

Electroforesis capilar

Juan Miguel Castagnino ¹

Adaptación de la Conferencia presentada en el Congreso CUBRA IV, 1997,
San Miguel de Tucumán, Argentina.

Reimpresión del artículo publicado en Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana Vol. XXXIII, No. 3, 297-329, 1999.

RESUMEN

En el presente trabajo se detallan los principios físico-químicos básicos que rigen la separación de sustancias en la electroforesis capilar.

Se destaca el aporte que ha significado el desarrollo de los capilares de 20 a 50 μm de diámetro, de los detectores con arreglos de diodos y la operativa computacional para la interpretación gráfica de los datos obtenidos.

Se detallan los principios que rigen la electroforesis libre, zonal, isotacoforesis, isoelectroenfoque y cromatografía micelar con surfactantes y ciclodextrinas, y distintos ejemplos sobre sus aplicaciones.

Palabras clave: electroforesis capilar, electroforesis zonal, isotacoforesis, isoelectroenfoque, micelar, cromatografía electrocinética, surfactantes, ciclodextrinas.

- ▲ Historia.
- ▲ Definición de electroforesis.
- ▲ Electroforesis capilar.
- ▲ Breves nociones teóricas.
- ▲ Corriente electroosmótica.
- ▲ De la electroforesis en papel de filtro a la electroforesis capilar.
- ▲ El aparato para electroforesis capilar (EC).
- ▲ Aplicaciones.
- ▲ Desarrollos tecnológicos que contribuyeron a la EC.
Electroforesis capilar: Ventajas/ Volúmenes empleados/
Instrumentación/ Principios físico-químicos/ Capilares.
- ▲ Siembra de las muestras
Voltajes/ Eficacia de la separación/ Polaridad/ Detección.
- ▲ Reactivo en electroforesis capilar
Selección de buffers.
- ▲ Tabla de buffers.
- ▲ Buffers zw.
- ▲ Buffers zwitteriónicos.
- ▲ Aditivos.

¹ Doctor en Química. Exprofesor Titular de Análisis Biológicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA.

Correspondencia: Dr. Juan Miguel Castagnino, Calle 6 No. 1344, 1900- La Plata. Argentina. E-mail: secgral@fbpba.org.ar

ABSTRACT

In the present work the basic physical-chemical principles that govern the separation of substances in the capillary electrophoresis are detailed.

The contribution of the development of the capillaries of 20 to 50 μm of diameter, of the detectors with diodes-arrays and the operative computational for the graphic interpretation of the obtained data is highlighted.

The principles are detailed that govern the free, zonal electrophoresis, isotachophoresis, isoelectroenfoque and micellar chromatography with surfactants and cyclodextrins, and different examples on their applications are detailed.

Key words: capillary electrophoresis, zonal electrophoresis, isotachophoresis, isoelectroenfoque, micellar electrokinetic chromatography, surfactants, cyclodextrins.

- ▲ Surfactantes.
- ▲ Sectores quirales.
- ▲ Ciclodextrinas
Relaciones de la química supramolecular/ Ciclodextrinas (CD) o (CDs)/ Estructura espacial de las CD/ La conicidad/ La cavidad/ Uniones químicas entre el huésped y las CD.
- ▲ Las principales propiedades de las ciclodextrinas nativas.
- ▲ Tipos de electroforesis capilar.
- ▲ MECC o MECC (Electroforesis micelar electrocinética).
- ▲ Micelas.
- ▲ Clases de surfactantes y propiedades.
- ▲ Separación de especies neutras.
- ▲ Electroforesis capilar en gel (CGE o ECG).
- ▲ Capilares.
- ▲ Aplicaciones.
- ▲ Isoelectroenfoque capilar.
- ▲ Isotacoforesis.
- ▲ Aplicaciones de la isotacoforesis.
- ▲ Aplicaciones de la electroforesis capilar.
Electroforesis capilar en zonas (CZE) ECIF (O CIEF) / Tamizado molecular/ MEEC.
- ▲ Electro cromatografía micelar. Cromatografía micelar electrocinética. MEEC/ Definición/ Resumiendo/ Efectos de aditivos en la fase acuosa/ Principio de separación con la ciclodextrina/ Pares iónicos/ Urea/ Modificadores orgánicos.
- ▲ Referencias bibliográficas.

HISTORIA

El desplazamiento de sustancias bajo la acción de un campo eléctrico fue citado por Reuss en 1809 en las memorias de la Sociedad Imperial Natural (Moscow) (1809)¹.

Allí se describe la experiencia de la fig. 1, donde se observa el comportamiento migratorio de pequeñas partículas de arena en un ámbito de agua transparente contenido en un recipiente de vidrio con un lecho de arena fina en su fondo y dos tubos conteniendo electrodos de una batería.

El pasaje de la corriente produce un enturbiamiento en las proximidades del polo positivo producido por la migración de partículas de arena muy pequeñas que se movilizan por su carga eléctrica negativa.

Este experimento puede ser considerado como el primer aporte bibliográfico que revela la polarización de la sílice, pues la arena es dióxido de silicio y fundida permite obtener los capilares que se emplean en la electroforesis capilar.

Varios años más tarde, en 1816, fue observado el transporte del agua por acción de la corriente galvánica generada por la polarización negativa del capilar que une los dos recipientes electródicos.

La pared del capilar, sabemos hoy, adquiere carga negativa (al pasaje de la corriente eléctrica) produciéndose la polarización del agua, la que por consiguiente tiende a desplazarse hacia el polo negativo. Esta corriente líquida que se desplaza en sentido opuesto a la dirección de la corriente eléctrica, se designa con el nombre de **Fuerza electroendosmótica (FEO)** (fig. 2)

Definición de electroforesis

Ha sido definida como el movimiento o desplazamiento diferencial de especies cargadas (iones), sustancias neutras o migración pasiva, por atracción o repulsión en un campo eléctrico. La electroforesis en solución en medios libres sin elementos soportes (agar, almidón, geles de poliacrilamida), fue desarrollada por Tiselius^{2,3}, el que resolvió mezclas de proteínas en un tubo aplicando un campo eléctrico de corriente continua, no pulsante, estudios que lo hicieron acreedor al Premio Nobel en Química.

Los problemas experimentales que se presentaron, estuvieron vinculados a la difusión térmica y a la convección, lo que determinó el empleo de medios anticonvectantes como agar, agarosa y poliacrilamidas en forma de geles.

Las técnicas que más se han desarrollado están en la actualidad aplicadas al campo de las proteínas y productos de la biología molecular, como son los geles de agarosa y proliacrilamida en placas o films de distinto espesor verticales u horizontales⁴ (fig3).

Electroforesis capilar

El empleo de capilares para la separación de sustancias neutras o iones cargados eléctricamente, apareció en 1967 en una experiencia desarrollada por Hjerten empleando capilares milimétricos, los que eran rotados a través de su sección longitudinal para evitar los efectos de la convección.

Virtanen y Mikkers en 1979 desarrollaron las separaciones empleando electroforesis en capilares de 200 μm de diámetro interno en vidrio y teflón respectivamente.

La separación de cloruro, aspartato y glutamato por isotacoforesis, hecha por Martin en 1942, los trabajos de

Konstantinov, Oshukova en 1963 y los de Evereast en su tesis de graduación en 1964, fueron los precursores en el empleo de capilares y la medición de la absorción UV a través del mismo, permitió obtener los espectros característicos de la separación⁵.

Más adelante, en 1980, Jorgenson y Lukacs empleando técnicas avanzadas en la obtención de capilares de sílica fundida emplean diámetros de 75 μm y Jorgenson clarifica teóricamente las relaciones entre los parámetros operacionales y las cualidades de la separación revelando el elevado potencial analítico de esta técnica.

Esta separación de péptidos realizada sobre un capilar de sílica fundida a potenciales elevados 20 a 30 Kv en un campo de 400 a 500 v/cm refrigerados por aire, fue el lanzamiento de la EC⁶.

Estos capilares de 75 a 100 cm de largo y con diámetros internos de 50-70-100 μm y de 300 a 400 de diámetro externo son los que permiten una capacidad elevada de resolución $N > 200.000$ platos/m.

La corriente electroendosmótica (FEO) generada por los grupos silanol de la superficie interna del capilar da como resultado una corriente plana del frente del líquido que contrasta con el frente parabólico de la cromatografía líquida de alta resolución (fig. 4).

La ventaja de esta técnica es que el capilar de sílica fundida que generalmente se cubre con una capa de polimina para darle mayor rigidez y resistencia, tiene una ventana a través de ella que permite el pasaje de la luz UV de tal manera que la visualización es on-line.

Con esta técnica descrita es posible separar cationes, aniones, proteínas, macromoléculas y sustancias no cargadas en forma simultánea.

Breves nociones teóricas

La separación por electroforesis está basada en la diferencia de velocidad de los solutos en un campo eléctrico. La velocidad de un ion está dada por

$$v = \mu_c E \quad (1)$$

donde:

v : velocidad iónica

μ_c : movilidad electroforética

E : campo eléctrico

Existe una relación entre el voltaje aplicado y la longitud del capilar en volts/cm, la movilidad de un ión es una constante, la que puede ser determinada por el coeficiente friccional a través de un medio elegido.

$$\mu_c \times \frac{\text{fuerza eléctrica } (F_E)}{\text{fuerza friccional } (F_f)} \quad (2)$$

La fuerza eléctrica está representada en la siguiente ecuación:

$$F_E = q E \quad (3)$$

Y para un ión esférico la fuerza friccional está determinada por la ecuación:

$$F_f = - 6 \pi \eta r v \quad (4)$$

donde:

- q: carga iónica
- η : viscosidad de la solución
- r: radio iónico
- v: velocidad del ión

En el estado estacionario, las fuerzas son iguales y opuestas:

$$q E = 6 \pi \eta r v \quad (5)$$

$$q E = 6 \pi \eta r v \mu_c E$$

$$\mu_c = \frac{q E}{6 \pi \eta r E}$$

$$\mu_c = \frac{q}{6 \pi \eta r}$$

Con lo expuesto queda en evidencia que especies altamente cargadas tienen movilidades elevadas.

La movilidad electroforética se le encuentra usualmente en las tablas de constantes físicas.

Corriente electroendosmótica

El componente efector más importante en la EC es la electroendosmosis o corriente electroendosmótica, o fuerza electroendosmótica.

Surge como consecuencia de aplicar un campo eléctrico que genera una doble capa eléctrica entre la solución y la pared del capilar.

En condiciones acuosas, la fase sólida posee un exceso de cargas negativas, como resultado de dos procesos físico-químicos, la ionización de la superficie (que es un equilibrio ácido-base) y por otra parte la adsorción de especies iónicas sobre la superficie del capilar.

Estos procesos ocurren en el capilar al paso de la corriente eléctrica y la FEO se encuentra altamente controlada por los numerosos grupos silanoles (SiOH) que también pueden existir como SiO (fig. 5a).

Los círculos en grisado representan las moléculas de sílica transformadas por hidratación en silanoles en medio acuoso cuando pasa la corriente eléctrica (fig. 5b).

Los contraiones (cationes en la mayoría de los casos) mantienen el balance de cargas; ese potencial se llama potencial zeta. Cuando se aplica el voltaje a través del capilar, los cationes que forman la doble capa eléctrica migran hacia el polvo positivo (fig. 5 c).

Por consiguiente, la doble capa eléctrica tiene un balance que está a su vez en equilibrio con la pared que corresponde al potencial zeta.

La magnitud de FEO puede ser expresada en términos de la movilidad y velocidad por la fórmula siguiente:

$$V_{FEO} = (\epsilon \xi / \eta) E \quad \text{o}$$

$$\mu_{FEO} = (\epsilon \xi / \eta)$$

donde:

- V_{FEO} : velocidad
- μ_{FEO} : movilidad FEO
- ϵ : constante dieléctrica
- ξ : potencial Z

A pH elevados los grupos silanol son desprotonados y la FEO es significativamente mayor que a pH bajo donde son protonados.

De la electroforesis en papel de filtro a la electroforesis capilar⁷

El papel de filtro es un conglomerado de fibras de celulosa que se embeben en una solución buffer: éstas por su composición química, al paso de una corriente eléctrica se polarizan negativamente mientras que el agua se carga positivamente y migra en sentido opuesto a la dirección de migración de la corriente.

A esta corriente líquida, conocida como corriente electroendosmótica, se suman o se oponen las corrientes de líquido producidas por la evaporación e (->) y e (< -), la migración de un compuesto cargado positiva o negativamente será hacia el cátodo o el ánodo según actúen las fuerzas (fig. 6).

Si consideramos un capilar de sílice, el fenómeno es muy similar, pero la evaporación es nula. En la pared del capilar, por pasaje de la corriente eléctrica se produce una capa eléctrica negativa (silanos) que condiciona la polarización del agua y consecuentemente tiene lugar una corriente líquida en sentido opuesto al campo eléctrico aplicado.

La corriente líquida se transforma progresivamente en una fuerza llamada **fuerza electroendosmótica (FEO)**, que es equivalente a la obtenida por acción de la bomba en Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC).

Esta corriente de líquido actúa transportando a los compuestos contenidos en el capilar, acorde a la carga eléctrica que adquieren en el campo eléctrico (voltajes desde 20 a 50 V/cm).

