ALESSANDRA MAFFEI MONTEIRO

Cromatografia líquida capilar: desenvolvimento de colunas empacotadas e monolíticas, celas de detecção UV e aplicação da programação de temperatura

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Química (Química Analítica).

Orientador: Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças

São Carlos

2010

Dedicatória

A Deus, por tudo...

Dedico esta tese aos meus pais, Cirineia e Álvaro, pelo apoio e incentivo em todos os momentos de minha vida. Amo vocês!

Aos meus familiares e amigos, por saberem compreender minha ausência durante esta jornada, dedico este trabalho com amor, carinho e gratidão.

Aos amigos Cândida, Léon e Bezerra pelos sábios conselhos e imensa ajuda nos momentos mais difíceis.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças pela orientação e pelo incentivo durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Lincoln Figueira Marins Coutinho pelo companheirismo e por ter desenvolvido alguns dos equipamentos que possibilitaram a realização deste trabalho.

Aos Profs. Drs. Luiz Henrique Mazo e Suzana Lucy Nixdorf pela grande ajuda durante meu ingresso ao IQSC.

Ao Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto pelo conhecimento transmitido e ajuda em algumas etapas deste trabalho.

Ao Dr. Esmeraldo Aparecido Cappelaro pela ajuda na confecção das celas capilares de detecção UV.

Ao amigo Alexandre Cruz pela disponibilidade e competência para auxiliar na resolução dos problemas instrumentais.

Aos amigos Carlos Eduardo, Paulo Juliano, Jorge e Eurico pelo apoio, carinho e ajuda durante a realização deste trabalho.

À Odete Milão pela grande ajuda e incentivo.

Aos amigos do CROMA e funcionários do IQSC.

À CAPES, ao CNPq e à FAPESP pelo apoio financeiro concedido durante o doutorado.

*“Na vida, não vale tanto o
que temos, nem tanto importa
o que somos.*

*Vale o que realizamos com aquilo que
possuímos e, acima de tudo,
importa o que fazemos de nós!”*

CHICO XAVIER

Resumo

Apesar de seu início promissor, a miniaturização da cromatografia líquida tem se desenvolvido de forma lenta devido à dificuldade em adquirir colunas e equipamentos adequados à técnica. Nos últimos anos, o interesse nesta área da cromatografia tem sido crescente em decorrência das inúmeras vantagens proporcionadas pelo uso de colunas com diâmetro interno reduzido. Ainda que as colunas capilares se encontrem disponíveis comercialmente, sua produção em laboratório pode reduzir custos. Vários parâmetros de grande importância na cromatografia, como o tempo de retenção dos analitos e a pressão do sistema, sofrem variações quando a temperatura da coluna é alterada. Em cromatografia líquida capilar, a aplicabilidade da programação de temperatura é uma alternativa viável, uma vez que a distribuição de calor no interior das colunas ocorre de maneira rápida e uniforme. Os detectores espectrométricos de massas são considerados os mais adequados a esta técnica, pois permitem o monitoramento de compostos presentes em amostras pouco concentradas. Em decorrência do alto custo e indisponibilidade destes em alguns laboratórios, as pesquisas instrumentais nesta área têm empregado detectores mais simples, como os baseados na absorção de luz ultravioleta. Contudo o diâmetro interno reduzido das colunas capilares e, por consequência, o baixo volume de injeção da amostra tornam necessário que as celas de detecção sejam apropriadamente dimensionadas para que não ocorra excessivo alargamento dos picos cromatográficos. Desta maneira, o presente trabalho visa o desenvolvimento de colunas empacotadas e monolíticas, bem como a produção de celas de detecção adequadas ao uso em sistemas destinados à cromatografia líquida capilar. O estudo de algumas variáveis de empacotamento permitiu a obtenção de colunas com excelente eficiência. As fases estacionárias monolíticas foram confeccionadas pelo método sol-gel e utilizadas para promover separações bastante rápidas. Uma das celas de detecção produzidas obteve ótimo desempenho quando comparada a duas celas comerciais comumente empregadas em sistemas miniaturizados. A programação de temperatura foi aplicada durante a separação de tetraciclinas e esteróides, sendo estas análises obtidas com maior rapidez quando comparadas às realizadas sob condições isotérmicas.

Abstract

In spite of its promising start, the miniaturization of liquid chromatography has developed slowly due to the difficulties in obtaining appropriate columns and equipments suitable to this technique. In recent years, interest in this area of chromatography has been increasing due to the several advantages afforded by the use of columns with reduced internal diameter. Although the capillary columns are commercially available, its in-house production can reduce costs. Several parameters of great importance in chromatography, such as the retention time of analytes and the pressure of the system vary widely when the column temperature is changed. In capillary liquid chromatography the applicability of temperature programming is a viable alternative since the heat distribution across the column occurs quickly and uniformly. Mass spectrometric detectors are considered the most suitable for this technique since they allow the monitoring of compounds in low concentrated samples. Due to the high cost and unavailability of these instruments in some laboratories, instrumental research in this area has been using the simpler detectors, such as those based on the absorption of ultraviolet light. However, the reduced internal diameter of capillary columns and, consequently, the low injection volume of sample imply an appropriate dimensioning of the detection cell, so that excessive broadening of chromatographic peaks is avoided. Thus, this work aims with the development of monolithic and packed columns, as well as the production of suitable cells for the use in detection systems for capillary liquid chromatography. The study of some packing variables allowed to obtain columns with excellent efficiency. Monolithic stationary phases were prepared by sol-gel process and were used to promote very fast separations. One of the obtained detection cells produced good performance when compared to two commercial cells commonly used in miniaturized systems. Temperature programming was applied for the separation of tetracyclines and steroids, at higher speed when compared to those obtained under isothermal conditions.

Lista de Figuras

Figura 1 – Componentes básicos de um sistema para cromatografia líquida de alta eficiência.....	29
Figura 2 - Cromatograma ilustrando os vários parâmetros obtidos em uma análise típica.....	32
Figura 3 – Ilustração de um pico cromatográfico com cauda.....	36
Figura 4 - Ilustração apresentando os três tipos de colunas utilizadas em cromatografia líquida.....	40
Figura 5 – Esquema simplificado de um sistema de empacotamento com partículas em suspensão destinado ao preparo de colunas capilares. (a) cilindro de gás, (b) reservatório do solvente de empacotamento, (c) bomba amplificadora pneumática, (d) válvulas, (e) conexão em T, (f) reservatório de partículas em suspensão, (g) tubo capilar e (h) restritor (tubo de sílica fundida).....	42
Figura 6 – Esquema simplificado de um sistema para preparo de colunas capilares pela técnica de empacotamento a seco. (a) cilindro de gás, (b) válvula, (c) conexão em T, (d) reservatório das partículas de fase estacionária, (e) tubo capilar e (f) restritor (tubo de sílica fundida).....	44
Figura 7 – Esquema simplificado de um sistema de empacotamento de colunas capilares com fluido supercrítico. (a) cilindro de gás, (b) sistema de resfriamento, (c) bomba seringa de alta pressão, (d) medidor de pressão, (e) válvula, (f) banho de ultrassom, (g) reservatório da fase estacionária, (h) tubo capilar, (i) restritor (tubo de sílica fundida).....	45
Figura 8 - Representação esquemática das etapas de preparo de colunas capilares monolíticas poliméricas orgânicas.....	50
Figura 9 - Representação esquemática do preparo de colunas monolíticas capilares à base de sílica pelo método sol - gel.....	52
Figura 10 - Etapas da imobilização térmica de leitos particulados para o preparo de colunas capilares semimonolíticas.....	53
Figura 11 - Representação esquemática das etapas de preparo de colunas monolíticas capilares de sílica, utilizando o processo sol-gel para converter leitos particulados a semimonolíticos.....	54
Figura 12 – Esquema de um tubo preparado para a confecção de coluna capilar empacotada.....	59

Figura 13 – Imagem das tubulações, conexões e reservatório utilizados no preparo de colunas capilares empacotadas.....	60
Figura 14 – Imagem de uma coluna capilar preparada pela técnica de empacotamento com partículas em suspensão.....	61
Figura 15 – Imagem do sistema destinado à cromatografia líquida capilar utilizado nesta etapa do trabalho. Componentes: (1) bomba seringa <i>home-made</i> de alta precisão, (2) válvula de injeção, (3) forno <i>home-made</i> de alta precisão, (4) controladora, (5) detector UV-VIS com cela capilar de 35 nL, (6) atuador elétrico e (7) sistema de controle e aquisição de dados.....	63
Figura 16 – Cromatogramas obtidos com as colunas capilares preparadas neste trabalho. Dimensão das colunas: 150 mm x 250 µm d.i. Fase estacionária: C ₁₈ (Kromasil - 3,5 µm).....	65
Figura 17 – Valores da altura reduzida do prato (h), fator de retenção (k), fator de separação (α) e resolução (R) para as diferentes colunas produzidas. (h e k: pico correspondente ao pireno; α e R: picos adjacentes dos compostos fenantreno e antraceno).....	74
Figura 18 – Gráficos de desempenho das colunas em função da composição da mistura empregada na suspensão das partículas de fase estacionária (<i>slurry</i>), do tempo e da pressão de empacotamento.....	76
Figura 19 – Influência da composição do <i>slurry</i> (proporção de THF) e da pressão de empacotamento sobre a eficiência (ou número de pratos) das colunas.....	77
Figura 20 – Influência do tempo e da pressão de empacotamento sobre a eficiência (ou número de pratos) das colunas.....	78
Figura 21 – Influência da composição do <i>slurry</i> (proporção de THF) e do tempo sobre a eficiência (ou número de pratos) das colunas.....	78
Figura 22 – Imagem do forno desenvolvido no Laboratório de Cromatografia para preparo de colunas capilares monolíticas.....	84
Figura 23 – Imagem do sistema cromatográfico utilizado com colunas capilares monolíticas.....	85
Figura 24 – Imagens (externa e de corte) de fases estacionárias monolíticas onde ocorreu a formação de lacunas na extensão da coluna (A) e trincas no leito monolítico (B).....	86

Figura 25 – Imagens obtidas por um microscópio eletrônico de varredura de uma coluna monolítica à base de sílica produzida no Laboratório de Cromatografia. Magnitude: 500 X (A) e 25.00 K X (B).....87

Figura 26 – Cromatogramas obtidos com a utilização de uma coluna empacotada e uma monolítica, produzidas em laboratório, em análises com fluxos distintos. Dimensão das colunas: 150 mm x 250 µm d.i. Ordem de eluição: uracila, naftaleno, fenantreno e antraceno.....88

Figura 27 – Forno desenvolvido no Laboratório de Cromatografia (IQSC-USP) para utilização em cromatografia líquida capilar com programação de temperatura.....99

Figura 28 – Representação da reação de hidrólise ocorrida em fases estacionárias octadeciladas à base de sílica.....101

Figura 29 - Representação estrutural das fases estacionárias à base de zircônia e titânia.....101

Figura 30 – Estrutura química das principais tetraciclina utilizadas como fármacos veterinários. Fonte: The Merck Index®.....105

Figura 31 - Cromatogramas mostrando o efeito da composição da fase móvel na separação de uma mistura padrão contendo 100 mg L⁻¹ de TCs. Coluna: C₁₈ - 150 mm x 250 µm. Volume de injeção: 60 nL. Eluição isotérmica a 3,0 µL min⁻¹ e detecção a 365 nm. (1) OTC; (2) TC; (3) CTC e (4) DC.....110

Figura 32 - Cromatogramas mostrando o efeito da temperatura na separação de uma mistura padrão contendo 100 mg L⁻¹ de TCs. Coluna: C₁₈ - 150 mm x 250 µm. Volume de injeção: 60 nL. Análises a 3,0 µL min⁻¹ e detecção a 365 nm. (1) OTC; (2) TC; (3) CTC e (4) DC.....111

Figura 33 - Cromatogramas comparativos obtidos em condições isotérmicas e com TP na análise de uma mistura padrão contendo 100 mg L⁻¹ de TCs. Fase móvel A: 10% metanol, 10% acetonitrila e 80% ácido oxálico (0,01 mol L⁻¹). Coluna: C₁₈ - 150 mm x 250 µm. Volume de injeção: 60 nL. Vazão a 3,0 µL min⁻¹ e detecção a 365 nm. (1) OTC; (2) TC; (3) CTC e (4) DC.....113

