

# Colunas tubulares abertas recobertas internamente com uma camada porosa (PLOT) em cromatografia líquida miniaturizada

*Open tubular columns internally coated with a porous layer (PLOT) in miniaturized liquid chromatography*

**Juliana Soares da Silva Burato,  
Fernando Mauro Lanças\***

Instituto de Química de São Carlos –  
USP, São Carlos, Brasil  
Universidade de São Paulo, Avenida  
Trabalhador São-carlense, 400, CEP  
13566-590, São Carlos - SP - Brasil

\*flancas@iqsc.usp.br

## Resumo

A cromatografia líquida está evoluindo para a miniaturização a fim de alcançar melhores níveis de eficiência, seguindo os passos da cromatografia gasosa. O principal aspecto da miniaturização é a diminuição do diâmetro interno das colunas analíticas. As principais vantagens são a possibilidade de analisar amostras com pequenos volumes, aumento da eficiência de separação, e menor gasto de fase móvel e estacionária, de acordo com os princípios da Química Verde. Dentre as colunas miniaturizadas, as tubulares abertas do tipo PLOT (OT-PLOT-LC) se destacam devido à sua reduzida capacidade de carga, maior permeabilidade e eficiência de separação. No entanto, para uma melhor eficiência há a restrição de possuírem diâmetros internos iguais ou menores a 10 µm. Essa característica impõe limitações instrumentais, como a necessidade de um sistema especial de introdução de amostras e detectores com células de detecção de baixo volume, fatores responsáveis por retardar sua difusão comercial e estudo. Entretanto, o desenvolvimento de equipamentos capazes de operar em escala nano, com baixo fluxo e reduzido volume de fase móvel, tornaram-se propícios para a hifenização com espectrometria de massas, utilizando como forma de ionização impacto de elétrons ou eletrospray (PLOT-LC(ESI)MS E PLOT-LC(EI)-MS). O objetivo deste trabalho é relatar e discutir alguns dos principais pontos relacionados a miniaturização das colunas analíticas em cromatografia líquida, com destaque para as colunas tubulares abertas do tipo PLOT.

**Palavras chaves:** Cromatografia Líquida miniaturizada, OT-PLOT-LC, PLOT-LC(ESI)MS E PLOT-LC(EI)-MS.

## Abstract

Liquid chromatography is evolving to miniaturization in order to achieve better levels of efficiency, following the steps of gas chromatography. The main aspect of miniaturization is the reduction of the internal diameter of the analytical columns. The main advantages are the possibility of analyzing samples with small volumes, increased separation efficiency, and lower mobile and stationary phase expenditure, according to the principles of Green Chemistry. Among the miniaturized, the porous layer open tubular column (PLOT) (OT-PLOT-LC) stands out due to their reduced load capacity, higher permeability and separation efficiency. However,

for better efficiency there is a restriction of having internal diameters equal to or less than 10  $\mu\text{m}$ . This feature imposes instrumental limitations, such as the need for a special system for introducing samples and detectors with low-volume detection cells, which are responsible for delaying their commercial diffusion and study. However, the development of equipment capable of operating at a nano scale, with low flow and low mobile phase volume, has become suitable for hyphenation with mass spectrometry, using as an ionization form electron impact or electrospray (PLOT-LC(ESI)-MS and PLOT-LC (EI)-MS). The objective of this work is to report and discuss some of the main points related to the miniaturization of analytical columns in liquid chromatography, with emphasis on open tubular columns of the PLOT type.

**Keywords:** Miniaturized Liquid Chromatography, OT-PLOT-LC, PLOT-LC(ESI)MS E PLOT-LC(EI)-MS.

## 1. Introdução

Com os avanços tecnológicos ocorridos na miniaturização da cromatografia líquida, e a disponibilidade comercial de instrumentação mais adequada, tornou-se possível explorar o uso de colunas analíticas tubulares abertas do tipo PLOT (Porous Layer Open Tubular), inclusive o acoplamento com a técnica de detecção de espectrometria de massas usando como fonte de ionização nanospray (nano ESI) ou ionização com elétrons (EI). Problemas como dispositivos de injeção inadequados, conexões com grandes volumes mortos, altas pressões, bombas inadequadas, acoplamentos com detector e volumes extra coluna já foram, pelo menos parcialmente, resolvidos ou considerados.<sup>[1]</sup>

Embora essas colunas tenham sido reintroduzidas somente recentemente em cromatografia líquida, após um longo tempo sem novidades neste nicho, estudos têm demonstrado a sua aplicabilidade em proteômica e metabolômica, áreas nas quais as quantidades disponíveis de amostras são, com frequência, ínfimas.<sup>[2,3]</sup>

Na década passada, Karger e colaboradores reintroduziram o uso de colunas tubulares abertas do tipo PLOT em cromatografia líquida.<sup>[2]</sup> A partir deste trabalho, colunas PLOT com fase estacionária de PS-DVB (poli(estireno-co-divinilbenzeno)) e diâmetros internos iguais ou inferiores à 10  $\mu\text{m}$  têm sido amplamente

aplicadas para a separação de proteínas. Os grupos de pesquisa liderados por Lundanes, Karger e Brett têm desenvolvido diferentes aplicações em sistemas on-line empregando colunas analíticas do tipo PLOT com colunas monolíticas como pré-colunas.<sup>[4,5]</sup>

Atualmente o foco dos principais grupos de pesquisa que trabalham nesta área é no preparo de colunas PLOT com fase estacionária de PS-DVB; o que difere entre esses grupos é a forma do preparo. A preparação dessas colunas baseia-se em uma reação de polimerização *in situ* que pode ser iniciada por aquecimento ou por luz UV. Vale ressaltar que em todos os trabalhos publicados as colunas obtidas são reprodutíveis, e a grande diferença no preparo das mesmas consiste no uso de diferentes proporções dos reagentes, o que resulta em filmes de diferentes espessuras, usualmente entre 0,75 e 10  $\mu\text{m}$ .

A miniaturização da cromatografia líquida apresenta diversas vantagens em relação a cromatografia líquida convencional, enquanto a cromatografia líquida miniaturizada utilizando colunas tubulares abertas apresenta ainda mais vantagens teóricas frente as colunas de diâmetro reduzido empacotadas. Destaca-se o menor consumo da fase móvel e da fase estacionária, compatibilidade com a espectrometria de massas, eficiência de separação, e possibilidade de análise de amostras com volumes escassos, vantagens essas ressonantes com os princípios da Química Verde. Além disso, as colunas PLOT preparadas em capilares de

sílica fundida não exigem conexões e frits especiais, facilitando sua conexão em sistemas comerciais para nano-LC e micro-LC.

Esta revisão relata e discute alguns dos principais pontos relacionados a miniaturização das colunas analíticas em cromatografia líquida, com destaque para as colunas tubulares abertas do tipo PLOT.

## 2. Breve histórico da miniaturização das colunas analíticas em LC

A cromatografia líquida é uma técnica analítica de caráter físico-química, de separação versátil e abrangente. Quando acoplada a um detector de espectrometria de massas, cria uma ferramenta de análises químicas eficiente, apresentando exatidão nos resultados e permitindo a identificação e/ou quantificação dos compostos presentes em uma amostra com confiabilidade.

A invenção da cromatografia é creditada ao botânico russo Mikhail Tswett, quando, em 1900, realizou a separação de pigmentos de folhas de plantas utilizando um tubo de vidro preenchido com carbonato de cálcio.<sup>[6,7]</sup> Ao longo do século XX diversos cientistas colaboraram no desenvolvimento da cromatografia, e em 1952 Martin desenvolveu a cromatografia com fase móvel gasosa.<sup>[7,8]</sup>

A cromatografia gasosa obteve seu ápice de eficiência vinte anos após criada, por meio da miniaturização da técnica e ao acoplamento com o detector de espectrometria de massas. A miniaturização da cromatografia gasosa sobreveio da introdução das colunas analíticas capilares tubulares abertas, por meio do trabalho pioneiro realizado por Marcel J. E. Golay em 1957.<sup>[9]</sup>

Intrigado pela matemática envolvida nas separações, e na busca de uma coluna mais simples, os estudos de Golay o conduziram à separação de uma

mistura de hidrocarbonetos utilizando uma coluna de 1,37 mm de diâmetro interno, recoberta internamente com um filme fino de polietileno glicol, diferentemente das colunas empacotadas usadas até então.<sup>[9]</sup> Esta coluna desenvolvida por Golay foi a primeira de uma nova classe, as denominadas colunas tubulares abertas, caracterizada pela presença de uma fase estacionária recobrindo apenas a parede interna do tubo e pelo aumento da eficiência como consequência à redução do diâmetro interno.

Apesar da cromatografia líquida ter sido desenvolvida 50 anos antes que a gasosa não obteve os mesmos níveis de desenvolvimento no mesmo espaço de tempo, e ainda hoje segue em aprimoramento, caminhando em direção à miniaturização da técnica. Isto é devido às limitações instrumentais que eram incapazes de suprir as exigências necessárias para se operar em altas pressões, fluxos baixos e pequenos volumes, e à dificuldade de acoplamento com o detector de espectrometria de massas.<sup>[10-12]</sup> No entanto, alguns pesquisadores realizaram trabalhos pioneiros construindo os pilares para a miniaturização das colunas analíticas em cromatografia líquida.

O trabalho realizado Czaba Horvath em 1967 é considerado pioneiro na miniaturização de colunas analíticas em cromatografia líquida. Nele foi comparado o desempenho de separação de ribonucleotídeos utilizando uma coluna tubular aberta de 0,28 mm de diâmetro interno e 5 metros de comprimento, sem fase estacionária, com uma coluna empacotada de 1 mm de diâmetro interno e 2 m de comprimento empacotada com partículas de 50 µm recobertas com uma fase estacionária de troca iônica. Posteriormente tais colunas foram denominadas de “*microbore*”.<sup>[13,14]</sup>

Outro importante estudo em busca da miniaturização da cromatografia líquida foi realizado por Ishii e colaboradores, em 1973, quando realizaram pela primeira vez uma separação empregando cromatografia líquida em escala micro, concebendo o termo “*micro-LC*”. Neste trabalho foram separados hidrocarbonetos

aromáticos polinucleares (PAHs), utilizando uma coluna de 0,5 mm de diâmetro interno e 15 cm de comprimento, empacotada com partículas de 30  $\mu\text{m}$  recobertas com uma fase estacionária de politetrafluoretileno (PTFE).<sup>[15,16]</sup>

Os avanços tecnológicos propostos por Ishii abriram espaço para mais estudos sobre colunas empacotadas com diâmetros internos cada vez menores, como o realizado por Scott e Kucera, em 1976, no qual foram separados alquil-benzenos utilizando uma coluna de 1mm de diâmetro interno e 10 m de comprimento empacotada com partículas de 40  $\mu\text{m}$ .<sup>[17-19]</sup> Dois anos depois, em 1978, Tsuda e Novotny avaliaram a relação entre o diâmetro interno da coluna analítica (50-200  $\mu\text{m}$ ) com o tamanho da partícula de empacotamento (10-100  $\mu\text{m}$ ). Neste trabalho, concluíram que as colunas de 70  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno e as empacotadas com partículas de 30  $\mu\text{m}$  obtiveram as melhores relações de eficiência.<sup>[20,21]</sup>

Dada a crescente variação nos tipos de colunas, avaliá-las e compará-las se tornou um desafio até que, em 1977, Bristow e Knox desenvolveram um novo procedimento para análise de colunas, cunhando um novo termo: a impedância (E). Este parâmetro relaciona uma série de fatores intrínsecos de uma coluna em uma corrida cromatográfica específica, como tempo de retenção, variação de pressão, viscosidade do eluente dentre outros, possibilitando, por meio de um único valor, estimar o desempenho da coluna e compará-la frente a outras. De acordo com a equação proposta pelos autores, menores valores de E, resultam em colunas de melhor desempenho.<sup>[22]</sup>

Em seguida, no ano de 1979, Dandeneau e Zerenner contribuíram para a miniaturização da cromatografia líquida ao incorporarem a utilização de tubos capilares de sílica fundida à produção das colunas analíticas, o que se tornou um padrão para o preparo de colunas capilares e nano.<sup>[23]</sup> Isto se deve ao fato que os tubos do material sílica fundida apresentam maior resistência mecânica, flexibilidade, e são mais inertes

que os tubo de vidro e aço inox que eram anteriormente utilizados. Isso permitiu o desenvolvimento de colunas com diâmetros internos ainda menores, e a introdução de novas fases estacionárias.

