

## IMPLEMENTAÇÃO DE UM SISTEMA DE ELETROFORESE CAPILAR COM DETECÇÃO DE FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER

Marcia R. Santos, Marina F. M. Tavares

Instituto de Química - Universidade de São Paulo - Av. Prof. Lineu Prestes, 748 - 05580-901 - São Paulo - SP

Joel C. Rubim\*

Instituto de Química da Universidade de Brasília - CP 04478 - 70919-970 - Brasília - DF

Recebido em 9/2/99; aceito em 12/4/00

**DEVELOPMENT OF A LASER INDUCED FLUORESCENCE DETECTION SCHEME FOR CAPILLARY ELECTROPHORESIS.** A capillary electrophoresis system using laser induced fluorescence detection is described. A Raman system equipped with a microscope has been used to focus the laser beam on the capillary giving a lateral resolution of 1.5 mm. The fluorescence signal of the analyte (ZnPcTS - tetrasulfonated zinc-phthalocyanine) was collected by the microscope objectives and analysed by a monochromator with confocal characteristics equipped with a CCD detector. Electropherograms obtained with this system were compared to those obtained on a commercial instrument, showing that the described system presents a lower detection limit and better resolution.

**Keywords:** capillary electrophoresis; laser induced fluorescence detection; sulfonated Zn phthalocyanine.

### INTRODUÇÃO

A eletroforese, método de separação de moléculas carregadas sob a influência de um campo elétrico, é um processo que tem sido extensivamente utilizado, principalmente no campo da bioquímica, desde a década de 30. A remodelação desta técnica para o formato capilar introduziu inúmeras vantagens no que diz respeito à injeção e detecção em linha, aumento de resolução e eficiência.

A eletroforese capilar é uma técnica relativamente nova, foi primeiro idealizada por Hjertén<sup>1</sup> em 1967. Os primeiros trabalhos publicados datam da década de 70, entretanto, a primeira análise desenvolvida com sucesso foi publicada por Everaerts e seus colaboradores em 1979<sup>2</sup>, seguida de Jorgenson e Lukacs<sup>3</sup> em 1981. A partir de então, vem sendo utilizada por um número cada vez maior de pesquisadores na área da química<sup>4</sup>, bioquímica<sup>5</sup>, ciência forense<sup>6</sup>, laboratórios clínicos<sup>7</sup>, indústrias farmacêuticas<sup>8</sup> etc., confirmando a importância e aceitação desta potente ferramenta analítica.

Eletroforese capilar, na verdade, não é uma única técnica isolada, ela deve ser encarada como uma família de técnicas fundamentadas no mesmo princípio de migração sob ação de um campo elétrico, mas com mecanismos de separação diferentes.

Atualmente são 6 os membros da família da eletroforese capilar<sup>9</sup>:

1. Eletroforese capilar de zona ou solução livre que é a mais difundida (CZE) ou simplesmente CE;
2. Cromatografia eletrocínica micelar (MECC);
3. Eletroforese capilar por focalização isoeletrica (CIEF);
4. Eletroforese capilar de gel (CGE);
5. Isotacoforese (CITP);
6. Eletrocromatografia (CEC).

O universo de aplicações da eletroforese capilar tem se mostrado em crescimento exponencial, pois várias classes de compostos são passíveis de serem analisados. Podem ser estudados desde simples íons inorgânicos e orgânicos<sup>9,10</sup>, até ácidos nucleicos<sup>11</sup>, proteínas<sup>12</sup> e células<sup>13</sup>.

Uma das grandes versatilidades da eletroforese capilar é a possibilidade da utilização de uma ampla gama de detectores. Na eletroforese capilar estão disponíveis detectores que são, basicamente, a adaptação dos detectores utilizados nos equipamentos de

cromatografia em meio líquido para o formato capilar, e correspondente tempo rápido de resposta. Tais detectores podem ser: de absorção no UV-vis<sup>14</sup>, fluorescência<sup>15</sup>, fluorescência induzida por laser<sup>16</sup>, espectrometria de massas<sup>17</sup>, condutividade<sup>18</sup>, amperometria<sup>19</sup>, radioatividade<sup>20</sup>, índice de refração<sup>21</sup>, difrção circular<sup>22</sup> e Raman<sup>23</sup>.