Figura 34 - Cromatogramas comparativos obtidos em condições isotérmicas e com TP na análise de uma mistura padrão contendo 100 mg L⁻¹ de TCs. Fase móvel B: 12,5% metanol, 12,5% acetonitrila e 75% ácido oxálico (0,01 mol L⁻¹). Coluna: C₁₈ - 150 mm x 250 µm. Volume de injeção: 60 nL. Vazão a 3,0 µL min⁻¹ e detecção a 365 nm. (1) OTC; (2) TC; (3) CTC e (4) DC.....114

Figura 35 - Cromatogramas obtidos durante a análise de TCs em plasma bovino por TP-cLC. Fase móvel A: 10% metanol, 10% acetonitrila e 80% ácido oxálico (0,01 mol L⁻¹). Coluna: C₁₈ - 150 mm x

250 μm . Volume de injeção: 60 nL. Análise isocrática a 3,0 $\mu\text{L min}^{-1}$ e detecção a 365 nm. Ordem de eluição: (1) OTC; (2) TC; (3) CTC e (4) DC.....116

Figura 36 - Cromatogramas obtidos durante a análise de TCs em plasma bovino por TP-cLC. Fase móvel B: 12,5% metanol, 12,5% acetonitrila e 75% ácido oxálico (0,01 mol L⁻¹). Coluna: C₁₈ - 150 mm x 250 μm . Volume de injeção: 60 nL. Análise isocrática a 3,0 $\mu\text{L min}^{-1}$ e detecção a 365 nm. Ordem de eluição: (1) OTC; (2) TC; (3) CTC e (4) DC.....117

Figura 37 – Estrutura química dos esteróides analisados neste trabalho por TP-cLC. Fonte: ChemINDEX.....119

Figura 38 - Cromatogramas mostrando o efeito da composição da fase móvel na separação de uma mistura padrão contendo 50 mg L⁻¹ de cada um dos esteróides analisados. Coluna: C₁₈ - 150 mm x 250 μm . Volume de injeção: 60 nL. Eluição isotérmica a 3,0 $\mu\text{L min}^{-1}$ e detecção a 234 nm.....122

Figura 39 - Cromatogramas mostrando o efeito da temperatura na separação de uma mistura padrão contendo 50 mg L⁻¹ de cada um dos esteróides analisados. Coluna: C₁₈ - 150 mm x 250 μm . Volume de injeção: 60 nL. Vazão a 3,0 $\mu\text{L min}^{-1}$ e detecção a 234 nm.....124

Figura 40 - Cromatogramas comparativos obtidos em condições isotérmicas e com TP na análise de uma mistura padrão contendo 50 mg L⁻¹ de esteróides. Coluna: C₁₈ - 150 mm x 250 μm . Volume de injeção: 60 nL. Vazão a 3,0 $\mu\text{L min}^{-1}$ e detecção a 234 nm.....126

Figura 41 – Esquema simplificado de um detector com comprimento de onda fixo.....134

Figura 42 – Esquema simplificado de um detector com arranjo de diodos.....136

Figura 43 – Esquema simplificado de um detector com comprimento de onda variável.....137

Figura 44 – Ilustração de colunas capilares utilizadas na detecção *in-column* (A) e *on-column* (B)..138

Figura 45 – Ilustração da geometria das diferentes celas empregadas em cLC/UV.....139

Figura 46 – Imagens obtidas de uma cela capilar comercial (LC Packings) após uso prolongado (A e B) e depois de ser realizada a limpeza do caminho ótico (C e D).....142

Figura 47 – Cromatogramas obtidos de análises consecutivas realizadas sob mesmas condições cromatográficas e com o uso de uma cela capilar comercial danificada.....143

Figura 48 – Ilustração parcial do projeto destinado ao desenvolvimento de células capilares. Bloco I: Peça suporte para encaixe da estrutura central da célula.....	146
Figura 49 – Ilustração parcial do projeto destinado ao desenvolvimento de células capilares. Bloco II: Primeiro componente da estrutura central da célula.....	147
Figura 50 – Ilustração parcial do projeto destinado ao desenvolvimento de células capilares. Bloco III: Segundo componente da estrutura central da célula.....	148
Figura 51 – Imagem das duas peças que compõem a estrutura central de uma das células de detecção desenvolvidas no laboratório de cromatografia.....	149
Figura 52 – Imagem da junção dos dois blocos constituintes da estrutura central que compõe a célula A.....	150
Figura 53 – Imagem do tubo de aço inox e da estrutura central presente na célula B.....	151
Figura 54 – Imagens obtidas durante a confecção do caminho ótico (A) e após o término deste procedimento (B).....	152
Figura 55 – Imagem comparativa entre as três células capilares utilizadas neste trabalho.....	153
Figura 56 – Imagem de uma das células de detecção desenvolvidas neste trabalho.....	154
Figura 57 – Cromatogramas obtidos utilizando as Células A, B e C. Volume das células: 35 nL. Fluxo: 3 $\mu\text{L min}^{-1}$. Volume de injeção: 60 nL. Ordem de eluição: (1) naftaleno, (2) fenantreno e (3) antraceno; Concentração dos analitos: 25 mg L^{-1}	156
Figura 58 - Cromatogramas obtidos com o uso de uma célula micro (Shimadzu) e uma célula capilar desenvolvida neste trabalho. Volume da célula micro: não especificado pelo fabricante. Volume da célula B: 35 nL. Fluxo: 3 $\mu\text{L min}^{-1}$. Volume de injeção: 60 nL. Ordem de eluição: (1) naftaleno, (2) fenantreno e (3) antraceno. Concentração dos analitos: 30 mg L^{-1}	161
Figura 59 - Cromatogramas obtidos com o uso de uma célula capilar comercial (LC Packings) e uma célula capilar desenvolvida neste trabalho. Volume das células: 35 nL. Fluxo: 3 $\mu\text{L min}^{-1}$. Volume de injeção: 60 nL. Ordem de eluição: (1) naftaleno, (2) fenantreno e (3) antraceno. Concentração dos analitos: 25 mg L^{-1}	164

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Sistema de classificação baseado no diâmetro interno das colunas utilizadas em cromatografia líquida.....	25
Tabela 2 - Classificação da cromatografia líquida de acordo com o diâmetro interno das colunas e o intervalo de fluxo da fase móvel.....	25
Tabela 3 – Condições utilizadas no planejamento fatorial (2^3) para preparo das colunas.....	62
Tabela 4 – Parâmetros obtidos do cromatograma gerado com a utilização da coluna 1.....	66
Tabela 5 – Parâmetros obtidos do cromatograma gerado com a utilização da coluna 2.....	67
Tabela 6 – Parâmetros obtidos do cromatograma gerado com a utilização da coluna 3.....	68
Tabela 7 – Parâmetros obtidos do cromatograma gerado com a utilização da coluna 4.....	69
Tabela 8 – Parâmetros obtidos do cromatograma gerado com a utilização da coluna 5.....	70
Tabela 9 – Parâmetros obtidos do cromatograma gerado com a utilização da coluna 6.....	71
Tabela 10 – Parâmetros obtidos do cromatograma gerado com a utilização da coluna 7.....	72
Tabela 11 - Parâmetros obtidos do cromatograma gerado com a utilização da coluna 8.....	73
Tabela 12 – Tempo de preenchimento das colunas com partículas de fase estacionária C ₁₈	80
Tabela 13 – Área e altura dos picos cromatográficos quando utilizadas celas com diferentes estruturas e caminho ótico similar.....	158
Tabela 14 - Parâmetros cromatográficos obtidos quando utilizadas diferentes celas de detecção com caminho ótico similar.....	159
Tabela 15 - Área e altura obtida dos picos cromatográficos quando utilizadas celas de detecção diferentes.....	162

Tabela 16 - Parâmetros cromatográficos obtidos quando utilizada nas análises uma cela micro comercial (Shimadzu) e a cela B.....163

Tabela 17 - Área e altura obtida dos picos cromatográficos quando utilizadas celas de detecção diferentes (cela capilar comercial e cela B).....166

Tabela 18 - Parâmetros cromatográficos obtidos quando utilizada uma cela de detecção capilar comercial e a cela B.....167

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACN	Acetonitrila
CE	Eletroforese capilar
cLC	Cromatografia líquida capilar
cLC/MS	Cromatografia líquida capilar com detecção por espectrometria de massas
cLC/UV	Cromatografia líquida capilar com detecção por absorção ultravioleta
CTC	Clortetraciclina
DC	Doxitetraciclina
d.e.	Diâmetro externo
d.i.	Diâmetro interno
ETMOS	Etiltrimetoxisilano
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FID	Detector por ionização em chama
GC	Cromatografia gasosa
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IPA	Álcool isopropílico
LC	Cromatografia líquida
MeOH	Metanol
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MS	Espectrometria de massas
MTES	Metiltrietoxisilano
NaOH	Hidróxido de sódio
ODS	Octadecil
OTC	Oxitetraciclina
PEEK	Poliéter éter cetona
PTFE	Politetrafluoretileno
RP	Fase reversa
SFC	Cromatografia com fluido supercrítico
SPE	Extração em fase sólida

TCs	Tetraciclina
TP	Programação de temperatura
TC	Tetraciclina
TEOS	Tetraetoxisilano
THF	Tetrahidrofurano
TMOS	Tetrametoxisilano
UV	Ultravioleta
UV-VIS	Ultravioleta-visível

Lista de Símbolos

t_r	Tempo de retenção
t_r'	Tempo de retenção ajustado
t_m	Tempo morto
w_b	Largura da base do pico
R	Resolução
N	Número de pratos
N_{ef}	Número de pratos efetivos
N/m	Número de pratos por metro
H	Altura do prato
k	Fator de retenção
α	Fator de separação
H	Altura equivalente a um prato
h	Altura reduzida do prato
A_s	Fator de assimetria
T	Fator de alargamento
L	Comprimento
u	Velocidade linear média
d_p	Diâmetro da partícula
η	Viscosidade
E_a	Energia de ativação
T	Temperatura
D_m	Coeficiente de difusão molecular
k_b	Constante de Boltzmann
r	Raio
ΔP	Queda de pressão
Φ	Resistência ao fluxo

Sumário

CAPÍTULO 1

Introdução geral.....	22
 1. Introdução.....	23
1.1. A miniaturização da coluna de LC.....	23
1.2. A classificação da cromatografia líquida.....	24
1.3. Vantagens relacionadas à miniaturização das colunas de LC.....	26
1.3.1. Menor consumo de fase móvel e estacionária.....	26
1.3.2. Menor quantidade de amostra.....	26
1.3.3. Diminuição do fluxo ótimo.....	27
1.3.4. Fácil acoplamento a diversos sistemas de detecção.....	27
1.3.5. Melhor permeabilidade das colunas.....	27
1.3.6. Aplicabilidade da programação de temperatura.....	28
1.3.7. Facilidade na manutenção das colunas.....	28
1.4. Instrumentação.....	29
1.5. Fundamentos teóricos em cromatografia líquida.....	32
1.5.1. Tempo de retenção.....	33
1.5.2. Resolução.....	33
1.5.3. Fator de retenção.....	34
1.5.4. Fator de separação.....	34
1.5.5. Número de pratos.....	34
1.5.6. Altura equivalente a um prato.....	35
1.5.7. Altura reduzida do prato.....	35
1.5.8. Fator de assimetria e de alargamento.....	36

CAPÍTULO 2

Desenvolvimento de colunas capilares para LC.....	38
1. Introdução.....	39
1.1. Colunas empacotadas.....	40
1.1.1. Empacotamento com partículas em suspensão.....	41
1.1.2. Empacotamento a seco.....	43
1.1.3. Empacotamento com fluido supercrítico.....	44
1.2. Colunas tubulares abertas.....	45
1.3. Colunas monolíticas.....	46
1.3.1. Histórico.....	47
1.3.2. Classificação das colunas monolíticas.....	48
1.3.3. Preparo das colunas capilares monolíticas.....	48
1.3.4. Aplicação das colunas monolíticas em cLC.....	55
2. Justificativa e objetivos.....	57
3. Desenvolvimento de colunas empacotadas.....	58
3.1. Procedimento experimental.....	58
3.1.1. Materiais e reagentes.....	58
3.1.2. Preparo das colunas capilares empacotadas.....	58
3.1.3. Condições de empacotamento.....	61
3.1.4. Sistema cromatográfico.....	63
3.2. Resultados e discussão.....	64
4. Desenvolvimento de colunas monolíticas.....	82
4.1. Procedimento experimental.....	82
4.1.1. Materiais e reagentes.....	82
4.1.2. Preparo das colunas capilares monolíticas.....	82
4.1.3. Sistema cromatográfico.....	85