A resistência mecânica das colunas capilares de sílica fundida advém do recobrimento externo de poliimida. Estudos demonstram que uma ranhura de 1  $\mu\text{m}$  em um capilar de sílica fundida causa sua quebra, por isso a importância do recobrimento que, além de resistência mecânica, protege as colunas da exposição atmosférica.<sup>[24]</sup>

Nas décadas seguintes outros trabalhos miniaturizando colunas analíticas para cromatografia líquida foram realizados; no entanto, foi a partir do ano de 1997, com o desenvolvimento da cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), que as limitações instrumentais ao uso das colunas miniaturizadas foram parcialmente contornadas. Consequentemente, o estudo e desenvolvimento destas colunas passou mais uma vez a ser assunto de destaque na área.<sup>[25]</sup>

### 3. Classificação das colunas miniaturizadas em LC

Como consequência aos estudos de colunas com os mais variados diâmetros internos, feitas dos mais distintos materiais, ao longo da miniaturização da cromatografia líquida, vários autores preocuparam-se em classificar as colunas, buscando simplificar e sistematizar o estudo. Inicialmente, as colunas foram classificadas por Ishii, em 1988, de acordo com o diâmetro interno.<sup>[26]</sup> Concomitantemente, Barth também se baseava nesta classificação simplificada.<sup>[27]</sup> Por outro lado, Verzele e Dewaele sugeriram que na classificação também deveriam levar em consideração o material do qual o tubo da coluna era composto, que poderia ser de vidro, metal ou sílica fundida.<sup>[28]</sup>

Quase uma década depois, em 1996, Chevert e colaboradores e também Vissers estabeleceram uma

nomenclatura que se respaldava no diâmetro interno da coluna analítica e na faixa de fluxo da fase móvel.<sup>[29, 30]</sup> Todas as classificações mencionadas diferem em relação a alguns fatores, no entanto concernem que colunas para cromatografia líquida convencional possuem o diâmetro interno sempre maior que 1 mm.

Foi então que Saito, em 2004, propôs a classificação de colunas para cromatografia líquida mais completa e aceita até o presente trabalho, ao incorporar e distinguir as subdivisões de colunas analíticas com diâmetro interno inferior a 1mm, como pode ser observado na Tabela 1.<sup>[14]</sup> A partir desta nova nomenclatura, novos termos foram estabelecidos no que tange a cromatografia líquida miniaturizada, os quais incluem nano-LC, LC capilar e micro-LC. Sendo assim, pode-se considerar que a cromatografia líquida miniaturizada acontece quando se usa colunas analíticas em escala capilar e nano.


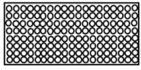



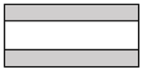


**Tabela 1.** Classificação de colunas miniaturizadas usadas em cromatografia líquida baseada na proposta de Saito et al.<sup>[14]</sup>

Diametro interno da coluna (mm)	Classificação
3,0 - 5,0	HPLC
<2	Narrow-bore HPLC
0,5 - 1	Micro-LC
0,1 - 0,5	cLC
0,01 - 0,1	Nano-LC
0,005 - 0,05	LC Tubular aberta

As colunas capilares possuem diâmetro interno entre 0,15 e 0,5 mm (150 a 500  $\mu\text{m}$ ) e são compatíveis com fluxos abaixo de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ , enquanto que as colunas nano possuem diâmetro interno inferior a 0,15 mm e operam com fluxos de 10 a 1000 nL/min.<sup>[11]</sup>

As colunas analíticas miniaturizadas para cromatografia líquida também podem ser classificadas de acordo com o tipo de preenchimento. Elas se dividem

em dois grupos: as com o tubo preenchido e as tubulares abertas, como pode ser observado na Figura 1.<sup>[31]</sup>

Capilar	Identificação	Corte Frontal	Corte Longitudinal
Preenchido	Empacotada		
	Monolítica		
Aberto	WCOT		
	PLOT		

**Figura 1.** Tipos de colunas analíticas miniaturizadas utilizadas em cromatografia líquida.

As colunas com o tubo completamente preenchido são divididas em empacotadas e monolíticas. As colunas empacotadas são integralmente preenchidas com partículas, enquanto que as monolíticas por um sólido poroso. Essas colunas foram empregadas nos primeiros sistemas instrumentais para cromatografia líquida, e até hoje são as mais utilizadas. Já, as colunas tubulares abertas, as quais possuem fase estacionária aderida somente à parede interna do tubo, são divididas em WCOT (Wall Coated Open Tubular) e PLOT (Porous Layer Open Tubular). O que as diferencia é o caráter da fase estacionária: nas colunas WCOT é não porosa, e na PLOT é porosa.<sup>[30-34]</sup>

O uso de colunas tubulares abertas em cromatografia líquida é vantajoso, frente ao uso de colunas totalmente preenchidas. Como o tubo é preenchido somente em sua superfície interna, é possível utilizar fluxos maiores sem aumento significativo da pressão na coluna. Tais colunas possuem diâmetro interno, menor e comprimento maior, o que aumenta sua eficiência, pois aumenta o número de pratos. Também, devido ao menor diâmetro interno o volume de injeção é

menor o que reduz o consumo de reagentes e a geração de resíduos.<sup>[30-34]</sup>

#### 4. Colunas tubulares abertas em LC

As colunas tubulares abertas, em inglês “*open tubular column*” (OT), são caracterizadas por possuírem fase estacionária aderida somente à parede interna do tubo, mantendo o centro vazio. É padrão possuírem o diâmetro interno em escala capilar, por isso são confeccionadas em tubos capilares de sílica fundida. Essas colunas foram desenvolvidas por Golay, em 1957, para cromatografia gasosa. A elas é atribuído o rápido desenvolvimento da cromatografia gasosa quando comparada com a líquida, devido ao fato de proporcionarem uma grande eficiência de separação.<sup>[9,16]</sup>

As colunas tubulares abertas são separadas em dois subgrupos: WCOT (*Wall Coated Open Tubular*) e PLOT (*Porous Layer Open Tubular*), que diferem entre si pelas características do filme de revestimento, como porosidade e espessura. As colunas PLOT são conhecidas por apresentarem filmes mais espessos e porosos, e as colunas do tipo WCOT são caracterizadas pelos filmes mais finos e não porosos, a base polímeros do tipo goma, como os silicões.<sup>[31]</sup> As colunas do tipo PLOT são mais utilizadas que as WCOT em cromatografia líquida devido terem maior capacidade de carga.

Pretorius e Smuts, em 1966, sugeriram pela primeira vez o uso de colunas tubulares abertas em cromatografia líquida. Eles propuseram que fossem utilizados fluxos turbulentos neste tipo de separação, já que a difusão dos analitos em líquido é menor do que em gás.<sup>[35]</sup> Sendo assim, quando as colunas tubulares abertas são utilizadas em cromatografia líquida em decorrência do estado físico da fase móvel, há uma diminuição nos coeficientes de difusão dos analitos, comparando-se com cromatografia gasosa. De modo que, para apresentarem eficiência equivalente àquela apresentada quando usadas para cromatografia líquida, devem ter o diâmetro interno do tubo e a espessura do filme consideravelmente

diminuídos.<sup>[16]</sup> Tal fato é evidenciado pelas equações de Giddings, que serão explanadas adiante.

Para os cálculos de eficiência em colunas tubulares abertas Hibbi e colaboradores adaptaram a equação de Van Deemter. Nesta adaptação os termos A e B foram desconsiderados. O termo A é desconsiderado porque as colunas tubulares abertas possuem a fase estacionária aderida somente a parede interna da coluna, desta forma não há a existência de um leito de partículas e os analitos não percorrem múltiplos caminhos até o detector.<sup>[16]</sup>

Já, o termo B é desconsiderado porque a difusão molecular dos analitos é mínima quando o volume da fase móvel líquida é muito pequeno. Portanto, para o cálculo de eficiência em colunas tubulares abertas somente o termo C é considerado.

A equação (1), a seguir, descreve o equilíbrio do analito com a fase estacionária. A incógnita  $d$  refere-se à espessura da fase estacionária,  $R$  ao fator de retenção, e  $D_s$  é a difusão dos analitos nesta fase. A equação (2) descreve a transferência de massa na fase móvel, onde  $r_c$  refere-se ao raio da coluna capilar e  $D_m$  relaciona-se com o coeficiente de difusão do analito.

$$Cf. e = \frac{2}{3} R (1 - R) d^2 \mu / D_s \quad (1)$$

$$Cf. m = (6R^2 - 16R + 11) r_c^2 \mu / 24 D_m \quad (2)$$

A substituição das equações 1 e 2 na equação de Van Deemter, é conhecida como equação de Giddings para colunas tubulares abertas (equação 3).

$$H = \frac{2}{3} R (1 - R) d^2 \mu / D_s + (6R^2 - 16R + 11) r_c^2 \mu / 24 D_m \quad (3)$$

Pela equação de Giddings é possível observar que a altura equivalente a um prato ( $H$ , fator proporcional a eficiência) é diretamente proporcional a velocidade

linear da fase móvel. Já os coeficientes de difusão,  $D_m$  e  $D_s$ , são inversamente proporcionais a este parâmetro. Tanto a espessura no filme da fase estacionária, quanto o raio da coluna, são fatores significantes na eficiência de separação.<sup>[36]</sup>

Anos depois da primeira tentativa de se adaptar colunas tubulares abertas à cromatografia líquida, em 1979, Knox e Gilbert publicaram um trabalho no qual verificaram que as colunas com diâmetro interno entre 10-30  $\mu\text{m}$  efetuavam separações cromatografia equivalentes a colunas empacotas.<sup>[37]</sup> Outro trabalho de destaque foi a explanação matemática de Jorgenson e Guthrie. Neste trabalho, publicado em 1983, os autores previram que as colunas tubulares abertas em cromatografia líquida poderiam alcançar seu ápice de eficiência chegando em até  $10^6$  pratos sendo que, para isso, deveriam ter 2  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno e 2 m de comprimento.<sup>[38]</sup>