El aparato para electroforesis capilar (EC)

Está constituido por una fuente de poder (FP) de alto voltaje (20 a 30 Kv) y de 0 a 200 μ A, y un capilar de sílica de 25 a 75 μ m de diámetro interno y de 100 a 200 μ m de diámetro externo, el que puede estar refrigerado por aire o líquido por efecto Peltier.

Los electrodos de platino se encuentran ubicados en el recipiente que contiene el buffer, que además de servir para su contacto recibe los extremos del capilar.

El carrusel puede estar termostizado y contiene los buffers y las muestras. Con un movimiento de ascenso y descenso puede enviar cada una de las soluciones empleadas en la corrida al capilar o a los recipientes electródicos.

Los capilares de sílica dejan pasar la luz ultravioleta visible a distintas longitudes de onda, generando por arreglos de diodos, los espectros para la identificación de los compuestos separados por electroforesis capilar (fig. 7).

Aplicaciones

El explosivo avance de la electroforesis capilar se ha extendido al área **biomédica**, en el campo de las proteínas, péptidos, ADN, análisis de líquidos de perfusión, monitoreo de drogas, marcadores genéticos tumorales y neurobioquímicos, drogas xenobióticas, de abuso, y pericias forenses.

En el área **biofarmacéutica**, para el control de calidad de productos farmacéuticos y biotecnológicos, quimioterápicos y de estructura quiral.

En el área de **alimentos**, se le aplica al fraccionamiento y cuantificación de aminoácidos, hidratos de carbono, ácidos orgánicos, aditivos y contaminantes.

En el área de **control ambiental**, permite la identificación de contaminantes y sus metabolitos, pesticidas, metales pesados e hidrocarburos.

Como todo desarrollo de un área analítica nueva, la incorporación de técnicas acopladas como la espectroscopia de masa, fluorescencia inducida por laser y otras variantes permiten augurar un promisorio futuro.

Desarrollos tecnológicos que contribuyeron a la EC

Seis desarrollos tecnológicos han concurrido para el desarrollo comercial de la instrumentación, que constituye en la actualidad la electroforesis capilar.

1. Los **capilares** de sílica fundido revolucionaron la cromatografía gaseosa (CG) y han producido la cámara de separación de la electroforesis capilar.
2. La disponibilidad de fuentes de potencia de alto voltaje 20 a 30 KV, altamente estabilizadas y automatizadas para el mantenimiento estable de la tensión y corriente.
3. Los **detectores** desarrollados para la cromatografía líquida de alta performance (HPLC), de absorbancia de alta sensibilidad pudieron ser aplicados con modificaciones ópticas al tubo capilar.
4. Los **desarrollos obtenidos por la electroforesis en geles de tamizado molecular** como los de poli(acrilamida), agarosa y otros, en las técnicas de la separación de proteínas.
5. **El desarrollo de los anfolitos**, obtenidos por copulación del ácido acrílico y las polietileno poliaminas que han permitido generar ambientes de pH continuos y estables, donde se logra separar proteínas de puntos isoeléctricos muy próximos.
6. El análisis computacional aplicado a la resolución de productos obtenidos por separación por HPLC o CE que pueden ser estudiados, espectralmente a través de software para tal fin.

ELECTROFORESIS CAPILAR: VENTAJAS

Las separaciones se realizan empleando mecanismos tradicionales, en un ámbito capilar, que además ofrece más facilidad y velocidad que la cromatografía líquida de alta performance (HPLC).

Mientras elimina el problema de los solventes de la HPLC, la toxicidad de los mismos y su costo, pues emplea soluciones acuosas en su gran mayoría con muy baja concentración iónica, incorpora los principios de la automatización a través de un hardware creado especialmente con un software altamente optimizado.

Las separaciones se obtienen en pocos minutos, *on line* con la corrida, obteniéndose simultáneamente resultados cuantitativos, en oposición a los procedimientos tradicionales que utilizan horas o días.

VOLUMENES EMPLEADOS

El empleo de microvolúmenes y la rapidez de la EC en oposición a la HPLC, consumiendo microlitros de muestra y volúmenes del orden de los nanolitros para las soluciones electrolíticas, la hacen una técnica altamente versátil y económica.

INSTRUMENTACION

Los aparatos desarrollados por la industria instrumental recién aparecieron en 1988, y el primer simposio internacional del año siguiente, permitió mostrar los avances extraordinarios de este logro analítico.

Los aparatos comerciales de EC comprenden dos compartimentos electroforéticos unidos por un compartimento que contiene un capilar, a una fuente de alta tensión de 20 a 30 kv, el que es sometido a la luz UV con un detector unido a un registrador, que grafica las diferencias de absorbancia; a un sistema de administración de datos. Las terminales de salida permiten, por su conexión, el registro del voltaje, tiempo de corrida, y registro de la temperatura del capilar, a través de un software que está incluido en una workstation computarizada (fig. 8)

PRINCIPIO FISICOQUIMICO

Las moléculas son separadas por las fuerzas del campo eléctrico aplicado. Recordemos que la electroforesis ha sido definida como el movimiento diferencial de especies cargadas (iones) o no, por atracción o repulsión en un campo eléctrico.

Las muestras separadas en el capilar son monitoreadas por el detector (fig. 9)

Los picos del electrograma son similares a los de la HPLC, y se generan como consecuencia de la concentración de los analitos y de su velocidad de migración (fig. 9 bis).

Las muestras son introducidas en el capilar por electroforesis o por electrocinética, o por desplazamiento por inyección.

Durante la inyección electroforética, el capilar está sumergido en la muestra y se aplica el alto voltaje.

Los iones de la muestra migran dentro del capilar en relación a sus movibilidades electroforéticas.

Si la fuerza iónica de la solución muestra es más baja que el buffer electroforético, los cambios en el campo eléctrico de la interfase muestra-buffer producen un efecto de enfoque o *stacking*, en el cual los iones del analito aparecen concentradas alrededor de la zona de la interfase. Este proceso de delineamiento de la zona, puede producir incrementos en la detección de la sensibilidad y poder de resolución (fig. 10).

El efecto de enfoque, puede producir cambios sustanciales en la inyección electroforética (fig. 11).

CAPILARES

La electroforesis se efectúa en capilares de sílica fundida, de 25 a 75 μm de diámetro interno; los capilares son recubiertos externamente con una película de poliaminas, para protegerlos de los daños mecánicos. A los efectos de permitir el pasaje de la luz ultravioleta se practica una ventana quemando con un micromechero la capa plástica de protección.

Siembra de las muestras⁸

La inyección electrocinética, consiste en introducir el material empleando una combinación de la bomba electroosmótica y la movilidad electroforética.

La **inyección por desplazamiento** puede ser realizada por aplicación de la muestra con gas inerte a presión (por ej. nitrógeno) o por vacío en el extremo del capilar.

Inyección por diferencia de altura. Idéntico efecto puede obtenerse por cambio en las alturas relativas de la muestra o de los viales de salida del buffer (inyección por gravedad).

La inyección electroforética, produce un desplazamiento iónico, una zona de muestra, con analitos de distinta concentración que en la solución de la muestra.

Si la fuerza iónica de la solución muestra es más baja que el buffer electroforético, los cambios en el campo eléctrico de la interfase muestra-buffer producen un efecto de enfoque o *stacking*, en el cual los iones del analito aparecen concentrados alrededor de la zona de la interfase. Este proceso de delineamiento de la zona, puede producir incrementos de la sensibilidad y poder de resolución.

El efecto de enfoque, puede producir cambios sustanciales en la inyección electroforética (fig. 12) (tabla I).

VOLTAJES

Las fuentes estabilizadas de corriente continua generan 10 a 30 kv y elevados campos eléctricos (100 a 500 v/cm) al capilar, pueden variar de 25 a 75 μm de diámetro interno, pudiendo llegar a 300 μm de diámetro externo. Las longitudes pueden llegar a 1 m, pero normalmente no exceden los 75 cm (fig. 13).

En algunos aparatos, el capilar se ofrece dentro de un soporte de plástico en el cual se ha prealineado el capilar con una lente de microenfocado, para obtener una detección más sensible y estable. Los cassettes de plástico que contienen el capilar son herméticos y en su interior se hacen circular líquidos refrigerados por efecto Peltier.

Es imprescindible mantener la temperatura a los efectos de evitar la formación de gradientes térmicos que producen distorsiones en las bandas aisladas. Las zonas de falta de definición se reducen cuando se emplean capilares de 25 a 50 μm de diámetro interno, y de esta forma se permiten definir las zonas y aumentar la sensibilidad.

La alta resistencia eléctrica del capilar limita la corriente y el calentamiento interno. Se logran campos eléctricos muy elevados (100 a 500 v/cm) con mínima generación de calor. El empleo de campos eléctricos muy elevados permite reducir drásticamente el tiempo de realización del examen, y la elevada relación del área al volumen disipa en forma eficaz el calor que se pueda producir.

EFICACIA DE LA SEPARACION

La eficiencia del pico, frecuentemente mayor de 10^5 a 10^6 platos teóricos, se debe en parte al accionar del flujo electroendosmótico, un fenómeno electroforético que se genera por el flujo de la solución dentro del capilar.

POLARIDAD

La EC puede ser desarrollada empleando polaridad positiva o polaridad negativa. Lógicamente, el valor del pH permite definir el sentido de la migración a pH bajos, muchas proteínas y péptidos son catiónicos y migran hacia el cátodo negativo en el extremo del capilar. Inversamente, a pH elevados muchas biomoléculas tienen una carga neta negativa y migran hacia el ánodo positivamente cargado.

El conocimiento del pK para distintos componentes de las muestras (péptidos y aminoácidos) como también del pI para las proteínas, permite seleccionar los buffers apropiados para determinar el sentido de la migración para que los compuestos se orienten hacia el detector; normalmente se emplean campos eléctricos de 200 a 400 v/cm.

Para muchas aplicaciones, el empleo de capilares de longitud elevada (hasta 1 m) permite y requiere voltajes mayores de 20 kv para encontrar el campo eléctrico adecuado.

DETECCION

Una amplia variedad de detectores han sido desarrollados para la EC (incluyendo fluorescencia, electroquímica y conductividad) pero los detectores más usados comercialmente son los que emplean el ultravioleta y UV visible.

Los detectores son similares a los de la cromatografía líquida de alta performance, usando fuentes de deuterio con filtros o detección con longitudes de onda seleccionadas.

Las fuentes de luz generalmente provienen de un haz de luz entre un fotodiodo de referencia y un microenfocado óptico en el estuche del capilar.

El scanning es a través de un detector que ilumina el capilar con luz blanca luego dispersada y analizada a través de un policromador por arreglo de fotodiodos (detector PDA para óptica reversa).

Alternativamente, el sistema óptico convencional (forward optic) puede ser empleado por una banda espectral aislada por un monocromador colocado entre la fuente de luz y el capilar.

El scaneo puede ser controlado rápidamente por un sistema computarizado que controla el movimiento del monocromador en el rango espectral en el tiempo de milisegundos.

Este sistema de detección produce menos ruido de fondo, y mucha más sensibilidad que el detector con arreglo de diodos PDA.

Reactivos en electroforesis capilar

Una amplia variedad de buffers y aditivos puede ser usada para las separaciones; la mayoría de ellos son buffers no tóxicos, de fosfato, borato y TRIS⁹.

Esto no es un contraste con la cromatografía líquida de alta performance (HPLC), pues no emplea sustancias orgánicas, inflamables o tóxicas como acetonitrilo, hexano, metanol y tetrahidro furano. Se requieren volúmenes muy pequeños de soluciones de electrolitos que no presentan los principios de toxicidad encontrados en HPLC.

SELECCION DE BUFFERS

Esta es una de las etapas básicas en la separación por EC. La sensibilidad de FEO al pH requiere buffers que mantengan el pH constante.

Los sistemas buffers efectivos tienen un rango de aproximadamente dos unidades de pH alrededor del valor del pKa (Tabla II). Los buffers polibásicos como fosfato, citrato tienen más de un pKa para usar, y pueden ser utilizados en un rango de pH más amplio.

El buffer que se emplea en EC debe reunir una serie de propiedades:

- 1) Buena capacidad de pH en el rango encontrado.
- 2) Baja absorbancia en la longitud de onda empleada en la detección.
- 3) Baja movilidad (para lo cual se necesita baja concentración iónica).

Las separaciones de proteínas y péptidos son regidas por las alteraciones del pH que están íntimamente ligadas al pI. Los cambios de pH afectan también al comportamiento de la electroendosmosis, pues a pH próximos a 3 la superficie interna del capilar se encuentra cargada negativamente por los grupos silanol.

Los iones positivos del buffer son atraídos y fijados sobre la capa negativa generando una doble capa eléctrica. Si imaginamos un corte del capilar y el plano de la hoja sumergido en el electrodo positivo, detrás tendremos el electrodo negativo, el agua migrará al polarizarse positivamente desde el plano hacia la parte posterior del plano del papel, como si lo atravesara (fig. 14).

Este es el fenómeno FEO de electroendosmosis, al cual ya nos hemos referido oportunamente. La magnitud de la electroendosmosis se incrementa en función del pH y en condiciones alcalinas la velocidad de la FEO es usualmente mayor que la velocidad de migración de los iones de la muestra.