A escolha do detector depende quase que exclusivamente das propriedades do soluto em questão e da faixa de concentração contemplada. A tabela abaixo mostra os limites de detecção típicos encontrados para diversos detectores<sup>24</sup>.

DETECTOR	LOD (mol.L <sup>-1</sup> )
absorção no UV-vis	10 <sup>-5</sup> - 10 <sup>-8</sup>
fluorescência direta (lâmpada)	10 <sup>-7</sup> - 10 <sup>-9</sup>
fluorescência induzida por laser	10 <sup>-14</sup> - 10 <sup>-16</sup>
amperometria	10 <sup>-8</sup> - 10 <sup>-9</sup>
Raman	10 <sup>-6</sup> - 10 <sup>-7</sup>
espectrometria de massas	10 <sup>-4</sup> - 10 <sup>-9</sup>
índice de refração	10 <sup>-5</sup> - 10 <sup>-6</sup>
condutividade	10 <sup>-5</sup> - 10 <sup>-6</sup>

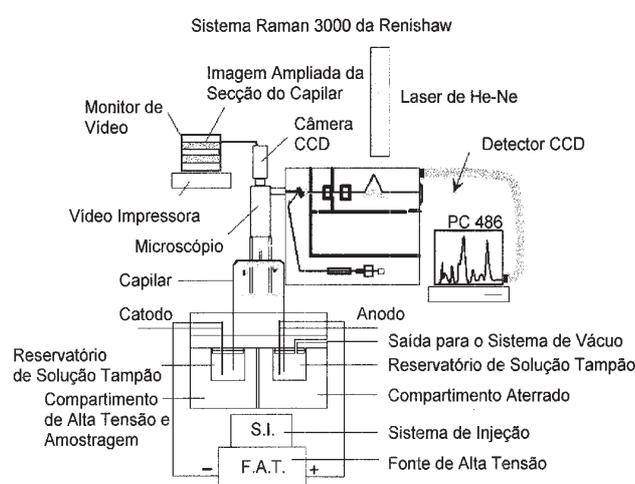
A detecção também pode ser feita de várias formas<sup>25</sup>: em linha e no final do capilar. A detecção em linha é feita enquanto o soluto ainda migra dentro do capilar, como é o caso da absorção UV-vis, fluorescência, fluorescência induzida por laser e Raman. Detecção no final do capilar, como o próprio nome sugere, o detector é posicionado no final da coluna; este método apresenta a desvantagem do alargamento da banda enquanto os solutos separados são levados ao detector. Este é o caso da espectrometria de massas onde o soluto é carregado ao espectrômetro de massas através de uma agulha<sup>25</sup>.

Este trabalho descreve a implementação de um sistema de eletroforese capilar acoplado a um sistema Raman, adaptado para detecção de fluorescência induzida por laser. No equipamento implementado, o detector empregado é do tipo dispositivo de carga acoplada (CCD). Fisicamente, o CCD é uma matriz de elementos sensíveis à luz. O dispositivo CCD é conhecido por alcançar ruídos de leitura ultra baixos, conferindo

grande sensibilidade e definição na geração de uma imagem. O presente trabalho tem como objetivo descrever os principais componentes do sistema e suas funções, comparar seu desempenho com o de um aparelho comercial e discutir a relação custo/benefício da implementação de tal sistema.

## PARTE EXPERIMENTAL

O equipamento implementado no laboratório está esquematizado na Fig. 1 e teve o seu formato inspirado em equipamentos disponíveis comercialmente. A instrumentação é simples e, como qualquer equipamento de eletroforese capilar, consiste basicamente dos seguintes componentes: dois reservatórios para eletrólitos, preenchidos geralmente por uma solução tamponada, o capilar (o canal onde ocorrerá a migração), uma fonte de alta tensão e um detector posicionado em linha. Em cada reservatório são imersas as extremidades do capilar que também é preenchido com a mesma solução condutora para fechar o contato elétrico.