Mesmo com a ausência de instrumentação adequada para miniaturizar um cromatógrafo líquido, e a impossibilidade de se fazer colunas analíticas tubulares abertas com diâmetros tão pequenos, alguns cientistas realizaram trabalhos pioneiros e colaboraram com o avanço dessa parte da ciência. Um desses pesquisadores, Ishii, realizou diversos trabalhos na área durante das décadas de 70 e 80. Em 1988, apresentou um trabalho no qual comparou a separação realizada por colunas tubulares abertas com diâmetro interno de 50-150  $\mu\text{m}$  e fase estacionária de SE-30 com colunas empacotadas, e constatou que as colunas tubulares abertas obtiveram resultado de separação mais eficiente.<sup>[20]</sup>

Segundo simulações matemáticas, as colunas analíticas mais adequadas para cromatografia líquida miniaturizada são as tubulares abertas.<sup>[37]</sup> Isso é enfatizado pelo cálculo de resistência ao fluxo ( $\Theta$ ), parâmetro adimensional correspondente a uma medida de permeabilidade da coluna. A resistência ao fluxo equivale a 32 para as colunas tubulares abertas e a 800 para as colunas empacotadas. Essa diferença se dá pelo fato das colunas tubulares abertas, assim como diz o nome, possuírem o centro vazio.<sup>[38]</sup>

Outro parâmetro que privilegia o uso das colunas tubulares abertas em cromatografia líquida é a impedância de separação, que é uma forma de comparar a eficiência de colunas diferentes. Ao aplicá-la, teoricamente, tem-se que as colunas tubulares abertas quando comparadas a colunas empacotadas devem apresentar uma redução de 100 vezes no tempo de análise e aumento em 10 vezes de resolução.<sup>[38]</sup>

No entanto, para obter tamanha eficiência, é necessário utilizar colunas com diâmetro interno extremamente reduzidos, menores que 5  $\mu\text{m}$ , o que é dificultoso e muitas vezes inviável para muito pesquisadores, principalmente nas décadas passadas quando não existiam instrumentação e tecnologia suficiente para a produção de tais colunas. Por isso, alguns pesquisadores fizeram experimentos com colunas tubulares abertas com diâmetros internos maiores, 25-50  $\mu\text{m}$ , e empregavam temperaturas elevadas a fim de diminuir a viscosidade da fase móvel para, consequentemente, aumentar a difusão dos analitos.<sup>[39,40]</sup>

Atualmente, devido aos avanços tecnológicos, problemas como dispositivos de injeção inadequados, altas pressões, bombas incapazes de bombear pequenos fluxos, dificuldade de acoplamento com detectores mais sensíveis, conexões com grandes volumes mortos já foram parcialmente contornados. Sendo assim, tornou-se mais fácil e possível explorar a utilização das colunas tubulares abertas em cromatografia líquida miniaturizada.

## 5. Efeito das variáveis físicas na eficiência e desempenho das colunas OT-LC

### 5.1. Material do tubo

Os primeiros tubos para colunas cromatográficas eram de cobre e aço inoxidável. O cobre, por ser muito reativo era, portanto, recomendado apenas para amostras

não polares. Já o aço inox, tornou-se o mais utilizado, porque apresentava vantagens, como ductilidade, boa condutividade, fácil conexão aos equipamentos e possibilidade de produzir tubos de diversos diâmetros internos e externos. Porém, apresenta como desvantagem a maior reatividade frente a moléculas polares.<sup>[41]</sup>

Outros metais como alumínio, níquel e ouro também foram avaliados. No entanto, o alumínio apesar de fornecer um recobrimento estável, favorecia a formação de óxidos que provocavam o alargamento das bandas de separação. O níquel, mesmo sendo o metal mais indicado para este propósito, dificilmente era encontrado nas dimensões adequadas. Já, o ouro, exibiu um desempenho excelente, mas seu custo impedia o uso em ensaios de rotina.<sup>[36]</sup>

Por isso o vidro foi um dos materiais mais difundidos para elaboração de colunas cromatográficas pois, apesar de não ser totalmente inerte, é mais adequado que os tubos de metal. As colunas de vidro apresentam como desvantagem a fragilidade e o volume morto elevado, que é consequência das conexões com os equipamentos do cromatógrafo. Além disso, contam com a difícil “molhabilidade” do material, o que dificulta a formação de um filme fino uniforme. Esta última complicação foi minimizada pelo desenvolvimento de tratamentos da superfície interna do tubo.<sup>[42,43]</sup>

Por fim, foram desenvolvidos tubos capilares de sílica fundida, que passou a ser a preferência para a produção de colunas. A sílica fundida além de apresentar maior “molhabilidade”, o que facilita a deposição do filme de fase estacionária, é um material resistente e que permite a investigação de colunas com diâmetros internos cada vez menores, além de possibilitar análises on-line.<sup>[41,43]</sup>

## 5.2. Diâmetro interno do tubo

O diâmetro interno do tubo é uma variável física que desempenha impacto na eficiência da coluna, pois

tem relação direta com a espessura da fase estacionária que determina a capacidade amostral. A relação entre eficiência e diâmetro interno pode ser verificada por meio da equação de Giddings (Equação 3) exibida anteriormente.<sup>[16]</sup> Nela observa-se que a eficiência varia proporcionalmente com o quadrado do raio do tubo. Por outro lado, a relação de fases ( $\beta$ ), que consiste na razão entre volume da fase móvel e da fase estacionária, relaciona-se com o diâmetro interno do tubo por meio da Equação (4), na qual  $r_c$  é o raio do tubo e  $d_f$  é a espessura do filme de fase estacionária.

$$\beta = \frac{r_c}{2d_f} \quad (4)$$

Assim, quanto maior o raio do tubo e, conseqüentemente, seu diâmetro, maior será a relação de fase, ou seja, maior será o volume de fase móvel em relação ao volume de fase estacionária. A priori, esta relação pode não ter grande significado, porém, quando relacionada ao fator de capacidade e à constante de partição, conduz à Equação (5), na qual  $K$  é a constante de partição e  $k$  é o fator de capacidade.

$$K = \frac{r_c}{2d_f} k \quad (5)$$

Esta equação expressa que colunas com tubos de raios maiores apresentam fatores de capacidade menores. Isso ocorre pois, em tubos com raios maiores e filme menos espessos, o volume de fase móvel será maior que o volume de fase estacionária, dificultando a interação dos analitos e prejudicando a separação.

## 5.3. Comprimento da coluna

As colunas tubulares abertas têm menor resistência ao fluxo que as colunas empacotadas, permitindo o uso de colunas mais longas, aumentando



eficiência de separação, uma vez que em colunas de maior comprimento há maior número de pratos.<sup>[43]</sup> Assim, a teoria cromatográfica prevê que colunas tubulares abertas com diâmetros reduzidos, menores que 10  $\mu\text{m}$ , apresentam resolução e velocidade semelhante, ou até mesmo superiores à colunas empacotadas.<sup>[44]</sup> Desse modo, a menor resistência ao fluxo, ocasiona menor pressão dentro da coluna, permitindo o uso de colunas mais longas e, conseqüentemente, com um maior número de pratos.

#### 5.4. Espessura da fase estacionária

Pela equação de Giddings (Equação 3) o quadrado da espessura do filme é diretamente proporcional ao termo  $C_L$  que, por sua vez, corresponde à resistência à transferência de massa na fase líquida. O fato demonstra a relevância da espessura do filme para o desempenho da coluna. De acordo com as Equações (4) e (5), quanto mais fino o filme, maior será a relação de fase e, conseqüentemente, menor será o fator de capacidade da coluna. Por outro lado, quanto mais espesso, menor a relação de fase e maior o fator de capacidade, porém o filme será mais instável e estará sujeito a “sangramentos”. Sendo assim, é necessária uma pré-avaliação de qual espessura de fase estacionária será utilizada antes de se produzir uma coluna tubular aberta.

### 6. Colunas PLOT-LC

Como já foi definido, as colunas tubulares abertas foram desenvolvidas por Golay em 1957 com a finalidade de contornar limitações das colunas empacotadas e melhorar a eficiência de separação por cromatografia gasosa.

O uso das colunas capilares mais o acoplamento com a técnica de detecção de espectrometria de massas são os responsáveis pelo apogeu da cromatografia gasosa,

alcançada poucos anos após ter sido desenvolvida. A cromatografia líquida ainda não atingiu este estágio de desenvolvimento, mas caminha em sua direção por meio de diversos trabalhos que visam miniaturizar a técnica.

As colunas tubulares abertas do tipo PLOT (Figura 2) possuem natureza mais favorável a aplicação em cromatografia líquida do que as colunas do tipo WCOT. A natureza porosa da fase móvel possibilita uma maior área superficial de contato o que promove uma maior interação da fase estacionária com os analitos e, conseqüentemente, aumenta o fator de retenção o que faz com que a separação cromatográfica seja mais eficiente.

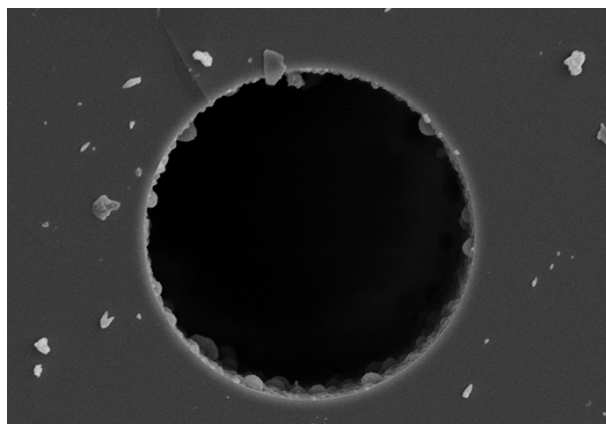
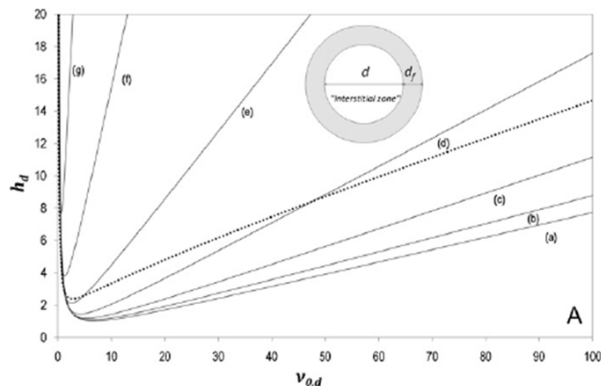


Figura 2. MEV de uma coluna PLOT de fase estacionária de PS-(DVB).

