se pode visualizar, este sistema possui 4 ventoinhas grandes utilizadas em computadores. Estas sugam o ar para a parte posterior desse módulo, que também é vedada por placas acrílicas. Logo acima dessas ventoinhas, pode-se ver uma grande placa de circuito impresso. Nela existe todo o sistema eletrônico de controle de temperatura, com sensores e lâmpadas incandescentes usadas como elemento dissipativo. O ar sugado pelas ventoinhas retorna para o módulo dos capilares através de uma ventoinha que possui um *cooler*, que funciona como um amortecedor térmico.

## **3.9 – Análises de aminoácidos em B1**

### **3.9.1- Introdução**

Dentre as moléculas mais importantes de serem analisadas nos seres vivos estão os aminoácidos (AAs). Além de serem as moléculas constituintes das proteínas de todos seres vivos, ainda podem possuir diversas funções de âmbito fisiológico. Por esse motivo é de extrema importância sua determinação nas mais variadas amostras, especialmente em análises clínicas [15, 23]. Essas moléculas já vêm sendo estudadas extensivamente com o uso da CE e um grande número de métodos já foram reportados, no entanto geralmente após laboriosos procedimentos de derivatização [73-74]. A Detecção direta por UV ou fluorescência só é aplicável a aminoácidos aromáticos, enquanto os outros necessitam passar por processos de derivatização. Uma alternativa bastante interessante e recente para a detecção de AAs é o uso da  $C^4D$  que já demonstrou ser aplicável na análise dessas moléculas tanto para eletroforese convencional [75-76] como em microchips [61, 77].

### **3.9.2- Reagentes e soluções**

Os aminoácidos Alanina (Ala), arginina (Arg), asparagina (Asn), ácido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu), glicina (Gly), glutamina (Gln), histidina (His), isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lys), metionina (Met), fenilalanina (Phe), prolina (Pro), serina (Ser), treonina (Thr), triptofano (Trp), Cisteína (Cys), Tirosina (Tyr) e valina (Val) foram obtidas da Fluka (Buchs, Switzerland). Hidróxido de sódio (NaOH) e ácido acético (HAc) foram obtidos da Merck (Darmstadt, Germany). Hidroxietilcelulose (HEC) foi comprado da Sigma (St. Louis, MO, USA). Soluções estoque de todos os aminoácidos ( $20 \text{ mmol L}^{-1}$ ) foram preparadas com água deionizada

(Barnstead/ThermoLyne, Dubuque, IA, USA). Exceção para os AAs Cys and Tyr cujos estoques foram de 10 mmolL<sup>-1</sup>.

### **3.9.3 - Procedimento utilizado para identificação dos AAs**

Apesar da reconhecida eficiência de separação em CE, os procedimentos de otimização de separações ainda é um processo lento e complicado. Isto acontece porque para cada tipo de amostra é necessária uma prévia otimização de parâmetros como, por exemplo, diâmetro e comprimento do capilar, potencial aplicado, pH e composição do eletrólito e amostra. Como a mobilidade dos íons em CE é extremamente dependente das condições de separação, picos podem se sobrepor ou mudar de posição se um destes parâmetros se modificar. Assim, se uma nova condição de separação é criada ou modificada, normalmente é necessário injetar todos os padrões novamente para identificar a correta posição de cada pico.

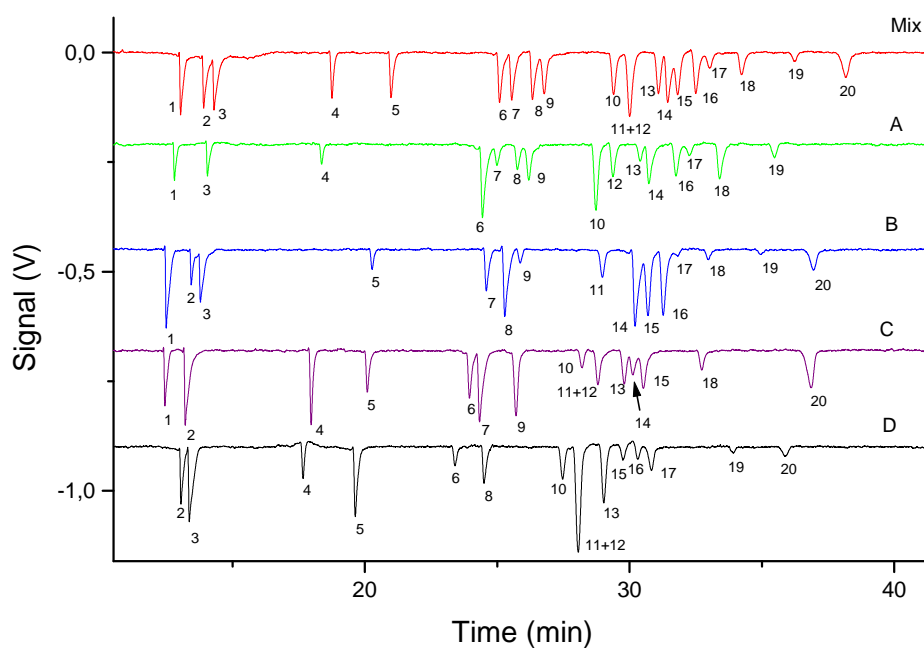
Visto que queremos demonstrar a separação de 20 AAs, decidimos criar um procedimento prático para facilitar a identificação de cada um deles com o menor número de corridas o possível. Assim, criamos uma tabela onde as linhas correspondem às misturas de padrões em diferentes concentrações, e as colunas aos analitos adicionados. Para esse procedimento ser aplicado com sucesso, cada coluna da tabela possui uma combinação única, evitando a obtenção de perfis similares. Como esse procedimento foi criado para facilitar a identificação dos analitos, foram utilizadas concentrações bastante distintas de cada AA, de forma que variações em suas alturas fossem visualmente perceptíveis. Com apenas quatro soluções é possível criar uma matriz de até vinte e quatro analitos, sem que haja coincidência de suas concentrações. Teoricamente, com apenas duas misturas poderíamos identificar todos os 20 AAs variando-se suas concentrações,

contudo os dados seriam de difícil interpretação visto que pequenas diferenças de concentração poderiam causar dúvidas. A **Tabela 3** possui quatro misturas (A, B, C e D) contendo os vinte AAs. Todas as misturas foram feitas a partir de soluções estoque de cada um dos AAs. A **Figura 37** apresenta os quatro eletroferogramas feitos a partir destas quatro misturas.

**Tabela 3:** Quatro diferentes misturas (A, B, C e D) de 20 AAs nas concentrações: 0 = não está presente; 1 (pequeno) =  $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 2 (médio) =  $800 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  e 4 (grande) =  $1,6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

	Ala	Arg	Asn	Asp	Glu	Gln	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Pro	Ser	Phe	Trp	Thr	Val	Cys*	Tyr*
<b>A</b>	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	4	4	4	4
<b>B</b>	1	1	2	2	4	0	0	2	2	4	4	0	1	1	4	4	0	0	1	1
<b>C</b>	2	4	1	4	2	2	4	0	4	0	2	1	0	4	0	1	1	2	0	2
<b>D</b>	4	2	4	1	1	4	2	4	0	2	0	4	4	0	1	0	2	1	2	0

\*Esses AAs possuem metade da concentração de todos os outros



**Figura 37.** Separação de aminoácidos em meio ácido: (1) Lys; (2) Arg; (3) His; (4) Gly; (5) Ala; (6) Val; (7) Iso; (8) Leu; (9) Ser; (10) Thr; (11) Asn; (12) Met; (13) Gln; (14) Trp; (15) Glu; (16) Phe; (17) Pro; (18) Thy; (19) Cys e 20 Asp. Eletrólito de corrida  $2,7 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ácido acético pH 2.1 com HEC 0.05%. Comprimento do capilar 86,2 cm (76 cm efetivos),  $50 \mu\text{m}$  I. D. Injeção por pressão a 40s, 1 kPa, 30kV. Detector  $\text{C}^4\text{D}$ , 550kHz, 2V p.p. Experimentos realizados em H1.

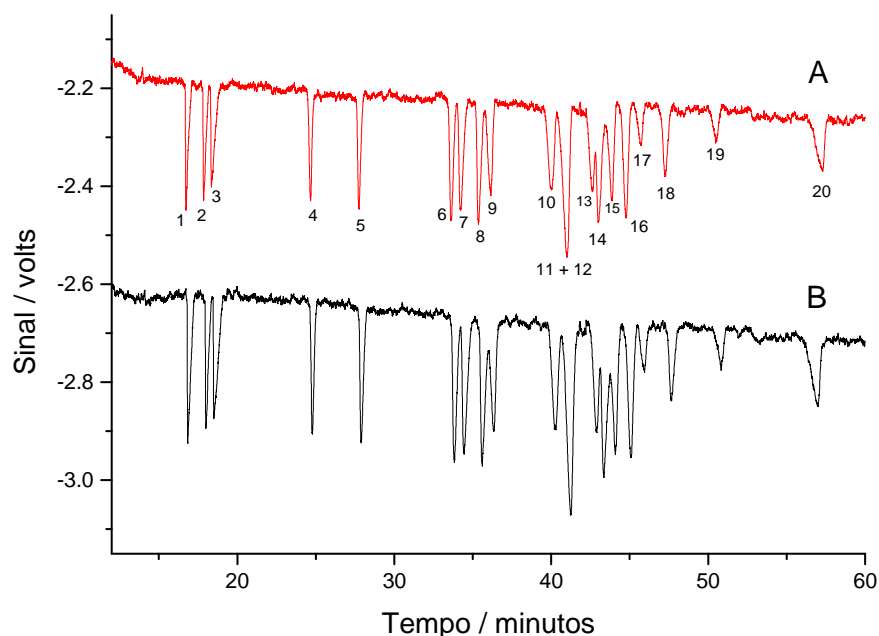
Observando, por exemplo, o quinto pico na **Figura 37**, verificamos que este é inexistente no eletroferograma A (0), possui uma concentração pequena em B (1), média em C (2) e grande em D (4). Essa seqüência somente é obtida se este pico for Alanina. Outro exemplo é o pico 18 que é grande em A (4), pequeno em B (1), médio em C (1) e inexistente em D (0). Pela **Tabela 3** essa combinação só pode ser obtida se este for Tirosina.

Através deste raciocínio conseguimos determinar todos os analitos presentes nessa amostra sem a necessidade de injeções individuais. Caso houvesse dúvidas do posicionamento de determinado analito, bastaria um reforço de determinado padrão, como é feito usualmente, mas não a injeção de todos novamente. Um ponto interessante desse procedimento é que, mesmo se os analitos possuem sensibilidades diferentes, os picos necessariamente vão aumentar ou diminuir de tamanho na mesma proporção, não prejudicando assim a sua identificação. Visto que fazemos comparações entre picos de eletroferogramas distintos, é muito importante também evitar variações de EOF para que os picos fiquem o mais alinhado possível. Assim quanto mais reprodutíveis as separações, maior a facilidade de identificação dos analitos usando esse procedimento. Esse procedimento nos pareceu muito simples e útil, facilitando a determinação de cada pico nas corridas apresentadas a seguir.