Esta propiedad puede ser una ventaja para analizar las muestras de especies aniónicas o catiónicas. En algunos casos experimentales, como la separación de péptidos o proteínas, los grupos hidrofóbicos poseen determinados sitios de fijación, lo que produce variaciones locales en la migración de la FEO, y por consiguiente, alteran la reproducibilidad de los resultados.

Estos problemas pueden ser minimizados trabajando a pH bajo, donde las superficies silanol no se encuentran ionizadas.

En los casos en que se trabaje a pH elevado, se emplean aditivos que reducen la absorción de los analitos.

El empleo de uniones covalentes en la superficie del capilar puede reducir dramáticamente la FEO, sobre todo en la separación de las proteínas (fig. 15).

Particular cobertura en la superficie interna del capilar, en condiciones de pH alcalino o neutro, permiten muy buenas separaciones.

Estos fenómenos han motivado numerosos problemas en la separación de proteínas en las distintas variantes, isoelectroenfoque, isotacoforesis, electroforesis en geles.

Fundamentalmente, el control de la FEO requiere alteraciones de la superficie cargada del capilar y de la viscosidad del buffer. En la tabla III que se detalla se ponen en evidencia las condiciones para optimizar la FEO y la movilidad de las propiedades de los solutos.

La FEO puede ser afectada ajustando la concentración y la fuerza iónica del buffer; elevadas concentraciones del buffer son útiles para la limitación de las interacciones iónicas, por disminución de las alteraciones iónicas contra la pared, pero el calentamiento de los capilares limita el uso de las concentraciones elevadas de los buffer.

La concentración de los buffers debe oscilar entre 10 a 50 mM, aunque es posible emplear concentraciones entre 100 a 500 mM. Las modificaciones de FEO pueden ser controladas alterando la cubierta dinámica, agregando aditivos al buffer, o con cubiertas covalentes.

Tabla de buffers ⁹

Una amplia variedad de buffers puede ser empleada en la electroforesis de zona (Capillary zone electrophoresis) (CZE).

Por ejemplo, el más usado es el fosfato a pH 2,5 y pH 7 y el borato a pH9, siendo la concentración de 10-50-100 mM. El impacto del pH sobre el analito puede producir, sustancialmente, complejos *zwitteriónicos* especialmente en péptidos y proteínas, pues la carga de esos compuestos es dependiente del pH en forma directa.

Una regla de uso frecuente es que hay que seleccionar al pH, entre dos unidades de pH por arriba o por debajo del pKa del analito sometido a la ionización completa; a valor de pH altamente alcalino, puede ser muy rápida y se pueden obtener separaciones incompletas.

Ciertas proteínas pueden ser separadas a pH ácido, debiendo en estas condiciones, los capilares estar sin carga. En estas condiciones, están positivamente cargadas y no existen acciones electrostáticas con la pared, sin embargo, pueden ocurrir interacciones hidrofóbicas y pueden producirse precipitaciones proteicas (tablas IV y V).

Buffers zwitteriónicos

TRIS-MES-CAPS-Tricine-Bicine son buffers zwitteriónicos y se emplean comúnmente para la separación de péptidos y proteínas, siendo sus características más importantes, siendo sus características más importantes, su baja conductividad, ya que se utilizan alrededor de sus pI. La ventaja de estos buffers reside en su baja conductividad, y por consiguiente reducen el calentamiento por efecto Joule. A veces se le agregan sales como cloruros, fosfatos y sulfatos al medio, que afectan la conformación de las proteínas e impactan sobre la separación.

También la adición de las sales modifica sustancialmente la FEO, por ruptura de la doble capa iónica de las paredes del capilar. Esta modificación está limitada por la cantidad de sales que pueden agregarse y producir calentamiento por efecto Joule.

Aditivos

Varias sustancias pueden ser agregadas a los buffers para modificar las movilidades electroforéticas; otros aditivos, tales como surfactantes o ciclodextrinas, forman entornos heterogéneos que pueden definir nuevos sistemas fisicoquímicos de la EC (tabla VI).

Surfactantes

Numerosos tipos de surfactantes pueden ser empleados (aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos y no iónicos).

En una concentración baja, la concentración de moléculas de surfactantes iónicos produce la concentración micelar crítica que pueda actuar como agente solubilizante por la formación de pares iónicos, o por interacciones hidrofóbicas.

Dependiendo de la carga del surfactante, puede ser que la FEO se incremente, aumente o se invierta.

En la figura S: (1) el capilar se polariza por el pasaje de la corriente eléctrica y produce la FEO; en (2) el surfactante en una determinada concentración produce la detención de la corriente electroendosmótica, y un exceso se traduce en la inversión de la corriente (FEO) (3).

Sectores quirales

La separación de enantiómeros ópticos que poseen un carbono asimétrico y que permite obtener compuestos llamados quirales, que dividen el punto estereoisométrico, representan la imagen especular del compuesto como son drogas y conservadores de alimentos en la industria.

Comunmente, la separación para identificarlo se realiza por HPLC y EC. Estos exámenes son generalmente complicados y de elevado costo.

En oposición a la fase quiral estacionaria, el análisis por electroforesis de zona (CZE) en un medio capilar empleando buffers de corrida de elevada selectividad, permite, empleando la EC y aditivos quirales, separar DL aminoácidos y drogas quirales.

Ciclodextrinas

El avance producido en las técnicas de interpretación de imagen molecular por aplicación de cristalografía de Rayos X, como Resonancia magnética nuclear, espectroscopia ESR, electroquímica, medidas cinéticas y termodinámicas, termogravimetría, calorimetría de barrido, espectroscopia IR y UV, resonancia paramagnética electrónica (EPR), doble resonancia electrónica y espectroscopia Raman, han permitido el nacimiento de la química supramolecular.

Este campo de la ciencia, de carácter multidisciplinario abarca aspectos químicos, físicos, biológicos, y tecnologías de especies químicas de gran complejidad, las que se encuentran unidas por uniones no covalentes intermoleculares.

RELACIONES DE LA QUIMICA SUPRAMOLECULAR

Se ha extendido a la química orgánica a los métodos sintéticos para la construcción de receptores químicos, a la química de coordinación de complejos, a la unión de complejos de ligandos con iones metálicos, a las interacciones moleculares, a la bioquímica y a los procesos biológicos (como ser la unión de una enzima con su sustrato).

Por lo tanto, para encarar una investigación con este enfoque multidisciplinario se hace necesario una nueva manera de encarar y desarrollar la investigación, la interpretación y correlación de resultados.

HIDROLISIS DE ALMIDON

La degradación enzimática del almidón produce una mezcla de glucosa, maltosa, malotriosa y una larga serie de cadenas lineales o ramificadas de malto oligómeros conocida como dextrinas.

Es en realidad un verdadero proceso hidrolítico pues es el producto primario de separación del enlace glucosídico y su reacción con una molécula de agua.

CICLODEXTRINAS (CD) O (CDs) ¹⁰

Cuando el almidón se degrada por la acción de la enzima glucosil transferasa se produce una reacción intramolecular sin que intervenga una molécula de agua, formándose productos cíclicos

mediante uniones alfa – 1,4 que se conocen con el nombre de **Ciclodextrina** (CDs).

Constituyen una serie de tres oligosacáridos cíclicos formando una familia de alfa- CD, beta-CD y gamma-CD, los cuales se encuentran compuestos por 6, 7, 8 unidades de D-(+) glucopirinasas unidos en forma alfa- 1,4 (fig. 16).

ESTRUCTURA ESPACIAL DE LAS CD

Debido a la conformación C1 de las unidades glicopiránicas, todos los grupos oxidrilos secundarios están ubicados en cada uno de los bordes del anillo (de mayor diámetro) y todos los primarios en el menor diámetro.

La cavidad interior se encuentra revestida por los átomos de hidrógeno y los puentes de oxígeno glucosídico respectivamente.

Los pares de electrones no enlazantes de estos puentes se encuentran orientados hacia el interior de la cavidad, generando una alta densidad electrónica.

Esta cavidad tiene por consiguiente un marcado carácter hidrofóbico y un momento dipolar muy marcado.

LA CONICIDAD ¹¹

Inicialmente se pensó que las CD tenían forma cilíndrica, pero la rotación de los grupos hidroxílicos primarios reduce el diámetro efectivo de la cavidad del lado donde están ubicados, lo que configura en forma más adecuada una estructura geométrica cónica.

La configuración y dimensiones aproximadas se indican en la figura 17.

LA CAVIDAD ¹²

Las cavidades de las CD cristalizadas a partir de soluciones acuosas no están vacías, sino que contienen en su interior de 2 a 8 moléculas de agua y otras tantas para integrar el cristal.

Los complejos, de inclusión de las CD se originan por sustitución total o parcial del agua incluida por la molécula huésped apropiada, que se traduce en una modificación de los espectros de RMN, de difracción neutrocia y de Rayos X.

Las CD forman complejos con aquellos compuestos que satisfagan:

- Requerimientos de complementariedad estereoelectrónica
- Posean dimensiones compatibles con las cavidades respectivas
- Factores geométricos que definirán qué moléculas invitadas pueden penetrar en las cavidades de las CD.

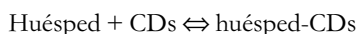
Las modificaciones pueden ser (figs. 18 y 19).

- Sustitución de 1 o más átomos de hidrógeno de los hidroxilos primarios y/o secundarios (éteres, ésteres, glucosil-CDs)
- Sustitución de 1 o más hidroxilos primarios o secundarios (desoxi-halógenos, amino, etc.)
- Eliminación de los átomos de hidrógeno del grupo C₅-CH₂-OH (C₅COOH)
- Rotura de 1 o más enlaces C2-C3 por oxidación con periodato.

UNIONES QUIMICAS ENTRE EL HUESPED Y LAS CD

- Interacciones del tipo van der Waals
- Uniones por puente de hidrógeno
- Interacción dipolo-dipolo
- Impulsión hidrofóbica
- Liberación de agua de mayor energía desde la cavidad
- Desprendimiento de energía de tensión del anillo macrocíclico
- Efectos de tensión solvente superficie.

Lo expuesto pone en evidencias las distintas fuerzas que rigen la incorporación del huésped a la CD.



En la fig. 20 queda explicada la interacción y se demuestra cómo las moléculas del solvente son expulsadas del interior de las CD para permitir la entrada del p-xileno.

Las principales propiedades de las ciclodextrinas nativas¹³

La forma de las ciclodextrinas es similar al de un cono truncado con diferentes cavidades de distintas dimensiones, y que se encuentran relacionadas con las distintas unidades de glucosa. Están relacionadas con la hidrofobicidad y con los grupos no polares (tabla VII).

La solubilidad de las β -CD es relativamente más baja que la α y las γ . Esto puede ser un problema cuando es necesario seleccionar un aditivo como elemento de fondo.

Cuando se emplean concentraciones elevadas de β -CD se puede emplear metanol-agua, etanol o mezclas de urea.

La solubilidad de las β -CD en solución acuosa en urea 4-8M de urea, puede aumentar de 0,089 a 0,226 M respectivamente.

Los grupos hidroxilos se presentan en las dos entradas de las CD en posición 2, 3 y 6 por cada glucopiranososa, puede ser modificada por reacciones químicas, es posibles producir CD con derivados con propiedades diferentes.

Las reacciones con los grupos hidroxilo alteran las propiedades de las ciclodextrinas:

- Mejora la solubilidad de las CD
- Formación de diferentes uniones con analitos que pueden mejorar la complejación
- Análisis de isómeros ópticos sin carga

Distintos parámetros experimentales pueden influir en la complejación y estereoselectividad, el tipo de CD, la concentración, voltaje aplicado, temperatura, longitud del capilar, fuerza iónica, solventes orgánicos, corriente electroosmótica, aditivos poliméricos.

Tipos de electroforesis capilar

Hemos citado la migración electroforética de acuerdo a los trabajos desarrollados por Tiselius en el tubo en U de sílice de 1937. La separación se efectúa acorde a la movilidad de los iones (fig. 21)

En las figuras 1, 2, 3 y 4 se describen distintos tipos de electroforesis capilar (EC).

ELECTROFORESIS CAPILAR LIBRE

En los gráficos se indica el instante cero ($t=0$) que corresponde al periodo de siembra, en el cual no hay separación. Al valor $t > 0$, se produce la separación por el empleo de la corriente aplicada (20 a 30 Kv) para un capilar de 50 μm de diámetro interno y longitud variada (20 a 70 cm).

En el primer gráfico se representa la migración de las especies iónicas ABC que se separan por distinta movilidad, generando zonas iónicas como en el caso de la electroforesis libre de Tselius, denominada *Electroforesis de Límites Móviles*.

ELECTROFORESIS DE ZONA¹⁵

Es el mismo principio que la electroforesis libre o de límites móviles. La incorporación de sustancias neutras que actúan como separadores permite su separación en zonas, como se muestra en la figura 21.2

ELECTROFORESIS CAPILAR POR ISOELECTROENFOQUE¹⁷

Este procedimiento está destinado a la separación de componentes anfotéricos de una mezcla en un gradiente de pH continuo y estable que se extiende desde bajo pH en el ánodo y elevado en el cátodo.

