

Vantagens e Limitações da Miniaturização em Cromatografia Líquida



Fernando M. Lanças
Editor

Fernando M. Lanças

Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos
13560-970 – São Carlos (SP)
Brasil
flancas@iqsc.usp.br

Resumo

Apesar das inúmeras vantagens obtidas com a substituição das colunas de HPLC por colunas capilares (c-LC ou micro-LC), esta última ainda não conseguiu atingir o mesmo grau de popularidade de sua contrapartida em cromatografia gasosa, ou seja, a HRGC (“High Resolution Gas Chromatography”, ou Cromatografia Gasosa de Alta Resolução”). No presente trabalho, as principais vantagens do uso de colunas capilares em LC são apresentadas e discutidas, assim como os principais fatores que ainda dificultam o pleno desenvolvimento desta técnica.

Palavras-chave

Cromatografia líquida capilar;
miniaturização; HPLC; micro-LC.

Abstract

In spite of the several advantages we will obtain by employing capillary columns instead of the conventional HPLC columns in liquid chromatography, this miniaturization have not obtained the same popularity as that obtained by its counterpart in gas chromatography, meaning HRGC (“High Resolution Gas Chromatography”). In the present work, the main advantages of using capillary LC columns are introduced and critically discussed, as well as the major facts that still hinder the full development of this technique.

Keywords

Capillary liquid chromatography;
miniaturization; HPLC; micro-LC.

1. Introdução

Desde a introdução da cromatografia líquida no início da década de 1900^{1,2}, praticamente nenhuma atenção foi dada à miniaturização da técnica durante cerca de meia década. Os trabalhos pioneiros de A.J.P. Martin e diversos colaboradores na área de cromatografia³⁻⁵ culminaram com o desenvolvimento

do alicerce do que seria posteriormente a cromatografia líquida de partição e a cromatografia em fase gasosa. Graças a estes trabalhos, Martin recebeu, em 1952, o Prêmio Nobel de Química, o qual foi dividido com um de seus colaboradores, Syngge. Entretanto, e apesar destes avanços, a verdadeira miniaturização na área surgiu com os trabalhos de Marcel J.E. Golay, o qual, ao entrar em contato com a cromatografia, ficou intrigado

com a matemática do processo de separação. Sendo um engenheiro elétrico por formação e experiência, tentou interpretá-la por meio das equações dos telegrafistas, utilizadas para descrever o processo em linhas de transmissão. Golay apresentou esta comparação única em um Simpósio sobre Cromatografia Gasosa, organizado durante o Congresso Nacional da American Chemical Society, em 1956, o qual foi publicado somente no ano seguinte.⁶ Ainda em 1956, Golay continuou os trabalhos teóricos e alguns experimentais, apresentando os resultados na forma de relatórios internos para a empresa onde trabalhava. O relatório datado de 5 de Setembro de 1956, no qual Golay sugeriu experimentos com um tubo capilar de 0,5-1 mm de diâmetro interno contendo uma fase estacionária apropriada, é considerado o mais importante.⁷ Estes experimentos foram realizados no outono de 1956, e relatam os primeiros resultados experimentais com colunas capilares de cromatografia gasosa. A amostra era constituída de uma mistura Phillips 37 (hidrocarbonetos) e uma mistura de isômeros do pentano. A coluna possuía 12 pés (366 cm) de comprimento por um diâmetro interno de 0,055 polegadas. (1,37 mm), tendo a parede interna recoberta com Carbowax 1540 (polietileno glicól). A detecção foi efetuada com um galvanômetro de alta velocidade, e um micro-TCD, especialmente feito por Golay para este trabalho. Os cromatogramas foram obtidos na temperatura ambiente. O relatório final, contendo a teoria completa das colunas capilares tubulares abertas – ainda válida hoje, 50 anos depois –, foi apresentado no Simpósio sobre Cromatografia Gasosa realizado em Amsterdam, The Netherlands⁸, em Maio de 1958.

A miniaturização em cromatografia líquida foi muito mais lenta que em gasosa. Geralmente, admite-se como um dos pilares da miniaturização em LC o trabalho pioneiro de Czaba Horvath, em 1967, com colunas de aço-inox empacotadas de 1 mm de d.i. e 2 m de comprimento. A separação de nucleotídeos deu origem às colunas denominadas *microbore*⁹.

Entretanto, a verdadeira miniaturização da LC ocorreria em 1973, com Ishii e colaboradores¹⁰, utilizando uma coluna de PTFE de 0,5 mm d.i. e 15 cm de comprimento para a separação de hidrocarbonetos aromáticos polinucleares. Neste período, Ishii cunhou o termo “*micro-LC*”.

O outro salto importante na direção da miniaturização em cromatografia líquida foi o trabalho publicado em 1979, por Dandeneau e Zerenner¹¹, no qual descreveram, pela primeira vez, os tubos capilares flexíveis de sílica fundida, os quais se tornariam, depois, o tubo padrão para preparo de colunas capilares e nano em cromatografia líquida.

2. Características das colunas empregadas em cromatografia líquida

Existem muitas classificações diferentes empregadas em cromatografia líquida, sendo a mais popular, no momento, aquela que leva em consideração o diâmetro interno da coluna e, como consequência, a faixa de fluxo ou vazão da fase móvel. A Tabela 1 apresenta as principais características destas colunas e a nomenclatura geralmente adotada¹².

Tabela 1. Classificação da técnica cromatográfica em função do diâmetro interno da coluna.

