



De la Electroforesis en Papel de Filtro a la Electroforesis Capilar

Dra. Irene Julia Aranda
Directora Técnica
BG Analizadores S.A.

La electroforesis ha sido definida como el movimiento de iones, sustancias neutras o migración pasiva por atracción o repulsión en un campo eléctrico.

El empleo de capilares para la separación de sustancias neutras o iones cargados eléctricamente apareció en 1967, a través de la experiencia de Hgerten empleando capilares milimétricos. Pero recién en 1980 Jorgenson y Lukacs, utilizando capilares de sílica de 75 micrones de diámetro lanzaron la Electroforesis Capilar (EC) como se utiliza actualmente.

Al comienzo de la utilización de la técnica electroforética, la misma se efectuaba sobre papel de filtro cuyas fibras de celulosa se embebían en una solución buffer, la que por su composición química al paso de una corriente eléctrica se polarizaba negativamente, mientras el agua se cargaba positivamente y migraba en sentido opuesto a la dirección de migración de la corriente.

Si consideramos un capilar de sílice, el fenómeno es muy similar, pero la evaporación es nula por encontrarse la sustancia contenida dentro del capilar.

Debido al pasaje de corriente eléctrica, en la pared del capilar se produce una carga negativa sobre la misma, 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 en fuerza electroosmótica, que es equivalente a la obtenida por acción de la bomba de vacío en HPLC.

La electroforesis capilar es una técnica alternativa de la electroforesis convencional y surge debido a que la velocidad de separación y resolución de los compuestos mejora a medida que aumenta el campo eléctrico aplicado. A pesar de esta mejora, el potencial no aumenta, aún sabiendo que existe una dependencia directa de éste con el campo eléctrico. Esto se debe a

que el calentamiento por efecto Joule se incrementa hasta afectar la calidad de la separación. Por tal motivo, y para solucionar esta dificultad, se realiza la electroforesis en un tubo capilar con un diámetro interno inferior a 0,1 mm y una longitud de 50 cm a 1 m, llegando estas medidas en los equipos de última generación a 25 micrones de diámetro y 14 cm de longitud. Esta técnica está representada en el siguiente esquema:



El mecanismo de separación está basado en las relaciones carga / masa de los analitos. Su utilidad está en la separación de proteínas y péptidos entre otras sustancias.

Entre las ventajas que ofrece la electroforesis capilar se puede citar las excelentes separaciones con volúmenes de muestra extraordinariamente pequeños (de 0,1 a 10 nL), en contraste con la electroforesis convencional en la cual se emplean volúmenes de muestra en el orden de los μL , con una elevada resolución y rapidez. Ofrece además, mayor facilidad y velocidad que la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

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

Podemos diferenciar varios tipos de electroforesis capilar:



- La electroforesis capilar en gel combina la técnica de electroforesis con la cromatografía de reparto. Permite la separación en función de la migración electroforética y también en función del peso molecular de las muestras. Se lleva a cabo en una matriz polimérica con estructura de gel poroso, cuyos poros contienen una mezcla tampón donde ocurre la separación. Estos geles están contenidos en un tubo capilar. Los geles utilizados son también de agarosa y poliacrilamida.
- Electroforesis capilar de zona: es una de las técnicas más importantes y más utilizada debido, probablemente, a su simplicidad y elevado poder de separación. Está basada en la separación de los analitos según la relación carga / tamaño. En esta técnica la composición del tampón es constante en toda la zona de separación. El potencial aplicado hace que los diferentes componentes iónicos de la mezcla migren cada uno según su propia movilidad y se separen en zonas que puedan estar completamente resueltas o parcialmente solapadas. Entre las zonas completamente resueltas hay huecos ocupados por el tampón.

La isotacoforesis significa electroforesis a velocidad uniforme. Esto significa que el tiempo de

recorrido en el capilar bajo condiciones isotacoforéticas es independiente de la velocidad. Es una técnica de separación por desplazamiento. Antes de iniciar la corrida, el capilar se debe llenar con un electrolito guía en un extremo. Este debe tener una gran movilidad y debe ser mayor que la de los componentes a separar. Luego se introduce la muestra seguida del electrolito terminal o cola, cuya movilidad debe ser menor que cualquiera de los componentes de la muestra. La selección de los electrolitos guías y terminales depende del conocimiento de los valores de las movilidades y del pKa para todos los componentes de la muestra.

En la isotacoforesis, las bandas siempre están en contacto con la zona adyacente. Esta característica es necesaria para mantener la continuidad eléctrica a lo largo del sistema, dado que no hay un electrolito de soporte.

Esta técnica puede ser utilizada para determinar cationes y aniones. Se requiere usualmente corridas separadas para determinar cada forma iónica.

A través de equipamiento de última tecnología, por la técnica de electroforesis capilar pueden realizarse automáticamente todas las etapas de la electroforesis desde el tubo primario hasta la obtención del perfil electroforético: identificación de muestras, dilución, lavado de los capilares, migración, detección, edición de los resultados y transmisión informatizada de los datos obtenidos.