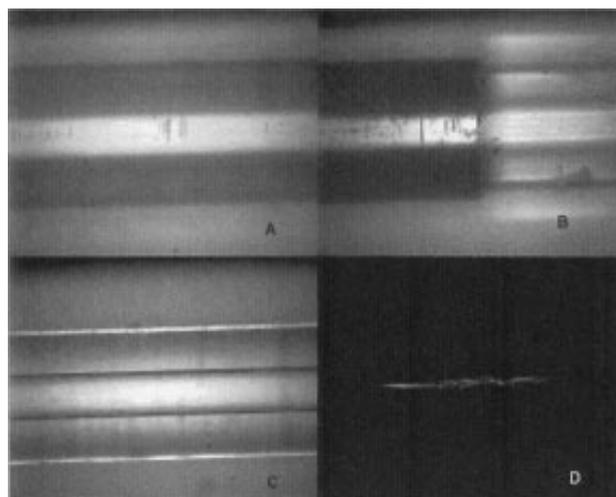
**Figura 1.** Esquema do sistema CE implementado no laboratório, em conexão ao espectrômetro Raman.

A caixa de alta tensão (Fig.1) é feita em acrílico para proteção do operador contra choques. Quando a mesma é aberta a alimentação de alta tensão é cortada imediatamente. A caixa foi construída com uma conexão para um sistema de vácuo, o qual é empregado no condicionamento do capilar, como será discutido oportunamente.

A fonte de alta tensão utilizada neste equipamento é modelo EH50RQ.19XM6, da Glassman High Voltage Inc. Esta fonte tem dupla polaridade e opera de 0 a 50 kV, o limite de corrente alcançado pela fonte chega a 190  $\mu$ A.

Os capilares utilizados são de sílica fundida da Polymicro Technologies Inc. e são revestidos externamente por uma camada de poliimida, o que lhes conferem resistência mecânica. O capilar possui as seguintes dimensões: 75  $\mu$ m de diâmetro interno, e 83,5 cm de comprimento total sendo 40,5 cm até o detector, neste ponto uma janela foi aberta no capilar através da queima do revestimento de poliimida, uma vez que este polímero, não sendo transparente, não permite a detecção da fluorescência emitida pela amostra. A Fig. 2 mostra a imagem do capilar com (a) e sem (c) o revestimento de poliimida, a região de queima (b) e a imagem do laser focalizado no diâmetro interno do capilar (d).

Para este sistema, foi empregado o seguinte método para lavagem e condicionamento de capilar: lavagem com uma solução de HNO<sub>3</sub> (50%, v/v) por 3 minutos, água por 6 minutos, NaOH (1,0 mol.L<sup>-1</sup>) por 3 minutos, novamente água por 6 minutos e finalmente uma lavagem com a solução eletrolítica de tampão citrato 0,100 mol.L<sup>-1</sup> por 20 minutos.



**Figura 2.** Foto do capilar obtida através de uma vídeo câmera acoplada ao microscópio. A. região do capilar revestida com poliimida; B. região do capilar onde ocorreu a queima do revestimento polimérico; C. região do capilar sem o revestimento polimérico; D. imagem da luz do laser no diâmetro interno do capilar.

A solução eletrolítica utilizada para as corridas era uma solução tampão 0,100 mol.L<sup>-1</sup> de citrato a um pH 2,5. A ftalocianina de zinco tetrassulfonada (ZnPcTS) de procedência Porphyrin, foi utilizada sem purificação prévia. As soluções de 10<sup>-4</sup> a 10<sup>-11</sup> mol.L<sup>-1</sup> de ZnPcTS foram obtidas por diluição de uma solução estoque de 10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup>.

O equipamento Raman utilizado como detector é um modelo 3000 da Renishaw dotado de uma câmera CCD (Dispositivo de Carga Acoplada) refrigerada a -70°C por efeito Peltier. A focalização da radiação laser dentro do diâmetro interno do capilar foi feita com o auxílio de um microscópio Olympus (modelo BTH2) equipado com uma objetiva (ampliação 80x). A radiação excitante utilizada foi a linha 632,8 nm de um laser de He-Ne refrigerado a ar, modelo 120 da Spectra Physics. O diâmetro do feixe laser no foco é de ca. 1,5  $\mu$ m. A potência do laser na amostra era menor que 50  $\mu$ W, ajustada de modo a evitar a fotodecomposição.