4.2. Resultados e discussão.....	86
5. Conclusões.....	89

CAPÍTULO 3

Programação de temperatura em cLC.....90

1. Introdução.....	91
1.1. Histórico da programação de temperatura em cLC.....	92
1.2. Difusibilidade molecular.....	93
1.3. Influência da temperatura na pressão.....	94
1.4. Influência da temperatura na eficiência da coluna.....	95
1.5. Estabilidade térmica dos compostos.....	97
1.6. Aspectos instrumentais.....	98
1.6.1. Controle da temperatura.....	98
1.6.2. Detecção.....	99
1.6.3. Fases estacionárias destinadas à alta temperatura.....	100
2. Justificativa e objetivos.....	103
3. Análise de tetraciclinas.....	104
3.1. Procedimento experimental.....	106
3.1.1. Materiais e reagentes.....	106
3.1.2. Sistema cromatográfico.....	106
3.1.3. Preparo da coluna capilar.....	106
3.1.4. Preparo das soluções padrão e amostras.....	107
3.2. Resultados e discussão.....	109
3.2.1. Otimização da fase móvel.....	109
3.2.2. Efeito da temperatura.....	111
3.2.3. Programação de temperatura.....	112

3.2.4. Separação de tetraciclinas em plasma bovino.....	115
4. Análise de esteróides.....	118
4.1. Procedimento experimental.....	120
4.1.1. Materiais e reagentes.....	120
4.1.2. Sistema cromatográfico e coluna capilar.....	120
4.1.3. Preparo das soluções padrão.....	120
4.2. Resultados e discussão.....	121
4.2.1. Otimização da fase móvel.....	121
4.2.2. Efeito da temperatura.....	123
4.2.3. Programação de temperatura.....	125
5. Conclusões.....	128

CAPÍTULO 4

Desenvolvimento de celas capilares para detecção UV.....129

1. Introdução.....	130
1.1. Lei de Lambert-Beer.....	132
1.2. Detectores de absorção UV.....	133
1.2.1. Detector com comprimento de onda fixo.....	133
1.2.2. Detector com arranjo de diodos.....	135
1.2.3. Detector com comprimento de onda variável.....	136
1.3. Geometria das celas capilares.....	137
1.4. Volume da cela.....	140
1.5. Durabilidade das celas capilares.....	141
2. Justificativa e objetivos.....	144
3. Procedimento experimental.....	145
3.1. Materiais e reagentes.....	145

3.2. Projeto e desenvolvimento das celas capilares.....	145
3.3. Confeção do caminho ótico.....	151
3.4. Montagem das celas.....	154
4. Resultados e discussão.....	155
4.1. Comparação entre as celas desenvolvidas.....	155
4.2. Celas comerciais.....	161
4.2.1. Cella micro.....	161
4.2.2. Cella capilar.....	164
5. Conclusões.....	169

CAPÍTULO 5

Conclusões gerais.....	170
-------------------------------	------------

CAPÍTULO 6

Referências bibliográficas.....	172
--	------------

CAPÍTULO 1

Introdução geral

1. Introdução

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes ou substâncias integrantes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre a fase estacionária e a fase móvel. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em uma migração diferencial destes componentes¹.

A descoberta da cromatografia se deu em 1903, pelo botânico russo Mikhael S. Tswett, entretanto seu grande desenvolvimento ocorreu na década de 1950. Sua miniaturização teve início por volta de 1957, quando Marcel J. E. Golay introduziu o uso de colunas capilares na cromatografia gasosa (GC)².

O desenvolvimento da cromatografia líquida (LC) tem seguido a mesma direção da GC, porém os avanços relacionados à sua miniaturização foram bastante lentos nas últimas décadas. Todavia, em decorrência das diversas vantagens relacionadas ao uso de colunas com menor diâmetro interno, o interesse na miniaturização da LC revelou-se crescente nos últimos anos.

1.1. A miniaturização das colunas

A utilização de colunas miniaturizadas em LC teve início por volta de 1967, quando Horváth e colaboradores^{3,4} empregaram colunas de aço inox com diâmetro interno (d.i.) de 1 mm e comprimentos de até 2 metros para realizar o estudo da influência dos parâmetros operacionais na separação de ribonucleotídeos.

Em 1973, Ishii e colaboradores^{5,6} demonstraram o sucesso obtido na separação de hidrocarbonetos aromáticos polinucleares com o uso de uma coluna de politetrafluoretileno (PTFE) de 0,5 mm d.i. e 15 cm de comprimento.

Três anos mais tarde, Scott e Kucera^{7, 8} demonstraram a alta eficiência obtida em uma separação de alquibenzenos realizada com a utilização de uma coluna com 1 mm de d.i. e 10 m de comprimento. Tsuda e Novotny^{9,10} relataram, em 1978, o uso de colunas com 50-200 μm de d.i. em LC.

Um dos grandes avanços na tecnologia de colunas foi dado em 1981, quando Takeuchi e Ishii^{11,12} demonstraram pela primeira vez o uso de colunas capilares preparadas com tubos de sílica fundida em LC.

Presentemente, a utilização de tubos capilares de sílica fundida na confecção de colunas miniaturizadas para LC tem sido bastante explorada e isto se deve a algumas particularidades destes tubos como, por exemplo, sua transparência, alta resistência e boa condutividade térmica.

1.2. A classificação da cromatografia líquida

Atualmente, muitos sistemas podem ser encontrados na literatura para a classificação da LC¹³⁻¹⁵. A maioria destes sistemas considera apenas o diâmetro interno das colunas empregadas, contudo a diversidade de materiais usados na manufatura das colunas e o fluxo da fase móvel utilizado também têm sido considerados para a classificação da LC.

A Tabela 1 mostra o sistema adotado por Meyer¹⁶, onde a classificação da LC baseou-se unicamente no diâmetro interno das colunas cromatográficas.

Tabela 1 – Sistema de classificação baseado no diâmetro interno das colunas utilizadas em cromatografia líquida¹⁶.

Coluna	d.i. (mm)
Convencional	> 1
Microbore	1
Capilar	< 1

Chervet e colaboradores¹⁷ classificaram a LC de acordo com o diâmetro interno da coluna aliado ao fluxo da fase móvel (Tabela 2).

Tabela 2 - Classificação da cromatografia líquida de acordo com o diâmetro interno das colunas e o intervalo de fluxo da fase móvel¹⁷.

Diâmetro interno	Fluxo	Classificação
3,2 - 4,6 mm	0,5 - 2,0 mL min ⁻¹	HPLC convencional
1,5 - 3,2 mm	100 - 500 µL min ⁻¹	HPLC microbore
0,5 - 1,5 mm	10 - 100 µL min ⁻¹	Micro-LC
150 - 500 µm	1 - 10 µL min ⁻¹	LC capilar
10 - 150 µm	10 - 1000 nL min ⁻¹	Nano-LC

1.3. Vantagens relacionadas à miniaturização da LC

O crescente interesse pela utilização de colunas miniaturizadas em LC está relacionado às inúmeras vantagens que estas apresentam frente às colunas convencionais. Algumas destas vantagens serão apresentadas e brevemente discutidas a seguir.

1.3.1. Menor consumo de fase móvel e estacionária

A diminuição do diâmetro interno da coluna é acompanhada pela diminuição da quantidade de fase estacionária utilizada no preparo das colunas, tornando viável a utilização de fases estacionárias especiais ou com alto custo.

As colunas capilares geralmente são empregadas com fluxos de fase móvel entre $2\text{--}3\ \mu\text{L min}^{-1}$, enquanto as colunas convencionais empregam fluxos de $0,5\text{--}1,5\ \text{mL min}^{-1}$. Desta forma, a redução drástica do consumo de fase móvel em sistemas para cromatografia líquida capilar (cLC) possibilita o uso de solventes que apresentem maior toxicidade e custo elevado, assim como o uso de fases inflamáveis ou exóticas.

1.3.2. Menor quantidade de amostra

A pequena quantidade de fase estacionária presente nas colunas miniaturizadas faz com que a quantidade de amostra a ser injetada no sistema cromatográfico seja muito reduzida, para que não sobrecarregue a coluna. Isto pode ser considerado de grande importância quando a quantidade de amostra disponível

é bastante limitada para ser analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

1.3.3. Diminuição do fluxo ótimo

A redução do diâmetro interno faz com que a velocidade linear ótima das colunas capilares seja cerca de 2 a 3 vezes menor que a obtida com o uso de colunas convencionais. Desta maneira, fluxos bastante lentos de fase móvel podem ser utilizados com colunas capilares, podendo ocasionar considerável redução da pressão do sistema, tornando possível a utilização de colunas mais longas ou empacotadas com partículas menores de fase estacionária.

1.3.4. Fácil acoplamento a diversos sistemas de detecção

O baixo fluxo de fase móvel utilizado em sistemas para cLC possibilita seu acoplamento direto com diferentes sistemas de detecção, tais como o espectrômetro de massas (MS) e o detector por ionização em chama (FID).

1.3.5. Melhor permeabilidade das colunas

Devido ao diâmetro interno reduzido dos tubos empregados na confecção das colunas capilares, o processo de empacotamento das colunas e a obtenção de leitos cromatográficos bastante compactos tornam-se mais difíceis. Deste modo, uma coluna capilar irá apresentar uma menor densidade de partículas¹⁸ e, conseqüentemente, sua permeabilidade será maior que a apresentada por uma

coluna convencional. O uso de colunas mais permeáveis faz com que a queda de pressão no sistema cromatográfico seja menor, possibilitando o emprego de colunas longas ou constituídas por partículas menores, sendo estas mais eficientes do que as comumente utilizadas em LC convencional.

1.3.6. Aplicabilidade da programação de temperatura

A aplicação de temperatura é uma técnica bastante empregada em GC para reduzir o tempo das análises. Seu uso em LC convencional não se recomenda em decorrência do gradiente radial de temperatura gerado dentro das colunas. Este gradiente forma-se devido ao alto fluxo empregado, ao diâmetro interno relativamente grande das colunas e à sua alta capacidade térmica. O baixo fluxo de fase móvel e as particularidades das colunas miniaturizadas fazem com que a programação de temperatura seja viável em cLC.

1.3.7. Facilidade na manutenção das colunas

Ao contrário das colunas convencionais para LC, preparadas em tubos de aço inox, as colunas capilares têm sido produzidas em tubos de sílica fundida, com boa transparência, permitindo a inspeção visual do leito cromatográfico caso haja a suspeita da presença de espaços vazios.

A manutenção de uma coluna capilar é realizada de forma bastante prática quando sua entrada apresenta-se suja. Os tubos de sílica fundida permitem realizar com facilidade o corte de uma pequena porção de sua extremidade sem que ocorra perda significativa de desempenho.

1.4. Instrumentação

Na atualidade, a grande maioria dos equipamentos disponíveis comercialmente para a HPLC encontram-se totalmente automatizados. A instrumentação requerida para estes equipamentos pode ser considerada relativamente simples (Figura 1), sendo o sistema composto basicamente por uma bomba de alta pressão, válvula de injeção, coluna analítica, detector e um sistema de aquisição de dados.

Figura 1 – Componentes básicos de um sistema para cromatografia líquida de alta eficiência.

O uso de colunas miniaturizadas em sistemas cromatográficos exige que todas as partes do equipamento sejam dimensionadas de acordo com as

características da coluna analítica. A seguir, algumas considerações sobre as diferentes partes de um sistema para cLC serão brevemente expostas.

Sistema de bombeamento da fase móvel: a bomba utilizada em cLC deve ser capaz de operar com estabilidade na faixa de fluxo de apenas poucos μL por minuto. Atualmente, as bombas mais utilizadas para esta técnica são do tipo seringa e pistão recíprocante.

Tubulações e conexões: o uso de tubulações deve ser evitado pois pode provocar o alargamento da banda cromatográfica. Preferencialmente, a coluna capilar será ligada de forma direta ao injetor e ao detector. Contudo, inexistindo esta possibilidade, devem ser utilizadas tubulações com diâmetro interno super-reduzido. As conexões requerem o emprego de peças apropriadas (uniões ZDV – *zero dead volume*) para evitar volume morto.