D.I. da Coluna	Fluxo (Vazão) da F.M.	Nome da Técnica
3,2 – 4,6 mm	0,5 – 2,0 mL min ⁻¹	HPLC convencional
1,5 – 3,2 mm	100 – 500 µL min ⁻¹	LC “microbore”
0,5 – 1,5 mm	10 – 100 µL min ⁻¹	LC em escala micro (µ-LC)
150 – 500 µm (0,15 – 0,5 mm)	1 – 10 µL min ⁻¹	LC capilar (c-LC)
10 – 150 µm (0,01- 0,15mm)	10 – 1000 nL min ⁻¹	nano-LC (n-LC)

D.I. = diâmetro interno; F.M. = Fase Móvel

As colunas convencionais de **HPLC** são caracterizadas por apresentarem um diâmetro interno superior a 3,2 mm e inferior ou igual a 4,6mm. Ainda são, de longe, as colunas mais empregadas em cromatografia líquida neste momento. Em função destas características, a maior parte dos equipamentos desenhados para HPLC opera bem com estas colunas, sem modificações ou adaptações. O fluxo típico destas colunas situa-se ao redor de 1,0 mL/min, com uma faixa entre 0,5 e 2,0 mL/min.

As colunas denominadas “*microbore*” representam um primeiro estágio na tentativa de miniaturização da técnica. São colunas de diâmetro interno, usualmente entre 1,5 e 3,2 mL/min (algumas empresas fabricam colunas com diâmetro interno ao redor de 3,0 mm ao invés de 3,2 mm). Os equipamentos convencionais, desenhados para HPLC convencional, de última geração, são capazes de operarem com estas colunas sem modificações. Com um fluxo típico entre 100 e 500 microlitros por minuto (0,1-0,5 mL/min), representam uma boa economia de solvente em relação à convencional, gerando cromatogramas semelhantes.

Colunas de diâmetro entre 0,5 e 1,5 mm de diâmetro são, usualmente, referidas como microcolunas para cromatografia líquida (**micro-LC**). Operam com fluxos bem mais baixos que as convencionais (10 a 100 µL/min) e requerem equipamentos especiais para que as vantagens da técnica possam ser utilizadas. Sua

principal característica em relação à convencional é a enorme economia de solvente. As colunas de diâmetro interno 1,0 mm foram bastante utilizadas na década de 1970, quando dos primeiros estudos da miniaturização da técnica, sendo então denominadas de colunas “microbore”, o que gera alguma confusão com a classificação apresentada acima.

A verdadeira miniaturização da técnica, com suas vantagens e limitações, inicia-se com as colunas capilares, similar ao que ocorreu em cromatografia gasosa. Estas colunas possuem diâmetro interno entre 0,15 e 0,5 mm (150 a 500 μm) e operam em fluxos (vazões) abaixo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Devido ao pequeno diâmetro do tubo, recebem o nome genérico de colunas capilares para LC. Devido ao baixo fluxo (1-10 $\mu\text{L}/\text{min}$), o uso destas colunas requer mudanças significativas na instrumentação, não apresentando resultados satisfatórios se utilizadas em um sistema convencional de HPLC, sem modificações.

As colunas para nano-LC são um caso particular das colunas capilares. São colunas de dimensões capilares (abaixo de 0,15 mm ou 150 μm de diâmetro interno) que operam com fluxos da ordem de nanolitros por minuto (10 – 1.000 nL/min). Requerem instrumentação ainda mais especializada, e seu emprego – a despeito das vantagens – ainda é bastante restrito.

A Figura 1 ilustra uma comparação, em escala, do diâmetro interno típico das principais colunas utilizadas em HPLC. Nota-se a grande diferença de diâmetro interno entre as colunas “convencionais” de HPLC, de diâmetro interno 4mm, e as capilares de diâmetro interno inferior a 0,5mm.

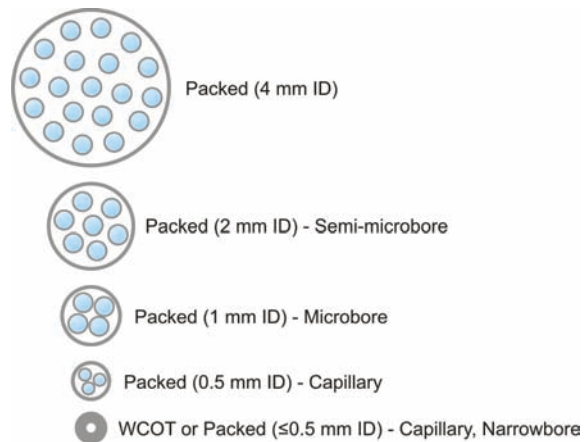


Figura 1. Comparação entre o diâmetro interno das principais colunas empregadas em HPLC.

3. Características das colunas empregadas em cromatografia líquida capilar

As colunas capilares constituem, atualmente, a forma de miniaturização mais investigada em LC. Seguindo as mesmas etapas ocorridas com a miniaturização da cromatografia gasosa, o uso de tubos capilares de sílica fundida, de diâmetro interno inferior a 500 μm (0,5 mm) representa a forma mais popular de cromatografia líquida miniaturizada. A Figura 2 ilustra as principais formas de colunas capilares existentes no momento para LC.