El secreto de esta técnica reside, fundamentalmente en la obtención de un gradiente de pH, continuo y estable, lo que ha sido posible empleando anfolitos obtenidos por la unión de poliaminas y ácidos orgánicos, formando uniones poliamínicas y policarboxílicas que en un ámbito de protones los ceden o los incorporan a las moléculas, lo que actúa como un estabilizador de pH.

Cuando un medio con anfolitos se aplica un campo eléctrico, los anfolitos migran hacia un punto isoeléctrico, generando un gradiente estable de pH. Estos anfolitos son sintetizados para obtener gradientes de pH de 2 a 11, y con resolución del orden de 0,001 unidades de pH.

Cuando al gradiente de pH se le introduce una proteína en ese gradiente de anfolitos, cada zona intercambia protones con la muestra proteica, generando una separación isoeléctrica conocida como electroenfocado o electrofocusing.

Considerando el gráfico de la figura 21.3, allí pueden apreciarse las diferentes zonas de pH creadas por la migración de protones que en el anfolito generan el gradiente de pH que condiciona el espectro isoeléctrico de las proteínas combinadas en las zonas de su punto isoeléctrico.

ISOTACOFORESIS¹⁸

El nombre deriva de la separación electroforética de las bandas que migran todas a igual velocidad (Iso= igual y tacho = velocidad).

La mezcla de analitos debe ser colocada entre dos soluciones electrolíticas con iones de diferente movilidad, uno rápido

llamado ion líder o inicial (L) y otro más lento llamado ion terminal (T) en la figura 21.4

Si se desea investigar un catión, el electrolito inicial puede contener un catión de elevada movilidad como el ion hidrógeno, mientras que el terminal puede contener un ion que sea más lento que el que se desea investigar. Por esta razón, el electrolito líder siempre debe ser colocado para migrar hacia el cátodo y el terminal debe migrar hacia el ánodo. Al aplicar el campo eléctrico, al cabo de un tiempo todos los iones adquieren la misma velocidad.

En la zona del campo donde los iones presentes tienen baja movilidad, el campo es más fuerte, moviéndose el menos móvil de los cationes a la misma velocidad que el más móvil de ellos.

En el estado estacionario, cada componente de la muestra catiónica migra como si se tratara de una banda pura, como si estuviera comprimida entre las paredes de un emparedado o sandwich entre la zona iónica de mayor y de menor movilidad.

La característica de esta técnica es que la focalización isotacofórica ocurre entre las bandas móviles produciendo bandas definidas.

MEKC o MECC (Electroforesis micelar electrocinética)

Es un híbrido entre la electroforesis y cromatografía, fue introducida por Terabe en 1984. Está ampliamente difundida y es la única técnica que permite la separación de sustancias neutras o cargadas.

La separación de sustancias neutras por MEKC se logra empleando tensoactivos en el buffer de corrida. La CMC (concentración micelar crítica) es de 8 a 9 mM para SDS.

Se forman micelas que son agregados de moléculas individuales tensoactivas.

Las micelas son esencialmente esféricas, con los extremos hidrofóbicos orientados hacia el centro como los extremos de una medusa, para evitar la interacción con el centro hidrofílico. El empleo de las micelas obtenidas por soluciones surfactantes puede dar un aumento de la separación como en la cromatografía líquida de fase reversa, pero con los beneficios de la EC. También la MECC produce en IEF, ITP (isoelectroforesis e isotacoforesis) un elevado control de EOF.

Micelas

Son agregados anfipáticos de moléculas conocidas como surfactantes. Ellas son largas cadenas de moléculas (10-50 unidades de carbono) que están caracterizadas por largas colas hidrofóbicas y cabezas hidrofílicas.

Las micelas normales están orientadas en solución con la cola hidrofílica aguzada hacia adentro y la cabeza hidrofóbica hacia fuera. La cola del surfactante no puede ser solvatada en solución acuosa. Cuando la CMC (concentración micelas crítica) es conocida, el agregado puede ser total.

El agregado produce cambios físico en la tensión superficial, viscosidad y su habilidad para dispersar la luz que acompaña a la formación de la micela.

Clases de surfactantes y propiedades

El dodecil sulfato de sodio es el surfactante más ampliamente usado: tiene un PM de 288 y un CMC de 8 mM, siendo el número de agregación número de moléculas/ micelas de 62. Las micelas tienen la habilidad de organizar analitos a nivel molecular, basados en interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. Las moléculas neutras pueden unirse a micelas mientras que el cuerpo hidrofóbico tiene un alto poder de solubilización. El analito puede ser particionado entre la micela y la mayor parte de la fase estacionaria; este factor contribuye a la movilidad electroforética del analito y contribuye sobre todas las separaciones.

La interacción entre las micelas y los solutos neutros es la que produce la separación. Las micelas son esencialmente esféricas, con los extremos hidrofóbicos orientados hacia el centro para evitar la interacción con el buffer hidrofílico, y los extremos cargados hacia el buffer.

En la fig. 22 se detallan la interacción de las micelas y los solutos neutros que son la causa de la separación.

Los tensoactivos, y en consecuencia las micelas cargadas, migran a favor o en contra de la FEO, dependiendo de la carga. Siendo el dodecil sulfato de sodio (SDS) un tensoactivo aniónico, migran hacia el ánodo, es decir en dirección opuesta a la FEO; a pH neutro o básico, las micelas migran hacia el ánodo en dirección opuesta a la FEO.

Como voltajes elevados la velocidad de la FEO es generalmente mayor que la velocidad de migración de las micelas, a pH neutro o básico, el movimiento resultante es en la dirección de la FEO.

Durante la migración, las micelas pueden interactuar con los solutos a través de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas como en cromatografía.

Durante la migración, las micelas pueden interactuar con los solutos en modo cromatográfico (fig. 23).

Separación de especies neutras

La separación de estas sustancias se efectúa por partición dentro y fuera de las micelas. Cuando el soluto interactúa más con la micela, mayor será su tiempo de migración, pues la micela es atraída contra la FEO; en cambio, cuando no está en contacto con la micela, es transportado por la FEO.

Los compuestos más hidrofóbicos interactúan más fuertemente con la micela y son más retenidos. La separación de solutos neutros es esencialmente cromatográfica y puede ser explicada usando relaciones cromatográficas modificadas. La selectividad puede ser manipulada variando la naturaleza física (tamaño, carga, geometría) de la micela, usando diferentes tensoactivos, similares a los empleados en las diferentes fases estacionarias; estos pueden ser aniónicos, catiónicos, no iónicos, zwitteriónicos o mezclas de ellos. También pueden emplearse sales biliares o microemulsiones.

Como ocurre en cromatografía, pueden ser empleados modificadores orgánicos para manipular soluto micela (ej.: metanol-acetonitrilo 2-propanol).

Electroforesis capilar en gel (CGE o ECG)¹⁶

La separación de moléculas de gran tamaño y peso molecular ha requerido el desarrollo de la electroforesis en gel. Esta separación tiene en especial que emplea procedimientos o

principios basados en el tamaño y empleando un polímero que actúa como “tamiz molecular”.

En la fig. 24, se ilustra el principio de la electroforesis zonal, en la cual los solutos migran a través del retículo del polímero que ofrece mayor obstáculo al movimiento, cuanto mayor es su tamaño.

El mecanismo que rige la separación en electroforesis capilar en gel (ECG) es similar al principio en gel, tubo o placa, a diferencia de la CGE, que incluyen campos eléctricos 10 a 100 veces más elevados, sin efecto de calentamiento Joule, la detección sobre el capilar y automatización de la instrumentación. Además, no se necesita usar un gel anticonvectivo, pues las características del capilar proporcionan esta capacidad.

Las separaciones preparativas, que constituyen la mayor ventaja de la electroforesis clásica, se pueden lograr en cierto grado, empleando capilares de diámetro interno mayor de 100 a 200 μm y bajos campos eléctricos.

Los polímeros de la ECGel pueden ser entrecruzados en forma covalente (como un BIS-Poliacrilamida) por unión hidrógeno como la agarosa o soluciones de polímero lineal como poliácril amida o metil celulosa.

Las macromoléculas pueden ser separadas usando cada tipo de gel (tabla IX).

Una matriz muy usada, la piliacrilamida entrecruzada, se polimeriza in situ y no se saca del capilar; es muy importante emplear soluciones sin gases (degasadas al someterlas al vacío) y emplear sustancias puras para evitar burbujas, pues si no pueden producirse geles inestables.

Capilares

Una mención especial merecen los capilares y su tratamiento. Se pueden emplear capilares de sílica fundida sin cubrir y es conveniente no emplear ambientes “coated”. Generalmente, una buena práctica es lavar el capilar con hidróxido de sodio (0,1 M) seguido de buffer y agua destilada filtrada, para eliminar los contaminantes.

La preparación de estos geles requiere mucho cuidado, pues son de polimerización muy rápida. Su inconveniente radica en que los geles tienen naturaleza rígida, y las muestras pueden tapar el capilar o pueden formarse burbujas que lo inutilizan. Con el uso apropiado, pueden hacerse múltiples inyecciones: la rigidez impide el empleo por inyección hidrodinámica.

Los polímeros lineales ofrecen una alternativa más flexible, pues son soluciones de polímero; no es imprescindible la polimerización “in situ”. El polímero puede disolverse en el buffer y se lo puede introducir hidrodinamicamente al capilar.

La concentración del polímero necesaria es inversamente proporcional al tamaño del analito. Cuando tiene baja viscosidad, pueden ser introducidos a presión, y son menos susceptibles a la formación de burbujas y otros problemas.

La eficiencia de la EGZ y ECGel son muy similares pues son técnicas electroforéticas zonales.

Aplicaciones

Ha sido muy aplicada esta técnica a la resolución de proteínas y productos de biología molecular (análisis de pureza de oligonucleótidos, terapia génica, secuenciado de DNA y análisis de productos de PCR y de química forense) (fig. 25).

Isoelectroenfoque capilar¹⁹

En esta técnica los recipientes electródicos se llenan uno con una solución básica y otro con una solución ácida. El capilar se llena con un anfolito que está constituido por una mezcla de agregados moleculares obtenidos por la reacción de ácido acrílico polietileno tetra o penta aminas que al paso de la corriente se ordena de acuerdo a la atmósfera protónica que se obtiene.

Esta atmósfera iónica de protones, reacciona con los grupos amino y carboxilos generando zwitteriones, que delimitan un gradiente de pH estable y continuo. Los péptidos y proteínas se desplazan y separan acorde el ámbito químico que permite su desplazamiento hasta el valor del pH igual a su pI. Los ámbitos extremos del pH del sistema anfolito pueden ser 3 a 9, subordinados a las características del anfolito empleado.

Al aplicar el campo en el capilar que contiene los solutos y el anfolito, las proteínas cargadas migran hasta enfocarse, por lo que encuentran el ámbito de pH igual a su punto isoelectrónico (pI); estas bandas proteicas son muy angostas porque la difusión a una zona de pH diferente resulta en generación de cargas, y la subsecuente migración de vuelta a la zona apropiada.

La corriente es la que produce la migración de los iones, y cuando el sistema alcanza el estado estacionario, no fluye más corriente, una vez enfocadas las proteínas en el área de los anfolitos, las soluciones son movilizadas y pasan a través del detector.

La FEO necesita ser reducida o eliminada, en la electroforesis capilar por isoelectroenfoque, porque el flujo podría barrer los anfolitos del capilar, antes que se complete el enfoque.

La reducción de FEO puede ser obtenida usando un cubrimiento dinámico o covalente; el primero es simple, pero es difícil obtener reproducibilidad, pero son útiles para limitar la adsorción de las proteínas a la pared del capilar.

Aplicaciones de la electroforesis capilar por isoelectroenfoque, se han empleado exitosamente para la medición del pI de proteínas y para lograr la separación de isomorfos. Es muy útil para la separación de hemoglobinas e inmunoglobulinas.

Isotacoforesis²⁰

En los compartimientos electródicos se une una combinación de dos sistemas buffers, para generar un estado en el cual todas las zonas separadas se muevan a igual velocidad, por eso se llama *iso* (igual) y *tachos* (velocidad).

En general se deben elegir los buffers que tengan uno de ellos como ion rápido y el otro un ion lento, y que el contraíon sea el mismo para los componentes de ambos buffers.

Cuando se aplica el campo eléctrico en la separación de aniones, se busca un buffer con un electrolito delantero que contenga un anión con una movilidad efectiva mayor que la del soluto. Similarmente, el buffer usado como electrolito terminal debe tener un anión cuya movilidad sea menor que la de los solutos. Cuando está actuando, el anión rápido o delantero se desplaza primero.

El estado estacionario se logra porque el campo eléctrico varía en cada zona, y es autoajustado para mantener la velocidad constante con el mínimo de campo en la zona de máxima movilidad.

Lo expuesto genera un fenómeno muy particular entre las zonas, y las fronteras iónicas son muy agudas entre ellas. Si un ion difunde en una zona vecina, cambia su velocidad y retorna rápidamente a su zona.