#### **3.9.4 – Separação de aminoácidos em B1**

A separação de aminoácidos em B1 foi uma forma de demonstrar uma das funcionalidades desse equipamento para amostras complexas. A **Figura 38** mostra a separação dos 20 AAs proteínogênicos em B1. O eletrólito utilizado foi o HAc  $2,7 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  contendo 0,05% de HEC. A adição de HEC previne a adsorção dessas moléculas na superfície interna do capilar.

Sob essas condições vemos a separação da maioria dos picos de todos os AAs com algumas poucas sobreposições.



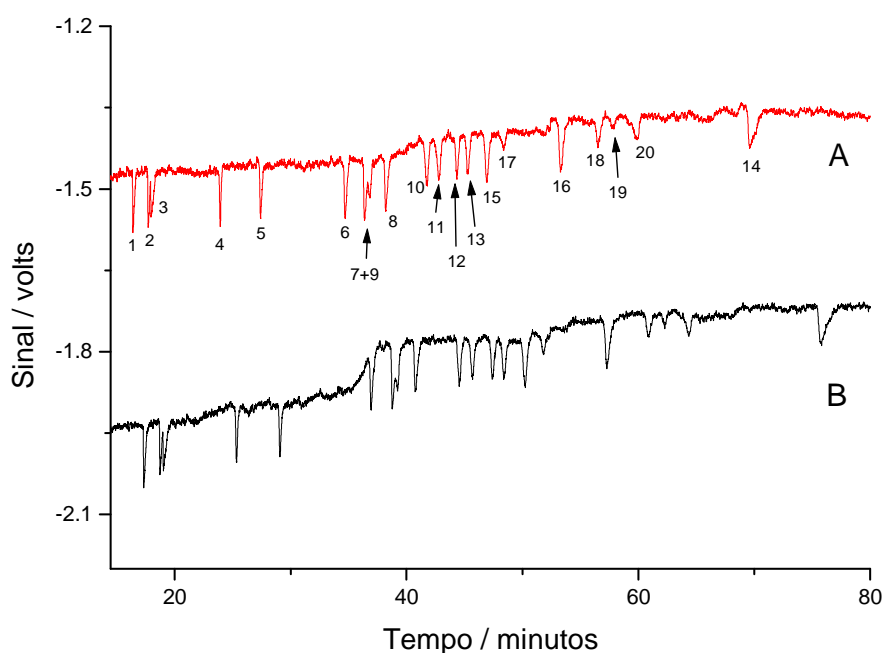
**Figura 38.** Separação de aminoácidos em meio ácido: Lys (1); Arg (2); His (3); Gly (4); Ala (5); Val (6); Iso (7); Leu (8); Ser (9); Thr (10); Asn (11); Met (12); Gln (13); Trp (14); Glu (15); Phe (16); Pro (17); Thy (18); Cys (19) e Asp (20). Todos aminoácidos  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  com exceção de Thy e Cys ( $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Eletrólito:  $2,7 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ácido acético pH 2,1 com HEC 0,05%. Capilar  $50 \mu\text{m}$ , 82 cm (67cm efetivos). Injeção por pressão a 30 s, 1 kPa, 28kV. Detector  $\text{C}^{4}\text{D}$ , 1MHz, 4V pico a pico. Corridas A e B realizadas simultaneamente em dois capilares distintos sob as mesmas condições.

Esta separação foi realizada em dois capilares que estavam em um dos quatro conjuntos de dois capilares, contendo o mesmo eletrólito. A concentração de  $2,7 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de HAc (pH 2,1) foi escolhida por apresentar a melhor resolução entre picos, após testarmos concentrações variando de 2 até  $3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Foram realizadas separações sem o uso de HEC, contudo a adsorção é tão elevada que alguns picos deixam de aparecer, podendo ocorrer um rápido entupimento do capilar se este não for corretamente lavado.



Essa separação apresentada acima foi desenvolvida com AAs razoavelmente concentrados ( $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Assim, picos como Leu e Ser e Try e Glu, que estão um pouco sobrepostos, se separam completamente em menores concentrações. Outro ponto interessante é que cada AA, mesmo em concentrações idênticas, se apresentam com tamanhos e formatos variados.

Visando uma separação mais eficiente desses AAs, procuramos acrescentar alguns aditivos no meio com o intuito de maximizar a separação, da mesma forma que fizemos na separação de quitoooligossacarídeos. Foram testados solventes orgânicos como acetonitrila e metanol ou detergentes como Tween 20 sem conseguirmos melhoras nos perfis de separação. No entanto, um efeito bastante acentuado na separação se deu com o acréscimo do detergente Triton X-100 ao eletrólito. A **Figura 39** mostra a separação desses AAs com o uso de Triton.



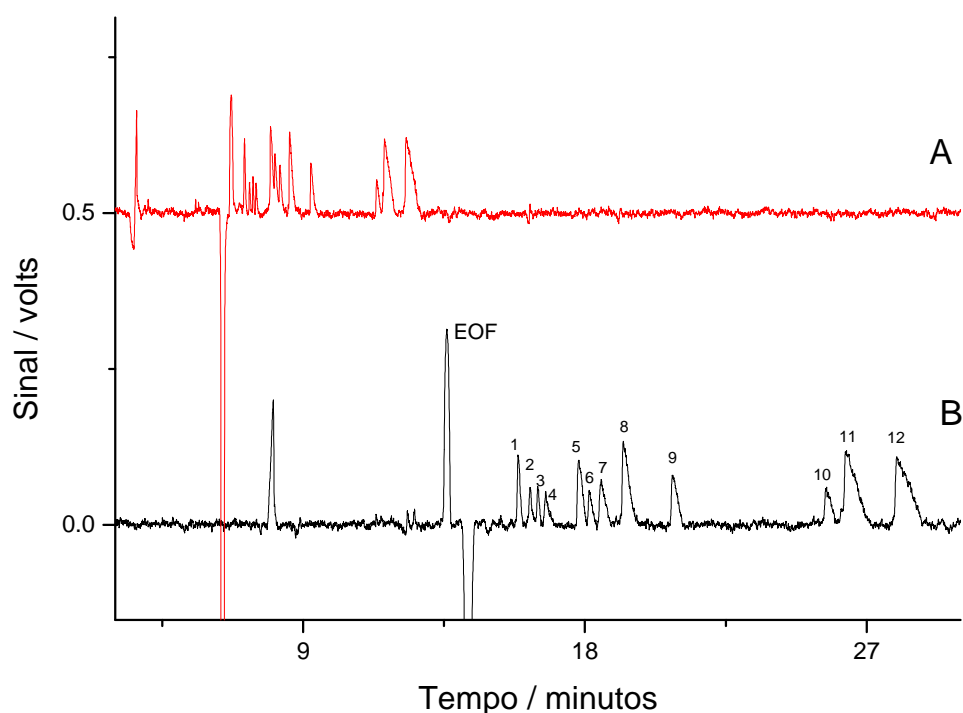
**Figura 39.** Separação de aminoácidos em meio ácido: Lys (1); Arg (2); His (3); Gly (4); Ala (5); Val (6); Iso (7); Leu (8); Ser (9); Thr (10); Asn (11); Met (12); Gln (13); Trp (14); Glu (15); Phe (16); Pro (17); Thy (18); Cys (19) e Asp (20). Todos aminoácidos  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  com exceção de Thy e Cys ( $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Eletrólito: 2,4 M ácido acético + 10% (v/v) de Triton X-100. Capilar de  $50 \mu\text{m}$ , 82 cm (67 cm efetivos). Injeção por pressão (1kPa) a 30 s, 28 kV. Detector  $\text{C}^4\text{D}$ , 1MHz, 4  $V_{pp}$ . Corridas A e B realizadas simultaneamente em dois capilares distintos sob as mesmas condições.

Nessas condições verificamos que os picos de Arg e His e Ile e Ser começam a se sobrepor.

Contudo, os picos de 11 a 15 que antes estavam muito próximos, com triton, se separaram muito bem. Também pode-se observar algumas trocas de posição de picos como a do triptofano, que se torna mais lento do que o aspartato nessa nova condição. Inclusive a corrida como um todo demora cerca de 20 min a mais nessas condições. Fatores que podem ter acarretado nessas mudanças podem ser variadas como, por exemplo, aumento da viscosidade do meio ou mudanças de pH. Pequenas variações nas migrações entre os eletroferogramas da **Figura 39** dizem respeito provavelmente a diferenças nos tamanhos dos capilares. Apesar de todos possuírem um comprimento que gira em torno de 82 cm alguns, tiveram que ser ligeiramente cortados devido a problemas de entupimento. Apesar de nessas duas condições termos conseguido a separação de todos os 20 AAs acreditamos ser possível um refinamento ainda maior dessa separação, para obtermos a separação completa de todos os AAs em uma única corrida. Nos trabalhos publicados usando  $C^4D$  para a detecção de AAs observamos picos sobrepostos em concentrações muito menores ( $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) [23].

Sendo que o equipamento B1 permite análises simultâneas com diferentes eletrólitos e potenciais aplicados, decidimos comprovar também seu funcionamento na separação de AAs, agora em pH básico e em diferentes potenciais de separação. Como se pode verificar na **Figura 40**, utilizamos o eletrólito Tris / CAPS pH 9,4 em dois potenciais de separação: A a +28 kV e B a +14 kV. Visto que neste pH esses AAs se comportam como ânions, era esperado que estes nem mesmo migrassem visto que o potencial aplicado é positivo e não estamos usando reversor de fluxo. No entanto, devido a estes possuírem mobilidades baixas, esses são arrastados pelo EOF que é elevado. Dessa forma, dos 20 AAs injetados, 18 deles migraram e foram detectados e

confirmados com a adição de *spikes* (reforço com determinado padrão). Como o EOF nessas condições é elevado, o tempo de corrida é a metade daquele para a separação em pH baixo, no mesmo potencial. Nestas condições, temos uma boa separação para alguns dos AAs como, por exemplo, Asn e Asp. Interessante notar que, em um potencial de 14kV, temos uma separação mais acentuada desses picos e alguns outros picos que estavam completamente sobrepostos como Met e Glu apresentam um perfil muito melhor de separação.



**Figura 40.** Separação de aminoácidos em meio básico: 1 mmol·L<sup>-1</sup> de (1) Iso, Leu e Ala; (2) Val; (3) Trp; (4) Gly; (5) Phe e Thy (0,5 mmol·L<sup>-1</sup>); (6) Met; (7) Gln; (8) Ser e Thr; (9) Asn; (10) Cys (0,5 mmol·L<sup>-1</sup>); (11) Glu; (12)- Asp: Eletrólito: TRIS/CAPS 0,25 mol·L<sup>-1</sup>, pH 9,4. Capilar de 50 μm, 82 cm (67 cm efetivos). Injeção por pressão a 30 s, 1 kPa, 28kV em A e 14kV B. Detector C<sup>4</sup>D, 1MHz, 4V p.p. Corridas A e B realizadas simultaneamente em dois capilares e reservatórios distintos sob as mesmas condições de separação com exceção do potencial aplicado.