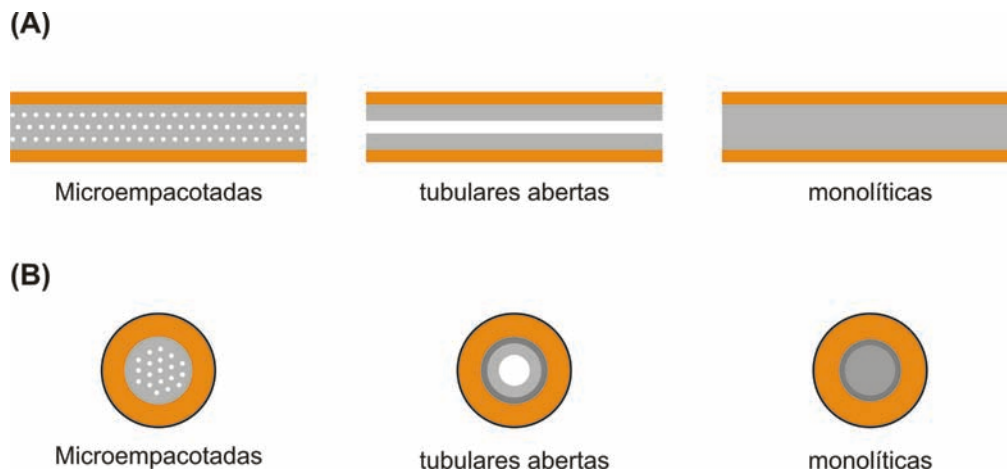


Figura 2. Formatos de colunas capilares empregadas em cromatografia líquida. (A): corte longitudinal; (B): corte frontal.

As *colunas capilares microempacotadas* são feitas preenchendo-se o tubo capilar (geralmente de diâmetro interno 0,1 a 0,2 mm) com partículas de diâmetro interno igual ou inferior a 5 μm . A técnica mais empregada para tal é preparar-se uma suspensão das partículas em um solvente apropriado (denominada “slurry packing”) a qual é pressurizada para dentro da coluna por uma bomba de alta pressão⁹. Partículas de diâmetro interno entre 1 e 3 microns têm sido utilizadas com sucesso nesta técnica. Entretanto, a diminuição do tamanho das partículas para obtenção de maior eficiência (N) é acompanhada de uma perda de permeabilidade da fase móvel e consequente aumento da pressão na coluna, o que exige equipamentos mais especializados para que as vantagens do uso destas colunas possam ser observadas.

As *colunas tubulares abertas*, à semelhança de suas similares em cromatografia gasosa, ao invés de apresentarem partículas preenchendo, possuem um filme fino da fase estacionária apenas na parede interna do tubo (daí serem também denominadas de WCOT – do inglês “wall coated open tubular”, ou tubular aberta com a parede revestida). A parte central da coluna é aberta (daí o nome tubular aberta, em inglês “open tubular column”), o que confere grande permeabilidade à coluna, e elimina o denominado “efeito dos múltiplos caminhos” da equação de alargamento da banda⁹. A maior dificuldade do uso destas colunas deve-se ao fato da baixíssima capacidade das mesmas, exigindo sistemas especiais de introdução da amostra e detectores com volumes mortos muito pequenos. É a forma de coluna capilar ainda menos estudada e menos desenvolvida, ainda que do ponto de vista teórica deva ser a de maior interesse quando integralmente desenvolvida.

As *colunas capilares monolíticas* representam uma alternativa às colunas tubulares abertas quando uma maior permeabilidade da coluna é desejada. Por não possuírem partículas, mas sim um leito cromatográfico preenchido com um monolito, a restrição à passagem da fase móvel é menor, resultando em pressões menores e permitindo o uso com fluxos maiores. Uma vez que a coluna toda é preenchida com a fase estacionária, estas colunas possuem maior capacidade do que as tubulares abertas.

4. Vantagens das colunas capilares em cromatografia líquida

4.1. Menor consumo de fase móvel.

Esta vantagem das colunas capilares sobre as convencionais é bastante óbvia e simples de entender: pelo fato de empregarem um fluxo (vazão) mais baixo da fase móvel, o consumo de solvente será muito inferior. Em condição típica, o fluxo empregado em HPLC é da ordem de $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ao passo que em c-LC (cromatografia líquida com colunas capilares) o fluxo típico é de $1\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Neste caso, o consumo de fase móvel pela c-LC quando comparada à HPLC será 1.000 vezes menor. A Tabela 2 ilustra o consumo de eluente por várias colunas, operando em condições típicas. Observa-se que enquanto em HPLC, usando colunas convencionais, o consumo em um dia de trabalho (8 horas) foi de meio litro (0,5L), o da coluna capilar foi de meio mililitro (mL). As vantagens da redução no uso de fase móvel não se reflete apenas na diminuição do custo de aquisição do solvente mas também no menor custo de descarte e, acima de tudo, a menor exposição do analista a grandes volumes de solventes tóxicos.

Tabela 2. Influência do diâmetro interno (ID) da coluna no volume de solvente consumido em um dia típico de trabalho (8 horas).

ID da coluna	F _c típico (8 horas)	Consumo de solvente
4.0 mm	1.0 mL/min	500 mL
2.0 mm	0.2 mL/min	120 mL
1.0 mm	50 $\mu\text{L}/\text{min}$	24 mL
0.5 mm	15 $\mu\text{L}/\text{min}$	7.0 mL
0.3 mm	5.0 $\mu\text{L}/\text{min}$	2.0 mL
0.2 mm	1.0 $\mu\text{L}/\text{min}$	0.5 mL