O equipamento comercial da Beckman utilizado para comparação com o sistema implementado foi o modelo 5510 P/ACE, dotado de 2 tipos intercambiáveis de detectores: uma matriz de fotodiodos para detecção na região do ultravioleta e visível, cuja fonte é uma lâmpada de deutério e uma fotomultiplicadora para detecção por fluorescência induzida por laser (LIF). Para este tipo de detector, a fonte é um laser (de semiconductor emitindo em 635 nm) que é levado à fotomultiplicadora por uma fibra óptica.

A injeção de amostra, na eletroforese capilar, pode ser feita de três formas: hidrodinâmica, por pressão negativa ou positiva, sifonagem e eletrocínética. A injeção hidrodinâmica é feita aplicando-se pressão pela introdução de um gás inerte no reservatório contendo a amostra ou pela aplicação de vácuo no reservatório que contém a solução tampão na outra extremidade do capilar. A injeção por sifonagem é feita pelo deslocamento de líquido provocado pela diferença de altura dos reservatórios de amostra e tampão. A injeção eletrocínética, por sua vez, é feita pela aplicação de um potencial, geralmente entre 5 e 15 kV, por alguns segundos. Este método de injeção é discriminatório já que a amostra injetada dependerá da relação carga/massa dos solutos presentes, diferentemente do que é observado nas injeções hidrodinâmicas, onde ocorre uma simples transferência de volume. No equipamento ora descrito, o sistema de injeção é unicamente eletrocínético.

A injeção é um fator bastante crítico num sistema eletroforético, pois afeta a resolução dos picos e, principalmente, a

reprodutibilidade dos tempos de migração. No sistema implementado se fez necessário o desenvolvimento de um dispositivo eletrônico para regular a injeção da amostra, atuando sobre a fonte de alta tensão, selecionando a tensão aplicada e o tempo de duração de cada injeção. A Figura 3 ilustra o circuito eletrônico desse dispositivo e as respectivas saídas conectadas à fonte de alta tensão. O circuito possui três comandos: 1) controlador do tempo de injeção, 2) controlador da tensão de injeção e 3) controlador da fonte. O controlador do tempo de injeção possui 3 posições pré-estabelecidas, 1 s, 5 s e 10 s, que combinados entre si podem aplicar a tensão pelo tempo adequado e desejado pelo operador. O controlador da fonte também possui 3 posições: repouso, corrida, e injeção. Na posição repouso, o circuito não permite a aplicação de potenciais, na posição corrida, a fonte está habilitada e pode-se aplicar a tensão selecionada no seu painel frontal. Finalmente, na posição injeção, o circuito aplica, através do gatilho, a tensão selecionada no controlador da tensão, no tempo estabelecido.

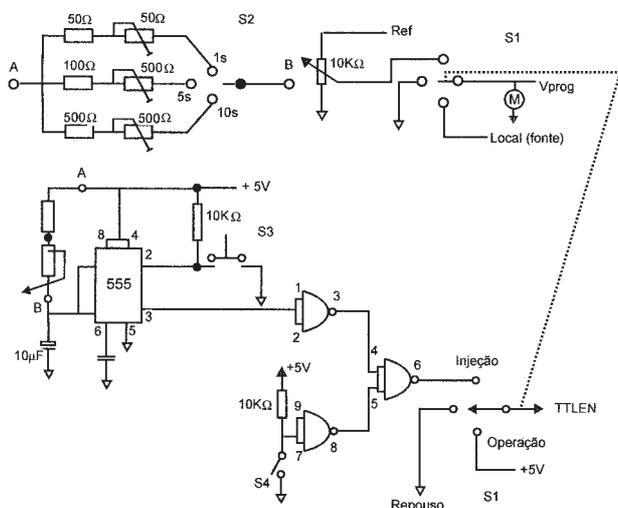


Figura 3. Esquema do circuito eletrônico desenvolvido para a injeção eletrocinética.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação do desempenho do sistema implementado foi feita considerando-se parâmetros como dissipação de calor, reprodutibilidade de área, o efeito de “binning” do CCD sobre o limite de detecção (LOD) da fluorescência para a ZnPcTS, bem como o perfil comparativo com um sistema comercial.