### **3.10 – Conclusões finais sobre B1 e perspectivas**

Visto que o equipamento foi concluído recentemente, não tivemos muito tempo para realizar testes aprofundados em seu sistema, mas diversos pontos instrumentais ficaram muito claros após os experimentos de separações de AAs. O primeiro deles diz respeito à pressão da bomba de aquário para a realização da lavagem dos capilares. Apesar de em testes de lavagens dos oito capilares de 75  $\mu\text{m}$  o procedimento ser satisfatório, ficou claro que para capilares de 50  $\mu\text{m}$  o sistema se torna ineficiente. Por esse motivo, foi necessário o acoplamento de uma bomba mais potente para a realização desses experimentos. Esta provavelmente será parte integrante do equipamento, evitando problemas de trocas constantes de capilares devido a entupimentos irreversíveis. Especialmente quando se utiliza soluções de alta viscosidade ou substâncias que se agregam facilmente no capilar, é fundamental uma lavagem bastante eficiente dos capilares. A partir do uso desta nova bomba, eliminaram-se esses problemas.

Outro ponto que foi modificado diz respeito à configuração do sistema de circulação de ar e controle de temperatura dos capilares. Como explicado anteriormente, existe um complexo sistema de ventoinhas que permite um eficiente controle da temperatura em todo o sistema. No entanto, tamanha eficiência criou um problema que diz respeito a um fluxo elevado de ar na região das amostras, que leva a uma alta evaporação, tanto do eletrólito de corrida como de amostras. Devido a esse problema era comum a mudança do perfil dos eletroferogramas devido a alterações na composição do eletrólito na região de baixa tensão. O problema foi solucionado provisoriamente desligando-se a ventoinha inferior que contém o amortecedor térmico. Visto que o ar retorna obrigatoriamente por essa ventoinha o papel do amortecedor térmico ainda cumpre seu papel e não verificamos perdas na estabilização devido ao seu desligamento. Essa ligeira mudança refletiu-se em resultados muito mais reprodutíveis e em uma evaporação aparentemente

desprezível. Uma modificação mais apropriada seria desenvolver uma placa protetora para evitar o fluxo de ar sobre os vials, deixando apenas aqueles em uso expostos.

Outro ponto que ficou bastante claro diz respeito ao sistema MSE. Apesar de o funcionamento ser satisfatório, alguns problemas como formação de bolhas ou interrupção do contato elétrico na região do catéter causaram alguns transtornos. Sendo assim, concluímos que apesar do correto funcionamento, o sistema MSE ainda necessita aprimoramentos, o que já era esperado. Apesar de infelizmente não conseguirmos por falta de tempo chegarmos em uma condição ideal de separação desses 20 AAs, mostramos que a separação e detecção de todos eles em uma única corrida provavelmente será alcançada. As diversas possibilidades de variações de condições possíveis com o uso de B1 será uma ferramenta muito útil neste sentido.

## 4 - DESENVOLVIMENTO DE MICROCHIPS DE PDMS COM IMERs

### 4.1- Introdução

As enzimas são muito utilizadas em química analítica devido à alta especificidade aos seus substratos e também pelo fato de poderem ser utilizadas repetidas vezes. Estas também podem ser utilizadas em solução ou imobilizadas em substratos sólidos (Reatores). O uso de Enzimas Imobilizadas em Reatores (IMERs) minimiza custos e tempo, tornando economicamente viável análises em modo contínuo [78]. Tipicamente as reações de imobilização não requerem enzimas altamente puras ou grandes quantidades de proteínas. Após imobilizadas, geralmente, as enzimas aumentam sua estabilidade contra o calor e variações de pH. Tradicionalmente, os IMERs tem sido acoplados com HPLC para medidas de proteínas [80], neurotransmissores, carboidratos [81-82], aminoácidos [83], e outras biomoléculas [84-85]. Contudo, com o recente desenvolvimento da Eletroforese Capilar (CE), aplicações com CE-IMERs têm sido desenvolvidas [79, 86].

Estes dispositivos híbridos têm a possibilidade de combinar a extraordinária eficiência da CE com a seletividade dos biosensores. Devido a estes dispositivos não necessitarem bombas ou uma instrumentação volumosa, uma vantagem adicional dos CE-IMERs é a possibilidade de miniaturização de todo o sistema. Os microchips ou lab-on-a-chip têm ganhado considerável atenção nos últimos anos devido à portabilidade, baixo custo e à possibilidade de trabalhar com volumes bastante reduzidos [87-88]. Entre os diferentes sistemas [78], o sistema glicose / glicose-oxidase tem sido extensivamente usado como sistema modelo por causa deste ser bem caracterizado, barato, estável, prático e também por permitir a comparação com outros biosensores [89-93]. O procedimento analítico geralmente envolve um passo de separação, que é em seguida acoplado a um IMER pós coluna que produz  $H_2O_2$ , sendo este finalmente detectado eletroquimicamente no final do canal de separação. Vários IMERs também tem sido integrados a

microchips [94-96]. Neste sentido, diferentes protocolos de ligação têm sido aplicados para imobilizar enzimas na superfície de canais. No entanto, a maioria dos dispositivos descritos muitas vezes necessita de instrumentação cara [97] ou um desenho específico de canal com o intuito de imobilizar as partículas [96].

A seguir, apresentaremos todo o desenvolvimento de um microchip com um IMER para detecção de glicose. Apesar de alguns trabalhos descreverem sistemas similares [97-101], a maioria deles requerem modificações específicas no canal de separação para manter as partículas no lugar adequado. Em segundo lugar, o presente microchip pode detectar diferentes analitos dependendo da enzima ligada nas partículas do IMER. Empacotando-se partículas no final do canal de separação, também evita-se mudanças no posicionamento e do tamanho do IMER [102]. Adicionalmente, devido à grande superfície das partículas (em comparação ao canal e a superfície do eletrodo) [103-104], grandes quantidades de enzimas podem ser imobilizadas. Outro ponto a favor de um IMER fabricado por empacotamento das partículas no final do canal de separação é que sua formação é independente da superfície química do substrato [98]. Além disso, caso a atividade seja perdida, o IMER pode permitir a ligação de novas enzimas ou a substituição das partículas do IMER.

A seguir, apresentaremos detalhes da preparação, desempenho e vantagens deste microchip. Este trabalho foi desenvolvido na Universidade do Texas em San Antonio durante estágio de doutorado sanduíche.

#### **4.2- Materiais e métodos**

O filme fotossensível SU-8 2035 foi adquirido da Micro Chem Co. (Newton, MA). O silicone Sylgard 184 e o agente de cura foram obtidos da Dow Corning (Midland, MI). Glicose e glicose-oxidase (GOx, EC 1.1.3.4, Tipo X-S de *Aspergillus niger*, 157 500 U g<sup>-1</sup> solid) foram

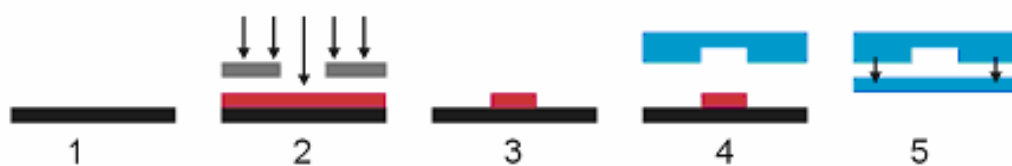
adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Soluções estoque dos analitos foram feitas adicionando-se a quantidade desejada no eletrólito de corrida. O eletrólito usado para a maioria dos experimentos foi o fosfato de sódio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) (Fisher Scientific, Fairlawn, NJ) em água, com o pH sendo ajustado quando necessário com o uso de  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de NaOH ou  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de HCl. Medidas de pH foram realizadas com o pHmetro (Orion 420Ap, Thermo, Waltham MA). Uma fonte de alta tensão construída no laboratório (HVPS) [98] foi utilizada para a separação e injeção em todos os experimentos. A detecção eletroquímica foi realizada com um potenciostato (CHI812 Instruments, Austin, TX). O eletrodo de trabalho usado foi um fio de ouro de  $25 \mu\text{m}$ , disposto perpendicularmente no final do canal de separação. Detalhes sobre o desenho do chip já foram descritos anteriormente [106-109 , 110-114]. A área de detecção foi estimada em  $0,0039 \text{ mm}^2$  ( $25 \mu\text{m}$  de diâmetro do eletrodo por  $50 \mu\text{m}$  da largura do canal). Prata e Platina foram usados como eletrodos de pseudoreferência e auxiliar respectivamente. Estes dois foram colocados no reservatório presente no final do chip.

### 4.3- Fabricação do chip de PDMS

A fabricação de microchips de PDMS já foi descrita em alguns trabalhos [115]. Em resumo, uma placa resistente e fina de silício (*wafer*) ( $100 \mu\text{m}$ ) (Silicon Valley Microelectronics Inc., Santa Clara, CA) foi submersa em uma placa de petri contendo solução piranha (1:1 de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  :  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) durante 30 minutos. Esta foi então lavada abundantemente com água deionizada e seca a  $200^\circ\text{C}$  por 15 minutos. Logo após, o *wafer* foi fixado em uma centrífuga do tipo *spin coater* (Laurell Technologies, NorthWales, PA) e sobre ele acrescido cerca de 3 mL do filme fotossensível SU-8 2035. A centrífuga foi então programada para funcionar a 500 rpm por 10 s seguidos de 3000 rpm por 30 s. Este procedimento foi realizado para esparramar o filme



fotossensível sobre o *wafer* com uma altura adequada. Após esse procedimento, a placa foi aquecida por 65 e 95°C por 5 e 10 min, respectivamente. Já com o filme seco (50 µm) sobre o *wafer*, uma máscara contendo o desenho dos canais (The Photoplot Store, Colorado Springs, CO) foi sobreposta ao *wafer*. Este conjunto foi exposto à luz ultravioleta (365nm - 13 mW / cm<sup>2</sup>) (Optical Associates Inc.; San Jose, CA) por 30 segundos e em seguida, após a retirada da máscara, foi aquecida a 95°C por 10 min. O molde do chip foi finalizado lavando-se o wafer com acetato de propilenoglicolmetiléter por 15 minutos. Este solvente retira a camada não polimerizada. Após esse procedimento, a placa foi ainda lavada com água deionizada e metanol para retirar pequenos resíduos ainda existente no *wafer*. Em seguida o wafer contendo o molde positivo foi seco a 60°C em atmosfera de nitrogênio. A camada contendo os canais foi fabricada através da solidificação de uma mistura homogênea e degaseificada de Sylgard 184 e do seu agente solidificador (10:1 em massa) sobre o molde. A superfície lisa do chip é constituída de uma camada de silicone solidificada sobre um *wafer* completamente liso, que não contém canais. A polimerização completa ocorreu a 65°C durante 2h em estufa. Após esse procedimento, as duas partes dos chip são cortadas em formato retangular e desmoldadas. Logo após, foram feitos os furos de 6 mm nas extremidades dos canais presentes no silicone e que já servem como reservatórios para a introdução do eletrólito. O canal de separação neste chip possui 52 mm de comprimento. Um desenho esquemático da fabricação do chip pode ser observado na **Figura 37**.