Si las zonas iónicas son menos o más concentradas que el electrolito delantero, éstas se hacen más angostas o más anchas, para su adaptación a la concentración apropiada. Esta propiedad entre soluciones que tienen un anión (o catión) común y un ion rápido (o lento) y permite su concentración, pues el ion a separar debe encontrarse entre las movibilidades del ion más rápido y del más lento.

Este efecto de concentración puede ser aplicado a electroforesis capilar de zona (CZE), a la electroforesis capilar electrocinética (MEKC) y a la electroforesis en gel.

Este fenómeno de concentración y afinado de las bandas se observa en las separaciones de proteínas o aminoácidos. Cuando no existe una adecuada refrigeración y se evapora el agua del buffer, la concentración del solvente aumenta y las bandas se hacen cada vez más nítidas. Un angostamiento de la zona puede ocurrir si se agrega electrolito en alta concentración.

Aplicaciones de la isotacoforesis ^{21, 25, 26, 27, 28}

La bibliografía es extensa en esta área, pero no tanto como las separaciones en electroforesis capilar zonal y los que emplean medios soportes como los geles lineales o entrecruzados.

Los primeros trabajos fueron realizados para separar aniones como oxalato urinario; también se ha aplicado a separación de purinas y pirimidinas en suero. Se ha extendido a la identificación y separación de pequeñas moléculas de péptidos en fluido de pacientes urémicos o pueden ser aplicados en electroforesis capilar de zona, pero con una etapa de isotacoforesis, los ácidos orgánicos como aniones piruvato, citrato, malato, acetoacetato, en electroforesis con capilares cubiertos con poliacrilamida lineal ¹⁵.

También se ha aplicado isotacoforesis para separar aminoácidos urinarios, previamente derivatizados con ophthalaldialdido (OPA) y nalfatalina 2, 3 – dicarboxaldehído. Los productos derivatizados por CZE son detectados empleando por fluorescencia estimulada con láser (fig. 26).

Aplicaciones de la electroforesis capilar ²²

ELECTROFORESIS CAPILAR EN ZONAS (CZE)

Ha sido empleada en Química Clínica para la separación de las proteínas del suero humano normal y patológico, péptidos como insulina, hemoglobinas normales y patologías en un lapso de 3 a 5 minutos. Separa pequeñas moléculas ionizadas, como nucleósidos, nucleótidos, aminoácidos, vitaminas y drogas iónicas ^{29-33, 36-42}.

Puede proveer la CZE la separación de estereoisómeros y puede esta técnica permitir la caracterización de drogas quirales y de sus metabolitos; se emplean ciclodextrinas en los buffers como aditivos. Los oligosacáridos cíclicos poseen cavidades hidrofóbicas en las cuales el anfolito puede estar en forma de complejo huésped. La cavidad y la dimensión del grupo funcional, es la que permite la enantioselectividad a la separación.

Con esta técnica se pueden separar iones inorgánicos, incorporando un ion que absorbe en UV y los iones se detectan por la producción de una absorbancia negativa, y producir picos negativos, se separan así iones como $S_2O_3^{2-}$, Br^- , Cl^- , SO_4^{2-} , NO_2^- , N_3^- , SCN^- , ClO_3^- , BrO_3^- , PO_4^{3-} .

ECIF (O CIEF) ²³

El sistema contiene en los recipientes electrodicos ácido fosfórico en el cátodo e hidróxido de sodio en el ánodo, el ámbito del capilar y la muestra contienen anfolito que al pasar la corriente genera un ámbito de pH en forma de gradiente estable y continuo en donde la proteína se desplaza hasta que su pI idéntico al pH del medio produzca su inmovilización.

Este gradiente se mantiene estable al paso de la corriente y para desplazarlo se emplea simultáneamente leve presión y corriente o se desplaza hidrodinámicamente por presión o combinado el electrolito por un zwitterion. Se emplean capilares recubiertos para reducir a cero la FEO.

TAMIZADO MOLECULAR ²⁴

Muchos compuestos y ácidos nucleicos forman complejos SDS proteínicos, que no se pueden separar empleando electroforesis de zona; esto se obtiene formando un gel con poliacrilamida como se usa tradicionalmente, o si no, colocando los polímeros en solución sin polimerizar dentro del capilar; así se han separado oligonucleótidos y sus secuencias de bases, y para la determinación de peso molecular.

MEEC

Contiene el sistema surfactante SDS, que en determinada concentración produce micelas a las que se agregan ciclodextrinas. Se ha separado uracimida, piridoxina, riboflavina, ácido ascórbico, cianocobalamina, ácido nicotínico y tiamina.

Electrocromatografía micelar. Cromatografía micelar electrocinética. MEEC ^{34, 35, 36}

DEFINICION

La cromatografía micelar electrocinética o electroforesis capilar con cromatografía micelar, llamada también electrocromatografía, está basada en un principio cromatográfico empleando soluciones homogéneas que contienen “carriers” iónicos o transportadores iónicos en el mismo aparato que se utiliza en la electroforesis capilar.

Las características fundamentales residen en que en la Electrocromatografía (MEEC) los analitos cargados o neutros pueden ser separados eléctricamente.

La aplicación de soluciones micelares con surfactantes iónicos, la ha transformado en una de las técnicas de más amplia aplicación para la separación de pequeñas moléculas.

La característica más importante es que la solución buffer contiene surfactante a una elevada concentración, que corresponde a una concentración micelar crítica. Estas micelas constituyen una pseudo fase en la cual la molécula del analito es particionada por las interacciones hidrofóbicas en el interior de la micela (fig. 27)

La Fuerza Electroendosmótica es empleada como una bomba transportadora de las micelas y del volumen del electrolito hacia el punto de detección.

Entre las técnicas de mayor uso el dodecilsulfato de sodio (SDS) es el surfactante más utilizado. Como las micelas están cargadas negativamente, son aniónicas. La migración electroforética está en dirección opuesta a la FEO, aumentando el rango de separación.

De acuerdo con la importancia y magnitud de la FEO, la velocidad electroforética de migración es muy grande cuando se desplaza hacia el detector. Comparando con la HPLC con fase reversa, la MEEC (fig. 28) exhibe una elevada eficiencia, fundamentalmente vinculada con dos características del fenómeno de la electroforesis.

- El perfil planar del frente de la fuerza electroendosmótica, elimina el efecto de borde curvo por el roce con la pared que se produce en la columna de HPLC.
- El intercambio entre el surfactante monómero y los campos altamente móviles de la fase micelar es rápido. Se produce un intercambio cinético muy rápido de la masa del analito entre la fase micelar móvil y la fase no micelar.

RESUMIENDO

El tiempo de migración del analito (t_r) es limitado entre el tiempo de migración de la solución de fondo (t_0) y el tiempo de migración t_{mc} .

Al modificar el pH por debajo de 5, la corriente electrosmótica se hace menor que la velocidad electroforética de la micela en SDS y entonces la micela migra hacia el electrodo positivo.

Cuando se emplea bromuro de dodecil trimetil amonio en lugar de SDS, se produce una reversión de la corriente electrosmótica pues migra hacia el electrodo positivo, debido a la absorción de moléculas de surfactante, sobre la pared del capilar.

EFFECTOS DE ADITIVOS EN LA FASE ACUOSA

Los aditivos más empleados se encuentran vinculados a los surfactantes y son similares en sus efectos a los logrados con la HPLC.

Existen cuatro categorías de aditivos:

1. Ciclodextrinas (CDs)
2. Pares iónicos
3. Urea
4. Modificadores orgánicos

PRINCIPIO DE SEPARACION CON LA CICLODEXTRINA (fig. 29)

En este tipo de procedimientos el capilar de silica fundida se llena con solución buffer que contiene un surfactante de elevada concentración, para que se formen micelas.

Esta concentración micelar crítica (CMC) es una constante de gran importancia que influye decididamente en la separación.

Cuando se emplea SDS como surfactante aniónico, la micela cargada negativamente se desplaza hacia el electrodo positivo por electroforesis, contrariamente la corriente electrosmótica migra hacia el electrodo negativo, debido fundamentalmente, a la carga negativa del capilar.

La corriente electroendosmótica (FEO) es mayor que la migración electroendosmótica de la micela bajo condiciones neutras o básicas, sin embargo, las micelas aniónicas del SDS migran hacia el electrodo negativo con una velocidad retardada.

Cuando un analito neutro se inyecta en la solución micelar, éste se distribuye entre la micela y la solución de fondo (fig. 31).

1. La velocidad de migración del analito depende del coeficiente de distribución y de la solubilización micelar.

Si el analito es neutro migra a una velocidad entre dos extremos: la velocidad de la corriente electroendosmótica V_{est} y la velocidad de la micela. Se encuentra explicado en el gráfico que se detalla.

En el sistema MEEC-CD electrocromatografía micelar con ciclodextrina, éstas migran a la misma velocidad que la corriente electrosmótica, si la molécula de analito es neutra se incluye en CD en la fase acuosa y se desplaza a la velocidad electroendosmótica (figs. 30 y 32)

Es decir que el analito migra a diferente velocidad ya sea que se encuentra dentro de ésta y a otra velocidad distinta si se encuentra en la solución.

Las CD retardan el coeficiente de distribución entre el líquido y la micela, lo que se traduce en una mejoría en la separación.

Las estructuras tridimensionales cónicas de las CD permiten la incorporación en el interior de la misma, de sustancias hidrofóbicas (fig. 30).

PARES IONICOS

Se emplean sales de tetra alquil aluminio que se producen la repulsión entre las micelas de SDS reduciendo la capacidad aniónica del analito.

UREA

La urea incrementa la solubilidad de compuestos hidrofóbicos en agua.

MODIFICADORES ORGANICOS

Suministran un aumento de la resolución y un cambio en la selectividad. Los más usados son el metanol, el 2-propanol y el acetonitrilo.

La revisión que antecede permite tener un panorama de las múltiples variantes de la electroforesis capilar y las aplicaciones a las áreas analíticas ya comentadas.



Figura 1. Migración de las partículas de sílice

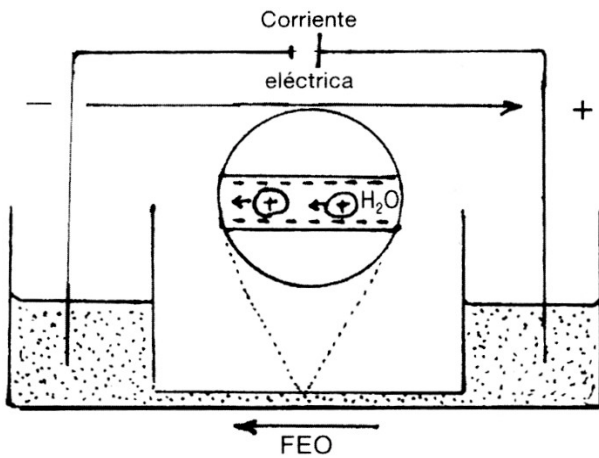


Figura 2. Fuerza electroosmótica

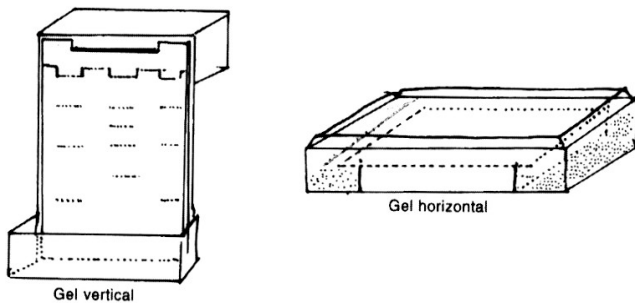


Figura 3. Distintos tipos de electroforesis



Figura 4. Comparación entre EC y HPLC

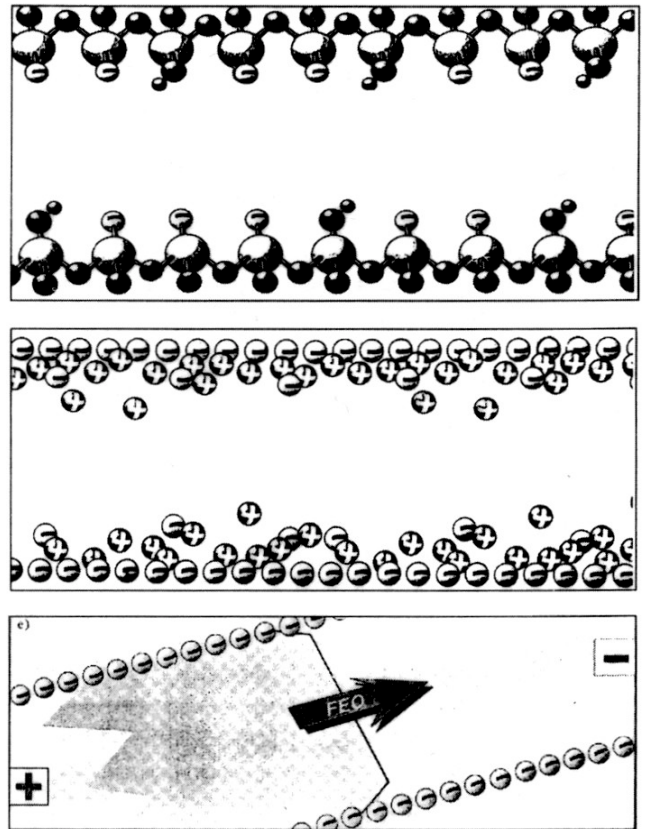


Figura 5. Desarrollo de flujo electroosmótico

a) Superficie de sílice fundida cargada negativamente (Si-O). b) Acumulación de cationes hidratados cerca de la superficie. c) Flujo de cargas hacia el cátodo luego de la aplicación de un campo eléctrico.