A geração de calor por efeito Joule, devido à passagem de corrente elétrica pela solução, constitui-se numa importante limitação da eletroforese convencional, pois acarreta o alargamento de bandas e, portanto, a perda da resolução. A adaptação da eletroforese para dimensões capilares trouxe várias vantagens, dentre elas destacam-se a eficiente dissipação do calor, possibilitando a aplicação de voltagens da ordem de 30 a 50 kV, alcançado-se, conseqüentemente, campos elétricos mais intensos. Podem ser atingidos campos elétricos da ordem de 500 V/cm<sup>28</sup>, o que reduz o tempo de análise e aumenta a eficiência da separação de forma sensível.

A eficiência na dissipação do calor gerado pelo efeito Joule pode ser avaliada através de um simples experimento, que consiste na verificação da linearidade da lei de Ohm. No sistema implementado, observa-se a eficiente dissipação do calor até um potencial de 25 kV, utilizando-se como sistema tampão citrato 0.1 mol.L<sup>-1</sup> pH 2,5.

Como descrito anteriormente, o detector do espectrômetro Raman é um CCD. Seu conceito de funcionamento baseia-se na transferência de carga de um elemento detector da matriz,

que é constituído de um semi-condutor, para o elemento adjacente e assim sucessivamente, até a junção somadora de saída.

Os detectores CCD possuem uma propriedade que os destaca dos demais. Nele é possível fazer um tipo de leitura onde cada elemento detector é combinado, ou seja, é possível somar vários elementos detectores numa junção de saída, na própria matriz do CCD. Este processo é chamado “binning” e a grande vantagem de somar o sinal dentro da própria matriz é que a carga somada está sujeita apenas a uma única leitura e ao ruído a ela associado, diferentemente de uma soma digital de dados, onde soma-se também o ruído de leitura de cada elemento à segunda potência.

A conseqüência direta do efeito de “binning” é a intensificação do sinal detectado de um analito em baixa concentração, diminuindo o limite de detecção (LOD). O limite de detecção refere-se à mínima massa ou concentração de um analito que pode ser detectada dentro de uma relação sinal-ruído (S/R) aceitável. Neste trabalho o LOD foi adotado como sendo aquele onde observa-se a detecção de um pico com uma relação sinal/ruído igual a 2. Neste trabalho verificou-se uma dependência direta em termos práticos, do efeito de “binning” e o limite de detecção. Com o equipamento implementado pode-se alcançar concentrações de analito da ordem de 10<sup>-11</sup> mol.L<sup>-1</sup>, com o aumento da capacidade de “binning” do detector. Cabe salientar que, dado ao volume diminuto de amostra injetada, cerca de 10 nL, esta concentração corresponde a aproximadamente a 10<sup>-21</sup> moles do analito em questão.

O equipamento implementado apresenta boa linearidade numa faixa de 3 ordens de grandeza dentro da mesma condição de “binning”. Apresenta também uma boa reprodutibilidade em termos de tempo de migração (1% c.v., coeficiente de variação) e altura de pico (0,2% c.v.) para uma seqüência de 10 injeções.

A Figura 4 mostra um eletroferograma obtido no equipamento implementado onde verifica-se a presença de 3 eixos, número de onda (cm<sup>-1</sup>), tempo de migração (s) e intensidade (unidades arbitrárias de fluorescência ou U.A.). Neste equipamento é possível não apenas obter um perfil de separação, como o espectro de fluorescência (embora numa região espectral estreita limitada pelo tamanho do CCD) e o espectro Raman no caso de um analito que não emita fluorescência.