**Figura 41-** Desenho esquemático da fabricação do molde do chip e do chip de PDMS. 1- *wafer* de silício, 2- wafer de silício com a camada de material fotossensível sendo irradiada por raios UV através da máscara, 3- molde pronto para se colocar o silicone, 4- desmolde do chip, 5- duas superfícies de silicone após seladas formam o chip.

O eletrodo de trabalho foi alinhado no final do canal de separação antes da selagem do chip [115]. As duas camadas de PDMS, a lisa e a contendo os canais, foram então colocadas em um equipamento de esterilização por plasma (Harrick, PDC-32G, Ithaca, NY), oxidadas por 20s e imediatamente colocadas em contato para a selagem. A **Figura 41** mostra fotos reais do molde onde um chip havia sido desmoldado (A), a máscara contendo o desenho do chip (B) e um chip pronto (C).

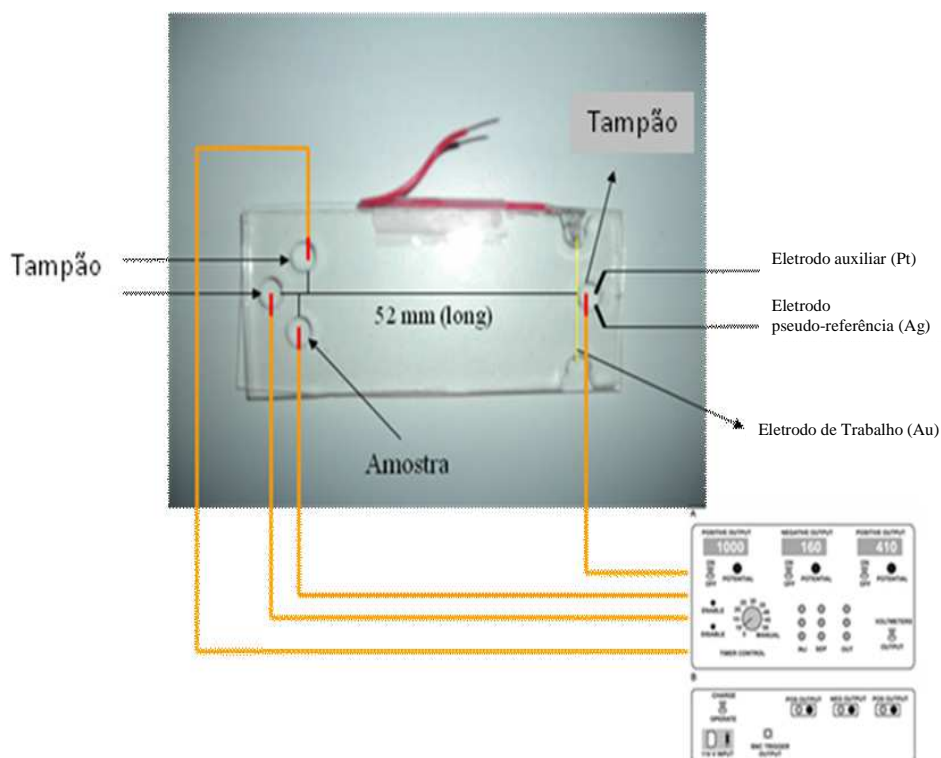


**Figura 42** : A- molde do chip, B- máscara com o desenho dos canais, C- chip pronto

As extremidades do eletrodo de trabalho foram seladas com pequenas gotas de cola rápida em gel (*Super Bonder Gel*). Finalmente o contato elétrico do micrométrico fio de ouro (eletrodo de trabalho) foi feito com um fio de cobre, usando-se uma tinta de prata. Um injetor do tipo duplo T com 500  $\mu\text{m}$  de *gap* entre os dois canais laterais (amostra e lixo da amostra) foi desenhado no molde, definindo um injeção de amostra de apenas 1.2 nL. A quantidade de eletrólito colocada em cada um dos quatro reservatórios foi de 50  $\mu\text{L}$ , exceto no reservatório de amostra com 45  $\mu\text{L}$ , para evitar a entrada de amostra no canal de separação.

Durante a injeção de amostras, potenciais de +500V, -50V e +500V foram aplicados nos reservatórios de amostra, lixo da amostra e nos dois reservatórios de eletrólito, respectivamente. Assim, as injeções eletrocínéticas foram realizadas a +450 V. Durante a separação, o potencial aplicado no reservatório de amostra e lixo, que era de -50V, passa também a ter + 500 V e no

reservatório principal da esquerda é aplicado o potencial de separação (+1100V), com o terra disposto junto com os outros dois eletrodos no reservatório da direita. Os contatos elétricos com o chip foram feitos com eletrodos de platina posicionados no final de todos os canais. A **Figura 42** mostra com maiores detalhes o chip e seus contatos elétricos.



**Figura 43**– Desenho esquemático do microchip mostrando suas conexões e a fonte de alta tensão

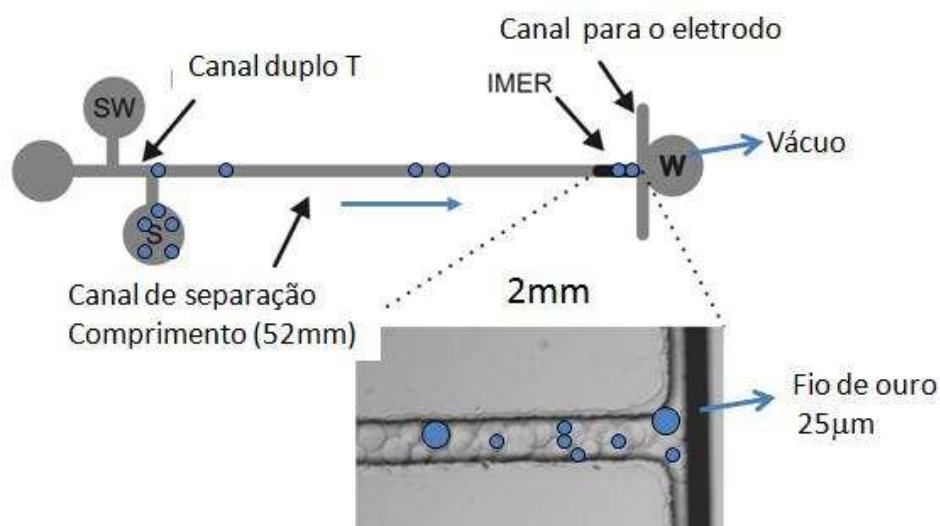
#### 4.4 - Desenvolvimento do IMER

O IMER utilizado no desenvolvimento deste chip foi baseado no uso de micro partículas de agarose contendo grupos N-hydroxi succinimida ester (NHS) que se ligam com os grupamentos amino das proteínas. Essas partículas foram retiradas de uma coluna de afinidade NHS-activated HP (1 mL, GE Healthcare) utilizada em cromatografias. Uma coluna foi desmontada e as

partículas, colocadas em um tubo plástico Eppendorf de 1,5 mL. As partículas (partículas esféricas de agarose 6%, ~ 34  $\mu\text{m}$ ) foram armazenadas em geladeira em isopropanol (100%) até a utilização, para prevenir a desativação dos grupos NHS.

Antes da reação de ligação das partículas com a enzima, as partículas foram sequencialmente lavadas duas vezes com  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de HCl e duas vezes com  $0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{NaHCO}_3 + 0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de NaCl (pH 8). Após este procedimento, as partículas foram centrifugadas por 5 min a 12500 rpm e o sobrenadante, descartado. Imediatamente após, 1 mL de uma solução contendo glicose oxidase (10 mg/mL) foi misturada com as partículas e deixadas sob agitação moderada durante 30 min em temperatura ambiente ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ). As partículas foram então lavadas três vezes no eletrólito de corrida ( $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de tampão fosfato, pH 8,5) para condicionar e também para se retirar enzimas não ligadas. As partículas foram então guardadas em geladeira para utilização no momento adequado. Novas partículas foram ativadas semanalmente através desse procedimento.

Antes do empacotamento das partículas no chip para a formação do IMER, este foi completamente preenchido com o eletrólito de corrida. Após esse procedimento, uma pequena quantidade de partículas foi acrescida no reservatório de injeção de amostras e com uma sucção moderada no reservatório final as partículas sugadas percorriam o canal de separação e eram barradas pelo eletrodo de ouro, formando-se assim o IMER sem a necessidade de um design diferenciado para a construção do chip. A **Figura 43** mostra um desenho esquemático do chip e da formação do IMER.



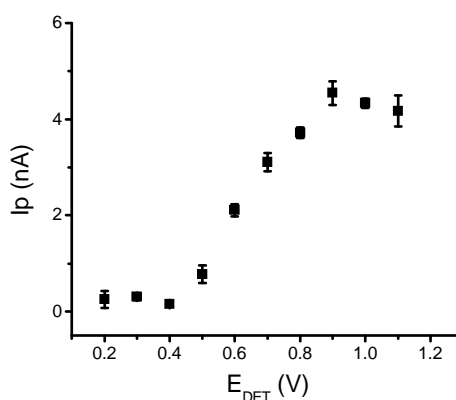
**Figura 44** – Desenho esquemático da formação do IMER no chip. Em destaque micrografia real do IMER com 2mm de comprimento.

Após a formação do IMER, a solução contendo as partículas presentes no reservatório *S* (**Figura 43**) foi substituída pelo tampão sem partículas. Após a sucção das partículas restantes presentes no canal de separação, o chip está pronto para a realização dos experimentos. Todo esse procedimento foi realizado com a utilização de uma lupa para enxergar a montagem do IMER. A proximidade do IMER com o eletrodo minimiza a difusão do  $H_2O_2$  formado. Em experimentos preliminares (dados não mostrados), foi observado que a quantidade de partículas presentes no IMER possui significativo efeito na resposta do chip. Apesar de grandes quantidades de partículas ( $\geq 2,5$  mm) aumentarem a produção de peróxido, estas restringem o fluxo de solução, aumentando a difusão e resultando em picos alargados. Apesar de IMERs pequenos ( $\leq 1,5$ mm) permitirem um EOF maior, o menor tempo de contato do açúcar com o IMER resulta em pouco peróxido produzido. Por esta razão, todos experimentos foram feitos com IMERs de 2 mm que apresentou a melhor resposta.

#### 4.5 - Resultados e discussão

Antes de qualquer tipo de análise, foi necessário otimizar o proposto chip através da detecção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para se obter as melhores condições de separação e detecção dessa molécula [116-118]. O efeito do potencial de detecção ( $E_{\text{DET}}$ ) na resposta eletroquímica do  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi estudado através de injeções consecutivas de uma solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  enquanto acréscimos de 100 mV no potencial eram realizados. A **Figura 44** apresenta uma curva bem definida pode ser definida entre 0,5 e 1,3 V com a corrente variando em cerca de 0,5 V e alcançando um platô em cerca de 0,9 V. Quando potenciais superiores a 1,3 V foram utilizados, um decréscimo na corrente de pico foi verificada, provavelmente, devido a reações na superfície do eletrodo.