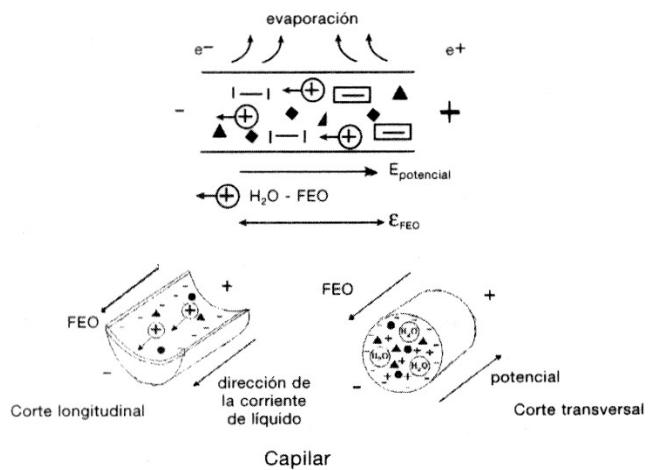


Figura 6. Polarización de las fibras de celulosa ante el paso de una corriente eléctrica

TABLA 1
Volúmenes inyectados para varios capilares

ΔP	50 μm	75 μm	100 μm
50 mbar	1,0 nL	5,2 nL	16,4 nL
75 mbar	1,5 nL	7,8 nL	24,6 nL
100 mbar	2,0 nL	10,4 nL	32,8 nL

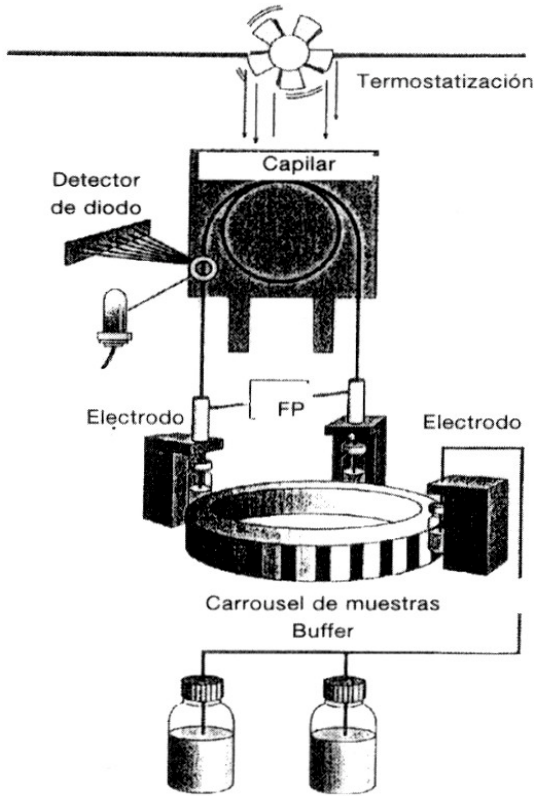


Figura 7. Esquema de un aparato de electroforesis capilar

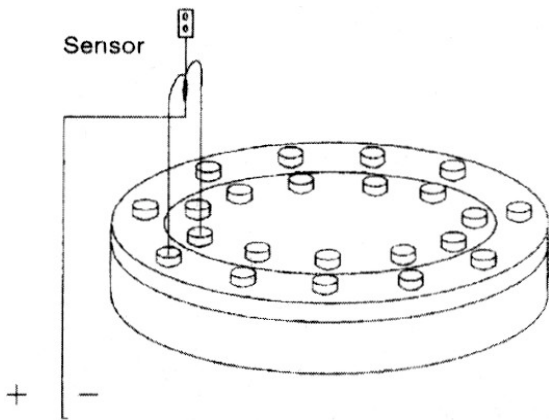


Figura 8. Carrousel para muestras en una EC

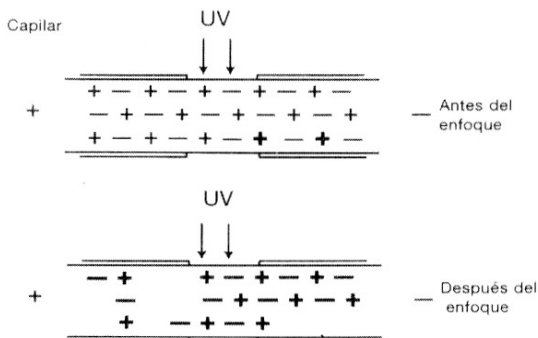


Figura 10. Enfoque de la muestra en la migración electroforética

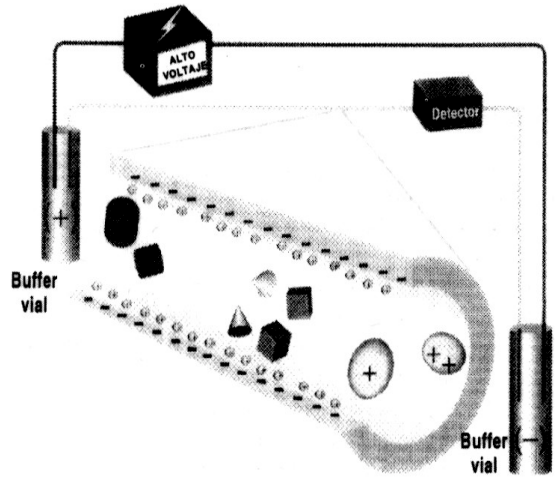


Figura 9. Representación del fenómeno de polarización del capilar, desplazamiento iónico y detección.

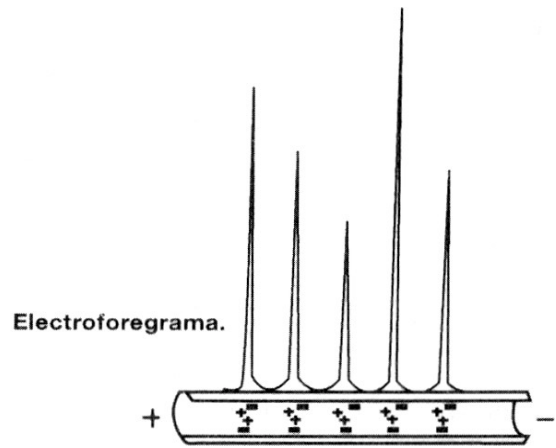


Figura 9 bis. Electroforegrama

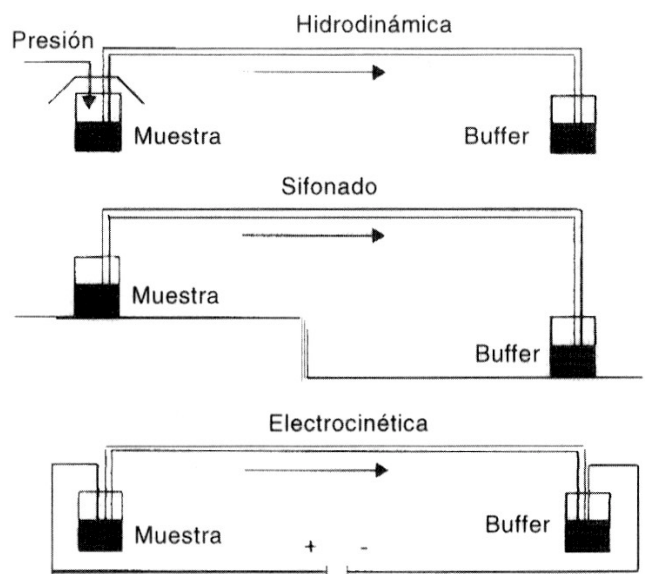


Figura 12. Diagrama de los tres métodos de introducción de muestras.

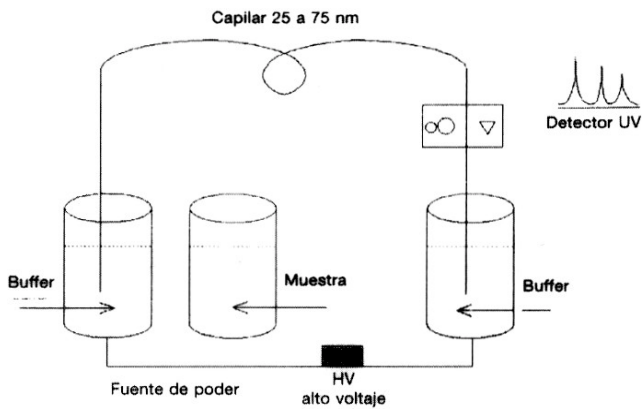


Figura 11. Condiciones experimentales.

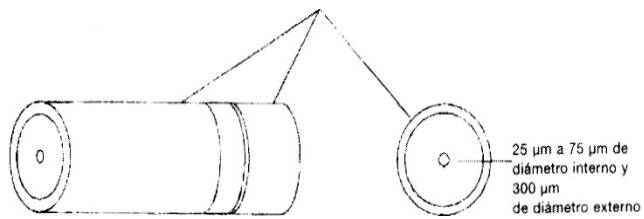


Figura 13. Esquema de un capilar.

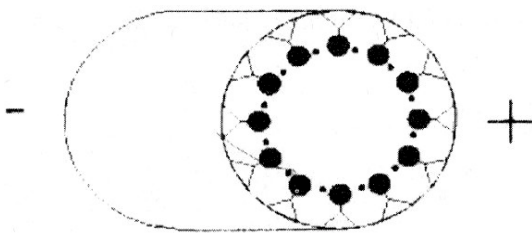


Figura 14. Corte de un capilar.

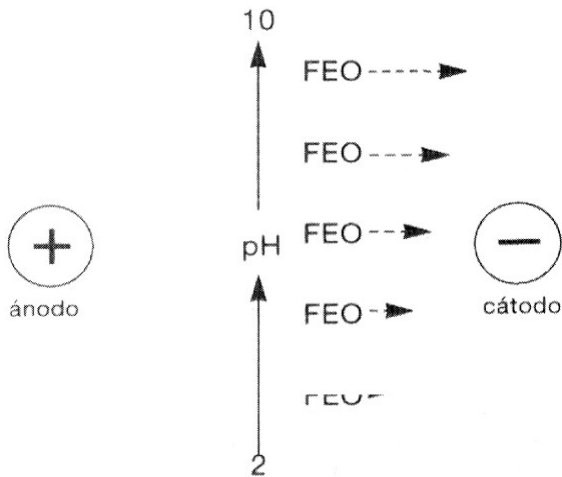


Figura 15. Electroosmosis.

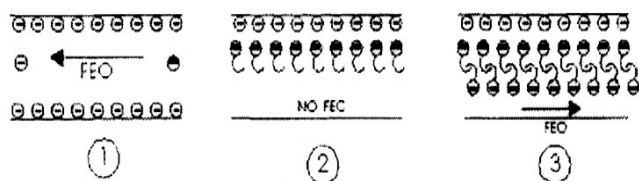


Figura S

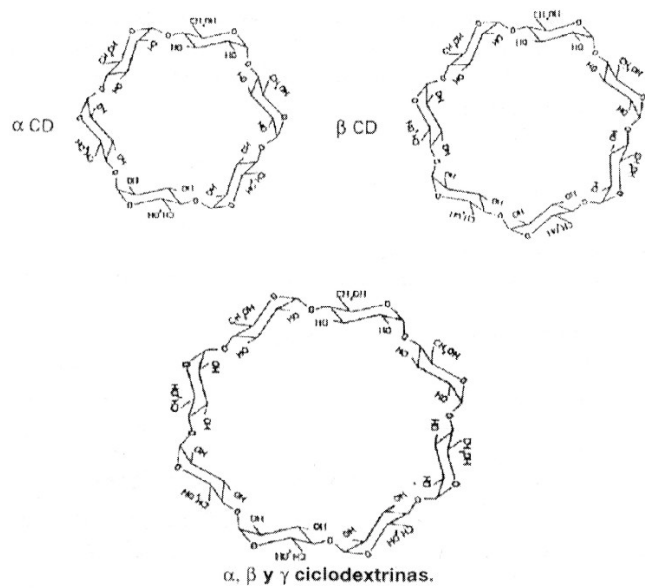


Figura 16. Su estructura les permite conformar una serie de complejos de inclusión con una gran variedad y cantidad de especies moleculares.

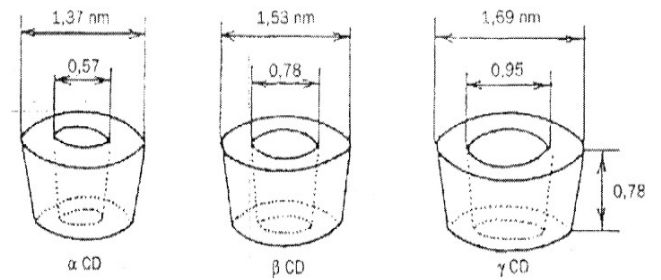


Figura 17. Dimensiones moleculares de las ciclodextrinas.