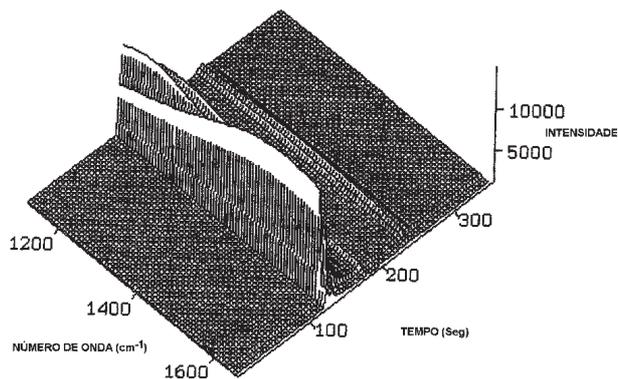


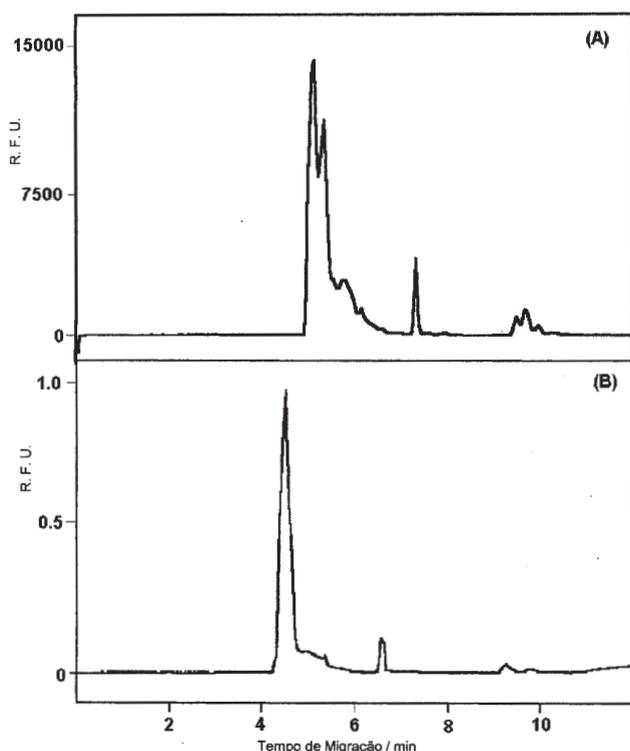
Figura 4. Eletroferograma com 3 eixos obtido de uma solução de ZnPcTS (10<sup>-3</sup> mol. L<sup>-1</sup>) no equipamento implementado. Condições: Injeção eletrocinética: -5 kV / 5s; Tampão: citrato 100 mol. L<sup>-1</sup>, pH 2,5; Voltagem de corrida: -30kV, “binning”= 100.

O perfil eletroforético pode ser obtido com recursos do programa de manipulação de dados do espectrômetro. O procedimento consiste em escolher uma linha do CCD paralela ao eixo do tempo, representando um único comprimento de onda de emissão da fluorescência. O resultado é um eletroferograma convencional, ou seja, com 2 eixos, tempo e intensidade.

## Comparação do sistema implementado a um sistema comercial.

O desempenho do sistema implementado no laboratório foi comparado ao equipamento comercial da Beckman, cujo detector é um tubo fotomultiplicador. A fotomultiplicadora é um elemento detector bastante sensível, de alto ganho, com baixo nível de ruído, e de custo operacional mais baixo que o CCD; embora este último ainda exiba uma sensibilidade melhor, de pelo menos 10 vezes, quando comparada ao tubo fotomultiplicador.

A ZnPcTS foi utilizada como molécula alvo em nossos estudos pois representa uma classe de compostos com importantes aplicações. Encontram-se o uso de ftalocianinas como corantes<sup>29</sup>, eletrodos modificados para células combustíveis<sup>30</sup>, em dispositivos eletrocromáticos<sup>31</sup>, como agente sensibilizador para o tratamento fotodinâmico do câncer<sup>32</sup>, entre muitos outros. A Fig.5 mostra os eletroferogramas da ZnPcTS  $10^{-3}$  mol. L<sup>-1</sup> obtidos com o sistema implementado no laboratório (A) e no equipamento comercial (B), em condições experimentais semelhantes de eletrólito e campo elétrico. O eletroferograma mostra vários picos que são tentativamente atribuídos à presença dos isômeros de posição do grupo sulfona no macrociclo, que podem ser encontrados num total de 4<sup>33</sup>, picos de menor intensidade por sua vez podem ser atribuídos a espécies com ordens superiores de estados de agregação e a espécies de menor grau de sulfonação.



**Figura 5.** Eletroferograma obtido de uma solução de ZnPcTS ( $10^{-3}$  mol. L<sup>-1</sup>) no equipamento implementado (A) e no equipamento comercial (B). Condições para equipamento implementado: Injeção eletrocínica: -5 kV / 5 s; eletrólito: citrato 0,100 mol.L<sup>-1</sup>, pH 2,5; Voltagem de corrida: -30 kV, "binning" = 100. Capilar: 75 mm de diâmetro interno, 83,5 cm de comprimento total (40,5 cm ao detector); equipamento comercial: Injeção eletrocínica -5 kV / 5 s; eletrólito: citrato 0,100 mol.L<sup>-1</sup>, pH 2,5; Voltagem de corrida: -16,8 kV. Capilar: 75 mm de diâmetro interno, 47cm comprimento total (40 cm ao detector).