Em cromatografia líquida miniaturizada as colunas analíticas tubulares abertas do tipo PLOT nem sempre apresentam um elevado número de pratos o que, neste caso em específico, pode não ser relevante para a eficiência da coluna. Em uma coluna PLOT a retenção dos analitos é baseado principalmente nos processos de adsorção e rápida transferência de massa proporcionada pela alta permeabilidade da coluna.<sup>[31]</sup>

Nas colunas PLOT a eficiência está relacionada com a altura e não com a quantidade dos pratos. Quanto menor a espessura da fase estacionária e o diâmetro

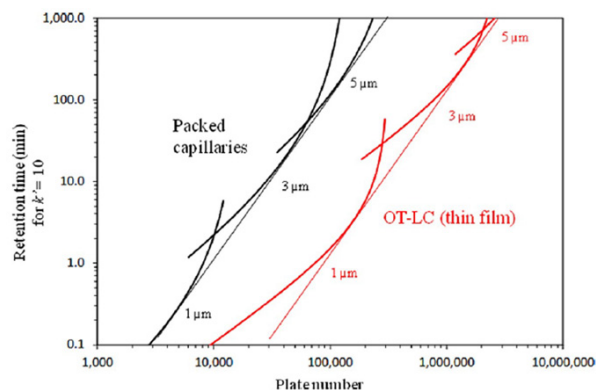
interno do capilar menor será o valor da altura do prato e, portanto, mais eficiente será a separação. Causon e colaboradores comprovaram essa relação ao relacionarem a curva de Van Deemter para colunas PLOT com diferentes espessuras de fases porosa, como pode ser observado na Figura 3.<sup>[45]</sup>



**Figura 3.** Curva de Van Deemter para colunas do tipo PLOT com diferentes taxas de recobrimento de filme poroso, sendo: (a) 0,001; (b) 0,05; (c) 0,125; (d) 0,25; (e) 0,5; (f) 1,0; (g) 2,0  $\mu\text{m}$ .<sup>[45]</sup>

O uso de colunas tubulares abertas em cromatografia líquida é vantajoso, frente ao uso de colunas totalmente preenchidas. Como o tubo é preenchido somente em sua superfície interna, é possível utilizar fluxos maiores sem aumento significativo da pressão na coluna. Tais colunas possuem diâmetro interno menor e comprimento maior, o que aumenta sua eficiência de separação. Também, devido ao menor diâmetro interno, o volume de injeção é menor o que reduz o consumo de reagentes e de resíduos.<sup>[46]</sup>

A Figura 4, desenvolvida por Desmet e colaboradores, demonstra a eficiência cinética de colunas do tipo PLOT comparando-as com colunas empacotadas, sendo possível concluir que para qualquer tempo de retenção ( $t_R$ ), as colunas tubulares abertas apresentam no mínimo dez vezes mais pratos teóricos.<sup>[45]</sup>



**Figura 4.** Curva de eficiência cinética comparando colunas tubulares abertas do tipo PLOT com colunas empacotadas.<sup>[45]</sup>

Alguns grupos de pesquisa realizaram trabalhos nos quais eram utilizadas colunas analíticas PLOT em cromatografia líquida. No entanto, devido às limitações instrumentais da época esta parte da ciência ficou temporariamente esquecida. Foi em 2007, que Karger e colaboradores reintroduziram essa ideia. Eles desenvolveram uma coluna PLOT de diâmetro interno de 10  $\mu\text{m}$  e fase estacionária de PS-DVB para separar peptídeos demonstrando, experimentalmente, que a utilização destas colunas é possível e vantajosa, despertando o interesse de demais pesquisadores.<sup>[47]</sup>

Na presente década, alguns grupos de pesquisas estão se dedicando ao estudo e desenvolvimento de colunas tubulares abertas do tipo PLOT para cromatografia líquida miniaturizada, desenvolvendo fases estacionárias, metodologias de preparo, e formas de avaliação da eficiência de separação, que estão brevemente descritos nos demais subitens deste artigo.

## 7. Fases estacionárias empregadas em colunas PLOT-LC

A fase estacionária de uma coluna analítica tubular aberta do tipo PLOT proporciona a área superficial na qual ocorrem as interações com os analitos

que, através de processos de partição e adsorção, são separados. O material poroso que constitui esta fase pode ter caráter orgânico ou inorgânico e também pode ser desenvolvido a partir de novos materiais como fases híbridas.

### 7.1. Fase estacionária de polímero orgânico

Dentre as fases estacionárias empregadas em colunas PLOT as constituídas de polímeros orgânicos são as mais utilizadas em cromatografia líquida miniaturizada. Isto se dá pelo fato desse tipo de fase estacionária ter sido a primeira a ser desenvolvida, e, portanto, ter sido a mais reproduzida, até o presente momento, possuindo uma metodologia de preparo melhor estabelecida.<sup>[16]</sup> Outro fator importante é o fato dessas fases, principalmente a de poli(estireno-co-divinilbenzeno) (PS-DVB), serem compatíveis para realizar separações de moléculas grandes, como proteínas.

As principais vantagens relacionadas a utilização de fases estacionárias de polímeros orgânicos são a simplicidade da síntese, controle de porosidade do material, estabilidade frente a condições extremas de pH, elevada estabilidade térmica, e a possibilidade de realizar modificações em sua superfície com diversos grupos ativos. Como desvantagem destaca-se a baixa resistência mecânica.<sup>[45]</sup>

O principal método de obtenção deste tipo de fase estacionária utiliza uma reação de polimerização via radical-livre, podendo ser iniciada termicamente ou através de radiação eletromagnética. Independentemente do modo de iniciação, a síntese ocorre pela exposição de uma solução de polimerização composta de um monômero funcional, um iniciador, que é um radical livre, e um agente porogênico, que normalmente é um solvente, submetidos à uma fonte de energia. A taxa de reação de polimerização é governada principalmente pela taxa de iniciação do radical-livre, o qual tem seu tempo

de meia vida inversamente proporcional a quantidade de energia aplicada. Sendo assim, deve-se controlar a energia aplicada a fim de promover uma boa reação de iniciação do radical.<sup>[46]</sup>

Outro fator que influencia a qualidade de uma coluna PLOT com fase estacionária de polímero orgânico é o tempo de polimerização, pois reações mais longas geram fases porosas com macro poros que podem entupir a coluna capilar transformando uma coluna tubular aberta do tipo PLOT em uma coluna do tipo monolítica.<sup>[40]</sup>

Como exemplo de aplicação deste tipo de coluna em cromatografia líquida miniaturizada pode ser citado o trabalho publicado por Roserberg e colaboradores, no ano de 2013, no qual desenvolveram uma coluna tubular aberta do tipo PLOT com fase estacionária de poli(estireno-co-divinilbenzeno) (OS-DVB) para separar proteínas. Os autores utilizaram um sistema multidimensional SPE-PLOT-nano-LC-MS e obtiveram bons resultados de separação.<sup>[48]</sup>

### 7.2. Fase estacionária de polímero inorgânico

As colunas analíticas tubulares abertas do tipo PLOT para cromatografia líquida com fase estacionária de caráter inorgânico em sua grande maioria são formados por polímeros baseados em sílica. Este tipo de fase estacionária possui maior área superficial e resistência mecânica que a as fases de polímero orgânico.

A maior área superficial promove uma melhor interação com os analitos, gerando separações mais eficientes. Já, a resistência mecânica da coluna relaciona-se com a inibição dos fenômenos de contração e dilatação da fase estacionária, os quais são consequência da interação com a fase móvel. No entanto, como desvantagem destaca-se o fato dos polímeros inorgânicos serem pouco resistentes às mudanças de acidez

do meio, respondendo com eficiência apenas a uma faixa restrita de pH.<sup>[40]</sup>

Assim como as colunas PLOT com fase estacionária de polímero orgânico, a metodologia de preparo para as colunas de polímero inorgânico não é bem definida e ainda encontra-se em desenvolvimento. Na literatura encontram-se métodos distintos de preparação de tais colunas sendo este um fator limitante para que as colunas PLOT de polímero inorgânico sejam usadas na mesma proporção que as de polímero orgânico.

Alguns trabalhos relatam a obtenção deste tipo de coluna através de processos envolvendo precipitação de politoxi-silano, poli condensação hidrolítica de tetraetoxi-silicato e também a síntese da fase via processo sol-gel. Neste caso o processo sol-gel é bastante promissor já que é amplamente utilizado para obtenção de fases estacionárias em cromatografia líquida tradicional.<sup>[40]</sup>

### 7.3. Fase estacionária à base de novos materiais

A inclusão de novos materiais é um campo em constante desenvolvimento em Química Analítica. No caso das colunas miniaturizadas tubulares abertas, estes são aplicados com a finalidade de desenvolver novas fases estacionárias que sejam mais seletivas e reprodutíveis.

Materiais compostos por óxidos metálicos como, por exemplo, óxidos de titânio, alumínio e zircônio, assim como materiais porosos a base de cadeias carbônicas, como o grafeno, têm atraído elevado interesse pois apresentam alta estabilidade química e física em cromatografia líquida. Os principais novos materiais empregados, até o momento, para o preparo de colunas PLOT são: os óxidos metálicos, materiais que proporcionam troca iônica, polímeros molecularmente impressos e materiais híbridos, que são materiais que possuem tanto caráter orgânico como inorgânico.<sup>[5]</sup>

Como exemplo de aplicação de novos materiais aplicados à fases estacionárias pode ser citado o artigo publicado por Huang e colaboradores, no ano de 2011, no qual foi desenvolvido uma coluna PLOT para troca iônica a partir de uma mistura polimérica de quitosana e glutaraldeído obtendo um bom resultado ao separar proteínas.<sup>[49]</sup>

## 8. Avaliação de colunas PLOT-LC

Para avaliar colunas analíticas tubulares abertas do tipo PLOT em cromatografia líquida utiliza-se critérios físicos, químicos e cromatográficos.

### 8.1. Análises físicas

A microscopia de varredura (MEV) é uma das principais ferramentas na avaliação do estado físico das colunas. A foto fornecida por MEV permite a análise da uniformidade e espessura do filme poroso, e se este está devidamente aderido à parede capilar. A fim de avaliar a porosidade da fase estacionária, pode ser utilizado o método BET de adsorção de gases. Este método fornece informações sobre a área superficial da fase, o diâmetro médio e a distribuição dos poros. É importante ressaltar que os parâmetros físicos de uma coluna são imprescindíveis para sua qualidade; no entanto, poucos trabalhos os exploram.

### 8.2. Análises químicas

A análise química tem como objetivo verificar a seletividade da coluna desenvolvida. Essa análise é realizada pela comparação entre os cromatogramas resultantes das separações de padrões analíticos injetados em uma coluna convencional com os obtidos pela coluna PLOT. A construção de gráficos do tipo Radar é um método gráfico que possibilita a visualização de múltiplas variáveis de forma bidimensional, enquanto

que a utilização de gráficos cinéticos “*Kinetic Plots*”, facilitam esse tipo de análise pois permitem uma rápida visualização dos resultados obtidos.<sup>[45]</sup>

### 8.3. Análises cromatográficas

As análises cromatográficas empregadas na avaliação de coluna são realizadas aplicando parâmetros adimensionais ou reduzidos como a impedância (E), altura reduzida (h), resistência ao fluxo ( $\emptyset$ ) e velocidade reduzida (v). Por meio destes parâmetros é possível efetuar comparações entre colunas com características dimensionais e constitucionais diferentes. Além disso, é possível comparar a eficiência de separações com eluentes de diferentes viscosidades e solutos com diferentes coeficientes de difusão. Tais parâmetros estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Parâmetros cromatográficos para colunas tubulares abertas em cromatografia líquida.

