

Cromatografia líquida capilar: 1. Principais características da técnica

Lincoln F. M. Coutinho, Fernando M. Lanças*

*Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo
Cep 13560-970, São Carlos, SP, Brasil
e-mail: flancas@iqsc.usp.br*

Resumo

Este trabalho de revisão crítica é parte de uma série cujo principal objetivo é apresentar e discutir as características mais relevantes da cromatografia líquida capilar (cLC).

Dentre os vários aspectos cobertos neste trabalho, a revisão inclui o desenvolvimento, diferentes nomenclaturas propostas para a técnica, as principais vantagens, quando comparadas com a contrapartida denominada Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), e a instrumentação necessária para a operação no modo cLC. São também apresentadas e discutidas as principais razões pelas quais a cLC não é ainda uma técnica analítica de rotina.

Palavras-chave

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

Capillary liquid chromatography: 1. Main characteristics

Abstract

This review is part of a series to be published in this journal having as the main objective to present and discusses the major characteristics of capillary liquid chromatography, cLC.

Among the several aspects covered in the paper, the review includes its development process, the several proposed nomenclatures, the main advantages of cLC over its conventional counterpart termed High Performance Liquid Chromatography (HPLC), and the instrumentation requirements to properly operates using this technique. The reasons why cLC is not yet a major universal routine analytical technique is also presented and discussed.

Keywords

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

1 Introdução

Devido às inúmeras vantagens relacionadas à diminuição do diâmetro interno das colunas cromatográficas, a miniaturização da cromatografia líquida (LC) recentemente vem despertando grande interesse da comunidade científica.

A miniaturização de um sistema cromatográfico usualmente refere-se à redução do diâmetro interno (d.i.) da coluna. O início da miniaturização em cromatografia é geralmente atribuído a Marcel Golay, o qual, em 1957, estudou os efeitos da diminuição do diâmetro interno no desempenho das colunas para GC.

Apesar do grande sucesso obtido com a miniaturização em cromatografia gasosa, em cromatografia líquida, o início da miniaturização ocorreu somente cerca de 10 anos depois, com Czaba Horváth (1967), que empregou colunas de diâmetro interno com 0,5 e 1,0 mm d.i. na separação de ribonucleotídeos.

Atualmente, existem duas abordagens distintas para a miniaturização da LC. A primeira consiste na diminuição do diâmetro interno da coluna, enquanto a segunda consiste na separação dos analitos dentro de microchips. Esta revisão tratará somente da primeira abordagem.

Apesar de as primeiras colunas capilares para a LC terem sido desenvolvidas há mais de 40 anos, até poucos anos atrás, o seu uso foi bastante restrito, principalmente devido à falta de equipamentos adequados às suas dimensões e às dificuldades encontradas no empacotamento de colunas de pequeno diâmetro interno. No entanto, devido aos grandes avanços ocorridos nas últimas décadas nas áreas da mecânica, eletrônica, computação e preparo de colunas, atualmente já é possível tanto encontrar equipamentos comercialmente disponíveis destinados às aplicações capilares quanto preparar colunas capilares com grande eficiência e reprodutibilidade.

Nesta série de artigos, discutiremos inicialmente as principais características relacionadas à diminuição do diâmetro interno das colunas utilizadas na cromatografia líquida (Parte 1). Posteriormente, discutiremos alguns aspectos teóricos pertinentes à redução do diâmetro interno das colunas (Parte 2), a tecnologia atualmente disponível para o preparo de colunas capilares (Parte 3) e a instrumentação necessária para a cromatografia líquida capilar (cLC) (Parte 4).

2 Histórico

Nos últimos 70 anos, a LC veio presenciando grandes saltos de inovações em praticamente todos os seus aspectos, como o desenvolvimento da cromatografia de partição ocorrida na década de 40, o desenvolvimento da cromatografia de troca iônica na década de 50 e o desenvolvimento da sua versão instrumental na década de 60, entre muitos outros^[1-3].

No entanto, diferentemente do rápido desenvolvimento presenciado pela cromatografia gasosa (GC) que, em apenas 10 anos de existência, já possuía sua versão capilar e, em 20 anos, já tinha atingido sua maturidade como técnica de separação, o desenvolvimento da LC não tem sido tão rápido.

Apesar de a LC ter sido o primeiro modo cromatográfico a ser desenvolvido no início do século XX – 50 anos antes da GC –, por quase 70 anos ela foi utilizada sem grandes modificações, fazendo com que a sua versão instrumental (a HPLC) só fosse desenvolvida duas décadas após o desenvolvimento do primeiro cromatógrafo gasoso instrumental^[4].

As primeiras colunas desenvolvidas para a HPLC possuíam entre 1,6-3,0 mm de d.i. × 50-100 cm de comprimento e eram, geralmente, empacotadas com partículas de 30 μm recobertas com uma fase estacionária pelicular.

Entretanto, quando surgiram as primeiras fases estacionárias compostas de micropartículas porosas de 5-10 μm , observou-se que as novas colunas de 1,6-3,0 mm de d.i. empacotadas com o novo material, diferentemente do esperado, possuíam uma pior eficiência quando comparadas com colunas de diâmetro interno maiores (5-6 mm) empacotadas com o mesmo material^[5]. Essa observação fez com que grande parte dos cromatografistas da época acreditasse, erroneamente, que colunas de pequeno diâmetro interno possuíam intrinsecamente eficiências menores que as de grande diâmetro interno, o que fez com que as colunas de 5-6 mm de d.i. se tornassem o novo padrão a partir de então.

Na realidade, a menor eficiência obtida pelas novas colunas de pequeno diâmetro interno não estava intrinsecamente relacionada à sua dimensão, como se acreditava, mas, sim, a um excessivo alargamento de banda ocorrido tanto dentro da coluna – devido à limitada tecnologia de empacotamento existente na época – quanto fora da coluna – devido à utilização de detectores que eram inadequados aos picos estreitos normalmente eluídos dela.

Tais detectores eram projetados para serem utilizados, principalmente, com colunas de 2,1 mm d.i. \times 500 mm de comprimento, que possuíam em torno de 500 pratos teóricos, ou seja, eles eram projetados para a detecção de picos com um volume de eluição em torno de 200 μL ou maiores. Já uma coluna de 2,1 mm d.i. \times 250 mm de comprimento empacotada com as novas partículas de 5-10 μm podiam atingir até 10.000 pratos teóricos, fornecendo assim, para um pico não retido, um volume de eluição em torno de 24 μL que, obviamente, era muito estreito para as antigas celas de detecção de 8 a 12 μL de volume interno utilizadas na época.

Apesar de as colunas de 5-6 mm de d.i. \times 250 mm de comprimento fornecerem, para um pico não retido, um volume de eluição em torno de 100 μL (duas vezes mais estreitos que os

picos eluídos de suas antecessoras de 1,6-3,0 mm de d.i.), esse ainda podia ser detectado em uma cela de 8 μL sem significativa perda de eficiência. No entanto, devido ao processo de diluição intrinsecamente associado à cromatografia que tem sua extensão diretamente proporcional ao comprimento da coluna e ao quadrado do seu diâmetro interno, essas colunas forneciam picos com concentrações tão baixas quanto as primeiras colunas de 1,6-3,0 mm de d.i., empacotadas com fase estacionária pelicular, desenvolvidas para a HPLC – embora o seu número de pratos teóricos fosse 20 vezes maior^[6].