Injetores: o volume de injeção da amostra em um sistema cromatográfico é proporcional ao quadrado do diâmetro interno da coluna. Para colunas capilares este volume é bastante pequeno, porém uma boa repetibilidade pode ser alcançada com o uso de uma válvula injetora apropriada, disponível comercialmente a diversos volumes.

Coluna analítica: assim como em LC convencional, as colunas empacotadas são as mais utilizadas atualmente por apresentarem grande eficiência cromatográfica. O uso de colunas monolíticas em cLC apresenta como grande vantagem a possibilidade de reduzir bastante o tempo das análises, contudo a

eficiência alcançada com estas colunas ainda tem se mostrado inferior à apresentada com o uso de colunas empacotadas.

Detectores: dentre os comercialmente disponíveis, os detectores de massas e fluorescência podem ser considerados os mais adequados para a cLC. Os detectores de massas têm conquistado destaque nos últimos anos por apresentarem boa sensibilidade e permitirem acoplamento com o sistema cromatográfico de forma simples, uma vez que a vazão de saída do eluente da coluna é compatível com as condições em que operam. Contudo, devido ao custo ainda ser considerado relativamente alto, alguns grupos de pesquisa instrumental vêm buscando alternativas para a utilização de detectores mais simples e de baixo custo. Os detectores baseados na fluorescência dos compostos apresentam como principal vantagem a alta sensibilidade proporcionada, porém seu uso limita-se somente a compostos que fluoresçam ou sejam passíveis de derivatização com tais grupos.

Embora não sejam os mais apropriados para uso em sistemas miniaturizados, o custo relativamente baixo e a versatilidade dos detectores UV, em especial os possuidores de rede com arranjo de diodos, fazem com que constituam opção bastante atrativa. Contudo, quando tais detectores são utilizados em cLC, o volume da cela de detecção deve ser bastante reduzido para que o alargamento de banda não seja crítico nesta região do sistema.

Sistema de aquisição de dados: os sistemas desenvolvidos para adquirir dados em HPLC têm sido comumente empregados em cLC. Contudo os sistemas convencionais de aquisição de dados não podem ser considerados apropriados a cLC, uma vez que os picos eluídos de uma coluna capilar tentem a ser mais

estreitos que os provenientes de colunas para HPLC. Desta maneira, um sistema adequado para aquisição de dados em cLC deve ser capaz de aumentar a frequência de aquisição do sinal analítico na mesma razão da redução da largura do pico cromatográfico¹⁹.

1.5. Fundamentos teóricos em cromatografia líquida

Em um sistema cromatográfico, os compostos eluídos da coluna analítica serão monitorados por um detector e registrados como curvas Gaussianas. O registro completo de todos os analitos presentes em uma amostra é denominado cromatograma.

As equações fundamentais da cromatografia líquida são definidas a partir dos parâmetros obtidos de um cromatograma (Figura 2).

Figura 2 - Cromatograma ilustrando os vários parâmetros obtidos em uma análise típica²⁰.

A determinação de alguns parâmetros cromatográficos tem sido comumente empregada para avaliar e comparar o desempenho, ou eficiência, das colunas desenvolvidas para LC.

1.5.1. Tempo de retenção

O tempo de retenção (t_r) pode ser definido como o tempo transcorrido desde a injeção da amostra no sistema até a obtenção da altura máxima de um pico. É necessário, todavia, considerar que um analito leva um determinado tempo (conhecido como *tempo morto*) para percorrer a tubulação do sistema, desde a injeção até sua chegada ao detector, ainda que não retido pela coluna.

Para uma avaliação mais precisa de uma coluna, um analito não retido (ou pouco retido) deve ser adicionado à amostra para que seja determinado o tempo morto (t_m). Assim sendo, o tempo de retenção ajustado (t_r') de um composto retido pela coluna pode ser calculado através da equação

$$t_r' = t_r - t_m \quad \text{Equação 1}$$

1.5.2. Resolução

A resolução (R) é uma medida quantitativa que expressa a capacidade de separação de dois picos consecutivos em uma coluna.

$$R = \frac{2\Delta t_{r(1,2)}}{w_{b1} + w_{b2}} \quad \text{Equação 2}$$

onde w_{b1} e w_{b2} são as larguras encontradas para as bases dos picos cromatográficos.

1.5.3. Fator de retenção

O fator de retenção (k) estabelece a relação entre o tempo em que um composto passa na fase estacionária e na fase móvel.

$$k = \frac{t_r'}{t_m}$$

Equação 3

1.5.4. Fator de separação

O fator de separação (α) expressa a relação existente entre a retenção de dois picos consecutivos, sendo descrito através da equação

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{r2}'}{t_{r1}'}$$

Equação 4

1.5.5. Número de pratos

A eficiência de uma coluna cromatográfica pode ser expressa através da determinação do número de pratos (N) gerados. O número de pratos relaciona-se com o tempo de retenção de uma analito (t_r) e a largura da base do pico (w_b) conforme a equação

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{w_b} \right)^2$$

Equação 5

Para uma coluna com grande eficiência, o valor de N é bastante alto em decorrência da grande retenção de um analito e/ou a pequena largura do pico cromatográfico. Quando se emprega o tempo de retenção ajustado (t_r') para calcular o número de pratos (Equação 5), o valor obtido e que expressa a eficiência da coluna é então conhecido como número de pratos efetivos (N_{ef}).

1.5.6. Altura equivalente a um prato

Uma vez que o valor do número de pratos depende da extensão da coluna cromatográfica, a determinação da altura equivalente a um prato (H) irá permitir uma melhor comparação entre a eficiência de colunas com comprimentos distintos. Obtém-se a altura equivalente a um prato pela equação

$$H = \frac{L}{N} \quad \text{Equação 6}$$

sendo L o comprimento da coluna cromatográfica.

1.5.7. Altura reduzida do prato

A forma mais adequada para avaliar o desempenho cromatográfico de uma coluna é através da determinação de parâmetros adimensionais ou reduzidos. Entre estes parâmetros, a altura reduzida do prato (h) tem sido bastante utilizada por permitir que colunas com diferentes características (curtas ou longas, convencionais

ou capilares, com partículas grandes ou pequenas, etc) sejam facilmente comparadas.

Define-se a altura reduzida do prato (h) como

$$h = \frac{H}{d_p} \quad \text{Equação 7}$$

onde H é a altura equivalente a um prato e d_p o diâmetro da partícula.

1.5.8. Fator de assimetria e de alargamento

Os fatores de assimetria (A_s) e de alargamento (T) medem a simetria e as distorções frontais ou posteriores (caudas) de um pico. Estas medidas têm sido comumente determinadas para verificar a qualidade de uma coluna cromatográfica²¹.

A Figura 3 ilustra um pico cromatográfico onde pode ser observada a presença de cauda.

Figura 3 – Ilustração de um pico cromatográfico onde ocorre o aparecimento de cauda²².

O fator de assimetria (A_s) pode ser calculado a 5 ou 10% da altura do pico, enquanto o fator de alargamento (T) é geralmente calculado a 5% da altura do mesmo²². As equações utilizadas para determinar tais fatores são

$$A_s = \frac{b}{a}$$

Equação 8

$$T = \frac{a+b}{2a}$$

Equação 9

onde os valores de a e b são obtidos conforme mostrado na Figura 3.

CAPÍTULO 2

Desenvolvimento de colunas capilares para LC

1. Introdução

Atualmente, encontra-se disponível comercialmente uma considerável variedade de colunas destinadas à cromatografia líquida. Porém a possibilidade de preparar colunas com desempenho satisfatório em laboratório e a necessidade do aprimoramento das técnicas e metodologias de preparo, assim como o desenvolvimento de novas fases estacionárias, tem despertado grande interesse nos grupos de pesquisas instrumentais da área.

As colunas disponíveis para LC podem ser classificadas em três categorias, de acordo com o formato e a disposição da fase estacionária ao longo do tubo: colunas empacotadas, tubulares abertas e monolíticas. As colunas empacotadas são aquelas em que a fase estacionária apresenta-se na forma de micropartículas dispostas de modo a preencher toda a extensão da coluna cromatográfica. Nas colunas tubulares abertas, a fase estacionária mostra-se como uma fina camada de filme que recobre toda a superfície interna do tubo. Estas colunas têm sido bastante utilizadas em GC, contudo oferecem grande limitação para HPLC convencional e cLC, sendo seu uso praticamente restrito a nano-LC. As colunas monolíticas apresentam a fase estacionária como um meio contínuo e altamente poroso de separação, preenchendo toda a extensão do tubo. A possibilidade de produzir colunas com diversos tamanhos, sem que haja limitação quanto ao diâmetro interno do tubo, torna indicada a utilização destas colunas tanto em sistemas convencionais (HPLC) como em miniaturizados.

A Figura 4 ilustra o formato e a disposição da fase estacionária nas diferentes colunas disponíveis para LC.

Figura 4 - Ilustração apresentando os três tipos de colunas utilizadas em cromatografia líquida.

A seguir serão brevemente apresentadas algumas particularidades das colunas empregadas em LC, incluindo as principais técnicas de preparo de colunas capilares para cLC. Uma abordagem mais ampla será dada às fases estacionárias monolíticas, em decorrência de seu inicial estágio de desenvolvimento.

1.1. Colunas empacotadas

As colunas empacotadas, conhecidas também como particuladas ou recheadas, têm sido as mais amplamente empregadas nos diferentes sistemas cromatográficos. Para utilização em cLC, podem ser produzidas em tubos capilares de sílica fundida, aço inox e poliéter éter cetona (PEEK), sendo estes revestidos ou não, internamente, por sílica fundida.

Dentre as técnicas desenvolvidas para o preparo de colunas, a mais utilizada atualmente, tanto no preparo de colunas convencionais como capilares, consiste no empacotamento com partículas em suspensão²³⁻²⁶. Contudo outras técnicas de

empacotamento, incluindo o empacotamento a seco²⁷ e o empacotamento com fluido supercrítico²⁸⁻³¹, têm sido estudadas no intuito de obter colunas miniaturizadas com maior eficiência.

1.1.1. Empacotamento com partículas em suspensão

Na técnica de empacotamento com partículas em suspensão as partículas de fase estacionária são imersas em um solvente, de modo a formar uma suspensão. Esta é introduzida em um reservatório, ligado em uma de suas extremidades ao tubo que dará origem a coluna. A outra extremidade do reservatório conecta-se a uma bomba de alta pressão contendo um solvente apropriado, que é então purgado para promover o preenchimento da coluna cromatográfica.

Quando possível, um banho de ultrassom deve ser aplicado à coluna durante o processo de empacotamento para desagregar possíveis aglomerados de partículas porosas que possam comprometer a eficiência cromatográfica.

A instrumentação necessária para que seja feita a montagem de um sistema para empacotamento com partículas em suspensão é relativamente simples, sendo comumente empregada uma bomba amplificadora pneumática ou uma bomba de HPLC para impulsionar o solvente de empacotamento através das tubulações²¹.

A Figura 5 mostra um esquema simplificado de um sistema de empacotamento com partículas em suspensão.

Figura 5 – Esquema simplificado de um sistema de empacotamento com partículas em suspensão destinado ao preparo de colunas capilares. (a) cilindro de gás, (b) reservatório do solvente de empacotamento, (c) bomba amplificadora pneumática, (d) válvulas, (e) conexão em T, (f) reservatório de partículas em suspensão, (g) tubo capilar e (h) restritor (tubo de sílica fundida).

No preparo de colunas através desta técnica, as principais condições experimentais a serem consideradas para a obtenção de colunas com eficiência satisfatória são:

Escolha do solvente: O solvente (ou mistura de solventes) deve ser apropriadamente escolhido a fim de obter uma densidade aproximadamente igual à densidade das partículas de fase estacionária, para que estas permaneçam em suspensão durante todo o processo de empacotamento. O uso de solventes mais viscosos para suspender as partículas por períodos mais longos trará maior resistência ao fluxo, exigindo que seja utilizada uma pressão mais alta durante o processo de preenchimento da coluna³².

Pressão de empacotamento: A pressão ideal para o empacotamento é aquela que permitirá a compactação do leito cromatográfico de maneira mais homogênea possível, evitando a presença de microespaços livres dentro da coluna. Geralmente pressões bastante elevadas são utilizadas durante o processo de preparo das colunas³².

Tempo de empacotamento: O processo de empacotamento deve durar não somente o tempo necessário para a fase estacionária preencher toda a extensão da coluna, mas também considerar o tempo que as partículas levam para se acomodarem de forma homogênea no leito cromatográfico. Geralmente, o preenchimento da coluna leva poucos minutos, porém o processo pode se estender por horas quando se deseja obter colunas com alto desempenho cromatográfico.