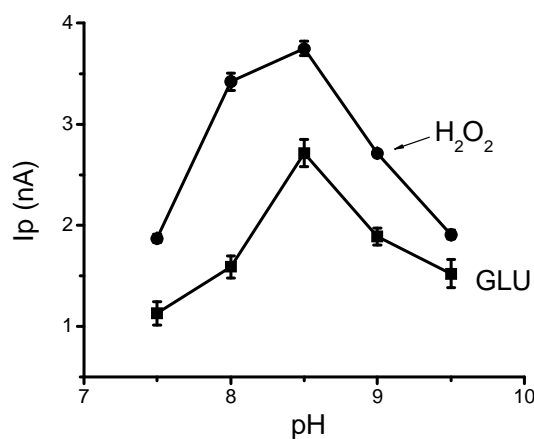
Como em 0,9 V obtivemos a maior relação sinal/ruído, este potencial de oxidação foi utilizado no restante dos experimentos.



**Figura 45** - Determinação do melhor potencial de trabalho ( $E_{\text{det}}$ ). Tampão fosfato  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 8,5. Amostra  $900 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $T_{\text{INJ}} = 5 \text{ s}$ ,  $E_{\text{SEP}} = 1100\text{V}$ .

Para verificar a estabilidade do sinal eletroquímico, foram feitas 20 injeções subsequentes de  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  demonstrando uma estabilidade de cerca de  $95 \pm 4\%$ . Este fator é importante, pois indica que a superfície do eletrodo não está sofrendo alterações muito significativas.

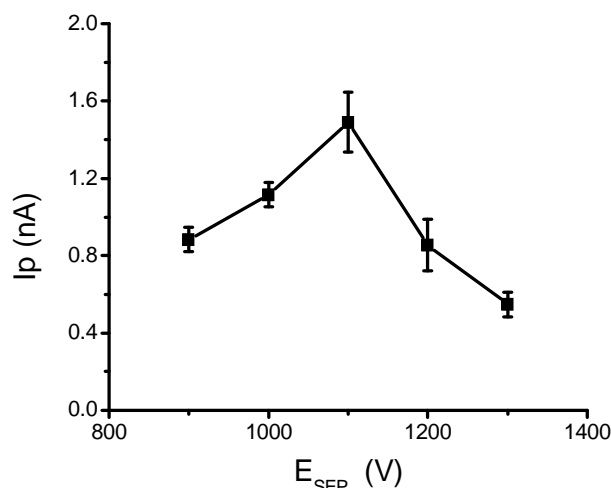
O efeito do pH de trabalho também foi investigado para injeções de glicose. Este parâmetro é de vital importância, porque ele afeta tanto o tempo de análise por alterar o EOF, como também por alterar a atividade enzimática e, conseqüentemente, na quantidade de peróxido formado. A influência do pH foi estudado utilizando tampões fosfato (pH 7,0 – 8,5) e pirofosfato (pH 9,0 – 9,5) através de injeções de 15 segundos de glicose ( $1,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Como controle desse experimento, também injetamos  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $900 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) sob as mesmas condições. A **Figura 45** mostra o pico de corrente versus pH, apresentando curvas bem delineadas, com um pH ótimo em torno de 8,5.



**Figura 46** - Efeito do pH na resposta eletroquímica do IMER. Condições de separação:  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de fosfato (pH 7-8,5) ou pirofosfato (pH 9 – 9,5).  $E_{\text{SEP}} = 1100\text{V}$ ,  $E_{\text{DET}} = 0,9\text{V}$ , amostra:  $900 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  ou  $1,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de glicose.

Em ambos os casos, tanto o  $\text{H}_2\text{O}_2$  injetado como o produzido enzimaticamente apresentaram perfis semelhantes. Considerando que o pH ótimo reportado para esta enzima é de 6,5 [119], isto sugere que a resposta eletroquímica (e não a reação enzimática) é o fator determinante na resposta desse biossensor. A partir deste experimento, selecionamos o tampão fosfato  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 8,5 como o mais adequado para estes experimentos, e este foi utilizado em todos os outros que se seguiram.

Como previamente reportado, o EOF pode afetar tanto o contato entre substrato-enzima como a difusão da amostra [120-121]. Uma forma de controlar o EOF o ajustar o potencial de separação aplicado. Para investigar a influência do potencial de separação ( $E_{SEP}$ ) na eficiência de reação, injeções consecutivas de  $2,3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de glicose foram realizadas sob potenciais variando de 900 a 1300 V.



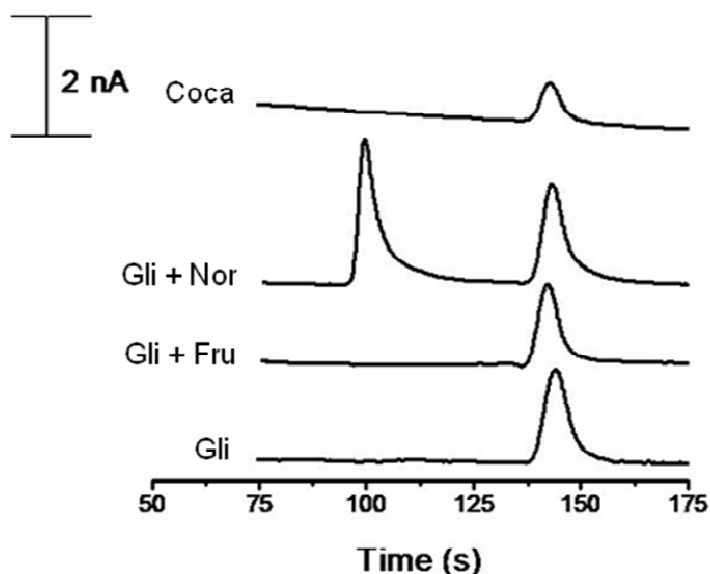
**Figura 47-** Efeito do potencial aplicado na resposta do IMER. Condições de separação:  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de tampão fosfato (pH 8,5), injeção de  $2,3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de glicose,  $T_{INJ} = 10 \text{ s}$ ,  $E_{DET} = 0,9\text{V}$

A **Figura 46** mostra que a melhor resposta é obtida a 1100 V. Em baixos potenciais, existe um favorecimento da difusão devido ao grande tempo da amostra no canal de separação. Por outro lado, em potenciais superiores a 1100V o tempo de contato da glicose com o IMER se torna curto, não permitindo uma eficiente reação enzimática. Assim, esse valor de potencial de separação foi adotado para os outros procedimentos de otimização do chip.

A relação entre a concentração de glicose e o pico de corrente também foi estudada, e foi verificada uma relação linear entre  $0,1$  a  $6,2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Para comprovar o correto funcionamento do chip, foram feitos experimentos de injeções de misturas de glicose, frutose e noradrenalina. A **Figura 47** apresenta um único pico correspondente à glicose injetada ( $980 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) a  $144 \pm 2 \text{ s}$ .



Como esperado, o pico correspondente à glicose não foi afetado pela adição de  $800 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de frutose, indicando novamente que o sinal é gerado pelo peróxido produzido. Além disso, também podemos ver que noradrenalina, que é eletroativa nessas condições, também se apresenta como um pico em  $99 \pm 2\text{s}$ , não interferindo na detecção de glicose que é detectada em  $143 \pm 2\text{s}$ .



**Figura 48-** Eletroferogramas obtidos com glicose (Gli), uma mistura de glicose e frutose (Gli+Fru), glicose e noradrenalina (Gli+Nor) e Coca-Cola (1:200). Condições de separação:  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de tampão fosfato (pH 8,5),  $T_{\text{INJ}} = 10\text{s}$ ,  $E_{\text{DET}} = 0,9\text{V}$  e  $1100\text{V}$ .

Com o objetivo de demonstrar a análise de amostras reais realizamos a determinação de glicose em Coca-Cola (1:200). Pôde-se observar um único pico de  $0,7 \text{ nA}$  a  $143 \text{ s}$  atribuído a glicose. Baseado na curva de calibração e na diluição realizada, chegou-se a um valor de  $216 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , que é valor semelhante apresentado em outros trabalhos para este refrigerante [122-123]. Interessantemente e como esperado, ao injetamos Diet Coke não foi verificado nenhum pico.

#### **4.6 – Conclusões**

O design do chip apresentado além de inovador tem uma característica interessante de reunir a sensibilidade da detecção amperométrica com a eficiência da separação em CE. Além de as partículas utilizadas para a formação desse IMER poderem ligar uma grande quantidade de enzimas, estas ainda permitem a ligação de enzimas distintas da glicose oxidase. Desta forma, outras enzimas podem ser ligadas a essas micropartículas para a detecção de outras moléculas.

## 5 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os dois sistemas para eletroforese capilar se mostraram bastante interessante para as aplicações pretendidas e representam uma evolução significativa para o quadro de instrumentos criados especificamente para uso com C<sup>4</sup>D. O equipamento H1 permitiu pela primeira vez a utilização de um sistema de eletrólise separada de modo permanente, porque até então ele era improvisado com seringas e adaptações a sistemas estabelecidos. Já o equipamento B1, além de recurso semelhante, permite que um variado número de condições eletroforéticas seja realizado simultaneamente.

Obviamente, os instrumentos também apresentam limitações e detalhes operacionais que merecem aprimoramento. O sistema de eletrólise separada – tanto na versão monocanal, quanto na multicanal – demanda um elevado número de conexões de gases e líquidos. Considerando que a fadiga dos materiais de selagem é um processo natural, em algum momento, falhas de pressurização ou vazamento de líquidos podem acontecer. Para se ter uma idéia, no equipamento H1, há aproximadamente 10 conexões de gases e 2 da ponte salina destinadas à implementação da eletrólise separada. No equipamento B1, computa-se 28 conexões para gases e 32 para líquidos. Assim, como vazamento é também uma questão estatística, a probabilidade de falhas é em muito intensificada.

Como já salientado, os sistemas também têm sido aplicados a testes de novas idéias e aprimoramento de subsistemas, como o de detecção. Assim, fica justificado o esforço coletivo demandado para a construção de todos os sistemas descritos.

Em contraposição ao porte do equipamento B1, temos o trabalho em microchip que mostra uma outra vertente para a eletroforese capilar. É claro que o equipamento como um todo não é tão

pequeno quanto pode sugerir o microchip, mas as perspectivas quanto ao que pode ser implementado dentro da coluna de separação é o aspecto mais interessante.

Tanto a detecção condutométrica, quanto a amperométrica se mostraram apropriadas à análise de biomoléculas, possuindo particularidades: o ponto forte da detecção condutométrica foi a dispensa de processos de derivação, enquanto que a detecção amperométrica apresentou melhor linha base e seletividade auferida pelo IMER.

A análise de proteínas e, em alguma extensão, de aminoácidos apresenta problemas devidos à adsorção na parede interna do capilar. No entanto, como demonstrado, a utilização de polímeros solúveis permitiu a obtenção de bons resultados, mesmo com apenas uma coluna. Embora a separação de todos os AAs tenha sido possível em mais de uma condição eletroforética, há a perspectiva de que, com alguns aprimoramentos, seja possível o uso de uma única coluna.

A separação de aminoácidos e os avanços na separação de açúcares mostram que a eletroforese capilar com detecção eletroquímica – e em particular, C<sup>4</sup>D – é uma técnica que deve continuar a se firmar no panorama da Química Analítica atual.