Pode-se verificar claramente a superior resolução dos picos em relação ao eletroferograma obtido no equipamento Beckman, muito embora neste caso, a injeção tenha sido favorecida pelo

aumento proporcional de voltagem. A melhor resolução dos picos, observada no instrumento descrito neste trabalho, pode ser entendida se considerarmos que o diâmetro do feixe do laser no sistema implementado é menor do que o do aparelho comercial. No entanto, no caso do sistema implementado, para a radiação laser em 632,8 nm e usando a objetiva de 80 x de aumento, o diâmetro do feixe do laser no foco é de ca. 1,5  $\mu$ m (dado do fabricante), enquanto que no equipamento comercial um espelho esférico concentra a luz do laser fornecida pelo cabo de fibra óptica no capilar. Outro fator que contribui decididamente para a resolução encontrada no caso do aparelho descrito é a capacidade confocal do instrumento, ou seja, qualquer sinal proveniente de emissões de luz fora da região focal, são fortemente rejeitadas pela instrumentação.

## CONCLUSÃO

A construção do equipamento de eletroforese capilar é simples e economicamente viável e sua adaptação a outros sistemas de detecção disponíveis é igualmente factível. O equipamento implementado no laboratório apresenta boa resposta linear do detector e reprodutibilidade de sinal. Seu desempenho quando comparado a um equipamento comercial mostra um limite de detecção considerado bom dentre os padrões aceitos na literatura para este tipo de detecção por fluorescência.

É claro que o custo da instrumentação espectroscópica usada neste trabalho é muito elevado frente ao custo de um equipamento comercial para eletroforese capilar. No entanto, um sistema compreendendo: i) um monocromador de 20 cm de distância focal com rede de difração de 160 linhas/mm (resolução de ca. 2 nm numa faixa espectral de 350 a 1000 nm); ii) um detector CCD, interface controladora do detector, computador e software; iii) laser de He/Ne de 5 mW; iv) lentes, filtros ópticos para cortar a luz do laser (notch filters) e interferências espectrais de ordem superior (filtros de canto) e v) fonte de alta tensão, capilar e outros pequenos acessórios, pode custar nos dias de hoje não mais que US\$ 25.000,00. Além do custo reduzido (ca. de 1/4 do custo do instrumento comercial, este sistema seria ainda mais versátil, pois poderia ser facilmente adaptado para outros tipos de experimentos espectroscópicos, como fotoluminescência (de estado sólido) induzida por laser, ou, com uso de uma lâmpada de tungstênio, ser usado para fazer espectroscopia de absorção e reflectância no visível e infravermelho próximo<sup>34,35</sup> (vide refs.[15 e 36], onde um sistema óptico semelhante ao descrito acima foi montado para fazer espectroscopia de reflectância no visível).

Além disso, este trabalho mostra que arranjos experimentais utilizados em espectroscopia Raman laser, já existentes, podem ser adaptados para serem utilizados como sistema de detecção de fluorescência induzida por laser.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP pelos auxílios concedidos (processos 94/4440-2 e 94/5929-5 e 97/01320-4)). MRS agradece a FAPESP pela bolsa concedida (96/0193-5) e a José A. F. da Silva e Marco A. Lopes pela idealização e construção, respectivamente, do sistema para injeção eletrocínica. JCR e MT agradecem ao CNPq pelas bolsas concedidas (301201/94-3).

## REFERÊNCIAS

1. Hjertén, S.; *Chromatogr. Rev.* **1967**, 9, 122.
2. Mikkers, F. E. P.; Everaerts, F. M.; Verheggen, Th. P. E. M.; *J. Chromatogr.* **1979**, 169, 11.
3. Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D.; *Anal. Chem.* **1981**, 53, 1298.
4. Tavares, M. F. M.; McGuffin, V. L.; *Anal. Chem.* **1995**, 67, 3687.