1.1.2. Empacotamento a seco

Comparada às demais técnicas, o empacotamento a seco apresenta como principal vantagem a utilização de uma aparelhagem bastante simples e de baixo custo. Esta técnica, no entanto, tem apresentado limitações quanto ao diâmetro das partículas de fase estacionária utilizadas, visto que partículas de diâmetros muito pequenos apresentam tendência a se aglomerarem.

Durante o empacotamento a seco, as partículas de fase estacionária são empurradas para dentro da coluna com o auxílio de um gás. O uso de pressões muito altas deve ser evitado para que as partículas não se quebrem durante o processo de empacotamento³².

A Figura 6 mostra um esquema simplificado de um sistema de empacotamento a seco utilizado no preparo de colunas capilares.

Figura 6 – Esquema simplificado de um sistema para preparo de colunas capilares pela técnica de empacotamento a seco. (a) cilindro de gás, (b) válvula, (c) conexão em T, (d) reservatório das partículas de fase estacionária, (e) tubo capilar e (f) restritor (tubo de sílica fundida).

1.1.3. Empacotamento com fluido supercrítico

Esta técnica de empacotamento combina as vantagens do empacotamento com partículas em suspensão e do empacotamento a seco, uma vez que o fluido supercrítico apresenta propriedades intermediárias entre os líquidos e os gases. A baixa viscosidade e o alto poder de difusão do fluido supercrítico podem permitir uma maior movimentação das partículas durante o empacotamento e, conseqüentemente, a obtenção de colunas capilares com maior eficiência em decorrência da homogeneidade do leito cromatográfico³².

A Figura 7 mostra um esquema de um sistema para empacotamento de colunas capilares com fluido supercrítico.

Figura 7 – Esquema simplificado de um sistema de empacotamento de colunas capilares com fluido supercrítico. (a) cilindro de gás, (b) sistema de resfriamento, (c) bomba seringa de alta pressão, (d) medidor de pressão, (e) válvula, (f) banho de ultrassom, (g) reservatório da fase estacionária, (h) tubo capilar, (i) restritor (tubo de sílica fundida).

O dióxido de carbono supercrítico tem sido utilizado como principal veículo de empacotamento por apresentar temperatura e pressão críticas confortáveis.

1.2. Colunas tubulares abertas

O uso de colunas tubulares abertas em LC foi sugerido pela primeira vez em 1966, por Pretorius e Smuts³³. O baixo poder de difusão dos analitos no líquido, quando comparado aos gases, fez com que inicialmente se cogitasse a utilização de

fluxos turbulentos neste tipo de análise. Knox e Gilbert³⁴ determinaram que as colunas tubulares abertas deveriam ser produzidas com diâmetros internos iguais ou inferiores a 10 μm para que elas pudessem competir com as colunas empacotadas. As dificuldades em se trabalhar com colunas de tais dimensões motivaram alguns pesquisadores a utilizarem colunas com d.i. um pouco maiores (50 μm), porém empregando temperaturas mais elevadas para que a viscosidade da fase móvel fosse diminuída e o poder de difusão dos analitos, aumentado^{35, 36}.

A utilização de colunas tubulares abertas em LC não tem sido amplamente explorada devido à falta de sensibilidade da técnica e à indisponibilidade de equipamentos comerciais que atendam suas exigências (injetores com baixo volume de amostra, bombas com nano fluxos precisos, etc). Com relação às colunas, o fator limitante consiste na dificuldade em se obter uma boa imobilização de uma camada uniforme de fase estacionária, sobre a superfície interna do tubo capilar, com alta capacidade de amostra. Embora atualmente não exista um detector universal apropriado para a técnica, o uso de detectores de fluorescência e o aumento da espessura do filme (fase estacionária) podem ser vistos como boas opções para contornar ou minimizar estes problemas.

1.3. Colunas monolíticas

As colunas monolíticas têm despertado grande interesse nos últimos anos devido à possibilidade de serem realizadas separações bastante rápidas, uma vez que a estrutura altamente permeável deste tipo de leito cromatográfico oferece menor resistência à fase móvel, viabilizando a utilização de fluxos consideravelmente altos durante as análises.

1.3.1. Histórico

O uso de fases monolíticas em cromatografia teve início na década de 70, quando Ross e Jefferson³⁷ utilizaram esponjas de poliuretana como fase estacionária para cromatografia gasosa e HPLC. Na época, este tipo de fase não despertou muito interesse devido à sua excessiva dilatação e amolecimento na presença de alguns solventes orgânicos. No final da década de 80, o interesse ressurgiu quando Hjertén e Liao³⁸ empregaram com êxito gel de poli(acrilamida) comprimido como fase estacionária contínua em separações de proteínas por HPLC.

O início do grande desenvolvimento da tecnologia de colunas monolíticas se deu em 1992, quando Svec e Fréchet³⁹ introduziram uma nova classe de meios contínuos de separação, baseada em monolitos poliméricos macroporosos.

Empregando o processo sol-gel, Minakuchi e colaboradores⁴⁰ prepararam monolitos de sílica derivatizada com grupos octadecil como fase estacionária para HPLC. Em 1998, Asiaie e colaboradores⁴¹ publicaram uma abordagem sobre colunas capilares de sílica fundida empacotadas com partículas octadeciladas, onde, através de tratamento térmico, foi formado o leito monolítico. Neste mesmo ano, Dulay e colaboradores⁴² publicaram um trabalho envolvendo o preparo de colunas monolíticas de sílica, destinadas a cLC, através da incorporação de partículas de ODS a uma solução sol-gel.

As fases monolíticas tornaram-se populares em 2000, com o lançamento de colunas monolíticas à base de sílica pela Merck. Atualmente, colunas monolíticas capilares e convencionais à base de sílica e polímeros orgânicos encontram-se disponíveis comercialmente.

1.3.2. Classificação das colunas monolíticas

Dependendo da natureza do material monolítico, as colunas classificam-se em duas categorias: colunas monolíticas à base de polímeros orgânicos e colunas monolíticas à base de sílica. O preparo de colunas monolíticas poliméricas orgânicas pode ser feito com diversos monômeros, tais como acrilamidas, acrilatos, metacrilatos, estireno, norborneno, entre outros, podendo também admitir a mistura de alguns monômeros como o estireno e o divinil benzeno. Do mesmo modo, no preparo de colunas monolíticas à base de sílica, uma variedade de precursores pode ser usada, como TMOS (tetrametoxisilano), TEOS (tetraetoxisilano), MTES (metiltrietoxisilano), ETMOS (etiltrimetoxisilano), entre outros, possibilitando também a mistura de dois ou mais precursores.

A grande vantagem apresentada pelas colunas monolíticas poliméricas orgânicas, quando comparadas às de sílica, consiste na boa estabilidade química em faixas extremas de pH.

1.3.3. Preparo de colunas capilares monolíticas

O preparo de colunas capilares monolíticas realiza-se basicamente através de três métodos:

- A) Polimerização de monômeros orgânicos,
- B) Formação de uma rede de sílica pelo método sol-gel,
- C) Imobilização de leitos particulados.

Dentre estes métodos, os dois primeiros têm sido mais utilizados. A imobilização das partículas pode ser feita visando tanto o preparo de colunas capilares “semimonolíticas” como também a confecção de *frits*⁴³⁻⁴⁵, utilizados para reter as partículas de fase estacionária dentro das colunas durante e após o empacotamento das mesmas.

Independente do método de preparo, o tubo capilar de sílica fundida deve ser previamente tratado (frequentemente pela passagem de uma base forte em seu interior) para aumentar a densidade de grupos silanóis, que servirão de âncora para o monolito aderir à superfície interna da coluna.

A) Polimerização de monômeros orgânicos

De um modo geral, o preparo de diferentes fases poliméricas orgânicas é fundamentalmente o mesmo, sendo feito através de polimerização *in situ*. Introduz-se uma mistura constituída por monômeros, agente de intercrossamento, iniciador e agente porogênico dentro de um tubo capilar de sílica fundida pré-tratado, fechando as extremidades do tubo após o preenchimento. Após o processo de polimerização, o material utilizado para fechamento da coluna é substituído por conexões e a coluna monolítica é ligada a uma bomba cromatográfica, onde um solvente apropriado é bombeado para remoção de resíduos. A derivatização (ou funcionalização) pode ser feita pela modificação dos grupos reativos da superfície do monolito, utilizando reagentes específicos, que serão introduzidos dentro da coluna após a etapa de preparo, ou pela adição de um monômero funcional na mistura inicial de polimerização.

A Figura 8 mostra um esquema de realização do preparo das colunas capilares poliméricas orgânicas.

Figura 8 - Representação esquemática das etapas de preparo de colunas capilares monolíticas poliméricas orgânicas.

Vários artigos de revisão envolvendo o preparo e aplicação de colunas monolíticas poliméricas em HPLC e cLC têm sido publicados nos últimos anos⁴⁶⁻⁴⁹. Jandera e colaboradores⁵⁰ publicaram um artigo descrevendo o preparo de colunas capilares monolíticas à base de metacrilato e sua utilização em separações rápidas de proteínas. Colunas monolíticas de poliestireno-divinilbenzeno foram preparadas por Huang e colaboradores⁵¹ e utilizadas para analisar peptídeos por cLC/MS.

B) Formação de uma rede de sílica pelo método sol-gel

Dentre os reagentes empregados no preparo dos leitos monolíticos, a quantidade de agente porogênico tem sido destacada por afetar sensivelmente as características estruturais do monolito. A utilização de uma quantidade maior deste reagente implica a formação de um maior número de poros no monolito, porém isto resulta na diminuição do tamanho destes poros, fazendo com que as colunas tornem-se menos permeáveis.

A síntese de colunas monolíticas capilares à base de sílica pelo método sol-gel inicia-se com o preparo da solução sol: mistura contendo precursores, agente porogênico, água e um catalisador, podendo este ser ácido ou básico. A solução sol deve ser constantemente agitada por algum tempo, sob baixa temperatura, para que se torne homogênea, sendo então introduzida dentro de um tubo capilar de sílica fundida, onde, através de reações de hidrólise e policondensação, o material será convertido a gel.

Para que ocorra cura (ou envelhecimento) do monolito, a coluna deve ser mantida em repouso por algum tempo, sendo posteriormente feita sua lavagem para remoção de resíduos. A funcionalização ou derivatização da coluna para o modo cromatográfico de interesse realiza-se com a utilização de reagentes apropriados.

Um esquema representativo do procedimento de preparo deste tipo de coluna e das etapas onde o tratamento térmico pode ser realizado é mostrado na Figura 9.

Figura 9 - Representação esquemática do preparo de colunas monolíticas capilares à base de sílica pelo método sol - gel.

Diversos trabalhos descrevendo a síntese de monolitos à base de sílica, através do método sol-gel, podem ser encontrados na literatura⁵²⁻⁵⁵. Um estudo sobre as propriedades estruturais de colunas capilares monolíticas de sílica foi realizado por Motokawa e colaboradores⁵⁶. Através de alterações na quantidade de agente porogênico e utilizando tanto precursores isolados como misturados, os autores obtiveram colunas com diferentes características, efetuando estudo sobre a influência da estrutura do monolito (tamanho da rede de sílica e dos poros) na eficiência cromatográfica.

O preparo de colunas capilares de sílica em fase reversa, sob diferentes condições, e um estudo sobre as propriedades cromatográficas destas colunas na análise de compostos polares e apolares foi investigado por Kobayashi e colaboradores⁵⁷.

C) Imobilização de leitos particulados

A principal vantagem dos métodos de imobilização de leitos particulados consiste na inexistência de necessidade da etapa de derivatização, uma vez que as partículas introduzidas no capilar no processo de empacotamento normalmente já se encontram funcionalizadas.

- **Sinterização**

O processo de sinterização, realizado através do aquecimento de leitos particulados, faz com que as partículas de fase estacionária permaneçam aderidas umas às outras e à superfície do capilar. Este processo pode ser realizado utilizando um forno com boa precisão ou através da passagem de uma bobina aquecida ao longo da coluna, conforme mostrado na Figura 10.

Figura 10 - Etapas da imobilização térmica de leitos particulados para o preparo de colunas capilares semimonolíticas.

Adam e colaboradores⁵⁸ publicaram um trabalho onde algumas colunas empacotadas, através das técnicas de empacotamento com partículas em suspensão e fluido supercrítico, tiveram seu leito cromatográfico imobilizado, originando leitos “semimonolíticos”.