4.2. Maior “mass sensitivity” (sensibilidade de massa) que a HPLC

Um dos detectores mais empregados em HPLC é baseado na absorção de luz quando uma solução contendo o analito de interesse atravessa a cela de detecção⁹. Parte da luz será absorvida e outra parte será transmitida pela solução, detectada e registrada pelo sistema de dados do equipamento. Por meio de um

conversor logaritmo, a transmitância (T) é convertida para Absorbância, a qual será empregada para a análise quantitativa. A quantificação do analito é efetuada com base na “lei” de Beer-Lambert-Bouger, a qual estabelece que a radiação absorvida pelo analito depende de sua absorvidade (a), do comprimento do caminho óptico (b) e da concentração na fase móvel (c), de acordo com a Equação 1:

$$A = a \cdot b \cdot c \quad (\text{eq.1})$$

Uma vez que a absorvidade é uma propriedade da substância, e o caminho óptico é um parâmetro fixo que depende apenas do comprimento do caminho óptico, ou seja, da cela de detecção, a Absorbância (A) dependerá então diretamente da concentração c, podendo ser expressa como (Equação 2).

$$A = x \cdot c$$

onde x substitui a.b na Eq.1, e ilustra o fato de que se estes parâmetros forem mantidos constantes a Absorbância, A, dependerá diretamente da concentração, c.

Como c é uma relação entre a massa do analito presente na cela no momento da detecção (m) e o volume desta (v), ou seja, $c = m/v$, mantendo-se a massa constante e diminuindo-se o volume do eluente, haverá um aumento na concentração da amostra e, como consequência, da Absorbância da solução em análise. Um excelente exemplo deste efeito é quando a mesma solução é introduzida em uma sistema HPLC e em um sistema c-LC. Uma vez que o fluxo (vazão) da fase móvel em c-LC é muito menor, haverá menor quantidade de solvente, ou seja, a concentração do analito na cela de detecção será maior. Se todas as variáveis permanecerem constantes, haverá um aumento do sinal analítico em c-LC quando comparado com HPLC; este efeito é geralmente referido como “aumento da sensibilidade de massa” (“*mass sensitivity*”) em HPLC, e produz um aumento no sinal analítico.

Outros detectores, além dos baseados na absorção da radiação UV-VIS, apresentam esta característica e são denominados detectores sensíveis à

massa⁹ do analito presente na cela no momento da detecção. Outro exemplo deste tipo de detector é o espectrômetro de massas empregando electrospray como fonte de ionização (ESI)¹³. A Figura 3 mostra uma comparação entre os resultados quantitativos obtidos para dois analitos empregando colunas de diferentes diâmetros internos e com a detecção sendo feita por espectrometria de massas (LC-ESI-MS). O número à direita superior para cada cromatograma representa a contagem de área registrada no espectrômetro de massas. Como pode ser observado, um aumento significativo na área é observado quando o diâmetro interno do tubo é diminuído (mais de 2 milhões de contagens de área para a coluna capilar contra cerca de 7.000 para a convencional).

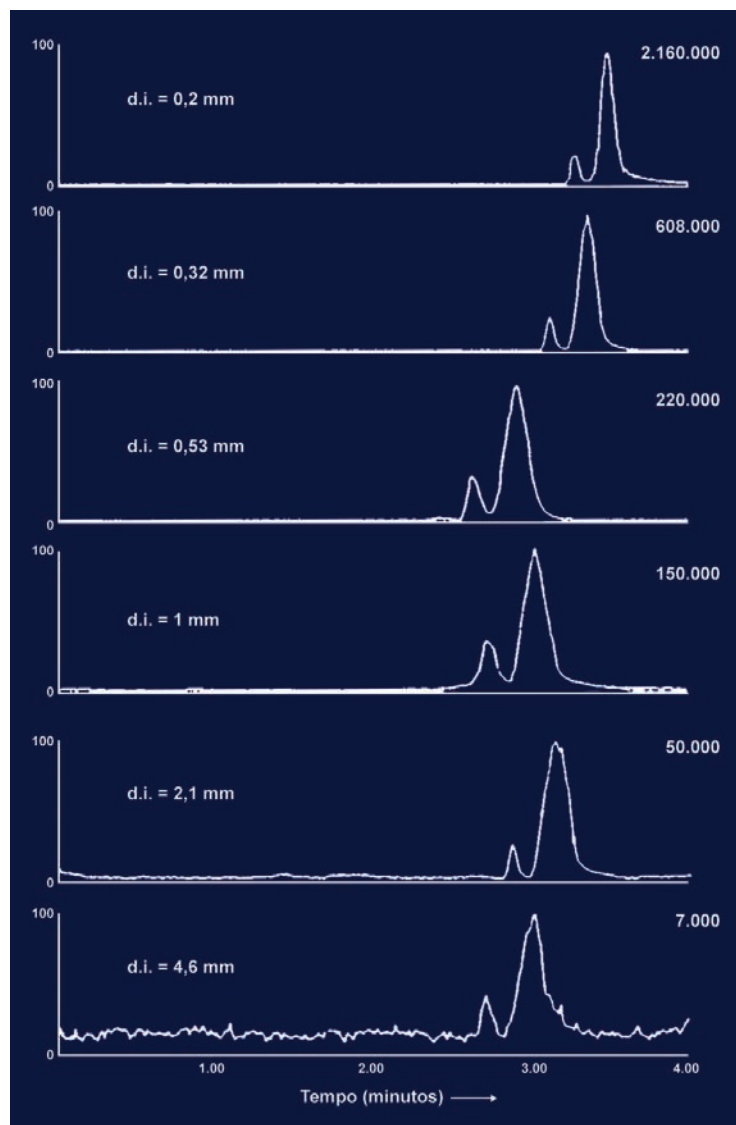


Figura 3. Variação do sinal analítico para uma mistura de dois compostos em função do diâmetro interno da coluna.