Desse modo, quando surgiram as primeiras fases estacionárias porosas de 5-10 μm , havia a necessidade de se redesenhar todo o equipamento cromatográfico (incluindo os detectores) para que ele se adaptasse às novas colunas. No entanto, ocorreu o inverso, as colunas tiveram seu diâmetro interno aumentado para que se adaptassem aos equipamentos^[7].

Devido ao desenvolvimento tardio de sua instrumentação, o processo de miniaturização das colunas utilizadas na LC teve seu início somente cerca de dez anos após a introdução das colunas capilares na GC^[8], com os trabalhos pioneiros de Horváth et al.^[9,10], Ishii et al.^[11-17], Scott e Kucera^[18-23] e Tsuda e Novotny^[24-26].

Em 1967, Horváth et al. publicaram seu primeiro trabalho^[9] relacionado com colunas capilares, com foco no estudo da dispersão dos picos em colunas tubulares abertas de aço-inox de 0,3 mm de d.i. (sem fase estacionária) e em colunas de aço-inox de 1 mm d.i., empacotadas com partículas de 50 μm , recobertas com uma fase estacionária pelicular de troca iônica.

Posteriormente, em 1969, Horváth e Lipsky publicaram um novo trabalho^[10], que discutia diversos fatores que influenciavam a separação de ribonucleotídeos utilizando colunas de aço inox de 1 mm d.i., empacotadas com partículas recobertas com resina pelicular de troca catiônica.

Um novo passo no sentido da miniaturização da LC foi dado por Ishii et al.^[11-17] que, em 1973, separaram, com sucesso, hidrocarbonetos aromáticos polinucleares, utilizando uma coluna de politetrafluoretileno (PTFE) de 0,5 mm d.i. e 15 cm de comprimento, empacotada com partículas de 30 μm .

Três anos mais tarde, Scott e Kucera^[18-23] relataram a separação de alquil-benzenos com alta eficiência em colunas de aço inox de 1 mm d.i. (posteriormente denominadas colunas “micro-bore”) e 10 m de comprimento e, em 1978, Tsuda e Novotny^[24-26] publicaram um trabalho que estudava o desempenho de colunas de diversos diâmetros internos (50-200 μm), empacotadas com diferentes tamanhos de partículas (10-100 μm).

Apesar desse início promissor, a miniaturização da LC continuou bastante lenta nos últimos 40 anos e, só recentemente, ela (re)começou a receber a atenção merecida.

3 Nomenclaturas utilizadas

Atualmente, existe muita discussão a respeito do sistema de nomenclatura a ser empregado na classificação da LC. A maioria das técnicas tem sido classificada com base no tipo ou diâmetro interno da coluna cromatográfica; todavia, com o uso de novos materiais para a manufatura dos tubos, como tubos de sílica fundida, tubos poliméricos, tubos de aço inoxidável, tubos microtorneados em placas de silicone etc., essa nomenclatura vem se tornando insuficientemente precisa^[27].

Ishii^[5] foi um dos primeiros autores a sugerir uma classificação das colunas de acordo com o seu diâmetro interno (Tabela 1).

Verzele e Dewaele^[28] sugeriram que a classificação (Tabela 2) deveria levar em conta, além do diâmetro interno, os vários tipos de colunas (metálicas, sílica fundida, tubulares abertas etc.).

Aproximadamente na mesma época, Barth et al.^[29] usaram um sistema simplificado (Tabela 3) que também se baseava no diâmetro interno do tubo.

Mais recentemente, Chervet et al.^[30], seguidos por Vissers^[31], classificaram a LC de acordo com a faixa do fluxo (vazão) da fase móvel (Tabela 4).

No entanto, apesar de algumas classificações associarem o termo “cromatografia líquida capilar” (“LC capilar” ou “cLC”) a um tipo específico de coluna, esse termo é frequentemente utilizado para se referir, de uma forma geral, a todas as técnicas que utilizam colunas de diâmetros internos menores que as utilizadas normalmente na HPLC.

Embora as diversas classificações citadas difiram em um ou mais pontos, todas consideram que as colunas de diâmetro interno menor que 1,0 mm não são mais classificadas como colunas de HPLC convencional. Desse modo, estipularemos, nesta revisão, o uso do termo “cromatografia líquida capilar” (cLC) a todas as técnicas que utilizam colunas com diâmetro interno igual ou menores que 1,0 mm. A Figura 1 ilustra um comparativo em escala dos diversos diâmetros internos das colunas utilizadas na LC.

Tabela 1 Nomenclatura proposta por Ishii et al.^[5] para LC.

Diâmetro interno (mm)	Nomenclatura
4,6	HPLC convencional
1,5	Semi-micro HPLC
0,46	Micro-HPLC
0,15	Ultramicro-HPLC
0,2-0,05	Colunas micro-capilares (fracamente) empacotadas
0,06-0,01	Coluna (capilar) tubular aberta

Tabela 2 Nomenclatura proposta por Verzele e Dewaele^[28] para LC.

Diâmetro interno	Tipo	Nomenclatura
5 mm ou maiores	Metálicas empacotadas	LC preparativa
5-3 mm	Metálicas empacotadas	LC ou LC convencional
2-1 mm	Metálicas empacotadas	Colunas microbore
100-25 μm	Tubulares abertas de vidro ou sílica fundida semi-empacotadas	SPOT-LC
–	Tubulares abertas com paredes recobertas com material poroso	PLOT-LC
–	Tubulares abertas com paredes recobertas com suportes revestidos	SCOT-LC
–	Tubulares abertas com paredes recobertas	WCOT-LC ou LC capilar

Tabela 3 Nomenclatura proposta por Barth et al.^[29].

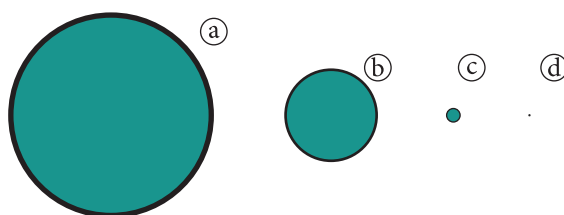
Diâmetro interno	Nomenclatura
2-0,5 mm	Colunas microbore
< 0,5 mm	Colunas de micro-LC

Tabela 4 Nomenclatura proposta por Chervet et al.^[30] e Vissers^[31].

Diâmetro interno	Fluxo	Nomenclatura
4,6-3,2 mm	0,5-2,0 mL/min	HPLC convencional
3,2-1,5 mm	100-500 $\mu\text{L}/\text{min}$	HPLC microbore
1,5-0,5 mm	10-100 $\mu\text{L}/\text{min}$	Micro-LC
500-150 μm	1-10 $\mu\text{L}/\text{min}$	LC capilar
150-10 μm	10-1000 nL/min	nano-LC

4 Vantagens relacionadas à miniaturização da coluna

Um ponto importante que deve ser ressaltado no que diz respeito à miniaturização da coluna de LC é que o seu principal interesse não está relacionado com o decréscimo do tamanho da instrumentação, mas, sim, pelo fato de ela trazer muitas vantagens relacionadas ao custo e, principalmente, à eficiência da técnica^[32].

**Figura 1** Comparação em escala dos diversos diâmetros internos das colunas. a) convencional (4,6 mm); b) microbore (2,1 mm); c) capilar (320 μm); d) WCOT (20 μm).