- **Método sol-gel**

A imobilização de leitos particulados pelo método sol-gel realiza-se pela introdução de uma solução sol em uma coluna previamente empacotada. O capilar é selado nas extremidades e mantido em repouso para que ocorram reações de hidrólise e policondensação, convertendo a solução sol a gel.

A Figura 11 mostra uma representação esquemática das etapas envolvidas no preparo de colunas “semimonolíticas” pelo processo sol-gel.

Figura 11 - Representação esquemática das etapas de preparo de colunas monolíticas capilares de sílica, utilizando o processo sol-gel para converter leitos particulados a semimonolíticos.

O preparo de colunas capilares “semimonolíticas” e a avaliação de seu desempenho em análises de compostos aromáticos e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos foi reportado por Tang e colaboradores⁵⁹. Utilizou-se a técnica de empacotamento com fluido supercrítico para introduzir partículas octadeciladas no interior dos capilares. Após o preparo das colunas particuladas, uma solução sol contendo TMOS e ETMOS foi usada para promover a imobilização do leito particulado.

3.3.4. Aplicações de colunas monolíticas em cLC

Nos últimos anos, um grande número de trabalhos relacionados à aplicação de colunas monolíticas em cromatografia líquida (cLC e HPLC) e eletrocromatografia foi publicado^{46-48, 60-62}. Dentre as inúmeras aplicações possíveis, algumas têm se destacado, como as análises de drogas e metabólitos, aditivos em alimentos, amostras biológicas e separações enantioméricas.

A separação e determinação rápida de diversos peptídeos e proteínas utilizando colunas capilares monolíticas foi possível devido ao uso de altas vazões de fase móvel^{63,64}. Lee e colaboradores⁶⁵, empregando colunas monolíticas capilares preparadas por copolimerização de diferentes monômeros acrílicos, conseguiram separar quatro proteínas em menos de 40 segundos, obtendo alta reprodutibilidade nas corridas cromatográficas.

O preparo de colunas monolíticas capilares à base de sílica, destinadas a promover separações enantioméricas, foi relatado por Hobo e colaboradores⁶⁶. A funcionalização dos monolitos com seletos quirais como a L-fenilalaninamida e L-

prolinamida tornou possível a separação de aminoácidos dansilados e hidroxíácidos por cLC.

As separações enantioseletivas também podem ser feitas utilizando colunas monolíticas com impressão molecular^{67,68}. O modo de preparo destas fases é similar ao empregado para as demais colunas monolíticas, exceto pela inserção de uma molécula modelo junto à mistura inicial de polimerização. Após o preparo destas colunas, extrai-se a molécula com o uso de um solvente apropriado, deixando sua impressão molecular na matriz monolítica.

Algumas condições cromatográficas como, por exemplo, a temperatura da coluna e o pH das fase móvel, ainda são limitadas com relação aos suportes de sílica. Como alternativa, alguns óxidos metálicos (ZnO_2 , TiO_2 , Al_2O_3 , HfO_2) têm sido utilizados no preparo de fases estacionárias⁶⁹⁻⁷².

2. Justificativa e objetivos

As técnicas cromatográficas, aliadas a diferentes modos de detecção, têm sido amplamente utilizadas para promover a separação, determinação e quantificação de compostos presentes em uma grande diversidade de amostras. A eficiência destas separações está intimamente ligada às propriedades das colunas analíticas, disponíveis comercialmente em vários tamanhos e diferentes materiais. Contudo a possibilidade de preparo de colunas com desempenho satisfatório em laboratório representa alternativa bastante atraente, visto que minimiza custos instrumentais. Esta etapa do trabalho tem como objetivo preparar colunas empacotadas e monolíticas para uso em cromatografia líquida capilar.

3. Desenvolvimento de colunas empacotadas

3.1. Procedimento experimental

3.1.1. Materiais e reagentes

As partículas de fase estacionária (C₁₈ - Kromasil) utilizadas para o preparo das colunas apresentavam 3,5 µm de diâmetro e foram obtidas da Eka Chemicals. Tubos capilares de sílica fundida com 520, 250 e 50 µm de diâmetro interno (d.i.) foram adquiridos da Polymicro Technologies Inc. e MicroQuartz. Filtros de fibra de vidro foram obtidos da Whatman. Tetrahidrofurano (THF 99%) foi obtido da Sigma-Aldrich e álcool isopropílico (IPA) foi adquirido da Qhemis. Acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH) grau HPLC foram adquiridos da J. T. Baker. Os padrões analíticos de naftaleno, fenantreno, antraceno e pireno foram cedidos pela Supelco. A uracila, utilizada como marcador de tempo morto em todas as análises cromatográficas, foi obtida da Sigma. Água com alta pureza foi procedente de um sistema de purificação Elga.

3.1.2. Preparo de colunas capilares empacotadas

O processo de preparo das colunas capilares iniciou-se pela confecção das estruturas que darão origem ao corpo das colunas. Para todas as colunas preparadas, um tubo capilar de sílica fundida com 250 µm de d.i. foi cortado com comprimento de 15,5 cm. Em uma das extremidades do tubo, introduziu-se um filtro de fibra de vidro com a finalidade de servir como *frit*, mantendo as partículas de fase

estacionária dentro do tubo durante e após o processo de empacotamento. A fibra de vidro foi posteriormente posicionada a 0,5 cm da extremidade do tubo através da inserção de um capilar restritor (50 μm de d.i. e 15 cm) que dá suporte ao *frit* e, ao mesmo tempo, permite que a saída da coluna seja conectada à entrada do detector. Fixou-se este conjunto com resina epóxi de secagem rápida. Para dar maior resistência às colunas, a região de junção entre os capilares foi recoberta por um tubo com 520 μm de d.i., do mesmo material, sendo este posteriormente preenchido com resina epóxi de secagem prolongada.

A Figura 12 ilustra a estrutura dos tubos preparados para a confecção das colunas.

Figura 12 – Esquema de um tubo preparado para a confecção de coluna capilar empacotada.

O sistema de empacotamento com partículas em suspensão foi montado de forma bem simples. Ligou-se uma bomba recíprocante modelo LC-20AD (Shimadzu)

a uma tubulação que se encontrava acoplada à entrada de um reservatório de aço inox, onde uma suspensão contendo 8,0 mg de fase estacionária (C_{18}) foi introduzida. Na parte inferior do reservatório, um dos tubos capilares previamente preparados havia sido conectado de forma que, durante o processo de empacotamento, o solvente contido na bomba (metanol) fosse passado através do sistema, empurrando a suspensão de partículas para dentro da coluna.

A Figura 13 mostra uma imagem obtida das tubulações, conexões e do reservatório utilizado durante o processo de empacotamento.

Figura 13 – Imagem das tubulações, conexões e reservatório utilizados no preparo de colunas capilares empacotadas.

Após o processo de preenchimento do tubo capilar, o sistema foi desligado e a coluna mantida conectada a este durante 1 hora para que ocorra sua despressurização. Terminada a despressurização, a coluna foi conectada a uma união com volume reduzido (Upchurch Scientific), sendo esta ligada a um tubo restritor (50 μm de d.i.) que permite seu acoplamento à válvula de injeção do sistema cromatográfico.

A Figura 14 mostra uma das colunas capilares produzidas neste trabalho.

Figura 14 – Imagem de uma coluna capilar preparada pela técnica de empacotamento com partículas em suspensão.

Quando uma coluna é desconectada do sistema de empacotamento antes do tempo necessário à sua despressurização, as partículas de fase estacionária podem ser deslocadas para fora do tubo devido à diferença de pressão entre o ambiente e o interior da coluna.

3.1.3. Condições de empacotamento

No desenvolvimento deste trabalho quase uma centena de colunas capilares foram produzidas. Ao longo dos anos, efetuaram-se muitas modificações no sistema cromatográfico, de forma que uma comparação para avaliar o desempenho de todas estas colunas produzidas seria impraticável. Tendo observado durante anos o

comportamento das colunas produzidas sob diversas condições experimentais, optou-se pela aplicação de um planejamento fatorial que permitisse a realização de poucos ensaios, onde as colunas produzidas seriam então testadas em um sistema cromatográfico mantido inalterado.

As variáveis estudadas no preparo de colunas capilares foram: a composição da mistura utilizada para suspender as partículas de fase estacionária (*slurry*), o tempo e a pressão de empacotamento.

A Tabela 3 mostra as condições utilizadas no preparo das colunas, sendo o *slurry* composto por THF e IPA, respectivamente. O tempo mostrado corresponde ao bombeamento de solvente através da coluna após o preenchimento de toda extensão por fase estacionária.

Tabela 3 – Condições utilizadas no planejamento fatorial (2^3) para preparo das colunas.

Planejamento Fatorial	Slurry (THF:IPA, v/v)	Tempo (minutos)	Pressão (MPa)
Coluna 1	1:6	10	10
Coluna 2	1:6	60	10
Coluna 3	1:6	10	40
Coluna 4	1:6	60	40
Coluna 5	6:1	10	10
Coluna 6	6:1	60	10
Coluna 7	6:1	10	40
Coluna 8	6:1	60	40

3.1.4. Sistema cromatográfico

As análises foram efetuadas em um sistema cromatográfico (Figura 15) composto por uma bomba de alta pressão e um forno com alta precisão destinado à programação de temperatura, ambos desenvolvidos pelo CROMA (IQSC – USP). O controle destes equipamentos foi realizado através de um software desenvolvido no laboratório¹⁹.

Figura 15 – Imagem do sistema destinado à cromatografia líquida capilar utilizado nesta etapa do trabalho. Componentes: (1) bomba seringa *home-made* de alta precisão, (2) válvula de injeção, (3) forno *home-made* de alta precisão, (4) controladora, (5) detector UV-VIS com cela capilar de 35 nL, (6) atuador elétrico e (7) sistema de controle e aquisição de dados.

O sistema de injeção utilizado foi composto por uma válvula Valco, ligada a um atuador elétrico. Equipou-se esta válvula com um rotor apropriado à técnica (*loop* interno), com volume de injeção de 60 nL.

A detecção foi feita empregando um detector com arranjo de diodos (SPD-M10A_{VP}) conectado a uma controladora modelo CBM-20AD, operando com o software *LCsolution*, sendo todos eles obtidos da Shimadzu. Uma cela capilar com

configuração em “U” e volume de 35 nL, desenvolvida em outra etapa deste trabalho (Capítulo 4), foi instalada no detector e utilizada em todos os experimentos. Para obter uma maior estabilidade na linha de base, ligou-se um restritor de sílica fundida com 30 cm de comprimento (50 μm d.i.) à saída da cela de detecção.

3.2. Resultados e discussão

As colunas capilares produzidas nesta etapa do trabalho, sob diversas condições de empacotamento, foram testadas no sistema para cLC montado no Laboratório de Cromatografia. Este sistema apresenta grande sensibilidade a variações da temperatura ambiente, sendo necessária a utilização de um bom sistema de refrigeração para a obtenção de resultados confiáveis.

Durante a realização dos experimentos, o fluxo da fase móvel foi mantido a 3,0 $\mu\text{L min}^{-1}$. A fase móvel empregada foi uma mistura de 70% acetonitrila e 30% água. A amostra escolhida para os testes tem sido comumente empregada para avaliar colunas empacotadas, sendo composta por padrões analíticos de uracila (1), naftaleno (2), fenantreno (3), antraceno (4) e pireno (5), solubilizados na fase móvel. A concentração de cada um dos analitos na amostra foi de 30 mg L^{-1} . Para todos os testes efetuados, a temperatura da coluna e do ambiente foi de 30 e 21°C, respectivamente.

A Figura 16 apresenta alguns dos cromatogramas obtidos através dos experimentos realizados. Para permitir a comparação entre o desempenho apresentado pelas diferentes colunas preparadas, estes cromatogramas foram utilizados para obter os resultados mostrados na Tabela 4 a 11.

Figura 16 – Cromatogramas obtidos com as colunas capilares preparadas neste trabalho. Dimensão das colunas: 150 mm x 250 μ m d.i. Fase estacionária: C_{18} (Kromasil - 3,5 μ m).

Tabela 4 – Parâmetros obtidos do cromatograma gerado com a utilização da *Coluna 1*.