4.3. Acoplamento com Espectrometria de Massas

A forma de ionização mais empregada atualmente no acoplamento entre HPLC e Espectrometria de Massas emprega uma interface do tipo Electrospray¹³. Este acoplamento funciona de forma otimizada quando o fluxo (vazão) da coluna de cromatografia líquida é entre 5 e 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Estes fluxos não são atingidos com boa reprodutibilidade empregando-se sistemas de cromatografia líquida convencionais, otimizados para operarem em fluxos próximos a 1 mL/min . Assim, é bastante comum os sistemas convencionais utilizarem uma divisão do fluxo da fase móvel (“split”), fazendo com que apenas parte do fluxo entre no MS. Por outro lado, empregando-se colunas capilares, em especial com bombas as quais operam em microfluxos da fase móvel, a divisão (“split”) da fase móvel é desnecessária. Outra possibilidade neste caso é utilizar-se um fluxo auxiliar (“make-up”) de nitrogênio na interface para se adequar os fluxos das colunas de diâmetro maior ao ideal para o acoplamento. Nestes casos, o uso de colunas capilares simplifica o acoplamento e o fluxo utilizado é o ideal para se obter máxima sensibilidade no uso do Electrospray¹³.

4.4. Maior simplicidade no interfaceamento com outras técnicas analíticas

Empregando-se colunas de diâmetro interno 4,6mm em HPLC, o volume total de um pico é usualmente superior a 100 μL , o que torna o acoplamento com outras técnicas analíticas mais difícil. Uma técnica analítica particularmente interessante a ser melhor explorada é a LC-GC, na qual efetua-se uma pré-separação da amostra em uma coluna de HPLC e o pico (ou parte dele) é transferido para uma coluna de cromatografia gasosa para outra etapa de análise. Um exemplo de aplicação deste enfoque seria empregando-se a HPLC como uma forma de “clean-up” da amostra a ser analisada por cromatografia gasosa. Neste caso, a amostra é introduzida na coluna de HPLC e quando chegar o tempo de retenção do composto de interesse o fluxo da fase móvel é desviado do detector e encaminhado para uma coluna de cromatografia gasosa, usualmente por meio de uma válvula comutada por tempo por um software. Este enfoque é particularmente interessante, por exemplo, no caso de análise de pesticidas voláteis em amostras de alimentos. A primeira coluna serve para “limpar” a amostra de carboidratos, proteínas, corantes e outros compostos não voláteis os quais danificariam a coluna de GC se nela introduzidos.

Assim, quando a fração contendo os pesticidas voláteis eluir da coluna de HPLC, ela é direcionada para o sistema de introdução de amostra do GC e depositada no injetor. A partir daí, o gás de arraste irá carrear a fração para a coluna, e ocorrerá então a análise da mesma. Outro exemplo de aplicação seria na análise de enantiômeros voláteis em fluidos biológicos. A presença de vários compostos não voláteis na amostra requer extensivo preparo de amostras para que os mesmos não danifiquem a (usualmente frágil) coluna quiral. Neste exemplo, a amostra de fluido biológico contendo os enantiômeros é introduzida na coluna de HPLC e, no tempo de retenção dos mesmos, o efluente da coluna é dirigido para o injetor do GC pelo mesmo sistema de válvula descrito anteriormente. Assim, evita-se danificar a coluna quiral de GC com compostos não voláteis. Vários outros exemplos deste tipo de acoplamento, uma das modalidades da denominada cromatografia multidimensional, podem ser encontrados na literatura¹⁴⁻¹⁸. Apesar de amplamente estudado nas décadas de 1980 e 1990, este enfoque foi praticamente abandonado pelo fato do grande volume de um pico de uma coluna convencional de HPLC ($>100\mu\text{L}$) ser incompatível com o pequeno volume aceito pelas colunas capilares de cromatografia gasosa (1-2 μL). Em muitos casos, apenas uma fração do pico de HPLC podia ser transferido para a coluna de GC, técnica denominada de “heart cutting”, fazendo com que o perfil do cromatograma de GC variasse dependendo do local de amostragem no pico de HPLC. Mais recentemente, a disponibilidade comercial de sistemas para introdução de grandes volumes de amostras em GC (“large volume injection”), possibilitou este acoplamento com maior facilidade. Entretanto, o custo e dificuldade de operação da maioria destes sistemas dificultou a aceitação destes sistemas entre os analistas. Este problema pode ser solucionado com facilidade pelo uso de cromatografia líquida capilar ao invés de HPLC convencional. Neste caso, o volume típico de um pico será da ordem de 1-2 μL , o qual pode ser integralmente transferido para a coluna de GC, sem dificuldades ou artifícios.

4.5. Emprego de Fases Estacionárias “Exóticas”

Pelo fato das colunas capilares apresentarem menor diâmetro interno, a quantidade de fase estacionária dentro da coluna é proporcionalmente menor. Como consequência, pode-se empregar fases estacionárias mais caras, usualmente denominadas de “exóticas”, como as fases estacionárias quirais. O