## 6 - BIBLIOGRAFIA

- [1] Collins, F. S.; Lander, E. S.; Rogers, J.; Waterston, R. H., *et al.* Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **2004**, *431*, p.931-945.
- [2] Plaut, O.; Staub, C. Capillary Electrophoresis in Forensic Toxicology. *Chimia* **2002**, *56*, 3, p.96-100.
- [3] Frost, M.; Kohler, H.; Blaschke, G. Determination of LSD in blood by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* **1997**, *693*, 2, p.313-319.
- [4] Fillet, M.; Bechet, I.; Piette, V.; Crommen, J. Separation of nonsteroidal anti-inflammatory drugs by capillary electrophoresis using nonaqueous electrolytes. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 9, p.1907-1915.
- [5] Li, J.; Fritz, J. S. Nonaqueous media for separation of nonionic organic compounds by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 1, p.84-91.
- [6] Issaq, H. J.; Chan, K. C.; Muschik, G. M. The effect of column length, applied voltage, gel type, and concentration on the capillary electrophoresis separation of DNA fragments and polymerase chain reaction products. *Electrophoresis* **1997**, *18*, 7, p.1153-1158.
- [7] Holland, L. A.; Chetwyn, N. P.; Perkins, M. D.; Lunte, S. M. Capillary Electrophoresis in Pharmaceutical Analysis *Pharmaceutical Research* **1997**, *14*, p.372-387.
- [8] Thibon, V. R. A.; Bartle, K. D.; Abbott, D. J.; McCormack, K. A. Analysis of zinc dialkyl dithiophosphates by nonaqueous capillary electrophoresis and application to lubricants. *Journal of Microcolumn Separations* **1999**, *11*, p.71-80.
- [9] Wang, H.; Lu, M.; Le, C. DNA-Driven Focusing for Protein-DNA Binding Assays Using Capillary Electrophoresis *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, 15, p.4985-4990.

- [10] Fraga, M. F.; Ballestar, E.; Esteller, M. Capillary electrophoresis-based method to quantitate DNA-protein interactions. *Journal of Chromatography B* **2003**, 789, p.431-435
- [11] Tavares, M. F. M. Eletroforese Capilar: Conceitos básicos. *Quimica Nova* **1996**, 19, (2), p.173-181.
- [12] Tavares, M. F. M.; Colombara, R.; Massaro, S. Modified electroosmotic flow by cationic surfactant additives in capillary electrophoresis: an evaluation of electrolyte systems for anion analysis. *Journal of Chromatography A* **1997**, 772, p.171-178.
- [13] Backer, D. R. *Capillary Electrophoresis* **1995**, New York, John Wiley, 244p.
- [14] de Jesus, D. P.; Brito-Neto, J.G.A.; Richter, E.M.; Angnes, L.; Gutz, I. G. R.; do Lago, C. L. Extending the Lifetime of the Running Electrolyte in Capillary Electrophoresis by Using Additional Compartments for External Electrolysis. *Analytical Chemistry* **2005**, 77, p.607- 614
- [15] Landers, J. P., *Handbook of Capillary Electrophoresis* **1996**, Second Edition, New York, 894 p.
- [16] da Silva, J. A. F.; do Lago, C. L. Conductivity detection of aliphatic alcohols in micellar electrokinetic chromatography using an oscillometric detector. *Electrophoresis* **2000**, 21, 7, p.1405-1408.
- [17] Brito-Neto, J.G.A.; da Silva, J.A.F.; Blanes, L.; do Lago, C. L. Understanding capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary and microchip electrophoresis. Part 1. Fundamentals. *Electroanalysis* **2005**, 17, p.1198-1206.
- [18] Brito-Neto, J.G.A.; da Silva, J.A.F.; Blanes, L.; do Lago, C. L. Understanding capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary and microchip electrophoresis. Part 2. Peak shape, stray capacitance, noise, and actual electronics. *Electroanalysis* **2005**, 17, p.1207-1214.
- [19] da Silva, J. A. F., do Lago, C. L. An oscillometric detector for capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry* **1998**, 70, p.4339-4343
- [20] Carvalho, A.Z.; Fracassi da Silva, J.; do Lago, C. L. Determination of mono- and disaccharides by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Electrophoresis* **2003**, 24, p.2138-2143.

- [21] Genta, F. A.; Blanes, L.; Cristofolletti, P. T.; do Lago, C. L.; Terra, W. R.; Ferreira, C. Purification, characterization and molecular cloning of the major chitinase from *Tenebrio molitor* larval midgut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **2006**, 36, p.789-800.
- [22] Blanes, L. ; Saito, R. M.; Genta, F. A.; Donegá, J.; Terra, W. R.; Ferreira, C; do Lago, C. L. Direct detection of underivatized chitooligosaccharides produced through chitinase action using capillary zone electrophoresis. *Analytical Biochemistry* **2008**, 373, p.99-103
- [23] Tuma, P.; Samcová, E.; Andelová, K. Determination of free amino acids and related compounds in amniotic fluid by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Journal of Chromatography B*, **2006**, 839, p.12-18
- [24] Baltussen, E.; Guijt, R. M.; der Steen, G. V.; Laugere, F.; Baltussen, S.; van Dedem, G. W. K. Considerations on contactless conductivity detection in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **2002**, 23, 17, p.2888–2893
- [25] Zemann, A. J.; Schnell, E.; Volgger, D.; Bonn, G. K. Contactless conductivity detection for capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry* **1998**, 70, 3, p.563-567.
- [26] Saito, R. M. ; Neves, C. A. ; Lopes, F. S. ; Brito-Neto, J.G. A. ; Blanes, L. ; do Lago, C. L. Monitoring the Electroosmotic Flow in Capillary Electrophoresis Using Contactless Conductivity Detection and Thermal Marks. *Analytical Chemistry* **2007**, 79, 1, p.215-223
- [27] Mandou, M. J. *Fundamentals of Microfabrication: The Science of Miniaturization* **2002**, 2 ed. Boca Raton, CRCpress, 589 p.
- [28] Manz, A.; Graber, N.; Widmer, H.M. Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing *Sensors and Actuators B* **1990**, v.1, 1-6, p.244-248
- [29] Li, P.H.; Wang, W.J.; Parameswaran, M. An acoustic wave sensor incorporated with a microfluidic chip for analyzing muscle cell contraction, *Analyst* **2003**, v.128, p. 225-231
- [30] Christodoulides, N.; Tran, M.; Floriano, P.N.; Rodriguez, M.; Goodey, A.; Ali, M.; Neikirk, D.; Mc Devitt, J.T. A microchip-based multianalyte assay system for the assessment of cardiac risk. *Analytical Chemistry* **2002**, 74, p.3030-3036

- [31] Jiang, X.Y.; Ng, J.M.K.; Stroock, A.D.; Dertinger, S.K.W.; Whitesides, G.M. A miniaturized, parallel, serially diluted immunoassay for analyzing multiple antigens. *J. Am. Chem. Soc* **2003**, v.125, p.5294-5295
- [32] Sato, K.; Yamanaka, M.; Takahashi, H.; Tokeshi, M.; Kimura, H.; Kitamori, T. Microchip-based immunoassay system with branching multichannels for simultaneous determination of interferon- $\gamma$ . *Electrophoresis* **2002**, v.23, p. 734-739
- [33] Jin, L.J.; Ferrance, J.; Sanders, J.C.; Landers, J.P. A microchip-based proteolytic digestion system driven by electroosmotic pumping. *Lab Chip* **2003**, v.3, p.11-18
- [34] Slentz, B.E.; Penner, N.A.; Regnier, F.E. Sampling BIAS at channel junctions in gated flow injection on chips. *Analytical Chemistry* **2002**, v. 74, p.4835-4840
- [35] Sanders, J.C.; Breadmores, M.C.; Kwok, Y.C.; Horsman, K.M.; Landers, J.P. Hydroxypropyl cellulose as an adsorptive coating sieving matrix for DNA separations: Artificial neural network optimization for microchip analysis. *Analytical Chemistry* **2003**, v.75, p. 986-994
- [36] Tian, H.J.; Landers, J.P. Hydroxyethylcellulose as an effective polymer network for DNA analysis in uncoated glass microchips: optimization and application to mutation detection via heteroduplex analysis. *Analytical Biochemistry* **2002**, v.309, p.212-223
- [37] Sun, K.; Yamaguchi, A.; Ishida, Y.; Matsuo, S.; Misawa, H. A Heater-integrated transparent microchannel chip for continuous-flow PCR. *Sens. Actuators, B*, **2002**, v.84, p.283-289
- [38] Liu, S. A microfabricated hybrid device for DNA sequencing. *Electrophoresis* **2003**, v.24, p.3755-3761
- [39] Shi, Y.N.; Anderson, R.C. High-resolution single-stranded DNA analysis on 4.5 cm plastic electrophoretic microchannels. *Electrophoresis* **2003**, v.24, p.3371-3377
- [40] Blazej, R.G.; Paegel, B.M.; Mathies, R.A. Polymorphism ratio sequencing: A new approach for single nucleotide polymorphism discovery and genotyping. *Genome Research* **2003**, v.13, p.287-293
- [41] Blanes, L.; Mora, M. F.; do Lago, C. L.; Ayon, A.; Garcia, C. D. Development of Lab-on-a-Chip Biosensor for Glucose Based on a Packed Immobilized Enzyme Reactor. *Electroanalysis* **2007**, v.19, 23, p.2451-2456



- [42] Ohira, S. I.; Toda, K.; Ikebe, S. I.; Dasgupta, P. K. Hybrid microfabricated device for field measurement of atmospheric sulfur dioxide. *Analytical Chemistry* **2002**, v.74, p.5890-5896
- [43] Bromberg, A.; Mathies, R.A. Homogeneous immunoassay for detection of TNT and its analogues on a microfabricated capillary electrophoresis chip. *Analytical Chemistry* **2003**, v.75, p.1188-1195
- [44] Wooley, A.T.; Lao, K.; Glazer, A.N.; Mathies, R.A. Capillary electrophoresis chips with integrated electrochemical detection. *Analytical Chemistry* **1998**, v.70, p.684-688
- [45] Reyes, D.R.; Iossifidis, D.; Auroux, P.; Manz, A. A Micro Total Analysis Systems. 1. Introduction, theory and technology. *Analytical Chemistry* **2002**, v.74, p.2623-2636
- [46] Manz, A.; Graber, N.; Widmer, H.M. Miniaturized total chemical-analysis systems - a novel concept for chemical sensing. *Sens. Actuators B* **1990**, v.1, p.244-248
- [47] McDonald, J.C.; Whitesides, G.M. Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices. *Acc. Chem. Res* **2002**, v.35, p.491- 499
- [48] Duffy, D.C.; McDonald, J.C.; Schueller, O.J.A.; Whitesides, G.M. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Analytical Chemistry* **1998**, v.70, p.4974-4984
- [49] Sia, S.; Whitesides, G.M. Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies. *Electrophoresis* **2003**, v.24, p.3563-3576
- [50] do Lago, C.L.; Silva, H.D.T.; Neves, C.A.; Brito-Neto, J.G.A.; Silva, J.A.F. A dry process for production devices based on the lamination of laser-printed polyester films. *Analytical Chemistry* **2003**, v.75, p. 3853-3858
- [51] Gas, B.; Coufal, P.; Jaros, M.; Muzikár, J.; Jelínek, L. Optimization of background electrolytes for capillary electrophoresis: I. Mathematical and computational model *J. Chromatogr. A* **2001**, 905, p.269-279
- [52] Thorsteinsdóttir, M.; Beijersten, I.; Westerlund, D. Capillary electroseparations of enkephalin-related peptides and protein kinase A peptide substrates *Electrophoresis* **1995**, 16, 1, p.564-573
- [53] Gordon, M. J.; Lee, K. J.; Arias, A. A.; Zare, R. N. Protocol for resolving protein mixtures in capillary zone electrophoresis. *Analytical Chemistry* **1991**, 63, p.69-72