Coluna 1	Uracila	Naftaleno	Fenantreno	Antraceno	Pireno
tr (min)	1,95	6,00	9,88	10,85	14,61
tr' (min)	---	4,05	7,93	8,90	12,66
wb (min)	---	0,20	0,33	0,38	0,35
N/m	---	96000,00	95612,51	86960,29	185863,05
Nef/m	---	43740,00	61595,24	58511,54	139559,70
H (um)	---	10,41	10,45	11,49	5,38
h	---	2,97	2,98	3,28	1,53
k	---	2,07	4,06	4,56	6,49
As (10%)	---	---	1,18	1,10	---
T (5%)	---	---	1,05	1,09	---
α	---	---	1,12		---
R	---	---	2,73		---

Tabela 5 – Parâmetros obtidos do cromatograma gerado com a utilização da *Coluna 2*.

Coluna 2	Uracila	Naftaleno	Fenantreno	Antraceno	Pireno
tr (min)	2,03	6,34	10,49	11,58	15,71
tr' (min)	---	4,31	8,46	9,55	13,68
wb (min)	---	0,22	0,40	0,47	0,53
N/m	---	88585,34	73360,06	64751,54	93719,36
Nef/m	---	40939,06	47714,40	44039,23	71063,92
H (um)	---	11,28	13,63	15,44	10,67
h	---	3,22	3,89	4,41	3,04
k	---	2,12	4,16	4,70	6,73
As (10%)	---	---	1,15	1,27	---
T (5%)	---	---	1,13	1,22	---
α	---	---	1,12		---
R	---	---	2,50		---

Tabela 6 – Parâmetros obtidos do cromatograma gerado com a utilização da *Coluna 3*.

Coluna 3	Uracila	Naftaleno	Fenantreno	Antraceno	Pireno
tr (min)	1,92	5,92	9,70	10,65	14,31
tr' (min)	---	4,00	7,78	8,73	12,39
wb (min)	---	0,22	0,35	0,41	0,47
N/m	---	77237,24	81928,70	71971,44	98880,86
Nef/m	---	35261,70	52705,00	48360,35	74126,86
H (um)	---	12,94	12,20	13,89	10,11
h	---	3,69	3,48	3,96	2,88
k	---	2,08	4,05	4,54	6,45
As (10%)	---	---	1,11	1,20	---
T (5%)	---	---	1,07	1,13	---
α	---	---	1,12		---
R	---	---	2,50		---

Tabela 7 – Parâmetros obtidos do cromatograma gerado com a utilização da *Coluna 4*.

Coluna 4	Uracila	Naftaleno	Fenantreno	Antraceno	Pireno
tr (min)	1,98	6,07	9,95	10,93	14,74
tr' (min)	---	4,09	7,97	8,95	12,76
wb (min)	---	0,22	0,39	0,44	0,51
N/m	---	81200,88	69429,76	65820,88	89101,15
Nef/m	---	36866,33	44546,76	44133,60	66771,28
H (um)	---	12,31	14,40	15,19	11,22
h	---	3,51	4,11	4,34	3,20
k	---	2,06	4,02	4,52	6,44
As (10%)	---	---	1,10	1,09	---
T (5%)	---	---	1,02	1,06	---
α	---	---	1,12		---
R	---	---	2,36		---

Tabela 8 – Parâmetros obtidos do cromatograma gerado com a utilização da *Coluna 5*.

Coluna 5	Uracila	Naftaleno	Fenantreno	Antraceno	Pireno
tr (min)	1,92	6,58	11,11	12,29	16,78
tr' (min)	---	4,66	9,19	10,37	14,86
wb (min)	---	0,34	0,63	0,70	0,87
N/m	---	39950,54	33172,31	32880,34	39680,22
Nef/m	---	20037,46	22697,53	23409,39	31119,15
H (um)	---	25,03	30,14	30,41	25,20
h	---	7,15	8,61	8,68	7,20
k	---	2,42	4,78	5,40	7,73
As (10%)	---	---	1,06	1,05	---
T (5%)	---	---	1,04	1,04	---
α	---	---	1,12		---
R	---	---	1,77		---

Tabela 9 – Parâmetros obtidos do cromatograma gerado com a utilização da *Coluna 6*.

Coluna 6	Uracila	Naftaleno	Fenantreno	Antraceno	Pireno
tr (min)	2,03	6,42	10,64	11,73	15,90
tr' (min)	---	4,39	8,61	9,70	13,87
wb (min)	---	0,26	0,44	0,51	0,56
N/m	---	65035,73	62374,43	56426,66	85989,79
Nef/m	---	30409,62	40844,13	38586,18	65434,31
H (um)	---	15,37	16,03	17,72	11,62
h	---	4,39	4,58	5,06	3,32
k	---	2,16	4,24	4,77	6,83
As (10%)	---	---	1,13	1,07	---
T (5%)	---	---	1,10	1,05	---
α	---	---	1,12		---
R	---	---	2,29		---

Tabela 10 – Parâmetros obtidos do cromatograma gerado com a utilização da *Coluna 7*.

Coluna 7	Uracila	Naftaleno	Fenantreno	Antraceno	Pireno
tr (min)	2,11	6,77	11,42	12,66	17,29
tr' (min)	---	4,66	9,31	10,55	15,18
wb (min)	---	0,22	0,42	0,50	0,54
N/m	---	101009,14	78861,01	68384,25	109353,12
Nef/m	---	47858,07	52411,85	47489,06	84291,68
H (um)	---	9,90	12,68	14,62	9,14
h	---	2,82	3,62	4,17	2,61
k	---	2,20	4,41	5,00	7,19
As (10%)	---	---	1,25	1,25	---
T (5%)	---	---	1,20	1,23	---
α	---	---	1,13		---
R	---	---	2,69		---

Tabela 11 - Parâmetros obtidos do cromatograma gerado com a utilização da *Coluna 8*.

Coluna 8	Uracila	Naftaleno	Fenantreno	Antraceno	Pireno
tr (min)	2,14	6,90	11,56	12,79	17,41
tr' (min)	---	4,76	9,42	10,65	15,27
wb (min)	---	0,22	0,42	0,49	0,54
N/m	---	104925,61	80806,40	72673,76	110876,30
Nef/m	---	49934,10	53657,68	50389,00	85294,15
H (um)	---	9,53	12,37	13,76	9,01
h	---	2,72	3,53	3,93	2,57
k	---	2,22	4,40	4,97	7,13
As (10%)	---	---	1,25	1,30	---
T (5%)	---	---	1,25	1,28	---
α	---	---	1,13		---
R	---	---	2,70		---

Para avaliar a eficiência das colunas produzidas neste trabalho, serão considerados os dados (Tabela 4 a 11) extraídos do último pico eluído, correspondente ao composto pireno.

Os dados obtidos através dos cromatogramas apresentados na Figura 16 mostram que uma menor largura da base do pico (w_b) foi obtida quando utilizada a *Coluna 1* no sistema. Algumas das demais colunas produzidas apresentaram maior tempo de retenção ajustado (t_r'), contudo o efeito de alargamento dos picos mostrou-se superior nestas colunas. Conforme apresentado na *Introdução Geral* deste trabalho, a eficiência de uma coluna cromatográfica é maior quanto mais elevado for o número de pratos efetivos (N_{ef}) gerados. Desta forma, a *Coluna 1* foi considerada a mais eficiente entre todas as colunas avaliadas, uma vez que o N_{ef} gerado por ela foi superior ao encontrado para as demais colunas produzidas.

Para permitir uma melhor comparação entre as colunas, os valores de alguns dos parâmetros cromatográficos foram distribuídos nos gráficos apresentados na Figura 17.

Figura 17 – Valores da altura reduzida do prato (h), fator de retenção (k), fator de separação (α) e resolução (R) para as diferentes colunas produzidas. (h e k : pico correspondente ao pireno; α e R : picos adjacentes dos compostos fenantreno e antraceno).

O gráfico A da Figura 17 mostra que os valores do fator de retenção (k) encontrados para as colunas produzidas foram relativamente distintos, ainda que as colunas tenham sido produzidas com mesmas dimensões e fase estacionária. Segundo Meyer¹⁶, o valor de k é diretamente proporcional ao volume ocupado pela fase estacionária e sua área superficial. Desta forma, os resultados indicam que a densidade de empacotamento (ou a quantidade de fase estacionária) foi diferente entre as colunas produzidas. Os valores obtidos da altura reduzida dos pratos (h) revelaram que a densidade do leito cromatográfico não é diretamente proporcional a eficiência da coluna. Isto se confirmou pelo baixo valor de h obtido para a *Coluna 1*, na qual o valor de k não foi o maior encontrado em relação aos demais.

O gráfico apresentado na Figura 17-B mostra que os valores obtidos para o fator de separação (α), entre os picos de fenantreno e antraceno, foram similares para todas as colunas produzidas. Estes valores consideram apenas a razão existente entre os tempos de retenção de picos adjacentes, sem avaliar o perfil destes picos. Uma vez que a qualidade do leito cromatográfico (homogeneidade, densidade, etc) influi diretamente na largura da base dos picos, colunas preparadas com a mesma fase estacionária podem apresentar resolução (R) distinta, conforme mostrado no gráfico B. Neste caso, o maior valor de R obtido com o uso da *Coluna 1* sugere que a dispersão dos picos em seu interior foi menos pronunciada que nas demais colunas, proporcionando a obtenção de picos mais estreitos.

O estudo da influência dos parâmetros de empacotamento sobre a eficiência das colunas foi realizado através do software *Statistica*. Este programa permite que todos os parâmetros (composição do slurry, tempo em que o solvente foi purgado através da coluna após seu preenchimento e pressão de empacotamento) sejam avaliados, bem como suas interações.

Os gráficos mostrados na Figura 18 demonstram a influência de cada um dos parâmetros, isoladamente, na eficiência da coluna. Os pontos verdes localizados sobre as linhas vermelhas indicam as condições ideais encontradas para o preparo de colunas capilares com elevado número de pratos. As linhas verdes indicam o perfil observado quando as condições de preparo se distanciam das condições consideradas ótimas.

Figura 18 – Gráficos de desempenho das colunas em função da composição da mistura empregada na suspensão das partículas de fase estacionária (*slurry*), do tempo e da pressão de empacotamento.

A interpretação dos gráficos presentes na Figura 18 revela que a composição do *slurry* é o parâmetro de maior influência na obtenção de colunas eficientes. O tempo em que foi purgado metanol através da coluna após o preenchimento de toda sua extensão foi considerado significativo, porém a pressão de empacotamento não exerceu qualquer influência sobre a eficiência das colunas. Contudo, quando se deseja otimizar todas as condições empregadas no preparo de colunas, é

necessário que sejam avaliadas as interações entre os parâmetros e seus efeitos sobre a eficiência cromatográfica.

As superfícies de resposta mostradas na Figura 19, Figura 20 e Figura 21 foram geradas através do programa *Statistica*. As regiões mostradas em vermelho escuro indicam a obtenção de um elevado número de pratos efetivos (N_{ef}) em função da interação dos parâmetros de preparo avaliados neste trabalho (Tabela 3). A intensidade das cores é diretamente proporcional ao desempenho das colunas, sendo as regiões em verde escuro correspondentes à obtenção de colunas com menor eficiência.

Figura 19 – Influência da composição do *slurry* (proporção de THF) e da pressão de empacotamento sobre a eficiência (ou número de pratos) das colunas.

Figura 20 – Influência do tempo e da pressão de empacotamento sobre a eficiência (ou número de pratos) das colunas.

Figura 21 – Influência da composição do *slurry* (proporção de THF) e do tempo sobre a eficiência (ou número de pratos) das colunas.

O gráfico apresentado na Figura 19 mostra que colunas bastante eficientes podem ser obtidas quando o empacotamento é feito a qualquer pressão compreendida na faixa avaliada, desde que pequenas proporções de THF sejam utilizadas na composição do *slurry*. A interpretação da Figura 20 indica que, para qualquer pressão (10-40 MPa), a passagem de solvente após o preenchimento do capilar deve ser feita por um período de tempo moderado, de forma a não comprometer a eficiência da coluna. Este tempo deve ser também limitado quando pequenas proporções de THF são utilizadas para compor o *slurry* (Figura 21). Obviamente, este estudo estatístico pode ser considerado de grande importância para prever o comportamento das colunas produzidas sob tais condições, porém não pode ser generalizado quando outras variáveis estiverem presentes.