Parâmetro	Equações para OT-LC
Altura reduzida	$h = L / Nd_c$
Velocidade reduzida	$v = \mu d_c / D_m$
resistência ao fluxo	$\emptyset = \Delta P t_m d_c^2 / \eta L^2$
Impedância	$E = t_m \Delta P / N^2 \eta (1+k)$

As expressões reduzidas de altura (h) e velocidade (v), originalmente propostas por Knox e Parcher, são utilizadas para avaliar os efeitos do fluxo na eficiência cromatográfica. Esses parâmetros se baseiam no diâmetro interno da coluna ( $d_c$ ); no coeficiente de difusão do analito na fase móvel; no comprimento da coluna (L); no número de pratos teóricos (N) e na velocidade linear ( $\mu$ ). Já, a resistência de fluxo ( $\emptyset$ ) relaciona a variação de pressão ( $\Delta P$ ), o diâmetro interno da coluna ( $d_c$ ) e o tempo morto ( $t_m$ ) com a viscosidade da fase móvel ( $\eta$ )

e o comprimento da coluna cromatográfica (L). Por fim, a impedância de separação (E) relaciona o tempo morto ( $t_m$ ), a variação de pressão ( $\Delta P$ ), o número de pratos teóricos (N), a viscosidade da fase móvel ( $\eta$ ) e o fator de retenção (k).

Outro parâmetro teórico utilizado para aferir a eficiência de uma coluna é a eficiência cinética. A eficiência cinética é definida como o tempo mínimo necessário para que uma coluna analítica obtenha certo número de pratos teóricos. Como as colunas tubulares abertas, tanto a WCOT quanto a PLOT, não possuem seu interior completamente preenchido, apresentam maior permeabilidade em comparação com as colunas analíticas com o interior completamente preenchido. Desta forma, teoricamente alcançam maior número de pratos em menos tempo.

## 9. Instrumentação básica para colunas PLOT-LC

Para se utilizar cromatografia líquida miniaturizada é necessário adaptar alguns elementos de um cromatógrafo líquido convencional, como a bomba, o módulo de injeção, os conectores e o sistema de detecção. Todos os componentes instrumentais devem ser dimensionados, para que não haja efeitos negativos sobre os parâmetros cromatográficos que podem comprometer a eficiência da separação.

O sistema de bombeamento deve ser capaz de gerar fluxos da ordem de nanolitros ou microlitros por minuto. Para vazões da ordem de 50 a 150  $\mu\text{mL min}^{-1}$  estão disponíveis comercialmente bombas do tipo seringa e do tipo duplo pistão recíprocante, sendo este segundo o responsável pelo melhor desempenho devido à rapidez em atingir o equilíbrio de vazão, facilidade na criação de gradientes e boa compensação da pressão da coluna,<sup>[50]</sup> além de possibilitarem a formação de gradientes binários, terciários e quaternários. Mas, quando os fluxos são da ordem de nanolitros por minuto, para colunas com

diâmetro interno inferior a 500  $\mu\text{m}$ , torna-se necessário o uso de *splitters* ou divisores, que atuam no sistema dividindo o fluxo. Essa técnica possibilita o uso de equipamentos de HPLC convencionais; contudo não há diminuição no gasto de fase móvel e os fluxos obtidos são pouco reprodutíveis.<sup>[42]</sup>

As conexões são responsáveis pelos volumes mortos pré e pós-coluna, que contribuem para o alargamento das bandas. Idealmente, a coluna deveria ser diretamente conectada ao injetor e ao detector, contudo esse processo é difícil e acaba exigindo alguns tubos e conexões. Os materiais mais utilizados para as conexões são de aço inoxidável e de poli-éter-éter-cetona (PEEK), e as peças usadas para conectar os componentes instrumentais devem apresentar dimensões adequadas à coluna em uso.<sup>[50]</sup>

Também, é importante ressaltar que a injeção de volumes muito baixos é prejudicial à sensibilidade do detector, e a injeção de volumes elevados, ocasiona a sobrecarga da coluna e o alargamento de bandas.<sup>[51]</sup> Por isso, o volume injetado deve ser preciso e, no caso da cromatografia líquida miniaturizada, o volume de amostra injetado deve ser proporcional ao quadrado do diâmetro interno da coluna. Assim, o volume a ser injetado é consideravelmente inferior àquele de injetores convencionais de HPLC, normalmente até 100  $\mu\text{L}$ , de modo que estes são frequentemente adaptados para injetar nanolitros de amostra. Para evitar o uso de adaptações, válvulas posicionadas entre o injetor e a coluna podem ser utilizadas.<sup>[21]</sup>

Com respeito aos sistemas de detecção, a cromatografia líquida miniaturizada permite o uso da maioria dos detectores usados em HPLC; porém as celas de detecção devem ser projetadas para atender aos requisitos de menor volume (ordem de micro e nanolitros) e baixo fluxo, visando manter a sensibilidade de detecção.

Um dos detectores mais comuns é o de absorvância no ultravioleta, onde a cela de detecção deve

ter um volume máximo de algumas dezenas de nanolitros para que não haja alargamentos significativos das bandas. A melhor maneira de evitar que estes alargamentos ocorram é efetuar a detecção *on-column*, em que uma parte da própria coluna (sem o filme de poliimida e a fase estacionária) atua como cela de detecção. Porém, como os tubos de sílica fornecem caminhos ópticos muito reduzidos, a detectabilidade nesse tipo de análise é muito baixa. Alternativamente, a detecção pode ser realizada em um capilar conectado à saída da coluna. Várias tentativas foram feitas para prolongar o caminho óptico, desde celas do tipo bolha até celas multirefletoras.<sup>[44]</sup>

Outra opção é a detecção por fluorescência que é considerada uma técnica de detecção muito sensível, mas exige que o analito seja fluorescente, ou seja derivatizado para que se torne fluorescente e então seja detectado. Além disso, detectores eletroquímicos e por condutividade, além de espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier, também podem ser usados.<sup>[44]</sup>

No entanto, o acoplamento com a espectrometria de massas, que é a técnica universal de detecção mais sensível, até o momento, é o mais adequado para as colunas tubulares abertas em cromatografia líquida pois como elas tem pequenos fluxos e pressões de saída tornam-se compatíveis com esse tipo detector.

## 10. Acoplamento com Espectrometria de Massas

As colunas tubulares abertas do tipo PLOT, quando usadas em cromatografia líquida miniaturizada, possuem velocidade linear ótima cerca de 3 vezes menor que a de colunas convencionais, ou seja, fornecem fluxos mais lentos e, conseqüentemente, geram menos pressão de saída permitindo o acoplamento direto com o sistema de detecção de espectrometria de massas.

Tal acoplamento é bastante promissor pois a espectrometria de massas é uma das técnicas de detecção mais eficientes da atualidade. No entanto, como a espectrometria de massas é compatível com amostras gasosas, é necessário o uso de interfaces e ionizadores entre a saída da coluna miniaturizada com o detector de espectrometria de massas. Na presente revisão serão discutidas a fonte de ionização do tipo de eletrospray (ESI) e a fonte de ionização por ionização por elétrons (EI).

## 10.1. Acoplamento entre c-LC(PLOT) e MS empregando ESI

### 10.1.1. Histórico da ESI

Na década de 1980 houve um grande empenho científico em medir com precisão a massa molecular de macromoléculas biologicamente importantes, principalmente proteínas. No entanto, as proteínas apresentam características que não são compatíveis com os métodos de ionização por elétrons e ionização química, os quais eram os únicos métodos de ionização robustos disponíveis na época.<sup>[52]</sup>

Por serem moléculas polares, não voláteis e termicamente lábeis quando ionizadas com elétrons ou por ionização química, as estruturas das proteínas eram completamente destruídas e, conseqüentemente, os resultados gerados não eram eficientes. Como alternativa passou-se a usar a técnica de ionização de bombardeamento com átomos rápidos (FAB), técnica esta que produz íons individualmente carregados do analito.<sup>[53]</sup>

No entanto, a técnica FAB não é adequada para a ionização de moléculas grandes e, somado ao fato dos analisadores de massa da época não conseguirem medir com precisão a valor carga-massa das proteínas, não era possível analisar tais moléculas. Sendo assim, a única maneira de analisar esse tipo de amostra era através da

digestão das amostras antes da análise, resultando muitas vezes na descaracterização delas.<sup>[52]</sup>

Este problema foi contornado em 1982 por Dole e colaboradores, através do desenvolvimento do método de ionização por electrospray (ESI). Os autores descreveram um dispositivo capaz de transformar gotículas de água em íons no estado de vapor; eles geraram macro íons, a partir de soluções diluídas de espécies poliméricas em pressão atmosférica.<sup>[53]</sup>

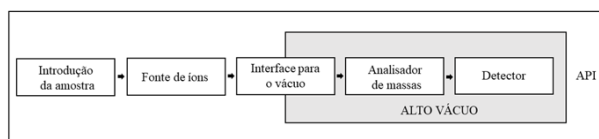
No entanto, a técnica de ionização por electrospray só foi acoplada à Espectrometria de Massas em 1984 quando Fenn e Yamashita demonstraram a aplicabilidade desta como método de ionização branda ao transferirem moléculas grandes, proteínas, para íons em forma gasosa. O acoplamento rendeu a Fenn o prêmio Nobel de Química em 2002.<sup>[54]</sup> Desde então, a interface electrospray tornou-se confiável para a ionização de macromoléculas biologicamente importantes, e a ESI-MS tornou-se uma ferramenta eficaz para a confirmação estrutural tridimensional de moléculas.

Essa interface é ideal para ionizar compostos que apresentam desde média até alta polaridade, e alta massa molecular. A utilização da interface electrospray no acoplamentos de cromatografia líquida capilar utilizando colunas analíticas tubulares abertas do tipo PLOT com espectrometria de massas já foi realizada algumas vezes e tende a crescer nesta área de pesquisa substituindo os analisadores do tipo UV-Vis que atualmente são os mais utilizados.

Como exemplo bem-sucedido deste acoplamento pode ser citado um artigo publicado por Karger e colaboradores. Os autores desenvolveram uma coluna tubular aperta do tipo PLOT de fase estacionária de poli(estireno-co-divinilbenzeno) (OS-DVB) com a finalidade de analisar células de câncer de útero, obtendo como resultado uma eficiente separação de 1071 peptídeos associados a 536 proteínas.<sup>[47]</sup>

### 10.1.2. Instrumentação utilizando ESI

O electrospray é uma técnica de ionização em que íons são produzidos através de um spray gerado por uma tensão aplicada a um líquido criando um aerossol. A ESI ou eletropulverização é uma técnica de ionização muito aplicada, pois permite a criação de íons à pressão atmosférica ao invés de à vácuo. A Figura 5 ilustra em diagrama um espectrômetro de massas que utiliza ESI como ionizador, enfatizando o fato deste ser uma interface que opera em pressão atmosférica.