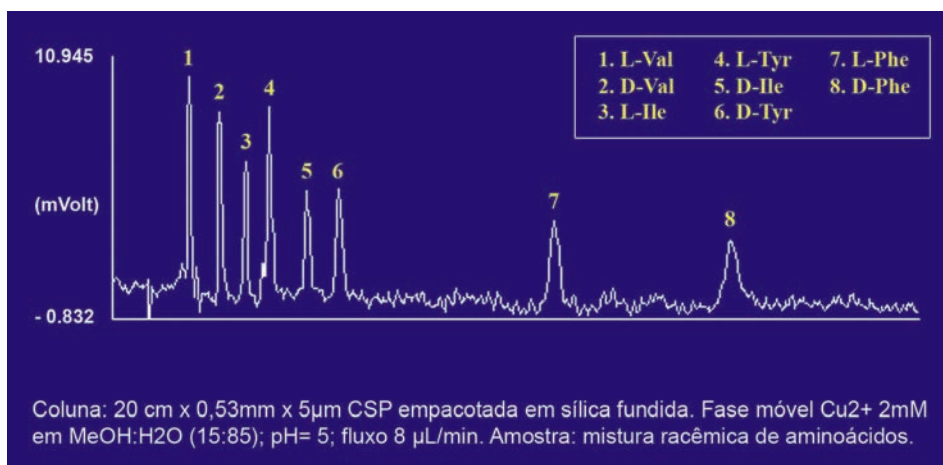


Figura 4. Separação de uma mistura racêmica de aminoácidos em coluna quiral capilar.

custo acentuadamente maior destas colunas quando comparadas com as colunas de ODS (C-18), por exemplo, dificultam ou até mesmo impedem a ampliação desta importante área de pesquisa, em especial suas aplicações na área farmacêutica. Entretanto, com o desenvolvimento das colunas capilares, quantidades muito pequenas de fase estacionária são necessárias. A Figura 4 ilustra uma separação de uma mistura racêmica de aminoácidos em uma coluna capilar quiral onde observa-se uma excelente separação entre os enantiômeros.

Uma vez que utiliza pequenas quantidades de fases estacionárias, este enfoque se torna particularmente atraente quando do desenvolvimento de um método para o qual várias colunas diferentes precisam ser testadas e a quantidade de fase estacionária disponível é pequena.

4.6. Inércia Química da coluna de sílica fundida (capilar) quando comparada com a de metal (convencional).

Enquanto que a maior parte das colunas de HPLC são feitas de metal, o tubo empregado nas colunas capilares é usualmente de sílica fundida. A sílica é um material sintético de elevada pureza, na qual a concentração de metais e de grupos silanóis é mantida baixa e controlada. Assim, este é o material mais inerte disponível no momento para utilizar no preparo de colunas para cromatografia, e largamente empregado nas colunas de cromatografia gasosa. Infelizmente, a resistência dos tubos de sílica fundida é inversamente proporcional ao diâmetro do tubo, e colunas com diâmetros muito superiores a 0,5 mm

tendem a ser extremamente frágeis. Assim, não são preparadas colunas de HPLC em tubo de sílica fundida. Entretanto, como as colunas capilares possuem diâmetro menor, este tipo é o mais apropriado e utilizado para o preparo destas colunas. O desenvolvimento de colunas capilares de elevada inércia química desenvolveu uma demanda para que as outras partes da coluna e do próprio sistema de tornassem inertes. Assim, os “frits” (filtros colocados nas duas extremidades da coluna para segurar a fase estacionária dentro do tubo) de metal empregados em HPLC começaram a ser substituídos por frits produzidos dentro da própria coluna, por meio de processos de sinterização de sílica e seus derivados. Isto produz um meio mais inerte e evita adsorção de compostos de caráter ácido ou básico acentuado, em baixas concentrações. Outra consequência foi a substituição de tubos, uniões, conexões de aço inox, empregadas em HPLC, por materiais mais inertes como PEEK e Teflon. A consequência destes cuidados tem sido a produção de colunas mais inertes do que as de HPLC, e que permitem a análise de compostos de maior polaridade com melhor forma dos picos.

4.7. Facilidade na inspeção visual das colunas

As colunas capilares feitas de sílica fundida apresentam uma camada externa de poliimida para aumentar a flexibilidade e resistência mecânica do tubo, pois a sílica fundida (transparente como o vidro) é frágil. Mesmo assim, quando uma coluna de sílica fundida é colocada contra a luz, é possível observar seu interior e determinar irregularidades no

empacotamento, tais como vazios e canais preferenciais, e outros defeitos. Estas irregularidades produzem alargamento da banda cromatográfica e deterioram a qualidade da separação. Esta facilidade não ocorre nas colunas de HPLC, as quais são usualmente feitas de metal não transparente.

4.8. Maior permeabilidade das colunas capilares

A permeabilidade é definida como a facilidade com a qual a fase móvel percola através da coluna⁹.

Em estudos independentes, Novotny e Verzele determinaram que a resistência típica das colunas de HPLC é $\varnothing = 800 - 1.000$, enquanto que das colunas capilares $\varnothing = 400$. Portanto, a diminuição do diâmetro do tubo acarreta uma diminuição na resistência à passagem da fase móvel e, como consequência, aumenta a permeabilidade da coluna. Outra decorrência deste fato é a diminuição na pressão das colunas capilares quando comparadas com as convencionais de HPLC.

4.9. Facilidade em efetuar-se programação de temperatura em LC capilar

Apesar de amplamente utilizada em cromatografia gasosa, em especial com colunas capilares, a mudança da temperatura da coluna durante uma análise é praticamente inexistente em HPLC. Uma das razões é que os tubos de metal e parede espessa, empregados nas colunas de HPLC, não transferem de forma adequada o calor para dentro da coluna, produzindo uma distribuição irregular de temperatura entre a parede externa da coluna, a parede interna, a fase estacionária e a fase móvel. O desenvolvimento das colunas capilares de sílica fundida auxilia na solução deste problema de diferentes formas. Em primeiro lugar, o tubo é de diâmetro menor, a parede muito mais fina e a transmissão de calor mais homogênea e rápida. Assim, a temperatura dentro e fora da coluna será praticamente a mesma, e igual à da fase móvel. Isto torna desnecessário um artifício adicional que é o preaquecimento da fase móvel quando emprega-se colunas convencionais de HPLC. O desenvolvimento de instrumentação adequada para a programação de temperatura em LC capilar tem tornado este tema de grande interesse pela comunidade científica internacional, sendo previsível que a programação de temperatura em HPLC e LC capilar deverá ser tema de grande interesse na próxima década,

uma vez que poderá diminuir ou mesmo substituir o uso de gradiente de fase móvel e seus inconvenientes (inclusive o financeiro).