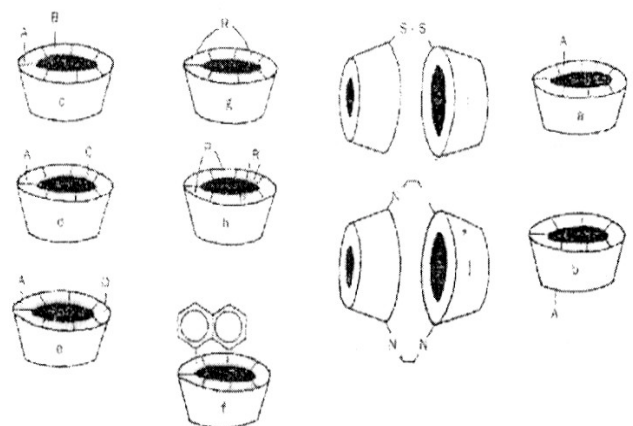


Figura 18. Estructuras de los derivados de las ciclodextrinas: a) monosustituido sobre el lado de los hidroxilos secundarios; b) monosustituido sobre el lado de los hidroxilos primarios; c) disustituidos A-B; d) disustituido A-C; e) disustituido A-D; f) anexo; g) coronado; h) donlamente coronado; i) doble con un puente; j) doble con dos puentes.

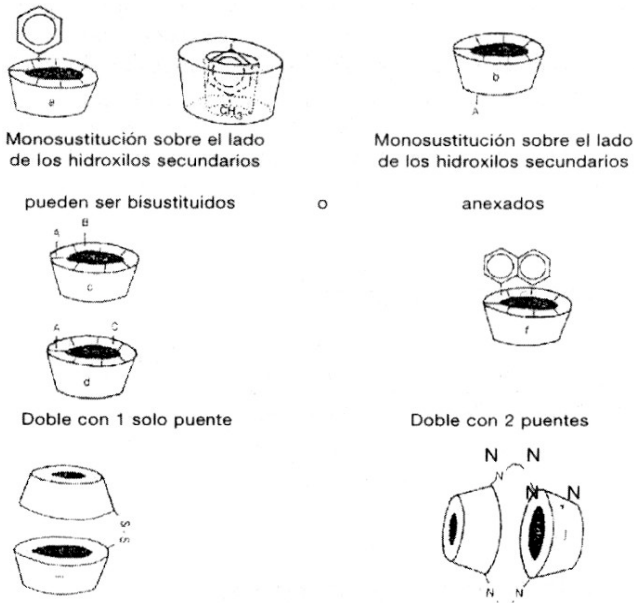


Figura 19. Estructura de los derivados de las CD.

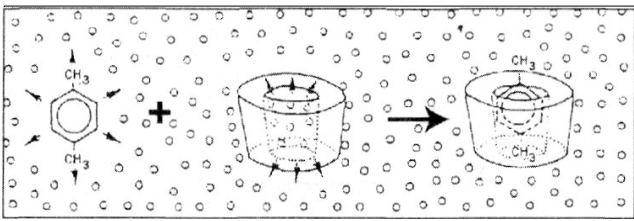


Figura 20. Interacción de las ciclodextrinas con las moléculas del solvente.

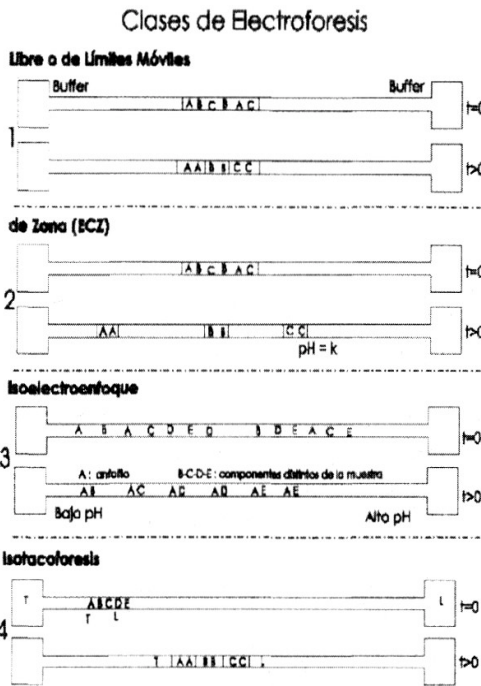


Figura 21. Distintos tipos de electroforesis capilar.

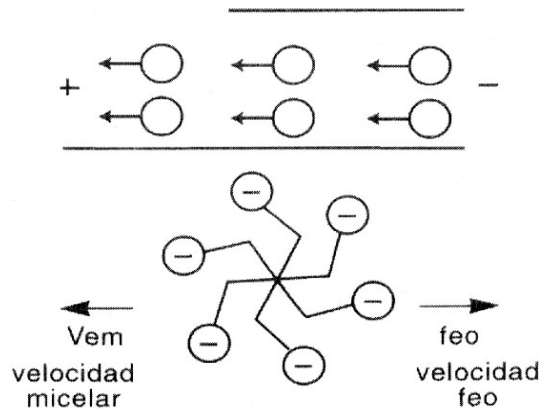


Figura 22. Micela en migración.

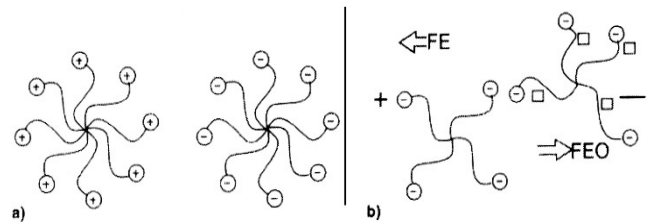


Figura 23. Interacción entre micelas y solutos neutros.

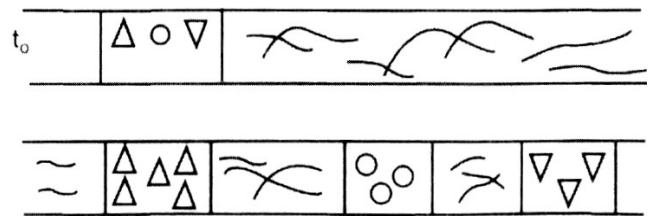


Figura 24. Principio de la EF de zona.

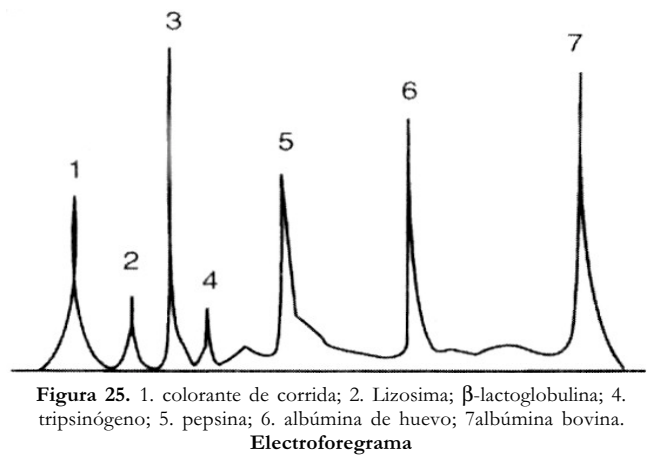


Figura 25. 1. colorante de corrida; 2. Lizosima; β-lactoglobulina; 4. tripsinógeno; 5. pepsina; 6. albúmina de huevo; 7 albúmina bovina.

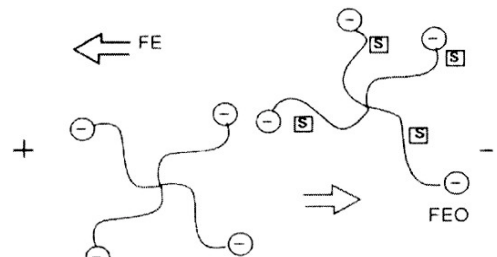


Figura 27. Micela y molécula del analito.

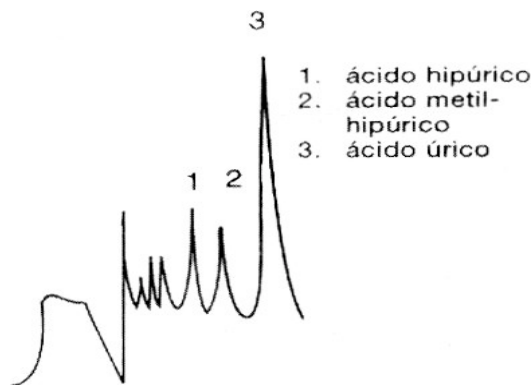


Figura 26. Separación por electroforesis capilar por isotocoforesis.

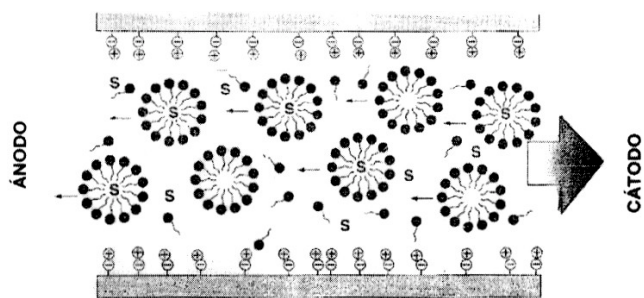


Figura 28. Esquema de una separación MEEC (S=muestra, por ej., drogas, vitaminas, compuestos quirales).

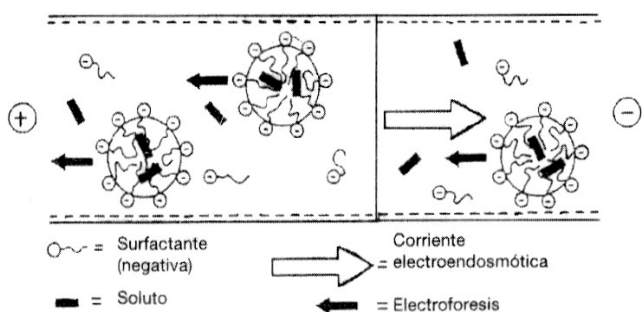


Figura 29. Ilustración esquemática del principio de separación MEEC.

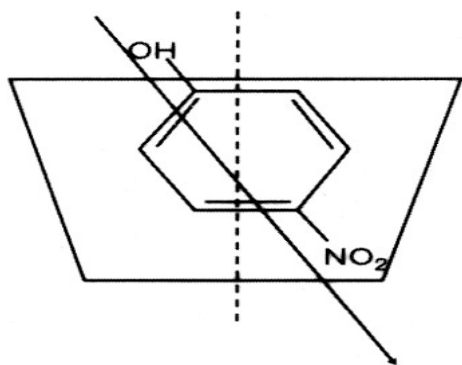


Figura 30. El gran momento dipolar calculado para la α -ciclodextrina tiene como consecuencia que el p-nitrofenol se inserte con su vector momento dipolar en sentido opuesto al de la molécula anfitriona.

EJEMPLO DE MECC Electrocromatografía micelar MEEC

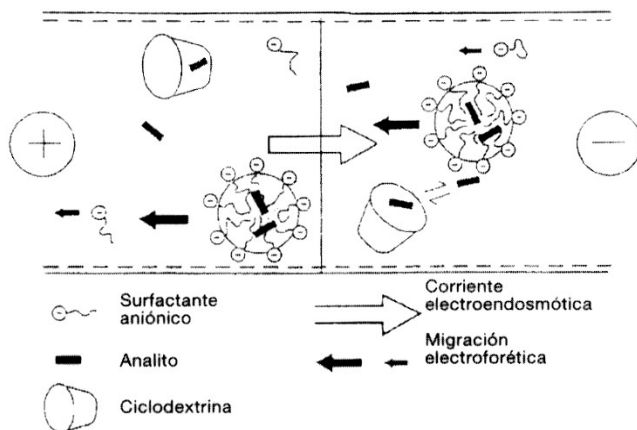


Figura 31. Principio esquemático de separación con ciclodextrina y micela.