**Figura 5.** Montagem das principais partes de um espectrômetro de massas típico, ilustrando a fonte de íons fora do sistema de alto vácuo. Neste caso, a ionização ocorre à pressão atmosférica (API). Adaptado da referência [54].

Na ESI utiliza-se a energia elétrica para auxiliar a transferência de íons da solução para a fase gasosa, antes de serem submetidos à análise por espectrometria de massas. Logo, as espécies iônicas em solução são analisadas com sensibilidade aumentada por meio de ESI-MS. Além disso, os compostos neutros também podem ser convertidos para a forma iônica, em solução ou em fase gasosa, por protonação ou cationização. A transferência de espécies iônicas da solução para a fase gasosa envolve três etapas: a dispersão da solução por meio de pulverização, seguida pela evaporação do solvente e, por último, a formação de íons a partir das gotículas altamente carregadas.

Nesse tipo de ionização a amostra é dissolvida em um solvente polar, tipicamente menos volátil do que os utilizados em cromatografia gasosa e, em seguida, é bombeada através de um capilar de aço inoxidável

no qual corre uma corrente elétrica que flutua de 2000 a 4000 V. O eluente é então nebulizado para uma câmara na presença de um campo eletrostático forte e de um gás de secagem aquecido. O campo eletrostático provoca a dissociação dos analitos, enquanto que o gás de secagem aquecido evapora o solvente. À medida que as gotículas encolhem, a concentração de carga nelas aumenta. Eventualmente, as forças repulsivas entre íons com cargas semelhantes excedem as forças coesivas e os íons são ejetados para a fase gasosa. Por fim, estes íons são atraídos e passam para o espectrômetro de massas, induzidos pelos efeitos combinados da atração eletrostática e vácuo.

A fonte de ionização ESI é simples, quando comparada com outras fontes para espectrometria de massas. É necessária apenas uma fonte de alta tensão (1000 a 7000 V) que esteja em contato com a solução contendo os analitos. Tipicamente, esta solução é bombeada através de um capilar com diâmetro interno de 50 a 100  $\mu\text{m}$  com fluxo inferior a 10  $\mu\text{L min}^{-1}$ . No caso das colunas PLOT para cromatografia líquida os fluxos são menores que 1  $\mu\text{L min}^{-1}$ , devido ao diâmetro interno inferior a 50  $\mu\text{m}$ , e o processo de ionização passa a ser chamado de nanoelectrospray (nanoESI).

### 10.1.3. Íons formados por ESI

Durante a ionização por ESI pode ocorrer a formação de três tipos de íons: moleculares, moléculas protonadas/desprotonadas, ou moléculas cationizadas ou anionizadas. A extensão com a qual cada um destes íons é formado pode ser compreendida em termos do balanço entre três processos essencialmente distintos, que ocorrem no interior do capilar.

As reações redox de oxidação e redução produzem íons moleculares ( $M^{+\bullet}$ ) ou ( $M^{-\bullet}$ ). Já, as reações ácido/base que proporcionam respectivamente protonação e desprotonação geram moléculas protonadas,



$[M+H]^+$ , ou desprotonadas,  $[M-H]^-$ . Por último, as reações de coordenação com cátions, geralmente os da família 1A, ou ânions, principalmente cloretos, levam à formação de moléculas cationizadas  $[M+Na]^+$ , ou anionizadas  $[M+Cl]^-$ .

#### 10.1.4. Vantagens e desvantagens da ionização por ESI

Dentre as vantagens da ESI, destaca-se a sua aplicabilidade à uma vasta gama de analitos, incluindo biomoléculas de elevada massa molecular, tais como proteínas e ácidos nucleicos. Esta técnica de ionização é considerada relativamente suave/branda, sendo eficaz na análise de compostos não voláteis e termicamente lábeis. Além disso, é uma técnica que permite o controle sobre a fragmentação, é prontamente acoplada a cromatografia líquida miniaturizada, capaz de produzir complexos intactos não covalentes, e permite a formação de múltiplas cargas no analito de interesse.

Algumas limitações ao uso desta técnica de ionização são a pouca fragmentação dos analitos, sendo necessário realizar análises em tandem para a obtenção de informações estruturais, dificuldade em criar bibliotecas espectrais já que a fragmentação não é uniforme, e efeito de supressão dos íons formados. Destacam-se também o fato da ionização por electrospray operar com maior eficiência em cromatografia em fase reversa, sendo muitas vezes necessárias reações pós coluna para adequar a fase, e a necessidade do analito ser polar e o solvente volátil.

## 10.2. Acoplamento entre c-LC(PLOT) e MS empregando EI

### 10.2.1. Histórico EI

A ionização por elétrons foi desenvolvida por Dempster em 1918, sendo o primeiro modo de ionização a ser acoplado a um espectrômetro de massas. Em 1929, Bleakney e Nier aperfeiçoaram o equipamento. A utilização dessa forma de ionização acoplada a espectrometria de massas com um detector de uma separação cromatográfica, realizada por uma coluna tubular aberta, conferiu o ápice de eficiência à cromatografia gasosa.<sup>[55]</sup>

Esse tipo de ionização acontece em vácuo, ou em baixas pressões, e é caracterizada por realizar uma fragmentação intensa, gerando íons moleculares. Sendo assim, é idealmente utilizada para análise de moléculas pequenas, pois quando uma molécula grande é ionizada desta maneira é muito fragmentada ao ponto de ser difícil identifica-la.

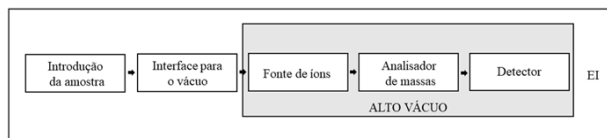
Em cromatografia líquida miniaturizada as colunas analíticas tubulares abertas apresentam baixa pressão de saída, o que torna promissor o acoplamento com um espectrômetro de massas utilizando como fonte de ionização a ionização por elétrons, uma vez que este opera em baixas pressões. No entanto, até o momento não existem publicações que relatem o acoplamento. c-(PLOT)LC-(EI)MS; apenas o acoplamento com colunas empacotadas foram exploradas.

Em 1996 Cappiello e colaboradores realizaram um trabalho pioneiro ao acoplarem c- LC-(EI)MS através de uma micro versão da interface Particle Beam (PB). O grupo de Cappiello aprimorou a instrumentação e, até o momento, é um dos poucos centros de pesquisa mundiais que trabalham na área, realizando o acoplamento direto, sem interface, da coluna miniaturizada à fonte de impacto por elétrons. Os pontos fortes do acoplamento direto são

a mitigação do efeito de matriz, a alta tolerância a sais e outros solventes não voláteis, e a relativa simplicidade instrumental.<sup>[56]</sup>

### 10.2.2. Instrumentação utilizando EI

Em um espectrômetro de massas que usa como fonte de ionização o impacto por elétrons, depois de separada pela coluna analítica, a amostra é introduzida em uma interface para o vácuo para que a pressão do eluente torne-se compatível com a fonte de ionização. Em seguida o eluente é ionizado na fonte de íons, e passa para um analisador de íons do espectrômetro de massas, aonde a razão massa-carga ( $m/z$ ) das espécies produzidas pela fonte de íons é medida. Por fim, esses dados são transmitidos para um detector que irá convertê-los em um cromatograma. A Figura 6 ilustra em diagrama de blocos um espectrômetro de massas que utiliza EI como fonte de ionização.



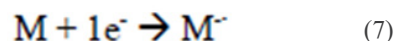
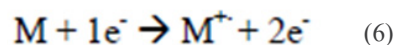
**Figura 6.** Montagem das principais partes de um espectrômetro de massas típico, ilustrando a fonte de íons dentro de um sistema submetido a alto vácuo. Adaptado da referência [54].

A ionização por elétrons, também denominada impacto eletrônico, é uma técnica que consiste em direcionar um feixe de elétrons de energia definida sobre uma amostra, em fase gasosa, sob baixa pressão. No processo de ionização o feixe de elétrons é gerado pelo aquecimento de um filamento catódico, comumente constituído de rênio, e é direcionado para a câmara de ionização, mantida a baixa pressão por uma bomba de vácuo, através de uma fenda. Um potencial elétrico, geralmente 70 V, é aplicado para acelerar o feixe de elétrons através da fenda. No lado oposto da câmara,

um anodo positivamente carregado atua como receptor do feixe de elétrons, de forma a manter o mesmo devidamente focalizado.<sup>[55]</sup> Em seguida, a entrada da amostra ocorre em outra fenda do bloco, sendo carregada por um gás; os elétrons descrevem trajetórias helicoidais na câmara, visando aumentar a chance de ionização. Os íons formados na fonte são atraídos para uma outra fenda, a qual dá acesso ao analisador de massas, e são acelerados por eletrodos. Em geral, essa câmara é aquecida em torno de 300° C para prevenir a condensação dos íons formados.

### 10.2.3. Íons formados por EI

Geralmente são formados 100 vezes mais íons radicalares positivos do que íons negativos, sendo que para que esse processo ocorra, a energia cinética de bombardeamento deve superar a energia de ionização da molécula alvo.<sup>[55]</sup> Ao interagir com a molécula neutra do analito (M), pode ocorrer a ejeção ou adição de um elétron à molécula, que passará a apresentar um número ímpar de elétrons, configurando um íon radicalar, conforme equações (6) e (7).



Nesse contexto, a maioria dos equipamentos que trabalham com feixes de elétrons de energia fixa, opera com 70 eV de energia. O excedente energético da energia de ionização é responsável pela fragmentação da molécula, e cria diferentes padrões de fragmentação que são usados para identificar e quantificar os compostos que estão sendo analisados.

#### 10.2.4. Vantagens e desvantagens da ionização por EI

As principais vantagens em utilizar uma fonte de ionização por elétrons são relacionadas a sua grande reprodutibilidade, fornecimento de informações estruturais, instrumentação bem estabelecida e simples, a existência de bibliotecas virtuais de espectros, e aplicabilidade à uma vasta gama de compostos.

Como desvantagem destacam-se o fato do analito de interesse necessariamente ser volátil e termicamente estável, limitando a aplicação para uma diversa gama de compostos e a impossibilidade de ionizar compostos de alta massa molecular devido a intensa ionização que promove uma alta fragmentação da estrutura molecular, descaracterizando a amostra. O acoplamento c-(PLOT) LC-(EI)MS requer o desenvolvimento de estratégias capazes de contornar a problemática das diferenças de pressão, já que a ionização por elétrons opera em vácuo e a cromatografia líquida miniaturizada não; assim como o fato dessa forma de ionização ser mais efetiva em moléculas em fase gasosa.

### 11. Vantagens e limitações das colunas PLOT-LC

#### 11.1. Vantagens

Existem diversas vantagens em se utilizar colunas analíticas tubulares abertas do tipo PLOT em cromatografia líquida. Como exemplo, o menor consumo da fase estacionária devido à redução do diâmetro interno das colunas analíticas. Como nas colunas PLOT a fase estacionária encontra-se aderida apenas a parede interna do capilar o consumo é ainda menor, permitindo a utilização de fases mais raras e caras.