Devido às inúmeras vantagens que permitem sua aplicação em áreas onde a HPLC convencional não se mostra totalmente adequada, atualmente a cLC vem sendo considerada como uma técnica complementar à HPLC. A seguir, algumas dessas vantagens serão discutidas.

4.1 Menor consumo de fase estacionária

Provavelmente, a vantagem mais imediata da redução do diâmetro interno das colunas cromatográficas esteja na redução da quantidade de fase estacionária utilizada. Para colunas empacotadas (recheadas ou preenchidas), o volume que a fase estacionária ocupa dentro de uma coluna é proporcional ao comprimento da coluna e ao quadrado do seu diâmetro interno. Desse modo,

uma coluna que possui um diâmetro interno de 0,32 mm consumirá uma quantidade de fase estacionária em torno de 200 vezes menor que aquela utilizada no empacotamento de uma coluna de 4,6 mm d.i. Essa enorme redução pode tornar viável o uso de fases estacionárias que normalmente não são utilizadas na HPLC convencional devido ao seu alto custo ou às pequenas quantidades.

4.2 Menor consumo de fase móvel

Semelhantemente à redução do consumo de fase estacionária, a redução do diâmetro interno das colunas também implicará na redução do consumo da fase móvel.

Uma vez que a separação cromatográfica não é dependente do fluxo volumétrico de fase móvel, mas, sim, de sua velocidade linear média (u), uma mesma separação poderá ser atingida em duas colunas semelhantes, porém, de diferentes diâmetros internos, se mantivermos a mesma velocidade linear média para ambas^[21,33-35].

A relação entre o fluxo volumétrico (F) da fase móvel e sua velocidade linear média (u) é dada pela seguinte Equação 1:

$$F = \frac{u \pi d_c^2 \varepsilon}{4} \quad (1)$$

onde d_c é o diâmetro interno da coluna e ε a porosidade da mesma.

Desse modo, considerando que a HPLC utiliza fluxos (vazões) da fase móvel entre 0,5-1,5 mL/min em colunas de 4,6 mm d.i., o fluxo previsto para uma coluna de 0,32 mm d.i. será cerca de 2,5-7,0 μ L/min.

Em um típico laboratório de controle de qualidade, onde um cromatógrafo provavelmente estará em funcionamento 8 horas por dia, 5 dias por semana, 20 dias por mês e 12 meses por ano, mais de 100 L de solventes utilizados como fase móvel serão produzidos em um período de apenas um ano caso esse laboratório uti-

lize colunas de 4,6 mm d.i. A maioria desses solventes é altamente tóxica para o homem e para o ambiente, requerendo assim estocagem, transporte e descarte especiais^[4].

Já no caso de esse mesmo laboratório utilizar colunas de 0,32 mm d.i., o volume de fase móvel descartado poderá ser reduzido em torno de 200 vezes, resultando assim em um consumo de apenas 500 mL de fase móvel no mesmo período de funcionamento. Em muitos casos, a quantidade total de fase móvel necessária para uma única separação poderá ser de menos de 150 μ L (5 μ L/min; 30 minutos por análise). Isso explica por que a cLC também é chamada de “cromatografia de uma gota” (“*one drop chromatography*”).

Devido à significativa redução no consumo de fase móvel, a miniaturização da coluna possibilitará o uso de fases móveis de maior custo, como fases quirais, e solventes deuterados, assim como fases móveis tóxicas e inflamáveis, sem que eles forneçam grandes riscos à segurança do laboratório ou à saúde dos analistas.

4.3 Pequena quantidade de amostra

O volume de amostra que deve ser introduzido em colunas capilares empacotadas é proporcional ao quadrado do diâmetro interno da coluna. Essa característica é de extrema importância em situações em que não se dispõe de grande quantidade de amostras, como nas áreas de estudos biomédicos, química forense, produtos naturais, entre muitas outras.

4.4 Aumento na sensibilidade

Uma vez que o processo de diluição ocorrido dentro de uma coluna cromatográfica é inversamente proporcional ao quadrado do seu diâmetro interno, a concentração de um analito eluído de uma coluna capilar de 0,32 mm d.i. será cerca de 200 vezes maior que a concentração

desse mesmo analito eluído de uma coluna convencional de 4,6 mm d.i. caso as duas separações sejam realizadas em condições cromatográficas semelhantes. Sendo assim, se um detector sensível à concentração (UV-Vis, fluorescência, índice de refração etc.) for utilizado, haverá um ganho na sensibilidade na detecção dos picos eluídos.

Entende-se por “condições cromatográficas semelhantes” as condições em que a eficiência das duas colunas, o comprimento delas, o caminho ótico utilizado nas duas detecções e a quantidade em massa do analito injetado sejam, essencialmente, os mesmos.

Na prática, dificilmente condições idênticas poderão ser utilizadas nas separações em escala convencional e capilar, principalmente no que diz respeito à injeção da mesma massa de analito em ambas as colunas, já que a capacidade de amostra de uma coluna capilar é muito reduzida. Dessa forma, essa vantagem da cLC frente à HPLC somente será válida nos casos em que a quantidade de amostra disponível for menor que a capacidade de amostra da coluna convencional^[35,36,42]. A Figura 2 ilustra três cromatogramas simulados em condições cromatográficas semelhantes para três colunas de diferentes diâmetros internos.

4.5 Aplicabilidade de programação de temperatura

Na cromatografia líquida, a temperatura da coluna tem um papel muito importante no controle de várias propriedades, como o coeficiente de partição, a pressão de vapor, a viscosidade e a difusividade molecular, entre muitas outras^[37]. Desse modo, quase todos os parâmetros de importância na cromatografia, incluindo o tempo de retenção, seletividade, eficiência, pressão do sistema e várias outras propriedades da fase estacionária, serão, em maior ou menor escala, influenciados por variações da temperatura da coluna^[38,39].

Apesar de a programação de temperatura ser uma técnica muito utilizada na cromatografia gasosa, ela é de difícil aplicação na HPLC devido ao gradiente radial de temperatura formado dentro da coluna. Tal gradiente é criado principalmente devido ao grande diâmetro interno e alta capacidade térmica das colunas utilizadas pela HPLC. Portanto, uma vez que a cLC utiliza colunas de pequeno diâmetro interno e baixa capacidade térmica, a programação de temperatura nessa técnica se torna viável.

Embora a variação da temperatura na cromatografia líquida não produza efeitos tão pronunciáveis quanto aqueles produzidos pela variação do pH ou polaridade da fase móvel, a programação de temperatura é uma técnica muito promissora, uma vez que a instrumentação necessária para esse enfoque é mais simples e mais barata que um sistema de gradiente de fase móvel, seja ele realizado em baixa ou alta pressão.

Historicamente, o efeito da temperatura na retenção foi relatado, pela primeira vez, há mais de 50 anos por Strain^[40]. Um ponto importante levantado por esse autor diz respeito à decomposição dos analitos em temperaturas elevadas. Entretanto, dado o curto tempo das corridas cromatográficas na cLC, o tempo de exposição dos analitos a altas temperaturas é muito pequeno nessa técnica para que possa ocorrer degradação na maior parte das aplicações práticas da técnica.