5. Limitação para o uso da cromatografia líquida capilar

Em princípio, qualquer análise passível de ser efetuada por HPLC poderá ser feita, com vantagens, empregando-se LC capilar. Na prática, ainda existem algumas dificuldades a serem vencidas para que a popularização da LC capilar ocorra de forma similar ao que ocorreu com a GC capilar.

5.1. Necessidade de instrumentação dedicada

Uma vez que as colunas de LC capilar são bastante menores que as de HPLC, esta miniaturização deve ser acompanhada por toda a instrumentação para que as vantagens do uso destas colunas sejam observadas. Assim, o volume da cela do detector deverá ser diminuído (alguns nL contra cerca de 8-10 μL em HPLC convencional); o volume de injeção deverá ser bastante menor (menos de 60 nL em LC capilar contra $> 20 \mu\text{L}$ em HPLC); a bomba deverá ter um erro absoluto no fluxo muito inferior que a de HPLC convencional, uma vez que irá bombear tipicamente alguns $\mu\text{L}/\text{min}$; as conexões deverão ser minimizadas para evitar alargamento da banda etc. De forma adicional, cuidados especiais deverão ser tomados com a amostra, tais como filtração da mesma; filtração da fase móvel, uso de solventes mais puros tanto para fase móvel quando para diluição da amostra, e assim por diante. Portanto, a minimização das colunas exige o desenvolvimento de sistemas dedicados para LC capilar, o que não tem ocorrido ainda com a maior parte das empresas do setor, as quais insistem em apenas adaptar soluções paleativas, instalando adaptadores nos sistemas de HPLC para operarem em LC-capilar (como, por exemplo, colocar um divisor ou “*splitter*” na bomba para diminuir o fluxo da fase móvel). Certamente, o desenvolvimento contínuo desta área fará com que as grandes empresas produtoras de instrumentos para HPLC concentrem esforços no desenvolvimento de equipamentos dedicados à LC capilar, o que rapidamente permitirá a popularização da técnica, como ocorreu com a GC.

5.2. Desenvolvimento de novas colunas

Apesar da tecnologia para o preparo de qualquer coluna usada em HPLC estar disponível também para LC capilar, a limitação descrita no item anterior faz com que a oferta de colunas capilares seja ainda restrita às fases mais populares, como C-18. Outro problema com relação às colunas é a falta de similaridade entre colunas de diferentes fabricantes, o que obriga o usuário à fidelidade a uma empresa. Isto ocorre também em HPLC, uma vez que a maioria das colunas ainda são baseadas em sílica. Havendo pelo menos três tipos de sílica coexistindo no mercado neste momento (tipo A, B e C), as fase produzidas com as mesmas apresentam características distintas. A modificação da superfície da sílica para produção de fases quimicamente ligadas (“*bonded phases*”, como a C-18), pode ser feita com diferentes reagentes, resultando em superfícies também distintas. Além disso, após a reação de produção destas fases, pode ocorrer a existência de grupos silanóis (Si-OH) os quais poderão provocar a adsorção indesejável de analitos polares. Algumas empresas fazem então o capeamento (“*end-capping*”) da fase, bloqueando a atividade dos grupos silanóis⁹. Desta forma, as fases denominadas equivalentes de diferentes fabricantes dificilmente apresentam as mesmas características de retenção, principalmente para a análise de compostos polares em baixas concentrações. A procura por outros suportes para desenvolvimento de novas fases estacionárias, baseados em óxido de zircônio ou zircônia, óxido de titânio ou titânia e outras materiais poderá, em breve, homogeneizar mais as colunas produzidas para HPLC e, como consequência, as de LC capilar. Enquanto isso, e ainda dependendo do interesse dos grandes produtores internacionais de colunas e instrumentos para HPLC, um número reduzido de colunas para LC capilar deverá permanecer sendo produzido.

5.3. Número ainda limitado de aplicações práticas

Pelos fatos descritos nos itens anteriores, o número de colunas produzidas para LC capilar ainda é pequeno, quando comparado com as de HPLC. Como consequência, um número reduzido de aplicações foi descrito até o momento na literatura, e a maioria dos produtores de colunas se limitam a demonstrar o uso das mesmas por meio de padrões analíticos ao invés de amostras reais. A maior aplicação da LC capilar é ainda restrita à área de bioanalítica, a qual

experimentou grande crescimento nos últimos anos graças, principalmente, aos novos desenvolvimentos e investimentos na área farmacêutica e correlatas. Isto possibilitou o desenvolvimento da genômica, proteômica, metabolômica e várias outras áreas populares neste momento. Considerando o foco comercial nesta área, as empresas produtoras de colunas e instrumentos focalizaram as aplicações das colunas capilares principalmente nela. Assim, os usuários da HPLC, com foco em outras áreas como ambiental, alimentícia, petroquímica etc., tiveram pouco ou nenhum acesso a aplicações da LC capilar. Novos desenvolvimentos e aplicações em áreas como pesticidas em alimentos, novos poluentes em água, resíduos de drogas veterinárias em tecidos animais e leite, e outras, deverão aumentar a popularidade da LC capilar nos próximos anos.