Outra vantagem é o menor consumo da fase móvel, coincidindo com princípios da Química Verde. Isso ocorre em função da separação cromatográfica não ser dependente do fluxo volumétrico de fase móvel, mas sim de sua velocidade linear média. Sendo assim, a mesma separação é atingida em duas colunas semelhantes, porém, de diferentes diâmetros internos, se a velocidade linear da fase móvel for a mesma. Isto possibilita o uso de fases móveis mais caras e mais tóxicas, sem apresentar ameaça ambiental, pois o volume de resíduo gerado após uma separação é bastante limitado (2-5 ml).<sup>[57,58]</sup>

Também é possível observar o aumento da sensibilidade quando são utilizados detectores sensíveis a concentração como, por exemplo, UV-Vis e fluorescência. Isto é consequência direta da miniaturização do diâmetro interno da coluna, uma vez que o processo de diluição dentro de uma coluna cromatográfica é inversamente proporcional ao quadrado do diâmetro interno. Por possuírem um espaço não preenchido em seu interior, as colunas do tipo PLOT apresentam também a vantagem de serem mais permeáveis quando comparadas com as colunas empacotadas. Este fenômeno faz com que estas colunas apresentem menor pressão de saída, o que facilita o acoplamento com a espectrometria de massas.<sup>[40]</sup>

Outra consequência relacionada a fase estacionária é a possibilidade de analisar amostras que tenham pequeno volume como, por exemplo, amostras biológicas. Como a fase estacionária é pequena, não é possível a injeção de uma grande quantidade de amostra para não sobrecarregá-la. Desta forma, amostras consideradas “raras” que não podem ser separadas em análises convencionais, por terem um volume muito pequeno, podem ser separadas cromatograficamente por essas colunas.<sup>[45]</sup>

Há também vantagens relacionadas ao uso dos tubos capilares de sílica fundida como a possibilidade da fabricação de colunas mais longas, a aplicabilidade de programação de temperatura, e a facilidade de manutenção, além de ser um material com preço muito

menor que o aço inox comumente utilizado como tubo nas colunas convencionais.

Por último, deve-se considerar que o uso de colunas tubulares abertas do tipo PLOT em cromatografia líquida caminha em direção à cromatografia unificada isto se deve ao fato de as colunas PLOT já serem amplamente utilizadas, com sucesso, em cromatografia gasosa. Se a mesma eficiência cromatográfica for alcançada no uso dessas colunas em cromatografia líquida, em princípio será possível o desenvolvimento de um cromatógrafo com apenas uma coluna PLOT capaz de realizar análises em fase gasosa, líquida, e com fluidos supercríticos, princípio da cromatografia unificada.<sup>[54]</sup>

## 11.2. Limitações

Como desvantagem, vale salientar que a cromatografia líquida miniaturizada ainda não atingiu alta popularidade devido a alguns desafios a serem superados, incluindo a indisponibilidade de uma ampla variedade de equipamentos capazes de trabalhar com fluxos baixos com precisão, além do elevado custo destes. No entanto, grandes empresas da área estão investindo neste tipo de tecnologia, já existindo cromatógrafos líquidos comerciais que operam em sua totalidade nas escalas micro e nano.

Outra complicação é a produção das colunas. Como ainda não existem colunas PLOT para cromatografia líquida comercialmente disponíveis, precisam ser preparadas em laboratórios de pesquisa isso é um obstáculo adicional pois, devido ao diâmetro interno reduzido podem acontecer entupimentos e as colunas produzidas em diferentes laboratórios apresentarem características distintas. Isso ocorre devido a ausência de metodologias consolidadas para o preparo das colunas. Por fim, destaque-se a baixa capacidade amostral. Mas, a fim de contornar essa limitação, alguns grupos de pesquisa veem desenvolvido colunas analíticas tubulares

abertas do tipo PLOT para cromatografia líquida de multicanaís, possibilitando a injeção de maior quantidade de amostra.<sup>[59]</sup>

## 12. Aplicações

As colunas analíticas tubulares abertas do tipo PLOT têm diversas aplicações em cromatografia líquida miniaturizada. As aplicações nas áreas de proteômica, metabolômica e ambiental são as mais exploradas até o presente. O diâmetro interno reduzido, ao redor de 10  $\mu\text{m}$ , reduz a capacidade de carga da coluna, pois limita o volume interno e a quantidade de fase estacionária. Sendo assim, usualmente utiliza-se esse tipo de coluna para separar amostras de disponibilidade limitada.

A maioria dos trabalhos relatam o desenvolvimento de colunas PLOT com fase estacionária de PS-DVB que, por adsorção, separam moléculas com maior massa molecular e alta polaridade, o que faz com que a área de proteômica seja a mais explorada, até o presente momento.

Como já foi anteriormente destacado, o primeiro trabalho a reintroduzir o uso de colunas PLOT em cromatografia líquida envolveu a separação de proteínas.<sup>[47]</sup> A partir deste trabalho outros foram realizados com essa mesma finalidade, como os citados a seguir. Lundanes e colaboradores, separaram proteínas intactas do leite desnatado acoplando a cromatografia líquida miniaturizada com a espectrometria de massas, no qual foi obtido baixo carry-over e boa repetibilidade.<sup>[60]</sup> Outro trabalho bastante interessante, realizado pelo mesmo grupo de pesquisa, foi a separação de proteínas pequenas encontradas em células de câncer e mama, no qual obtiveram boa eficiência e repetibilidade com o uso de outra fase estacionária além da PS-(DVB): a OSD-OT.<sup>[61]</sup>

Wang e colaboradores prepararam uma coluna PLOT de 25  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno, e fase estacionária

de PS-(DVB), através de uma reação de polimerização in situ. Os autores estudaram os efeitos da concentração do precursor polimérico e do tempo de reação na variação da espessura do filme de fase estacionária e encontraram que em menores concentrações e menor tempo de reação o filme tende a ficar mais fino. As colunas desenvolvidas foram utilizadas na análise dos produtos provenientes da digestão proteica de fígado de camundongos. Os resultados comparando uma coluna PLOT e uma coluna empacotada de 75 µm de diâmetro interno, mostraram uma capacidade de pico relativamente similar, o que reforça a boa aplicabilidade das colunas PLOT em cromatografia líquida miniaturizada.

A fim de solucionar a limitação da baixa capacidade de volume de amostra, principalmente quando se visa análises ambientais, alguns grupos de pesquisa desenvolveram colunas PLOT de multicanais. Kazarian e colaboradores desenvolveram uma coluna contendo 126 capilares internos, cada um de 4 µm de diâmetro interno e 0,26 µm de espessura. A coluna PLOT desenvolvida foi aplicada inicialmente na etapa de microextração de amostras ambientais de água contendo hidrocarbonetos poli aromáticos. Em condições otimizadas de análise, relataram recuperações dentro da faixa de 77% - 103%. A utilização dessa coluna na separação analítica de proteína citocromo C em modo isocrático foi investigada relatando reprodutibilidades abaixo de 1%, evidenciando o potencial dessas colunas na etapa de separação analítica.<sup>[5]</sup> Outra coluna multicanais bastante similar a esta foi desenvolvida Silva e colaboradores.<sup>[59]</sup>

Por fim, na tentativa desenvolver novas fases estacionárias para as colunas tubulares abertas do tipo PLOT para cromatografia líquida Al-Hussin e colaboradores desenvolveram uma coluna PLOT de cloreto de aminopropilidimetilamônio entrecruzado com divinilbenzeno (APAT-DVD) contendo um seletor quiral baseado em β-ciclodextrina (HSβCD) para aplicar em eletrocromatografia. Os autores destacam a elevada reprodutibilidade na faixa de 1,01 - 4,69% para a coluna

PLOT separar isômeros de tirosina, ácido aspártico e lisina.<sup>[5]</sup>

### 13. Conclusões e perspectivas futuras

A cromatografia líquida capilar com colunas analíticas tubulares abertas do tipo PLOT ainda não atingiu sua eficiência máxima e grande popularidade devido à alguns desafios a serem superados, como a baixa capacidade amostral, e as limitações instrumentais. No entanto, as colunas do tipo PLOT se encontram em desenvolvimento e as aplicações relatam resultados satisfatórios. A possibilidade da redução do diâmetro interno da coluna para níveis sub 10 µm representa a possibilidade de atingir elevados níveis de eficiência necessários em análises complexas.

Destaca-se também a possibilidade de acoplamento com a técnica de detecção de espectrometria de massas. As fontes de ionização por electrospray e por ionização por elétrons representam ideais extremos de análise. O electrospray ioniza com precisão moléculas polares e de alta massa molecular, enquanto a ionização por elétrons é ideal para moléculas não polares e de baixa massa molecular. A ionização por elétrons é uma técnica que gera alta fragmentação, possibilitando a obtenção de espectros de massas contendo informações estruturais usando apenas um estágio de massas. Já, a ionização por electrospray é branda e para que os compostos sejam identificados é necessário a aplicação de espectrometria de massas sequencial ou tandem (MS/MS).

Apesar da utilização de colunas PLOT para separações em cromatografia líquida ser um campo muito promissor, atualmente, as aplicações deste tipo de coluna ainda estão quase que exclusivamente voltadas às análises proteômicas e metabolômicas. A maioria dos trabalhos mostram o desenvolvimento de colunas PLOT com fase a base de PS-DVB, sendo que muitos autores entram em conflito sobre a melhor metodologia

para este processo. Sendo assim, nota-se uma lacuna no desenvolvimento de colunas PLOT com outras fases estacionárias que não sejam a base de PS-DVB. O desenvolvimento de novas fases estacionárias tornaria possível ampliar o potencial de utilização deste tipo de coluna na separação de compostos de menor massa molecular e maior polaridade, características distintas das moléculas estudadas atualmente empregando PS-DVB.

Desta forma, o cenário mostra-se promissor, já que diversos grupos de pesquisa têm exercido atividades ligadas a miniaturização da cromatografia líquida desde a síntese de fases estacionárias, novos procedimentos para o preparo das colunas, até a melhora no acoplamento com

sistemas de detecção. Sendo assim, espera-se que a partir do panorama atual, nos próximos anos, a cromatografia líquida capilar utilizando colunas analíticas do tipo PLOT possa se consolidar como uma alternativa aos meios tradicionais de separação e identificação.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPESP (Proc. N° 2017/02147-0), CNPq (Proc. N° 140277/2018-8 e Proc. N° 307293/2014-9) e a CAPES code 001 pelo apoio financeiro.