Thompson e Carr^[41] também afirmaram que a maioria das reações químicas, tais como hidrólise, oxidação, isomerização e epimerização, podem ser consideradas desprezíveis. Esse ponto é muito importante, visto que muitos justificam a não utilização da temperatura devido à degradabilidade dos analitos, sem que, no entanto, comprovem experimentalmente se essa degradação realmente ocorre^[42].

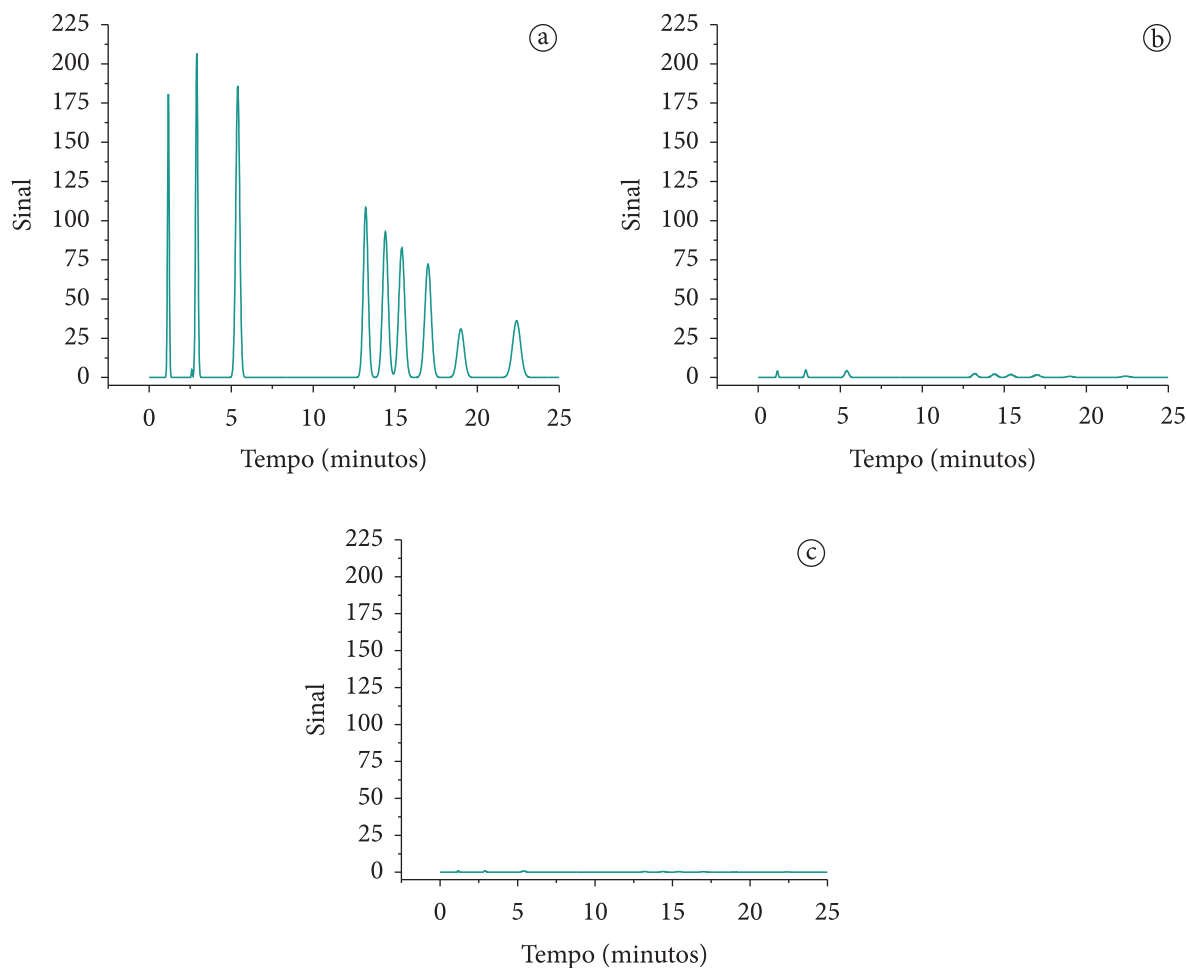


Figura 2 Cromatogramas simulados ilustrando o ganho de sensibilidade em colunas de diversos diâmetros interno: a) 0,320 mm; b) 2,1 mm; c) 4,6 mm.

4.6 Facilidade no acoplamento a diversos sistemas de detecção

Devido ao baixo fluxo utilizado na cLC, é possível o acoplamento direto com diferentes sistemas de detecção, como espectrometria de massas (MS) e detectores normalmente só utilizados na GC, como o detector por ionização em chama (FID) e detector por captura de elétrons (ECD).

4.7 Melhor permeabilidade das colunas

Dados obtidos por Verzele^[43] (Tabela 5) demonstram que as colunas capilares possuem uma permeabilidade cerca de duas vezes maior que as colunas utilizadas na HPLC convencional.

A principal vantagem de tal fato é a significativa redução da pressão da coluna, que poderá proporcionar a utilização de partículas menores que as utilizadas na HPLC convencional, ou a utilização de colunas mais compridas, o que permitirá, em ambos os casos, análises com alta eficiência.

As razões dessa melhor permeabilidade ainda não são claras. Segundo Verzele^[42], a melhor explicação seria que a densidade de empacotamento nas colunas de sílica fundida é menor. No entanto, essa menor densidade, diferentemente do que ocorre em colunas de grandes diâmetros internos, não acarretaria uma menor estabilidade para as colunas capilares devido ao

Tabela 5 Pressão da coluna (“back pressure”) para HPLC e cLC.

Material de Empacotamento	Pressão da Coluna* (bar)		Razão Conv./cLC
	Coluna convencional 4,6 mm x 25 cm	Coluna capilar 0,32 mm x 25 cm	
10- μ m ROSil-C18-HL-D	23	13	1,77
5- μ m Spherisorb-ODS	49	26	1,88
2- μ m ROSil-C18-D	437	228	1,91
1- μ m ROSil-C18-D	1190	602	1,97

* Os valores das pressões abaixo de 350 bar foram obtidos diretamente do equipamento, valores de pressões maiores que 350 bar foram obtidas por extrapolação linear; condições cromatográficas: fase móvel: 90:10 (v/v) acetonitrila/água; fluxo: 0,826 mL/min (coluna de 4,6 mm), 4 μ L/min (coluna de 0,32 mm); $u = 1,728$ mm/s (para as duas colunas). Dados modificados da referência 42.

seu pequeno diâmetro interno e consequente efeito de compressão (“*pinching effect*”) da parede da coluna sobre o empacotamento.

4.8 Diminuição do fluxo ótimo

Como pode ser visto na Figura 3, as curvas que mostram a variação de eficiência na formada altura de um prato (H) em função da velocidade linear média (gráfico de van Deemter) para colunas convencionais e microcolunas, apesar de se esperar teoricamente o mesmo comportamento, são diferentes na prática^[42,44]. Observa-se que as colunas de cLC possuem o valor de velocidade linear ótima cerca de duas a três vezes menor que o esperado quando comparadas às colunas convencionais.

A consequência prática dessa diminuição da velocidade linear ótima é que a utilização de fluxos lentos reduz consideravelmente a pressão do sistema, possibilitando assim que as colunas de cLC sejam mais compridas ou empacotadas com partículas menores que na HPLC convencional, gerando colunas mais eficientes.