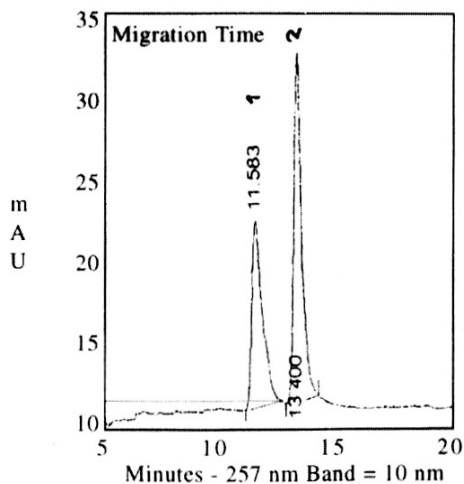


Figura 32.

pico 1: óxido metabolito
pico 2: clozapina

Buffer: 10% MeOH
90% SDS 150 M-fosfato de sodio 2,8 mM - borato de sodio 3,6 mM - pH9

capilar" sílica fundida 27 cm x 50 mm
20 °C
20 KV
5 seg inj (x presión 0,6 nL/seg)
0,2 mg/mL de cada componente

TABLA II
Distintos sistemas Buffers para Electroforesis Capilar

Nombre	pKa	Nombre	pKa
Fosfato	2,12 (pKa ₁)	TES	7,50
Citrato	3,06 (pKa ₁)	Hepes	7,55
Formato	3,75	Hepps	8,00
Succinato	4,19 (pKa ₁)	Tricina	8,15
Citrato	4,74 (pKa ₂)	Glicina amida	8,20
Succinato	5,57 (pKa ₂)	Hidroclorhídrico	
MES	6,15	glicilglicina	8,25
ADA	6,60	TRIS	8,30
BIS-TRIS	6,80	Bicine	8,35
propano			
Pipes	6,80	Morfolino	8,49
ACES	6,90	Borato	9,24
MOPSO	6,90	CHES	9,50
Imidazol	7,00	Chapso	9,60
MOPS	7,20	CAPS	10,40
Fosfato	7,21 (pKa ₂)	Fosfato	12,32 (pKa ₃)

TABLA III
CONDICIONES PARA OPTIMIZAR LA FEO Y LA MOVILIDAD DE LOS SOLUTOS

<i>Variable</i>	<i>Resultado</i>	<i>Observaciones</i>
Campo eléctrico	FEO proporcional al cambio	Eficiencia aumenta al incrementar la FEO. El calentamiento por efecto Joule puede modificar y dañar la separación.
pH buffer	pH aumenta → FEO aumenta pH disminuye → FEO disminuye	Puede modificar la carga o la estructura del soluto. Es el mejor método para modificar la FEO
Fuerza iónica o la concentración del buffer	Disminuye el potencial zeta y se incrementa la FEO	Elevada fuerza iónica genera elevada corriente y posible calentamiento por efecto Joule. Baja fuerza iónica, problemática absorción por la muestra. Puede distorsionar el ancho de los picos. Puede generar conductividad distinta en la muestra. Se reduce el condensado (stacking) de la muestra.
Temperatura	Cambia la viscosidad 2 a 3% por °C	Es importante mantener controlada la temperatura
Modificaciones orgánicas	Cambia el potencia zeta y la viscosidad usualmente disminuye la FEO	Cambios complejos, determinables experimentalmente. Se puede alterar la selectividad.
Surfactante	Solución hidrofóbica se adsorbe a la pared del capilar por acción intrínseca	Surfactantes aniónicos aumentan la FEO. Surfactantes catiónicos pueden disminuir o invertir la FEO. Puede alterar significativamente la FEO.
Polímeros hidrofóbicos neutros	Existen interacciones hidrofóbicas en la pared del capilar	Disminuye la FEO por cambio e incremento de la viscosidad.
Cubiertas covalentes	Unión química con la pared capilar	Pueden generarse muchas modificaciones posibles. La estabilidad puede ser problemática.

TABLA IV
Buffers más comunes para Electroforesis Capilar

Buffers	Rango de pH zwitteriónicos	Buffers	Rango de pH
Fosfato	1,14-3,14	Mes	5,15-7,15
Acetato	3,76-5,76	Pipes	5,80-7,80
Fosfato	6,20-8,20	Hepes	6,55-8,55
Borato	8,14-10,14	Tricina	7,15-9-15
		Tris	7,39-9,30

TABLA VI
Aditivos para Electroforesis de Zona

Aditivos	Función
Sales inorgánicas	Cambio conformacional proteico.
Solventes inorgánicos	Solubilizan y modifican la corriente endosmótica.
Urea	Desnaturaliza oligonucleóticos y solubiliza proteínas.
Ácido sulfónico	Relaciona agentes iónicos e hidrofóbicos
Surfactantes catiónicos	Producen el cambio reverso en la pared capilar
Derivados de la celulosa	Reducen la corriente electroendosmótica y actúa como tamizador.
Aminas	Cubren los grupos silanol

TABLA VII

Algunas propiedades de las Ciclodextrinas

<i>Tipo de ciclodextrina</i>	<i>Alfa</i>	<i>Beta</i>	<i>Gamma</i>
Nº de glucopiranosas	6	7	8
Peso molecular	973	1135	1297
Diámetro interno (nm)	0,47-0,52	0,60-0,64	0,75-0,83
Profundidad (nm)	0,79-0,80	0,79-0,80	0,79-0,80
Rotación específica [alfa] 25 D	150,5	162,5	177,4
Punto de ebullición (k)	551	572	540
Solubilidad en H ₂ O (g/100 mL a 25 °C)	14,5	185	23,2

TABLA V
Distintos Sistemas Buffers

	<i>Acción</i>	<i>Observaciones</i>
Aniónicos (SDS) (dodecil sulfato de sodio)	Desactiva la superficie del capilar a través de interacción iónica e hidrofóbica	Amplia variedad de surfactantes. Fáciles de usar. Por encima de CMC* en MEKC.
Catiónicos (CTAB) (bromuro de ceil-trimetil-amonio)		Disminuye FEO o la invierte. Puede desnaturalizar totalmente las proteínas.
No iónico (BRIS) Eteres de polietileno		
Zwitteriónico (CHAPS)		Puede ser usado en conjunto con fase reversa
3[(3-cholamidopropil)- dimetilamonio] 1 propano sulfanato aminas cuaternarias	Disminuye o revierte FEO	También actúan formando pares iónicos.
*concentración micelar mínima		

TABLA VIII
Clases de surfactantes y propiedades

<i>Surfactante</i>	<i>Tipo</i>	<i>CMC</i>	<i>Agregación</i>	
SDS	Aniónico	$8,1 \times 10^{-3}$	62	SDS: dodecil sulfato de sodio
CTAB	Catiónico	$9,2 \times 10^{-4}$	170	CTAB: bromuro de cetilmetil amonio
BRIJ – 35	No iónico	$1,0 \times 10^{-4}$	40	BRIJ 35: polioxitileno – 23- lauril éter
Sulfobetaína	Zwitteriónico	$3,3 \times 10^{-3}$	55	Sulfobetaína: N – dodecil - N–N dimetil amonio 3-propano 1-sulfónico ácido

TABLA IX
Polimeros de la EC en GEL

<i>Polímero</i>	<i>Concentración</i>	<i>Aplicación</i>
Entrecruzados	2,6% T, 3-6 C	Oligonucleótidos. Secuencia DNA
Lineales. Poliacrilamina	<0,1-6%	Fragmentos de restricción
Hidroxi alquil celulosa dextrano	6-15/%	Oligonucleótidos. Secuencia DNA, Proteínas
Agarosa	0,05-1,20%	Fragmentos de restricción. Proteínas

BIBLIOGRAFIA

1. Reuss F.F. Mem. Soc. Imper, Natural, Moscow, 2 (1809). Citado por Ribeiro L.P., Mitidiori E., Affonso O.R. *Paper electroforesis*, p1. Cita 2291. Elsevier Publishing Company 1961.
2. Tiselius A. *Trans. Faraday Soc.*, 33 (1937) 524
3. Tiselius A. *Abst. 12th Intern. Congr. Pure Appl. Chem.*, New York, September 1951, p. 67.
4. Chrambach A. *The Practice of Quantitative Gel Electrophoresis* Weinheim; Deerfield, Beach, FL, VCH 1985.
5. Heiger D. *Hewlett Packard. High Performance Capillary Electrophoresis*. (An Introduction) – France 1992 – No. 12-5001-6199-E – Prólogo J. Jorgensen, USA.
6. Lukacs K.D., Jorgenson J. W. Capillary Zone Electrophoresis. "Effect of physical parameters on separation efficiency and quantitation" *J. High. Res. Chromatogr.* 1985, 8, 407-411.
7. Castagnino J.M. *Electroforesis en papel. Aplicaciones Biológicas y Clínicas*. Eudeba, 1980.
8. "An Introduction to Capillary Electrophoresis". *Bio Rad laboratory Bulletin*. 1701, US/EG- Pag. 1-6
9. Heiger D. High Performance Capillary Electrophoresis an Introduction. *Hewlett Packard. CMBH*. Pag. 45-46. 1992
10. -14. Castro E.A., Barbiric J.D. "Estudios teóricos de las ciclodextrinas y sus complejos de inclusión". *An. Soc. Cient. Arg.* 227, 93-111, 1997.
15. Mc. Manigill D., Swedberg S.A. "Factors affecting plate height in high performance zonal capillary electrophoresis". *Tech in protein Chem.* T. Hugel ed. Academic Press: San Diego 1989, 468-477.
16. Cramabach A. "Advances methods in the biological Sciences". *The practice of Quantitative gel electrophoresis*. VCH 1985.
17. Svensson H. "Isoelectric fractionation, analysis and characterization of ampholytes in natural pH gradients". *Acta Chem. Scad.* 16 (1962) 546-466.
18. Evaerest F.M., Beckers J.L., Verheggen E.M. *Isotachophoresis, theory, instrumentation and applications*. Elsevier Publishing Company. 1976.
19. Evaerest F.M. *Analytical Simposia Serie. Analytical Isotachophoresis*. Elsevier Publishing Company. 1980.
20. Analytical Chemistry Simposia Series. *Biochemical and biological applications of isotachophoresis. Proceedings of the First International Symposium*. Baconfoy, 1979. Elsevier Publishing Company. 1979.
21. Brown P. Col. *Advances in chromatography*. Vol. 36. Capillary Electrophoresis of Protein. Cap. 6-7-8-9.
22. Antonis y Brown. *Chiral Advances and Chromatography*. p 426, Marcel Dekker Inc. (1997). An introduction to chiral analysis by capillary electrophoresis. Salvatore Fassoli. Instituto di Cromatografia del Consiglio Nazionale dell' Ricerche. Pag. 13-14-15. PO. Box 1000016, Monterorondo Scala (Roma, Italy).
23. Fassoli S. Chiral Separation by Capillary electrophoresis 15, 753 (1994) "Electrokinetic Chromatography: an interface between electrophoresis and chromatography" *Trends Anal Chem.* 1989, 8, 129-134.
24. Schwartz H., Pritchett T. Micelar electrokinetic Capillary Chromatography of illicit drug sustance. *Anal Chem.* 1991. 63, 823-827. Separation of proteins and peptides: Application to Analytical Biotechnology Copyright 1994. Beckman Instruments, USA. 727. 484.
25. Schmidt, V. Hagmaiz y F. Bruchelt. Determination of urinary oxalato: concentration by analytical isotachophoresis. p. 117. *Biochemical and biological applications of isotachophoresis. Analytical Chemistry Simposia Serie*. Elsevier Scientific Publishing Company.
26. Oerlemans, verheggen, F, Mikkers, Everaerts and Bruyn de C. Isotachophoresis Separation serum purines and pyrimidines. *Biochemical and biological applications of isotachophoresis*. p.63, Analytical Chemistry Simposia Serie. Elsevier Scientific Publishing Company. 1980.
27. Zimmerman, A. Baldesten, J. Bereström anc Fürst. Isotachophoresis separations of middle molecule peptides in uremic body fluids. *Biochemical and biological applications of isotachophoresis*. p. 141. Analytical Serie. Elsevier Scientific Publishing Company. 1980.
28. Reinoud N. J., Ijaden U.R., van der Greef J. Automated on Capillary Isotachophoresis reaction cell for fluorescence derivation of small sample volume at Ioe concentrations followed by capillary zone electrophoresis. *J.C. Cromatogr.* 673 (1994) 225-266.
29. Nesse A., Castagnino J.M. Fraccionamiento de aminoácidos empleando electroforesis por alto voltaje (EAV). *Bioquímica Clínica*. Vol. 2 (1971).
30. *Manual del Usuario Hardware P / ACE 5000 Serie*. Beckman.
31. *Manual del Usuario Software P/ ACE 5000 Serie*. Beckman (Programa Gold).
32. *The diode-arry advantage in UV / Visible spectroscopy*. Hewlett Packard, 1994.
33. *Apuntes del III Simposio latinoamericano de Electroforesis Capilar*.
34. Weinberg R. *Practical Capillary Electrophoresis*. Academic Press. 1993.
35. *Electroforesis capilar de Alta Performance* Hewlett Packard Argentina.
36. Chan K, Janini G., Mushik G., Isaaq H. Micelar electrokinetic chromatography of hidroxiloprine and other secondary aminoacids in biological samples with laser-induced fluorescence detection. *Journal of chromatography*, 622 (1993) 269-273.
37. Guzmán N. Et all. New approaches in Clinical Chemistry: on line analyte concentration and microreaction capillary electrophoresis for the determination of drugs, metabolic intermediates and biopolymers in biological fluids. *Journal of chromatography B*, 697 (1997) 37-66
38. Jenkins M., Guerin M. Capillary eectrophoresis as a clinical tool. *Journal of chromatography B*, 682 (1996) 23-34.
39. Jorgenson J. De Arman Lukas K. Capillary Zone Electrophoresis. *Science*, 222 (1993) 266-272.
40. *Separation of Chiral Amino Acids and Peptides by CE Using P/ ACE 2000*. Beckman, 1989.
41. *Enantiomeric Analysis of Primary and Secondary Amines by Fully Automated derivatization on a P/ACE System with LIF Detection*. Beckman, 1993.
42. Guzmán N. et all. A Quantitative Assay for the Determination of Proline and Hydroxiproline by Capillary Electrophoresis. *Journal of liquid Chromatography*, 15 (1992) 1163-1172