## Referências

- [1] SAITO, Y. et al. Capillary columns in liquid chromatography: between conventional columns and microchips. *Journal Of Separation Science*, v.27, n.17-18, p.1379-1390, 2004.
- [2] LUO, Q. et al. On-Line 1D and 2D Porous Layer Open Tubular/LC-ESI-MS Using 10- $\mu$ m-i.d. Poly(styrene-divinylbenzene) Columns for Ultrasensitive Proteomic Analysis. *Analytical Chemistry*, v.79, n.16, p.6174-6181, 2007.
- [3] ROGEBERG, M. et al. Separation optimization of long porous-layer open-tubular columns for nano-LC-MS of limited proteomic samples. *Journal Of Separation Science*, v.36, n.17, p.2838-2847, 2013.
- [4] LI, R. et al. Preparation and Application of Porous Layer Open Tubular Capillary Columns with Narrow Bore in Liquid Chromatography. *Chinese Journal Of Analytical Chemistry*, v.45, n.12, p.1865-1873, 2017.
- [5] KAZARIAN, A. A. et al. Wall modified photonic crystal fibre capillaries as porous layer open tubular columns for in-capillary micro-extraction and capillary chromatography. *Analytica Chimica Acta*, v.905, p.1-7, 2016.
- [6] COLLINS, C. H. Michael Tswett e o “nascimento” da Cromatografia. *Scientia Chromatographica*, v.1, n.1, p.7-20, 2009.
- [7] LANÇAS, F. M. Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE. Campinas: Átomo, 2016.
- [8] ETTRE, L. The development of gas chromatography. *Journal Of Chromatography A*, v.112, n.1, p.1-26, 1975.
- [9] GOLAY, M. J. E. Vapor Phase Chromatography and Telegrapher's Equation. *Analytical Chemistry*, v.29, n.6, p.928-932, 1957.
- [10] BLUE, L. E. et al. Recent advances in capillary ultrahigh pressure liquid chromatography. *Journal Of Chromatography A*, v.1523, n.2, p.17-39, 2017.
- [11] LANÇAS, F. M. Vantagens e Limitações da Miniaturização em Cromatografia Líquida. *Scientia Chromatographica*, São Carlos, v.1, n.3, p.51-60, 2009.
- [12] SILVA, R. et al. Cromatografia Líquida Capilar: Estado da Arte e Aplicações. *Química Nova*, v.34, n.5, p.841-849, 2011.
- [13] HORVATH, C. G. et al. Fast liquid chromatography. Investigation of operating parameters and the separation of nucleotides on pellicular ion exchangers. *Analytical Chemistry*, v.39, n.12, p.1422-1428, 1967.
- [14] SAITO, Y. et al. Capillary columns in liquid chromatography: between conventional columns and microchips. *Journal Of Separation Science*, v.27, n.17-18, p.1379-1390, 2004.

- [15] ISHII, D. et al. A study of micro-high-performance liquid chromatography. *Journal Of Chromatography A*, v.144, n.2, p.157-168, 1977.
- [16] HIBI, K. et al. Studies of open tubular micro capillary liquid chromatography. 1. The development of open tubular micro capillary liquid chromatography. *Journal Of High Resolution Chromatography*, v.1, n.1, p.21-27, 1978.
- [17] SCOTT, R. P. W. et al. Mode of operation and performance characteristics of microbore columns for use in liquid chromatography. *Journal Of Chromatography A*, v.169, p.51-72, 1979.
- [18] SCOTT, R. P. W. et al. Use of microbore columns for rapid liquid chromatographic separations. *Journal Of Chromatography A*, v.186, p.475-487, 1979.
- [19] SCOTT, R. P. W.; KUCERA, P. Use of microbore columns for the separation of substances of biological origin. *Journal Of Chromatography A*, v.185, p.27-41, 1979.
- [20] TSUDA, T.; NOVOTNY, Mi. Packed microcapillary columns in high performance liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, v.50, n.2, p.271-275, 1978.
- [21] TSUDA, T.; NOVOTNY, M. Band-broadening phenomena in microcapillary tubes under the conditions of liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, v.50, n.4, p.632-634, 1978.
- [22] BRISTOW, P. A.; KNOX, J. H. Standardization of test conditions for high performance liquid chromatography columns. *Chromatographia*, v.10, n.6, p.279-289, 1977.
- [23] DANDENEAU, R. D.; ZERENNER, E. H. An investigation of glasses for capillary chromatography. *Journal Of High Resolution Chromatography*, v.2, n.6, p.351-356, 1979.
- [24] GRIFFIN, G. Fused-silica capillary - the story behind the technology. *LCGC North America*, v.20, n.10, p.928-938, 2002.
- [25] MACNAIR, J. E. et al. Ultrahigh-Pressure Reversed-Phase Liquid Chromatography in Packed Capillary Columns. *Analytical Chemistry*, v.69, n.6, p.983-989, 1997.
- [26] ISHII, D. Introduction to microscale high-performance liquid chromatography. 1 ed. Wiley, 1987.
- [27] BARTH, H. G. et al. Column liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, v.60, n.12, p.387-435, 1988.
- [28] VERZELE, M.; DEWAELE, C. Liquid chromatography in packed fused silica capillaries or Micro-LC: A repeat of the capillary gas chromatography story?. *Journal Of High Resolution Chromatography*, v.10, n.5, p.280-287, 1987.
- [29] CHERVET, J. P. et al. Instrumental Requirements for Nanoscale Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*, v.68, n.9, p.1507-1512, 1996.
- [30] VISSERS, J. P. C. et al. Microcolumn liquid chromatography: instrumentation, detection and applications. *Journal Of Chromatography A*, v.779, n.1-2, p.1-28, 1997.
- [31] LEAL, V. L. et al. Avanços recentes na miniaturização de colunas para cromatografia líquida. *Scientia Chromatographica*, v.9, n.2, p.117-133, 2017.
- [32] NAZARIO, C. E. D. et al. Miniaturized Column Liquid Chromatography. *Nanomaterials In Chromatography*, p.359-385, 2018.
- [33] NAZARIO, C. E. D. et al. Evolution in miniaturized column liquid chromatography instrumentation and applications: An overview. *Journal Of Chromatography A*, v. 1421, p.18-37, 2015.
- [34] FANALI, S. An overview to nano-scale analytical techniques: Nano-liquid chromatography and capillary electrochromatography. *Electrophoresis*, v.38, n.15, p.1822-1829, 2017.
- [35] PRETORIUS, V.; SMUTS, T. W. Turbulent Flow Chromatography. A New Approach to Faster Analysis. *Analytical Chemistry*, v.38, n.2, p.274-281, 1966.
- [36] ETTRE L. S., Open tubular columns in gas chromatography: 1 ed. Boston: Springer, 1965.
- [37] KNOX, J. H.; GILBERT, M. T. Kinetic optimization of straight open-tubular liquid chromatography. *Journal Of Chromatography A*, v.186, p.405-418, 1979.
- [38] JORGENSEN, J. W.; GUTHRIE, E. J. Liquid chromatography in open-tubular columns. *Journal Of Chromatography A*, v.255, p.335-348, 1983.
- [39] COUTINHO, L.; LANÇAS, F. M. Cromatografia Líquida Capilar1. Principais Características da Técnica. *Scientia Chromatographica*, v.3, n.2, p.115-130, 2011.

- [40] COLLINS, D. A. et al. Porous layer open tubular columns in capillary liquid chromatography. *The Analyst*, v.139, n.6, p.1292-1302, 2014.
- [41] FONSECA, J. R. Avaliação dos processos de pré-tratamento da superfície da sílica fundida no preparo de colunas capilares inertes para cromatografia gasosa. 2009. 78 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.
- [42] GODEFROOT, M. et al. High temperature silylation of glass capillary columns. *Journal Of High Resolution Chromatography*, v.3, n.7, p.337-344, 1980.
- [43] GROB K. Making and manipulating capillary columns for gas chromatography: Heidelberg: Verlagsgruppe, 1986.
- [44] GÖHLIN, K.; LARSSON, M. Study of polyorganosiloxanes (native and solvent swollen) for the preparation of narrow (5–15 µm I.D.) and long (1–6 m) open tubular columns in reversed-phase liquid chromatography. *Journal Of Chromatography A*, v.645, n.1, p.41-56, 1993.
- [45] CAUSON, T. J. et al. Kinetic optimisation of open-tubular liquid-chromatography capillaries coated with thick porous layers for increased loadability. *Journal Of Chromatography A*, v.1218, n.46, p.8388-8393, 2011.
- [46] GUIHEN, E.; GLENNON, J. D. Recent highlights in stationary phase design for open-tubular capillary electrochromatography. *Journal Of Chromatography A*, v.1044, n.1-2, p.67-81, 2004.
- [47] YUE, G. et al. Ultratrace LC/MS Proteomic Analysis Using 10-µm-i.d. Porous Layer Open Tubular Poly(styrene–divinylbenzene) Capillary Columns. *Analytical Chemistry*, v.79, n.3, p.938-946, 2007.
- [48] ROGEBERG, M. et al. On-line solid phase extraction–liquid chromatography, with emphasis on modern bioanalysis and miniaturized systems. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, v.87, p.120-129, 2014.
- [49] HUANG, X. et al. Multilayer chitosan-based open tubular capillary anion exchange column with integrated monolithic capillary suppressor. *Analytica Chimica Acta*, v.707, n.1-2, p.210-217, 2011.
- [50] SCHOMBURG, G. et al. Alkylpolysiloxane Glass Capillary Columns Combining High Temperature Stability of the Stationary Liquid and Deactivation of the Surface. *Chromatographia*, v.12, n.10, 1979.
- [51] BOUCHE, J.; VERZELE, M. A Static Coating Procedure for Glass Capillary Columns. *Journal Of Chromatographic Science*, v.6, n.10, p.501-505, 1968.
- [52] HOFFMANN, E.; STROOBANDT V. *Mass spectrometry: Principles and Applications*. 3 ed. England: Ed. John Wiley & Sons Ltd, 2007.
- [53] DASS C. *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*: New Jersey: John Wiley & Sons, 2007.
- [54] LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: “finalmente compatíveis?”. *Scientia Chromatographica*, v.1, n.2, p.35-61, 2009.
- [55] HOFFMANN, E.; STROOBANDT V. *Mass spectrometry: Principles and Applications*. 3 ed. England: John Wiley & Sons Ltd, 2007.
- [56] CAPPIELLO, A. et al. Is particle beam an up-to-date LC-MS interface? State of the art and perspectives. *Mass Spectrometry Reviews*, v.15, n.5, p.283-296, 1996.
- [57] JOHNS, C. et al. Design and performance of a light-emitting diode detector compatible with a commercial capillary electrophoresis instrument. *Electrophoresis*, v.25, n.1819, p.3145-3152, 2004.
- [58] RYVOLOVÁ, M. et al. Combined Contactless Conductometric, Photometric, and Fluorimetric Single Point Detector for Capillary Separation Methods. *Analytical Chemistry*, v.82, n.1, p.129-135, 2010.
- [59] SILVA, M. R. et al. An automated and self-cleaning nano liquid chromatography mass spectrometry platform featuring an open tubular multi-hole crystal fiber solid phase extraction column and an open tubular separation column. *Journal Of Chromatography A*, v.1518, n.15, p.104-110, 2017.
- [60] [60] ROGEBERG, M. et al. Separation of intact proteins on porous layer open tubular (PLOT) columns. *Journal Of Chromatography A*, v.1217, n.17, p.2782-2786, 2010.
- [61] VEHUS T. et al. Versatile, sensitive liquid chromatography mass spectrometry – Implementation of 10 µm OT columns suitable for small molecules, peptides and proteins. *Scientific Reports*, v.6, p.37507, 2016.
- [62] WANG, H. et al. Preparation of open tubular capillary columns by in situ ring-opening polymerization and their applications in cLC-MS/MS analysis of tryptic digest. *Analytica Chimica Acta*, v.979, p.58-65, 2017.