- [54] Riguetti, P. G. Determination of the isoelectric point of proteins by capillary isoelectric focusing *Journal of chromatography A* **2004**, 1037, p.491-499
- [55] Hu, S.; Jiang, J.; Cook, L.M.; Richards, D. P.; Horlick, L.; Wong, B.; Dovichi, N. Capillary sodium dodecyl sulfate-DALT electrophoresis with laser-induced fluorescence detection for size based analysis of proteins in human colon cancer cells. *Electrophoresis* **2002**, 23, 18, p.3136-3142.
- [56] Kasicka, V. Recent advances in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography of peptides. *Electrophoresis*, **2003**, 24, p.4013-4006
- [57] Rundlett, K. L.; Armstrong, D. W. Methods for the determination of binding constants by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **2001**, 22, 7, p.1419-1427
- [58] Hu, S.; Zhang, Z.; Cook, L.M.; Richards, Carpenter, E. J.; Dovichi, N. J. Separation of proteins by sodium dodecylsulfate capillary electrophoresis in hydroxypropylcellulose sieving matrix with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, **2000**, 894, 13, p.291-296.
- [59] Book- Herb Schwartz and Tom Pritchett- Separation of Proteins and Peptides by Capillary Electrophoresis: Application to Analytical Biotechnology: Beckman Instruments, Inc.Fullerton, CA
- [60] Abad-Villar, E. M.; Kubáň, P.; Hauser, P. C. Evaluation of the detection of biomolecules in capillary electrophoresis by contactless conductivity measurement. *J. Sep. Sci.* **2006**, 29, 1031-1037
- [61] Abad-Villar, E. M.; Kubáň, P.; Hauser, P. C. Determination of biochemical species on electrophoresis chips with an external contactless conductivity detector. *Electrophoresis* **2005**, 26, p.3609-3614
- [62] Gilges, M.; Kleemiss, M. H.; Schomburg, G. Capillary Zone Electrophoresis Separations of Basic and Acidic Proteins Using Poly(vinyl alcohol) Coatings in Fused Silica Capillaries. *Analytical Chemistry* **1994**, 66, 13, p.2038-2046
- [63] Roberts, G.A.F. : Book - Chitin chemistry **1992**, Macmillan, Basingstoke

- [64] Merzendorfer, H.; Zimoch, L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *Journal of Experimental Biology* **2003**, 206 p.4393-4412.
- [65] Kramer, K.J.; Koga, D. Insect Chitin - Physical State, Synthesis, Degradation and Metabolic-Regulation. *Insect Biochemistry* **1986**, 16, p.851-877.
- [66] Kramer, K. J.; Muthukrishnan, S. Insect chitinases: Molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **1997**, 27, p.887-900.
- [67] Krokeide, I. M.; Synstad, B.; Gaseidnes, S. J.; Eijsink, V.G.H.; Sorlie, M. Natural substrate assay for chitinases using high-performance liquid chromatography: A comparison with existing assays. *Analytical Biochemistry* **2007**, 363, p.128-134.
- [68] Rassi, Z. E. Recent developments in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography of carbohydrate species. *Electrophoresis* **1999**, 20, p.3134-3144.
- [69] Lee, K.B.; Kim, Y. S.; Linhardt, R. J. Capillary Zone Electrophoresis for the Quantitation of Oligosaccharides Formed through the Action of Chitinase. *Electrophoresis* **1991**, 12, p.636-640.
- [70] Lockyear, L. L.; Cavender, A.E.; Dossey, B.S.; Ampe, J.H.; LeCrone, D.N. Practical considerations for the use of aqueous/acetonitrile buffer systems in capillary separations. *Journal of Separation Science* **2002**, 25, 773-777.
- [71] Segel, I. H. *Enzyme kinetics : behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems* **1975**, Wiley, New York.
- [72] Horn, S. J.; Sorbotten, A.; Synstad, B.; Sikorski, P.; Sorlie, M.; Varum, K. M.; Eijsink, V.G.H. Endo/exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by *Serratia marcescens*. *Febs Journal* **2006**, 273, p.491-503.
- [73] Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D. Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass Capillaries. *Analytical Chemistry* **1981**, v 53, 8, p.1298-130
- [74] Senk, P.; Kozák, L.; Foret, F. Capillary electrophoresis and mass spectrometry for screening of metabolic disorders in newborns. *Electrophoresis* **2004**, 25, 10-11, p.1447-1456
- [75] Coufal, P.; Zuska, J.; van der Goor, T.; Smith, V.; Gas, B. Separation of twenty underivatized essential amino acids by capillary zone electrophoresis with contactless conductivity detection. *Electrophoresis* **2003**, 24, 4, p.671-677

- [76] Tanyanyiwa, J.; Schwizer, K.; Hauser, P. C. High-voltage contactless conductivity detection of underivatized amino acids in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **2003**, 24, 12-13, p.2119-2124
- [77] Tanyanyiwa, J.; Abad-Villar, E. M.; Hauser, P. C. Contactless conductivity detection of selected organic ions in on-chip electrophoresis. *Electrophoresis* **2004**, 25, 6, 903-908
- [78] Girelli, A. M.; Mattei, E.; Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review. *Journal of Chromatography B* **2005**, 819, 1, p.3-16
- [79] Guzman, N. A. Improved solid-phase microextraction device for use in on-line immunoaffinity capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **2003**, 24, 21, p.3718-3727.
- [80] Korecka, L.; Bilkova, Z.; Holeapek, M.; Kralovsky, J.; Benes, M. et al. Utilization of newly developed immobilized enzyme reactors for preparation and study of immunoglobulin G fragments. *Journal of Chromatography B* **2004**, 808, 1, p.15-24.
- [81] Melander, C.; Momcilovic, D.; Nilsson, C.; et al. Microchip immobilized enzyme reactors for hydrolysis of methyl cellulose. *Analytical Chemistry* **2005**, 77, 10, p.3284-3291
- [82] Melander, C.; Bengtsson, M.; Schagerlof, H.; et al. Investigation of micro-immobilised enzyme reactors containing endoglucanases for efficient hydrolysis of cellodextrins and cellulose derivatives. *Analytica Chimica Acta* **2005**, 550, (1-2) p.182-190.
- [83] Markoglou, N; Hsuesh, R; Wainer, I. W. Immobilized enzyme reactors based upon the flavoenzymes monoamine oxidase A and B. *Journal of Chromatography B* **2004**, 804, 2, p.295-302.
- [84] Gao, X. F.; Li, Y.S.; Karube, I. Flow injection spectrophotometric determination of sulfated bile acids in urine with immobilized enzyme reactors using water soluble tetrazolium blue-5 *Analytical Chimica Acta* **2001**, 443, 2, p.257-264.
- [85] Tomer, S.; Dorsey, J. G.; Berthod, A. Nonionic micellar liquid chromatography coupled to immobilized enzyme reactors. *Journal of Chromatography A* **2001**, 923, (1-2), p.7-16.

- [86] Simonet, B. M.; Rios, A.; Valcarcel, M. Analytical potential of enzyme-coated capillary reactors in capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* **2004**, 25, 1, p.50-56
- [87]. Mao, H. B.; Yang, T. L.; Cremer, P. S. Design and characterization of immobilized enzymes in microfluidic systems. *Analytical Chemistry* **2002**, 74, 2, p.379-385.
- [88] Collier, A.; Wang, J.; Diamond, D.; et al. Microchip micellar electrokinetic chromatography coupled with electrochemical detection for analysis of synthetic oestrogen mimicking compounds. *Analytica Chimica Acta* **2005**, 550, (1-2), p.107-115.
- [89] Osborne, P. G.; Yamamoto, K.; Disposable enzymatically modified printed film carbon electrodes for use in the high-performance liquid chromatographic-electrochemical detection of glucose or hydrogen peroxide from immobilized enzyme reactors. *Journal of Chromatography B* **1998**, 707, (1-2), p.3-8
- [90] Ernst, H.; Ross, B.; Knoll, M. Reliable glucose monitoring through the use of microsystem technology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2002**, 373, 8, 758-761.
- [91] Vojinovic, V.; Esteves, F. M. F.; Cabral, J. M. S.; et al. Bionzymatic analytical microreactors for glucose, lactate, ethanol, galactose and l-amino acid monitoring in cell culture media. *Analytica Chimica Acta* **2006**, 565, 2, p.240-249
- [92] Suzuki, S.; Honda, S. Miniaturization in carbohydrate analysis *Electrophoresis* **2003**, 24, 21, 3577-3582
- [93] Mersal, G. A. M.; Bilitewski, U. Development of monolithic enzymatic reactors in glass microchips for the quantitative determination of enzyme substrates using the example of glucose determination via immobilized glucose oxidase. *Electrophoresis* **2005**, 26, 12, p.2303-2312
- [94] Wang, J.; Chatrathi, M. P.; Tian, B. M. Microseparation chips for performing multienzymatic dehydrogenase/oxidase assays: Simultaneous electrochemical measurement of ethanol and glucose. *Analytical Chemistry* **2001**, 73, 6, p.1296-1300

- [95] Lv, Y.; Zhang, Z. J.; Chen, F. A. Chemiluminescence microfluidic system sensor on a chip for determination of glucose in human serum with immobilized reagents. *Talanta* **2003**, 59, 3, p.571-576
- [96] Miyazaki, M.; Maeda, H. Microchannel enzyme reactors and their applications for processing. *Trends in Biotechnology* **2006**, 24, 10, p.463-470
- [97] Seong, G. H.; Heo, J.; Crooks, R. M. Measurement of enzyme kinetics using a continuous-flow microfluidic system. *Analytical Chemistry* **2003**, 75, 13, p.3161-3167
- [98] Banu, S.; Greenway, G. M.; McCreedy, T.; et al. Microfabricated bioreactor chips for immobilised enzyme assays. *Analytica Chimica Acta* **2003**, 486, 2, p.149-157
- [99] Mayer, M.; Rapp, E.; Marck, C.; et al. Fritless capillary electrochromatography *Electrophoresis* **1999**, 20, 1, p.43-49
- [100] Ceriotti, L.; de Rooij, N. F.; Verpoorte, E. An integrated fritless column for on-chip capillary electrochromatography with conventional stationary phases. *Analytical Chemistry* **2002**, 74, 3, p.639-647
- [101] Garcia, C. D.; Hadley, D. J.; Wilson, W. W.; et al. Measuring protein interactions by microchip self-interaction chromatography. *Biotechnology Progress* **2003**, 19, 3, p.1006-1010
- [102] Zhang, Q.; Xu, J. J.; Chen, H. Y. Glucose microfluidic biosensors based on immobilizing glucose oxidase in poly(dimethylsiloxane) electrophoretic microchips. *Journal of Chromatography A* **2006**, 1135, 1, p.122-126
- [103] Sakai-Kato, K.; Kato, M.; Toyo'oka, T. Creation of an on-chip enzyme reactor by encapsulating trypsin in sol-gel on a plastic microchip. *Analytical Chemistry* **2003**, 75, 3, p.388-393