4.9 Possibilidade de construção de colunas longas

Na HPLC convencional, o número de pratos não é proporcional ao comprimento da coluna quando várias colunas são conectadas em série.

Um das vantagens da cLC é a facilidade do uso de longas colunas, o que resultaria num elevado número de pratos. Isso se deve à diminuição da difusão por múltiplos caminhos e pela eficiente transferência de calor gerado pela queda de pressão na coluna. Tal geração de calor afeta o processo de transferência de massa, o que resulta numa baixa eficiência.

4.10 Utilização de colunas menores

Devido à grande eficiência das colunas utilizadas na cLC, existe também a possibilidade de se utilizarem colunas mais curtas com menores quantidades de material de empacotamento. Essa nova direção tem se tornado de grande interesse pelo fato de oferecer vantagens sobre os métodos convencionais, por exemplo, na diminuição do custo e do tempo de análise, assim como a possibilidade de analisar amostras termicamente menos estáveis.

4.11 Melhor inércia química

Tem sido demonstrada na literatura^[45] uma influência negativa de traços de metais no material de empacotamento, assim como nas paredes das colunas. Certamente, colunas de sílica fundida, devido à sua inércia química característica, reduziriam consideravelmente este tipo de problema.

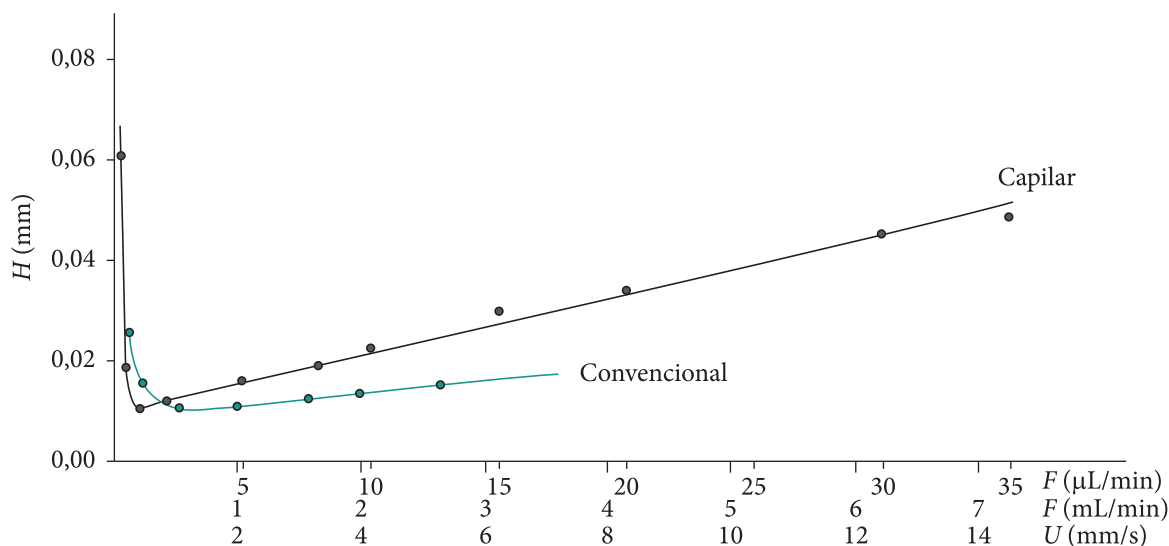


Figura 3 Gráfico de van Deemter para colunas empacotadas. Colunas: 4,6 mm x 15 cm (convencional), 0,32 mm x 15 cm (capilar de sílica fundida); fase estacionária: 5- μ m ROSil-C18-D; fase móvel: 75:25 (v/v) acetoneitrila/água; detector: UV (254 nm); composto: pireno. Adaptado da referência 42.

4.12 Facilidade na manutenção

Uma vez que as colunas de sílica fundida são, pelo menos, parcialmente transparentes, pode-se inspecionar visualmente problemas como vazios, canais etc. Caso necessário, podem-se utilizar revestimentos externos totalmente transparentes como silicones ao invés de poliimidas, uma vez que as colunas de LC, ao contrário das de GC, não são usualmente submetidas a temperaturas elevadas.

Outra vantagem advém das características da sílica: caso a parte superior de uma coluna se torne suja – por exemplo, devido à injeção de amostras sujas – pode-se cortar uma pequena parte da coluna com facilidade, sem prejuízo de seu desempenho, o que é praticamente impossível de ser realizado com colunas convencionais de aço inox utilizadas na HPLC.

4.13 Cromatografia unificada

Uma das principais vantagens da miniaturização da LC, assim como da GC e da cromatografia por fluido supercrítico (SFC), está na possibilidade do desenvolvimento da cromatografia unificada.

Devido a vários fatores, incluindo interesses comerciais de várias companhias, a família das técnicas cromatográficas teve seu desenvolvimento em instrumentos completamente diferentes^[4]. Entretanto, como apontado por Giddings^[46], a divisão da cromatografia em várias técnicas é artificial e improdutivo. Giddings também postulou que a GC, a LC e a SFC são apenas diferentes formas de apresentar a mesma técnica devido às particularidades na fase móvel. A primeira demonstração prática de que a GC, a LC e a SFC são complementares e podem ser efetuadas em um mesmo instrumento foi feita por Ishii et al.^[47].

Os princípios e as aplicações da Cromatografia Unificada foram publicados em outro trabalho anterior do grupo^[42].

5 Instrumentação necessária

Embora a cLC possua todas as vantagens já discutidas em relação à HPLC convencional, para que tal técnica obtenha o máximo desempenho, toda a instrumentação (injetor, tubulações, conexões, celas de detecção etc.) deve ser redi-

mencionada de acordo com o volume da coluna. Isso é particularmente importante para os volumes de injeção e detecção.

Apesar de atualmente já existirem instrumentos comercialmente disponíveis desenvolvidos para a cLC, nenhum deles atingiu um satisfatório desempenho, pois a grande maioria não passa de adaptações de sistemas convencionais, enquanto os novos sistemas ditos desenvolvidos para a cLC ainda permanecem superdimensionados^[48].

5.1 Sistema de bombeamento

O sistema de bombeamento da fase móvel utilizado na cLC deve ser capaz de fornecer um faixa de fluxos que vai desde nL até poucos μL por minuto. As melhores bombas utilizadas atualmente para tal finalidade são as do tipo seringa e as do tipo micropistão recíprocante, tendo essa última um melhor desempenho devido à grande habilidade de compensação da pressão da coluna (“back pressure”), rápida estabilização do fluxo e a facilidade de criação de gradiente^[5,49-54].

A maioria dos sistemas de bombeamento para cLC disponíveis comercialmente utiliza sistemas de divisão de fluxos conhecidos como “splitters”^[48,55-57]. No entanto, tais sistemas possuem várias limitações, como a dependência do fator de divisão quanto à pressão na coluna. Desse modo, se houver alguma variação da pressão na coluna, como a que pode ser causada por gradientes devido à constante mudança da viscosidade da fase móvel, haverá também uma variação do fluxo na coluna. Além disso, a utilização de divisores de fluxos não acarretará uma diminuição do consumo da fase móvel, fazendo com que os sistemas que não utilizam sistemas de divisão sejam mais atrativos e econômicos.