5. Piatak, M., Jr.; Luk, K.-C.; Williams, B.; Lifson, J. D.; *Biotechniques* **1993**, *14*, 70.
6. Northrop, D. M.; McCord, B. R.; Butler, J. M.; *J. Cap. Elec.* **1994**, *1*, 158.
7. Gordon, M. J.; Lee, K. J.; Arias, A. A.; Zare, R. N.; *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 63.
8. Frenz, J.; Wu, S. L.; Hancock, W. S.; *J. Chromatogr.* **1989**, *480*, 370.
9. Tavares, M. F.; *Quim. Nova* **1997**, *20*, 493.
10. Jones W. R.; Jnadik P. J.; *J. Chromatogr.* **1992**, *608*, 385.
11. Weston A.; Brown P.; Jandik P.; Jones W. R.; *J. Chromatogr.* **1992**, *608*, 395.
12. Pentoney S. L.; Konrad K. D.; Kaye, W.; *Electrophoresis*, **1992**, *13*, 467. Chen, D. Y.; Harke; H. R.; Dovichi N. J.; *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 4873.
13. Chen F-T. A.; *J. Chromatogr.* **1994**, *680*, 419. Rush R.S.; Derby P. L.; Strickland T. W.; Rohde M. F.; *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1834. Strege; M. A.; Lagu A. L.; *Electrophoresis* **1995**, *16*, 642.
14. Lee T. T.; Yeung E. S.; *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 3045. Xue; Q.; Yeung; E. S.; *J. Chromatogr. B* **1996**, *677*, 233. Hoyt Jr. A. M.; Beale S. C.; Larmann Jr. J. P. e Jorgenson J. W.; *J. Microcol. Sep.* **1993**, *5*, 325.
15. Walbroehl Y.; Jorgenson J. W.; *J. Chromatogr.* **1984**, *315*, 135.
16. Albin M.; Weinberger R.; Sapp E.; Moring S.; *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 417.
17. Chen D. Y.; Swerdlow H. P.; Harke H. R.; Zhang J. Z.; Dovichi N. J.; *J. Chromatogr.* **1991**, *559*, 237.
18. Moseley M. A.; Deterding L. J.; Tomer K. B.; Jorgenson J. W.; *J. Chromatogr.* **1991**, *63*, 109.
19. Ackermans M. T.; Everaerts F. M.; Beckers J. L.; *J. Chromatogr.* **1991**, *593*, 289.
20. Huang X.; Zare R. N.; Loss S.; Ewing A. G.; *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 189.
21. Altria K. D.; Simpson C. F.; Bharig A. K.; Theovald A. E.; *Electrophoresis* **1990**, *11*, 732.
22. Bruno A. E.; Krattiger B.; Maystre F.; Widmer H. M.; *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 2689.
23. Christensen P. L.; Yeung E. S.; *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 1344.
24. Chen C. Y.; Morris M. D.; *J. Chromatogr.* **1991**, *540*, 335.
25. Ewing G. W.; *Analytical Instrumentation Handbook*; Marcel Dekker Inc.; New York, NY 1997, p. 1359.
26. Rosenthal I.; *Photochem. Photobiol.* **1991**, *53*, 859
27. Howe L.; Zhang J. Z.; *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 3207.
28. Weinberger R.; *Practical Capillary Electrophoresis*; Academic Press; 1993, pag. 17; Baker D. R.; *Capillary Electrophoresis*; John Wiley & Sons Inc.; 1995, pag.4.
29. Moser, F. H.; Thomas A. L.; *The phthalocyanines – Manufacture and Applicatoins*, vol. II, Boca Raton, FL; CRC Press; 1983.
30. Zagal, J. H.; *Coord. Chem. Rev.* **1992**, *119*, 89.
31. Collins, G. C. S.; D. J. Schiffrin; *J. Electroanal. Chem.* **1982**, *139*, 335.
32. Rosenthal I.; Ben-Hur E.; *Phthalocyanines in Photobiology*. Em: Leznoff CC, Lever ABP eds. *Phthalocyanines: Properties and Applications*, vol. I, New York, NY:VCH Publishers 1989, 393.
33. Barbosa, C. A. S.; Constantino, V. R. L.; Tavares, M. F. M.; *J. Cap. Elec.* **1997**, *4*, 4.
34. Rubim J. C.; *J. Electrochem. Soc.* **1993**, *140*, 1601.
35. De Santana, H.; Temperini, M. L. A.; Rubim, J. C.; *J. Electroanal. Chem.* **1993**, *356*, 145.