5.4. Competição de técnicas similares

O desenvolvimento inicial da LC capilar ocorreu na década de 1980 e, mais intensamente, na década de 1990, como uma alternativa a HPLC. Neste período, algumas técnicas que competiam com a LC capilar conseguiram investimento de fabricantes de equipamentos. Dentre elas, uma foi a eletroforese capilar (CE) e a eletrocromatografia capilar (CEC). As duas técnicas utilizam colunas capilares de sílica fundida, porém os analitos caminham dentro da coluna com o auxílio de um potencial elétrico ao invés de uma fase móvel. Uma aplicação importante da CE tem sido na análise de moléculas grandes, como proteínas e íons, sobrando para a CEC um nicho de aplicações mais próximo ao da HPLC, ou seja, moléculas pequenas. Nesta mesma época, houve um forte interesse no desenvolvimento da cromatografia com fluido supercrítico (SFC), cuja principal aplicação analítica neste momento é na área farmacêutica. O desenvolvimento da cromatografia gasosa de alta temperatura (HT-HRGC) neste período também desviou um pouco da atenção da LC capilar, uma vez que várias classes de compostos que não eram parte das aplicações típicas de GC (tais como triacilglicerídeos intactos, ácidos orgânicos não derivatizados, produtos naturais de massa molecular elevada, derivados do petróleo, e outras) passaram a ser analisadas por HT-HRGC. Neste período de grande criatividade científica e desenvolvimento instrumental, a LC capilar acabou dividindo seu nicho de aplicações com várias outras técnicas nascentes, postergando seu desenvolvimento naquele momento.

6. Conclusões

Apesar das inúmeras vantagens do uso da LC capilar ao invés da HPLC convencional, esta técnica ainda não conseguiu a mesma popularidade de sua contrapartida em GC. Dentre as principais razões para tal, certamente uma das mais importantes é a necessidade do uso de instrumentação dedicada a esta técnica, ou seja, para que o potencial dela possa ser evidenciado, é necessário o uso de instrumentação adequada. Uma vez que o mercado para LC capilar ainda não cresceu o suficiente, quando comparado com a HPLC, o interesse comercial dos grandes produtores ainda não ocorreu, o que tem provocado poucos investimentos em novos desenvolvimentos tecnológicos além de pequenas adaptações de sistemas HPLC para operarem com colunas capilares. A recente popularização da espectrometria de massas acopladas a HPLC, ou seja, o desenvolvimento de sistemas LC/MS adequados do ponto de vista científico e com preços razoáveis, tende a impulsionar o desenvolvimento da LC capilar uma vez ser esta a melhor forma para o acoplamento em questão. Uma maior diversificação das aplicações desta técnica em outras áreas, além da bioanalítica, deverá atrair novos usuários para a mesma, aumentando a demanda e, como consequência, o interesse dos produtores de equipamentos e acessórios.

Do ponto de vista científico, já não existem mais dúvidas de que a LC capilar atingirá, em breve, uma maturidade e aceitação similar à da sua contrapartida em GC. Para tal, basta um maior empenho das empresas internacionais produtoras de colunas e equipamentos, para que este nicho cresça e surjam novos marcos de desenvolvimento na área. Ocorrendo o desenvolvimento da LC capilar, e com o atual estágio de desenvolvimento da GC capilar, estará aberto o caminho para o desenvolvimento da unificação total da cromatografia, ou seja, da cromatografia unificada^{15,16}.

7. Referências Bibliográficas

1. M. Tswett, *Physikalisch-chemische Studien Über das Chlorophyll. Die Adsorptionen.*, Ber. Dtsch. Botan. Ges. 24, 316-326 (1906)
2. M. Tswett, *Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls.*, Ber. Dtsch. Botan. Ges. 24, 384-392 (1906)
3. A.J.P. Martin and R.L.M. Synge, *Biochem. J.* 35, 91 (1941).
4. A.J.P. Martin and R.L.M. Synge, *Biochem. J.* 35, 1358-1368 (1941).
5. A.T. James and A.J.P. Martin, *Biochem. J.* 50, 679-690 (1952).
6. M.J.E. Golay, *Anal. Chem.* 29, 928-932 (1957).
7. M.J.E. Golay, "Discussion of the Results With Three Experimental Gas-Liquid Chromatographic Columns". Engineering Report No. 523, Perkin-Elmer Corp. (Norwalk, Connecticut, 5 September 1956).
8. M.J.E. Golay, in *Gas Chromatography (1958 Amsterdam Symposium)*, D.H. Desty, Ed. (Butterworths, London, 1958), pp. 36-55.
9. F.M. Lanças, "Cromatografia Líquida de Alta Eficiência", Ed. Átomo, 2009.
10. T. Takeushi, *Chromatography* 26, 1 (2005).
11. R.D. Dandeneau and E.H. Zerenner, *HRC &CC 1*, 351-356 (1979)
12. M. Szumski; B. Buszewski, *Critical Rev. Anal. Chem.*, 32, 1-46 (2002).
13. F.M. Lanças, *Scientia Chromatographica*, 1, 2 (2009).
14. F.M. Lanças, "Temperature-Programmed Capillary Liquid Chromatography", HPLC 2009, Dresden (Germany), 2009.
15. C. von Mühlen, F. M. Lanças, *Quim. Nova* 27, 747 (2004).
16. F.M. Lanças, "Unified Chromatography", in *Encyclopedia of Chromatography*, vol.2, Second Edition, J. Cazes (Editor), Marcel Dekker, 2005.