5.2 Tubulações e conexões

A tubulação utilizada nas conexões das diferentes partes do equipamento contribui para a variância do alargamento da banda, de forma

linear, quanto ao comprimento e, na quarta potência, quanto ao seu raio, fazendo com que a escolha das dimensões do tubo seja extremamente importante^[31].

Para colunas de 0,5-1,0 mm de d.i., tubulações de aço inox especialmente desenvolvidas com d.i. 0,25 ou 0,125 mm são geralmente aplicadas. Alternativamente, tubulações de PEEK ou sílica fundida podem ser utilizadas. Já para colunas de diâmetro interno menor que 0,5 mm (500 μm), o uso de tubulações deve ser evitado sempre que possível, devendo, desse modo, conectar a coluna diretamente no injetor e no detector.

Quando não for possível essa conexão direta, tubulações de diâmetro interno menor que 50 μm devem ser utilizadas. Todas as conexões devem ser feitas evitando volumes mortos, o que pode ser atingido utilizando uniões do tipo ZDV (“zero dead volume”).

5.3 Dispositivos de introdução da amostra

Devido à pequena quantidade de fase estacionária contida dentro da coluna, a quantidade de amostra que pode ser introduzida sem que se sobrecarregue a coluna pode ser tão pequena quanto 700 nL para colunas de 1,0 mm d.i. x 25 cm de comprimento até cerca de 3 nL para colunas de 75 μm d.i. x 15 cm de comprimento, considerando que ambas estejam empacotadas com partículas de 5 μm ^[58].

Normalmente, tais volumes de injeção podem ser atingidos facilmente e com grande repetibilidade, utilizando válvulas comercialmente disponíveis. Caso se necessite de volumes de injeção menores que aqueles fornecidos pelas válvulas, pode-se empregar diversas técnicas de injeção descritas na literatura^[59-62]. Atualmente, válvulas de até 4 nL podem ser encontradas comercialmente.

5.4 Colunas

Assim como ocorreu com a cromatografia gasosa, os dois principais tipos de colunas estudados para cLC são as colunas empacotadas e as colunas tubulares abertas (WCOT ou “*Wall Coated Open Tubular*”). Essa última geralmente consiste em um tubo de sílica fundida com um filme fino de fase estacionária recobrimo sua parede interna. Esse tipo de coluna é essencialmente igual às utilizadas na cromatografia gasosa capilar. Normalmente, a fase estacionária utilizada nesse tipo de coluna pode sofrer um processo de “*cross-linking*” ou ser imobilizada na parede do capilar para evitar a remoção da fase estacionária pelo eluente. A principal desvantagem desse tipo é que elas precisam possuir um diâmetro interno menor que 20 µm para que possuam uma boa eficiência.

Esse tipo de coluna fornece, teoricamente, melhores resultados do que os obtidos com colunas empacotadas. Isto é devido, principalmente, aos pequenos volumes requeridos para o equipamento e acessórios utilizados com esta técnica, em função da pequena capacidade de amostra desse tipo de coluna. Entretanto, sua utilização fora do meio acadêmico atualmente ainda é muito limitada^[4].

Como alternativa, as colunas empacotadas e monolíticas que utilizam a mesma tecnologia de preparação que as de HPLC têm ganhado muita aceitação na área da cLC. Diferentes técnicas de empacotamento vêm sendo relatadas, utilizando diversos meios de se transferir a fase estacionária do reservatório externo para dentro das colunas^[63], os quais incluem a utilização de gases^[64-66], dióxido de carbono supercrítico^[67-71] ou líquidos^[11,72].

5.5 Detectores

Praticamente todos os tipos de detectores utilizados em HPLC podem ser utilizados na cLC. A principal modificação necessária para que eles se adaptem ao pequeno volume de

amostra empregada nesta técnica, sem que haja um alargamento excessivo do pico, na maioria dos casos, envolve um decréscimo no volume da cela de detecção^[4].

Além dos sistemas de detecção normalmente utilizados na HPLC convencional, como a espectrofotometria na região do UV-Vis e a fluorescência, diversos outros sistemas que são de difícil acoplamento na HPLC convencional podem ser utilizados, por exemplo, espectrometria de massas (MS), ressonância magnética nuclear (NMR), detecção por ionização em chama (FID), detecção por captura de elétrons (ECD) etc.

5.6 Sistemas de aquisição de dados

O sistema de aquisição de dados na cromatografia tem um papel muito importante, mas que, muitas vezes, é menosprezado pelos cromatografistas. Um sistema de aquisição mal projetado (ou mal utilizado) pode influenciar negativamente tanto uma análise quanto uma coluna com baixa eficiência. Isso ocorre devido ao alargamento do pico causado, por exemplo, pela utilização de filtros analógicos de alta constante de tempo. Esse efeito de alargamento do pico é muito semelhante ao que ocorre quando se utiliza uma coluna com baixa eficiência e, deste modo, é muito comum se confundir um sistema de aquisição mal projetado/utilizado com uma coluna deteriorada.

Além da aparente falta de eficiência na separação, a frequência de aquisição do sinal proveniente do detector também pode degradar a exatidão de sua quantificação. Na HPLC convencional (colunas de 4,6 mm d.i.), a taxa de amostragem considerada suficiente para uma integração “exata” é de 20 a 30 pontos por pico. Uma vez que os picos eluídos de colunas capilares tendem a ser mais estreitos que aqueles eluídos das colunas de HPLC convencional, para que esse número seja mantido, devemos aumentar a frequência de aquisição do sinal analítico na mesma razão da redução da largura do pico.

Dessa forma, os sistemas de aquisição de dados projetados para a HPLC convencional não devem ser utilizados na cLC, uma vez que eles forneceriam uma frequência de amostragem inferior àquela necessária para a detecção dos picos estreitos comuns nas técnicas miniaturizadas.

6 Principais limitações da miniaturização em cromatografia líquida

Uma das barreiras mais críticas que a cLC vem enfrentando e, como consequência, dificultando o seu rápido desenvolvimento, é a limitada disponibilidade de equipamentos comercialmente disponíveis realmente dedicados a tal técnica. As diferentes formas de adaptação de equipamentos convencionais de HPLC para operarem em cLC têm resultado em diferentes graus de sucesso e, em muitos deles, desencorajado os usuários a trocarem as técnicas convencionais por suas contrapartidas miniaturizadas. De forma análoga, a pequena oferta comercial de colunas capilares de alta qualidade contendo diversos tipos de fases estacionárias tem sido uma limitação para muitos laboratório migrarem da HPLC para a cLC. Espera-se que, ainda nesta década, o interesse comercial de empresas da área em investir na produção de melhores instrumentos e uma maior diversificação das colunas convençam os usuários da HPLC do enorme ganho que significa a migração para a técnica miniaturizada.

7 Conclusão

Apesar de seu desenvolvimento tardio, a cLC vem se mostrando uma técnica muito promissora. No entanto, ela ainda não atingiu sua maturidade como técnica de separação a ponto de ser utilizada universalmente, principalmente como técnica de análises de rotina. Um dos principais fatores que ainda limitam uma uni-

versalização mais rápida da técnica é a limitada oferta de instrumentos e colunas de alta qualidade exclusivamente desenvolvidas e dedicadas a ela, assim como aplicações práticas fora da área de biomoléculas. Desse modo, para que a cLC possa atingir áreas além das acadêmicas e se tornar uma técnica de rotina tão bem sucedida quanto a cromatografia gasosa, ela ainda tem que despertar um maior interesse dos fabricantes de equipamentos para que invistam mais recursos na produção de equipamentos mais robustos, de mais fácil utilização e com mais aplicações práticas. Do ponto de vista científico, e a depender da área acadêmica, a cLC já atingiu a maturidade necessária para tornar-se uma técnica tão popular quanto a cromatografia gasosa capilar.