- [104] Huang, Y.; Shan, W.; Liu, B.; et al. Zeolite nanoparticle modified microchip reactor for efficient protein digestion. *Lab on a Chip* **2006**, 6, 534-539
- [105] Garcia, C. D.; Liu, Y.; Anderson, P.; Henry, C. S. Versatile 3-Channel High Voltage Power Supply for Microchip Electrophoresis. *Lab on a Chip* **2003**, 3, 331-335
- [106] Ding, Y.; Ayon, A.; Garcia, C. D.; Electrochemical detection of phenolic compounds using cylindrical carbon-ink electrodes and microchip capillary electrophoresis. *Analytical Chimica Acta* **2007**, 584, 2, 244-251.
- [107] Ding, Y. S.; Garcia, C. D. Application of microchip-CE electrophoresis to follow the degradation of phenolic acids by aquatic plants. *Electrophoresis* **2006**, 27, 24, p.5119-5127
- [108] Ding, Y.; Garcia, C. D. Analysis of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs by Capillary Electrophoresis Microchips. *Electroanalysis* **2006**, 18, 2202-2209
- [109] Ding, Y. S.; Mora, M. F.; Garcia, C. D. Analysis of alkyl gallates and nordihydroguaiaretic acid using plastic capillary electrophoresis – microchips. *Analytica Chimica Acta* **2006**, 561, (1-2), p.126-132
- [110] Garcia, C. D.; Dressen, B. M.; Henderson, A.; et al. Comparison of surfactants for dynamic surface modification of poly(dimethylsiloxane) microchips. *Electrophoresis* **2005**, 26, 3, p.703-709
- [111] Garcia, C. D.; Henry, C. S. Direct determination of carbohydrates, amino acids, and antibiotics by microchip electrophoresis with pulsed amperometric detection. *Analytical Chemistry* **2003**, 75, 18, p.4778-4783
- [112] Garcia, C. D.; Henry, C. S. Enhanced determination of glucose by microchip electrophoresis with pulsed amperometric detection *Analytica Chimica Acta* **2004**, 508, 1, p.1-9
- [113] Garcia, C. D.; Henry, C. S. Comparison of pulsed electrochemical detection modes coupled with microchip capillary electrophoresis. *Electroanalysis* **2005**, 17, 3, p.223-230

- [114] Ding, Y. S.; Garcia, C. D. Pulsed amperometric detection with poly(dimethylsiloxane)-fabricated capillary electrophoresis microchips for the determination of EPA priority pollutants. *Analyst* **2006**, 131, 2, p.208-214
- [115] Garcia, C. D.; Henry, C. S.: Book- Microchip Capillary Electrophoresis: Methods and Protocols **2006** (Ed: Henry, C. S.), Humana Press, Totowa, NJ, pp. 27.
- [116] Wang, J.; Chatrathi, M. P.; Collins, G. E. Simultaneous microchip enzymatic measurements of blood lactate and glucose. *Analytica Chimica Acta* **2007**, 585, 1, p.11-16
- [117] Morrin, A.; Guzman, A.; Killard, A. J.; et al. Characterisation of horseradish peroxidase immobilisation on an electrochemical biosensor by colorimetric and amperometric techniques *Biosensors & Bioelectronics* **2003**, 18, (5-6) p.715-720
- [118] Gerlache, M; Senturk, Z; Quarin, G; et al. Electrochemical behavior of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on gold *Electroanalysis* **1997**, 9, 14, p.1088-1092
- [119] Lopez, M. S. P.; Mecerreyes, D.; Lopez-Cabarcos, E.; et al. Amperometric glucose biosensor based on polymerized ionic liquid microparticles. *Biosensors & Bioelectronics* **2006**, 21, 12, p.2320-2328
- [120] Girelli, A. M.; Mattei, E.; Messina, A. Phenols removal by immobilized tyrosinase reactor in on-line high performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* **2006**, 580, 2, p.271-277
- [121] Girelli, A. M.; Mattei, E.; Messina, A. Immobilized tyrosinase reactor for on-line HPLC application: Development and characterization *Sensors and Actuators B* **2007**, 121, 2, p.515-521
- [122] Surareungchai, W.; Worasing, S.; Sritongkum, P.; et al. Dual electrode signal-subtracted biosensor for simultaneous flow injection determination of sucrose and glucose. *Analytica Chimica Acta* **1999**, 380, 1, p.7-15



[123] Chu, Q. C.; Fu, L.; Guan, Y. Q.; et al. Fast determination of sugars in Coke and Diet Coke by miniaturized capillary electrophoresis with amperometric detection. *Journal of Separation Science* **2005**, 28, 3, p. 234-238

[124] Fracassi da Silva, J. A.; Detecção condutométrica sem contato (oscilométrica) para eletroforese capilar de zona e cromatografia micelar eletrocinética - Tese de doutoramento pelo Instituto de Química da Universidade de São Paulo, março/2001.

## 7 – CURRICULUM VITAE

Lucas Blanes, 30 anos

E-mail: mimlucas@hotmail.com

1997 a 2001          Bacharelado em Biologia, Universidade de São Paulo, Brasil

1999 a 2004          Bacharelado em Educação, Universidade de São Paulo, Brasil

2002 a 2004          Mestrado em Ciências – Bioquímica sob orientação da Profa. Dra. Clélia Ferreira no Laboratório de Bioquímica de Insetos - Departamento de Bioquímica - Instituto de Química - USP - Bolsista FAPESP. Título da Dissertação: “B-glicosidases e B-Tioglicosidases de Insetos”

2004          Ingresso no curso de Doutorado em Química na área de Química Analítica sob orientação do Prof. Dr. Claudimir Lucio do Lago no Laboratório de Automação e Instrumentação Analítica – Departamento de Química Fundamental - USP. Bolsista FAPESP

### **Estágios**

1997-1999- Estagiário do projeto de Educação Ambiental da Biologia USP - Comissão de Visitas

1998-2000- Plantonista de Dúvidas e professor de reforço de Biologia e Química no Cursinho da Poli-USP

1999 - 2001- Estágio no Laboratório de Bioquímica de Insetos- IQ-USP

Novembro a Fevereiro de 2008 - Doutorado sanduíche na Universidade do Texas em San Antônio (EUA), sob orientação do Dr. Carlos D. Garcia

### **Monitorias realizadas no IQ-USP**

Primeiro semestre de 2005 - Bioquímica - Química Ambiental -Noturno

Primeiro semestre de 2006 - Química Analítica Instrumental – Farmácia - Diurno/Noturno

Primeiro e segundo semestres de 2007 - Química Analítica Qualitativa e Quantitativa - Farmácia - Diurno/Noturno

### Publicações:

BLANES, L. ; SAITO, R. M. ; GENTA, F ; DONEGÁ, J. ; TERRA, W. R. ; FERREIRA, C ; do LAGO, C. L. . Direct detection of underivatized chitooligosaccharides produced through chitinase action using Capillary Zone Electrophoresis. Analytical Biochemistry, **Analytical Biochemistry** 373 (2008) 99–103

BLANES, L. ; MORA, M. F. ; do LAGO, C. L. ; AYON, A. ; GARCIA, C. D. Lab-on-a-Chip Biosensor for Glucose Based on a Packed Immobilized Enzyme Reactor. **Electroanalysis**, vol 19 issue 23, (2007) 2451-2456

SAITO, R. M. ; NEVES, C. A. ; LOPES, F. S. ; Brito-Neto, J.G. A. ; BLANES, L. ; do LAGO, C. L. . Monitoring the Electroosmotic Flow in Capillary Electrophoresis Using Contactless Conductivity Detection and Thermal Marks. **Analytical Chemistry**, v. 79 (1) (2007) p. 215-223,

BLANES, L.; de Jesus, D. P. ; LAGO do, C. L. . Microchip Free Flow Electrophoresis on Glass Substrate Using Laser-printing Toner as Structural Material. Electrophoresis, V 27 (24), (2006) **Electrophoresis** 4935-4942

GENTA, F. A.; BLANES, L.; CRISTOFOLETTI, P. T.; do LAGO, C. L. ; TERRA, W. R. and FERREIRA, C.; Purification, characterization and molecular cloning of the major chitinase from *Tenebrio molitor* larval midgut - **Insect Biochemistry and Molecular Biology** (2006) V 36 (10), P. 789-800

BRITO-NETO, J. G. A.; SILVA, J. A. F. da ; BLANES, L.; do LAGO, C. L. Understanding Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection in Capillary and Microchip Electrophoresis. Part 1. Fundamentals. **Electroanalysis** v. 17, n. 13, p. 1198-1206, 2005.

BRITO-NETO, J. G. A.; da SILVA, J. A. F. ; BLANES, L.; do LAGO, C. L.. 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.

### Congressos:

BLANES, L.; LOPES, F. S.; FRANCISCO, K. J. M. ; VIDAL, D. T. R.; SANTOS, T. G. S. and do LAGO, C. L. Development of a Multi-Capillary Electrophoresis Equipment with Contactless Conductivity Detection and a Module for Separated Electrolysis. Braziliam meeting of Analytical Chemistry, João Pessoa , PB 2007

NOGUEIRA, T.; BLANES, L. and do LAGO, C. L. Determination of ionic species in bio diesel using capillary electrophoresis, Braziliam meeting of Analytical Chemistry, João Pessoa , PB 2007

BLANES, L.; SAITO, R. M.; NEVES, C. A.; LOPES, F. S.; do LAGO, C. L. Estudo da Dependência da Marca Térmica com o Campo Elétrico em Eletroforese Capilar. Anual meeting of Brazilian Society of Chemistry – Águas de Lindóia. 2006.

BLANES, L. and do LAGO, C. L., Analysis of proteins by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. In: LACE, 2005, Guarujá- SP. 11- LACE (Latin American Capillary Electrophoresis)- 2 - 6 dezembro 2005.

BLANES, L.; do LAGO, C. L.; GENTA, F. No buffer capillary electrophoresis of oligosaccharides produced through chitinase reaction from the beetle *Tenebrio molitor*. Annual meeting of Brazilian Society of Chemistry – Poços de Caldas, 2005 .

BLANES, L.; FERREIRA, C. ; SELIVON, D. . Glycosidases from *Anastrepha fraterculus* and *Anastrepha pickeli* larval midgut.: Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) – Caxambu, MG 2003 -17a 20 de maio, 2003. p. 31

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)