Agradecimentos

À FAPESP, pela bolsa de doutorado concedida (processo N.º 04/09384-7).

Referências

- 1 Snyder LR, Kirkland JJ. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 2nd ed. New York: Wiley, 1979.
- 2 Ettre LS. *High-Performance Liquid Chromatography*. New York: Academic Press Inc., 1980.
- 3 Szumski M, Buszewski B. Study of bed homogeneity of methacrylate-based monolithic columns for μ -hplc and CEC. *Crit. Rev. Analytical Chemistry* 2002, 32(4):1-28. <http://dx.doi.org/10.1080/10408340290765434>
- 4 Lanças FM. Unified Chromatography. In: Cazes J, editor. *Dekker Encyclopedia of Chromatography*. New York: Marcel Dekker, Chapter 6, 2000.
- 5 Saito M, Hibi K, Ishii D, Takeuchi T. *Introduction to Microscale High-Performance Liquid Chromatography*. New York: VCH Publisher, 1988.
- 6 Saito M, Waka A, Hibi K, Takahashi M. *Ind. Res. Develop.* 1983; 102.
- 7 Knox J H. Practical aspects of LC theory. *Journal of Chromatographic Science* 1977; 15(9):352-364

- 8 Golay M. Gas Chromatography. Academic Press Inc.: New York, 1958, 36.
- 9 Horváth CG, Preiss BA, Lipsky SR. Fast liquid chromatography. Investigation of operating parameters and separation of nucleotides on pelicular ion exchangers. *Analytical Chemistry* 1967; 39(12):1422-1428. <http://dx.doi.org/10.1021/ac60256a003>
- 10 Horváth CG, Lipsky SR. Rapid analysis of ribonucleosides and bases at the picomole level using pelicular cation Exchange resin in narrow bore columns. *Analytical Chemistry* 1969; 41(10):1227-1234.
- 11 Ishii D, Asai K, Hibi K, Jonokuchi T, Nagaya M. A study of micro-high-performance liquid chromatography: I. Development of technique for miniaturization of high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1977; 144(2):157-168. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)99351-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(00)99351-8)
- 12 Ishii D, Hibi K, Asai K, Jonokuchi T. Studies of micro high-performance liquid chromatography : II. Application to gel permeation chromatography of techniques developed for micro high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1978; 151(2):147-154. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)85378-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(00)85378-9)
- 13 Ishii D, Hibi K, Asai K, Nagaya M. Studies of micro high-performance liquid chromatography : III. Development of a "micro-pre-column method" for pre-treatment of samples. *Journal of Chromatography A* 1978; 152:341. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)85069-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(00)85069-4)
- 14 Ishii D, Hibi K, Asai K, Nagaya M, Mochizuki K, Mochida Y. Studies of micro high-performance liquid chromatography. IV. Application of the micro pre-column method to the analysis of corticosteroids in serum. *Journal of Chromatography A* 1978; 156:173-180. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)83137-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(00)83137-4)
- 15 Ishii D, Hirose A, Hibi K, Iwasaki Y. Studies on micro high-performance liquid chromatography : V. Design of a microscale liquid chromatograph and its application to cation-exchange separation of alkali metals *Journal of Chromatography A* 1978; 157:43-50. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)92320-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(00)92320-3)
- 16 Ishii D, Hirose A, Horiuchi I. Application of microscale liquid chromatographic technique to the anion Exchange separation of halide ions. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 1978; 45(1):7-14. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02517105>
- 17 Ishii D, Sakurai K. In: *Abstracts of the Tókió Conference of Applied Spectrometry*; 1973; Tokyo, Japão. 1973. 1B05, p.73.
- 18 Scott RPW, Kucera P. Mode of operation and performance characteristics of microbore columns for use in liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1979; 169(4):51-72. [http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673\(75\)85032-1](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673(75)85032-1)
- 19 Scott RPW, Kucera P. Use of microbore columns for the separation of substances of biological origin. *Journal of Chromatography A* 1979; 185, 27-41. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)85595-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(00)85595-8)
- 20 Scott RPW, Kucera P, Munroe M. Use of microbore columns for rapid liquid chromatographic separations. *Journal of Chromatography A* 1979; 186, 475-487. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)95268-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(00)95268-3)
- 21 Reese CE, Scott RPW. Microbore columns. Design, construction and operation. *Journal of Chromatographic Science* 1980; 18(9):479-486.
- 22 Scott RPW. Microbore columns in liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science* 1980; 18(2):49-54.
- 23 Kucera P. *Journal of Chromatography A* 1980; 198:93.
- 24 Tsuda T, Novotny M. Packed microcapillary columns in high performance liquid chromatography. *Analytical Chemistry* 1978; 50(2):271-275. <http://dx.doi.org/10.1021/ac50024a026>
- 25 Tsuda T, Novotny M. Band broadening phenomena in microcapillary tubes under the conditions of liquid chromatography. *Analytical Chemistry* 1978; 50(2):632-634. <http://dx.doi.org/10.1021/ac50026a023>
- 26 Hirata Y, Novotny M. Techniques of capillary liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1979; 186:521-528. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)95272-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(00)95272-5)
- 27 Chervet JP, Ursen M, Salzmann JP. Instrumental requirements for nanoscale liquid chromatography. *Analytical Chemistry* 1996; 68(9):1507-1512. <http://dx.doi.org/10.1021/ac9508964>
- 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 & Chromatography Communications* 1987; 10(5):280-287. <http://dx.doi.org/10.1002/jhrc.1240100513>

- 29 Barth HG, Barber WE, Lochmuller CH, Majors RE, Regnier FE. Column liquid chromatography. *Analytical Chemistry* 1988; 60:387R-435R.
- 30 Chervet JP, Ursem M, Salzmann JP. Instrumental requirements for nanoscale liquid chromatography. *Analytical Chemistry* 1996; 68(9):1507-1512. <http://dx.doi.org/10.1021/ac9508964>
- 31 Vissers JPC, Claessens HA, Cramers CA. Microcolumn liquid chromatography: instrumentation, detection and applications. *Journal of Chromatography A* 1997; 779(1-2):1-28. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00422-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00422-6)
- 32 Lanças FM. The Role of the Separation Sciences in the 21th Century. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2003; 14(2):183-197. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532003000200005>
- 33 Novotny M, Ishii D. *Microcolumn Separations*. Amsterdam: Elsevier, 1985.
- 34 Yang FJ. *Microbore Column Chromatography*. New York: Marcel Dekker, 1989.
- 35 Ishii D. *Introduction to Microscale High-Performance Liquid Chromatography*. New York: VCH Publisher, 1988.
- 36 Saito Y, Jinno K, Greibrokk T. Capillary Columns in Liquid Chromatography: Between Conventional Columns and Microchips. *Journal of Separation Science* 2004; 27:1379-1390.
- 37 Skvortsov AM, Gorbunov AA. Adsorption effects in the chromatography of polymers. *Journal of Chromatography A* 1986; 358:77-83. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)90317-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(01)90317-6)
- 38 Greibrokk T, Andersen T. Temperature programming in liquid chromatography. *Journal of Separation Science* 2001; 24:899. [http://dx.doi.org/10.1002/1615-9314\(20011201\)24:12%3C899::AID-JSSC899%3E3.0.CO;2-K](http://dx.doi.org/10.1002/1615-9314(20011201)24:12%3C899::AID-JSSC899%3E3.0.CO;2-K)
- 39 Holm A, Molander P, Lundanes E, Greibrokk T. Novel column oven concept with incorporated capability for cold spot sample enrichment for high throughput temperature gradient capillary liquid chromatography. *J. Sep. Sci.* 2003; 26:1147. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.200301500>
- 40 Strain HH. Conditions Affecting Sequence of Organic Compounds in Tswett Adsorption Columns. *Industrial Engineering Chemistry and Analytical Edition* 1946; 18:605. <http://dx.doi.org/10.1021/i560158a006>
- 41 Thompson JD, Carr PW. High-speed liquid chromatography by simultaneous optimization of temperature and eluent composition. *Analytical Chemistry* 2002; 74(16):4150-4159.
- 42 Mühlen C, Lanças FM. Cromatografia Unificada. *Química Nova* 2004; 27(5):747. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000500014>
- 43 Verzele M, De Weerd M, Dewaele C, Jong G, Lammers N, Spruit F. *LC & GC Magazine* 1986; (4):1162.
- 44 Hirose A, Wiesler D, Novotny M. High-efficiency microcolumn separation of polycyclic arene isomers isolated from carbon black. *Chromatographia* 1984; 18(5):239-242. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02270557>
- 45 Verzele M, Dewaele C. The evaluation of "reversed phase" high-performance liquid chromatography packing materials. *Chromatographia* 1984; 18(2):84-86. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02268462>
- 46 Giddings JC. *Dynamics of Chromatography*. New York: Marcel Dekker, 1965.
- 47 Ishii D, Niwa T, Ohta K, Takeuchi T. *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications* 1988; 11(11):800-801. <http://dx.doi.org/10.1002/jhrc.1240111110>
- 48 Rapp E, Tallarek U. *Journal of Separation Science* 2003; 26:453-470.
- 49 Berry V, Schwartz H. In: Yang FJ, editor. *Microbore Column Chromatography: A Unified Approach to Chromatography*. New York: Marcel Dekker, 1989. cap. 3.
- 50 Huang EC, Wachs T, Conboy J, Henion JD. Atmospheric pressure ionization mass spectrometry. Detection for the separation sciences. *Analytical Chemistry* 1990; 62:713A. <http://dx.doi.org/10.1021/ac00212a002>
- 51 Brown PR. Fabrication method to enhance stability of N,N,N',N'-tetracyclohexyl-3-oxapentanediamide calcium microelectrodes. *Analytical Chemistry* 1990; 62:955A. <http://dx.doi.org/10.1021/ac00218a021>
- 52 Ishii D. In: *Proceedings of the XXII International Symposium on Capillary Chromatography*; 1990; Tokyo. Tokyo, Japão: Industrial Publishing & Consulting, 1990. p. 14.
- 53 Flurer CL, Borra C, Andreolini F, Novotny MV. *Journal of Chromatography A* 1988; 448:73-86.
- 54 Banks JF, Novotny MV. *Journal of Microcolumn Separations* 1990(2); 84-87.
- 55 Van der Wal S, Yang FJ. Gradient elution system for capillary and micro HPLC. *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications* 1983; 6:216. <http://dx.doi.org/10.1002/jhrc.1240060415>

- 56 Nagae N, Itoh H, Nimura N, Kinoshita T, Takeuchi T. Rapid separation of proteins and peptides by reversed-phase microcolumn liquid chromatography. *Journal of Microcolumn Separations* 1991; 3(1):5-9. <http://dx.doi.org/10.1002/mcs.1220030103>
- 57 Chervet JP, Meijvogel CJ, Ursem M, Salzmann JP. *LC & GC Magazine* 1992; 10:140-148.
- 58 Vissers JPC. Recent developments in microcolumn liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1999; 856(1):117-143. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00692-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00692-5)
- 59 Claessens HA, Burcinova A, Cramers CA, Mussche Ph, van Tilburg CE. *Journal of Microcolumn Separations* 1990; (2):132.
- 60 Harvey MC, Stearns SD, Averette JP. *LC & GC Magazine* 1985; 3:5.
- 61 Jorgenson JW, Guthrie EJ. Liquid chromatography in open-tubular columns : Theory of column optimization with limited pressure and analysis time, and fabrication of chemically bonded reversed-phase columns on etched borosilicate glass capillaries. *Journal of Chromatography A* 1983; 255:335-348.
- 62 Manz A, Simon W. Injectors for open-tubular column liquid chromatography with 106 theoretical plates at retention times in the minute range. *Journal of Chromatography A* 1987; 387:187-196. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)94523-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(01)94523-6)
- 63 Lanças FM, Rodrigues JC, Freitas SS.. *Preparation and use of packed capillary columns in chromatographic and related techniques Journal of Separation Science* 2004; 27:1475-1482. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.200401853>
- 64 Guan Y, Zhou L, Shang Z. Dry-packed capillary columns for micro HPLC. *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications* 1992; 15:434-436.
- 65 Crescentini G, Mastrogiacomo AR. Liquid chromatography capillary columns dry-packed with polar and nonpolar stationary phases. *Journal of Microcolumn Separations* 1991; 3:539-545. <http://dx.doi.org/10.1002/mcs.1220030609>
- 66 Crescentini G, Bruner F, Mangoni F, Guan Y. *Analytical Chemistry* 1998; 60:1659-1662.
- 67 Malik A, Li W, Lee ML. Preparation of long packed capillary columns using carbon dioxide slurries. *Journal of Microcolumn Separations* 1993; 5:361-369. <http://dx.doi.org/10.1002/mcs.1220050409>
- 68 Tong D, Bartle KD, Clifford AA. Principles and applications of unified chromatography. *Journal of Microcolumn Separations* 1994; 6:249-256. <http://dx.doi.org/10.1002/mcs.1220060309>
- 69 Tong D, Bartle KD, Clifford AA, Edge AM. Theoretical studies of the preparation of packed capillary columns for chromatography. *Journal of Microcolumn Separations* 1995; 7(3):265-278. <http://dx.doi.org/10.1002/mcs.1220070311>
- 70 Koivisto P, Danielsson R, Markides KE. Factors affecting the preparation of packed capillary columns in supercritical carbon dioxide media. *Journal of Microcolumn Separations* 1997; 9(2):97-103. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-667X\(1997\)9:2%3C97::AID-MCS6%3E3.0.CO;2-0](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1520-667X(1997)9:2%3C97::AID-MCS6%3E3.0.CO;2-0)
- 71 Planeta J, Karasek P, Vejrosta J. Development of packed capillary columns using carbon dioxide slurries. *Journal of Separation Science* 2003; 26(6-7):525-530. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.200390071>
- 72 Vissers JPC, Hoeben MA, Laven J, Claessens HA, Cramers CA. Hydrodynamic aspects of slurry packing processes in microcolumn liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2000; 883(1):11-25. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00276-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00276-4)

Recebido: 02/05/2011

Aceito: 23/05/2011