Conforme discutido, as condições otimizadas para o preparo de colunas justificam a alta eficiência alcançada pela *Coluna 1* (N_{ef} : 139.559,70 pratos/metro; h : 1,53). Contudo, uma vez que a composição do *slurry* foi considerada até o momento como o parâmetro de maior influência na eficiência das colunas, o desempenho relativamente baixo observado com o uso da *Coluna 2* (N_{ef} : 71.063,92 pratos/metro; h : 3,04) não é coerente, devendo ser atribuído a outras variáveis experimentais empregadas durante sua confecção.

O tempo necessário para promover o preenchimento de toda a extensão do tubo ainda não foi discutido. Ainda que este parâmetro seja um dos mais importantes a ser considerado na produção de colunas cromatográficas, esta variável foi excluída do planejamento fatorial e será analisada em particular, em decorrência de sua grande dependência com as demais variáveis estudadas e, acima de tudo, das particularidades do sistema de empacotamento empregado neste trabalho.

Conforme citado na *Introdução* deste capítulo, a produção de colunas capilares através da técnica de empacotamento com partículas em suspensão realiza-se geralmente a alta pressão, utilizando reservatórios cônicos e composição de *slurry* que permita a suspensão das partículas durante um longo período. Sob tais condições, boas colunas podem ser produzidas e o preenchimento das mesmas ocorre de forma bastante rápida. Neste trabalho, o reservatório do *slurry* apresentava uma região plana, possibilitando que as partículas se depositassem nesta área, dependendo da proporção dos solventes do *slurry*, durante o processo de empacotamento. Esta estrutura foi propositalmente escolhida de forma a permitir que o preenchimento de algumas colunas fosse feito de forma lenta (Tabela 12)

Tabela 12 - Tempo de preenchimento das colunas com partículas de fase estacionária C₁₈.

Planejamento Fatorial	Tempo de empacotamento (min)	Pressão (MPa)	Altura reduzida do prato (<i>h_{pireno}</i>)
Coluna 1	120	10	1,53
Coluna 2	50*	10	3,04
Coluna 3	30	40	2,88
Coluna 4	30	40	3,20
Coluna 5	60	10	7,20
Coluna 6	60	10	3,32
Coluna 7	15	40	2,61
Coluna 8	15	40	2,57

* Reservatório do *slurry* foi submetido a impacto mecânico no intervalo de 5 minutos.

Quando comparados os dados apresentados na Tabela 12 com as condições de preparo das *Colunas 1 e 2* (Tabela 3), é possível concluir que a grande diferença na eficiência destas colunas deve-se ao tempo de empacotamento. Uma vez que ambas as colunas apresentavam pequena proporção de THF na composição do *slurry*, fazendo com que as partículas fiquem suspensas por pouco tempo, a deposição da fase estacionária dentro do reservatório ocorre de forma bastante rápida. O preenchimento destas colunas deveria ocorrer de maneira bastante lenta, porém durante o empacotamento da *Coluna 2*, o reservatório de *slurry* foi submetido a impacto mecânico, fazendo com que as partículas depositadas se encaminhassem para o interior da coluna com maior rapidez. Deste modo, demonstrou-se que o preparo de colunas bastante eficientes pode ser feito sob baixa pressão, desde que a composição do *slurry* e o equipamento estejam adequados para promover a migração lenta das partículas para o interior da coluna. Importa ressaltar que, quando o empacotamento é feito sob baixa pressão e se processa de forma moderada a rápida (*Colunas 2, 5 e 6*), a passagem de solvente através da coluna após seu preenchimento é favorável, pois permite que as partículas se acomodem de forma mais homogênea.

4. Desenvolvimento de colunas monolíticas

4.1. Procedimento experimental

4.1.1. Materiais e reagentes

No preparo das fases estacionárias monolíticas, utilizou-se tetrametoxisilano (TMOS) e polietilenoglicol (PEG 10.000), obtidos da Alfa Aesar. Uréia, tolueno e hidróxido de sódio (NaOH) foram procedentes pela Mallinckrodt. A piridina foi fornecida pela Merck, o dimetiloctadecilclorosilano (95%) foi obtido da Sigma-Aldrich e o ácido acético foi procedente da J. T. Baker. Os padrões analíticos de naftaleno, fenantreno e antraceno foram fornecidos pela Supelco e a uracila foi obtida da Sigma. Na composição da fase móvel e preparo das soluções padrão, foi utilizada acetonitrila (ACN) com alto grau de pureza (HPLC), fornecida pela Tedia, e água de um sistema de purificação Elga. Os capilares de sílica fundida com 250 e 75 µm de d.i. foram obtidos da Polymicro Technologies Inc. e MicroQuartz, respectivamente. As membranas para filtrar as amostras padrão, com poros de 0,5 µm, foram cedidas pela Millipore e o nitrogênio de alta pureza foi fornecido pela Aga.

4.1.2. Preparo das colunas capilares monolíticas

Para preparar colunas capilares monolíticas, é primordial que os tubos de sílica sejam previamente tratados para aumentar a densidade de grupos silanóis, que servirão de âncora para os monolitos aderirem à superfície interna das colunas. O procedimento adotado foi reproduzido da literatura⁵⁶, sendo uma solução de

NaOH ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) purgada através dos tubos ($250 \text{ }\mu\text{m}$ de d.i. e $1,0$ metro) durante 3 horas, à temperatura de 40°C . Posteriormente os tubos foram secos através da passagem de nitrogênio de alta pureza por 1 hora, de forma a garantir que não houvesse umidade no interior dos mesmos.

As colunas monolíticas à base de sílica foram produzidas pelo método sol-gel. A solução sol preparada continha $0,45 \text{ g}$ de uréia, 2 ml de TMOS, 5 ml de uma solução de ácido acético ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) e $0,44 \text{ g}$ de PEG. Submeteu-se esta mistura a agitação por 45 minutos, a 0°C , para que ficasse homogênea, sendo então introduzida dentro dos capilares de sílica com o auxílio de um adaptador tubo-seringa obtido da Upchurch Scientific. Os tubos preenchidos foram levados a um forno onde a temperatura manteve-se fixa a 40°C por 15 horas, sendo então elevada até 120°C por 3 horas. As colunas foram retiradas do forno e os primeiros 15 cm de suas extremidades foram cortados e descartados. Cada uma das colunas produzidas foi conectada a uma bomba seringa, sendo então purgada uma mistura contendo água e acetonitrila ($50:50$, v/v), por 30 minutos, para promover a remoção de resíduos. Após lavagem e secagem das colunas, foram novamente levadas ao forno a 330°C , por 25 horas, para decompor as porções orgânicas presentes. Terminado o processo de produção dos leitos monolíticos, segmentos das colunas foram cortados e reservados para realização de testes de caracterização por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A Figura 22 mostra uma imagem do forno desenvolvido especialmente para a produção de colunas capilares monolíticas. Este forno, montado no laboratório de Cromatografia (IQSC-USP), apresentava 1 metro de comprimento, sendo composto por um tubo de cerâmica com 6 orifícios, permitindo a produção simultânea de várias colunas.

Figura 22 – Imagem do forno desenvolvido no Laboratório de Cromatografia para preparo de colunas capilares monolíticas.

A derivatização ou funcionalização das fases estacionárias monolíticas realizou-se *in situ*, pela modificação de grupos reativos da superfície dos monolitos com um agente octadecilante. Utilizando um cilindro de nitrogênio, um reservatório metálico e tubulações apropriadas, uma solução composta por 80% (v/v) de piridina em tolueno e 20% (v/v) de dimetiloctadecilclorosilano foi purgada através das colunas. Selaram-se as extremidades de cada coluna produzida com septos de silicone e as mesmas foram levadas ao forno, a 95°C, durante cinco horas. Terminado este procedimento, as colunas foram lavadas com acetona e secas com nitrogênio, sendo todo processo de derivatização repetido para assegurar a modificação da superfície monolítica⁴¹.

Para todas as colunas produzidas, efetuou-se o condicionamento do leito cromatográfico pela passagem de uma mistura contendo acetonitrila e água (50:50, v/v), durante todo o período noturno.

4.1.3. Sistema cromatográfico

O sistema cromatográfico empregado para avaliar o desempenho das colunas monolíticas era constituído por uma bomba LC-10ADvp, um detector de redes de diodos SPD-M10Avp contendo uma cela semi-micro (2,5 µL) e um controlador SCL-10Avp, sendo todos da Shimadzu. O sistema de injeção era composto por válvula manual de 60 nL da VALCO (CI4W.06). Foram utilizados um forno¹⁹ e uma coluna analítica com 250 µm de d.i. e 15 cm de comprimento, preparada com partículas de Spherisorb C₁₈ - 3 µm, sob condições não otimizadas.

A Figura 23 mostra uma imagem obtida do sistema cromatográfico empregado nesta etapa de estudo.

Figura 23 – Imagem do sistema cromatográfico utilizado para testar as colunas capilares monolíticas.

4.2. Resultados e discussão

Embora os métodos descritos para o preparo de colunas monolíticas à base de sílica mostrem-se relativamente simples, falhas graves no processo de produção destas colunas podem acontecer com frequência. A Figura 24 mostra imagens obtidas de duas colunas capilares monolíticas produzidas neste trabalho.

Figura 24 – Imagens (externa e de corte) de fases estacionárias monolíticas onde ocorreu a formação de lacunas na extensão da coluna (A) e trincas no leito monolítico (B)

A quantidade de fase estacionária presente nos tubos é muito pequena, contudo o encolhimento destas fases e fragmentações no leito foram evidenciadas. As falhas observadas nas colunas apresentadas na Figura 24 foram atribuídas ao encolhimento excessivo dos monolitos durante as etapas de conversão da solução sol a gel e/ou envelhecimento (cura).

Ainda que nenhuma condição de preparo tenha sido modificada, após sucessivas tentativas obtiveram-se leitos monolíticos contínuos, conforme mostrado na Figura 25.

Figura 25 – Imagens obtidas por um microscópio eletrônico de varredura de uma coluna monolítica a base de sílica produzida no Laboratório de Cromatografia. Magnitude: 500 X (A) e 25.00 K X (B).

A Figura 25 mostra imagens de MEV obtidas de um segmento extraído de uma coluna produzida com sucesso neste trabalho (A) e uma aproximação da superfície do monolito contido neste segmento (B).

Para demonstrar o desempenho das colunas monolíticas produzidas, a coluna correspondente ao segmento mostrado na Figura 25 foi octadecilada e apropriadamente ligada ao sistema cromatográfico descrito na seção 4.1.3. A fase móvel otimizada para a realização dos experimentos foi composta por uma mistura de acetonitrila e água (40:60, v/v). A temperatura da coluna foi mantida estável a 30°C para todos os experimentos, sendo variado apenas o fluxo da fase móvel. Sob tais condições, uma coluna empacotada foi utilizada para promover a separação dos compostos de análise.

A Figura 26 mostra os cromatogramas obtidos através das análises realizadas com a coluna monolítica, a fluxos de fase móvel distintos, e um cromatograma obtido com a coluna empacotada, a 3 $\mu\text{L min}^{-1}$. O sinal analítico destes cromatogramas foi obtido a todos os comprimentos de onda da região UV (*Max Plot*).

Figura 26 – Cromatogramas obtidos com a utilização de uma coluna empacotada e uma monolítica, produzidas em laboratório, em análises com fluxos distintos. Dimensão das colunas: 150 mm x 250 μm d.i. Ordem de eluição: uracila, naftaleno, fenantreno e antraceno.

A comparação dos cromatogramas mostrados na Figura 26 mostra que, sob estas condições, o uso de colunas monolíticas a fluxos elevados proporcionou uma diminuição significativa no tempo de análise, sendo este reduzido em aproximadamente oito vezes quando o fluxo foi dez vezes maior que o empregado para a coluna empacotada.

Os dados mostrados nos cromatogramas demonstram que, mesmo a fluxos bastante altos, a pressão do sistema foi bastante inferior à observada quando utilizada a coluna empacotada com mesma dimensão. A alta permeabilidade da coluna monolítica produzida deve-se ao tamanho dos macroporos (1 a 3 μm) presentes em sua estrutura.

5. Conclusões

O estudo realizado nesta etapa demonstrou que colunas capilares empacotadas podem ser preparadas com sucesso em laboratório. A exploração dos parâmetros de empacotamento revelou que a produção de colunas com alta eficiência pode se processar a pressões relativamente baixas, quando utilizada uma mistura de solventes que diminua o tempo de suspensão das partículas de fase estacionária. Sob estas condições, o preenchimento de toda extensão da coluna ocorre de maneira lenta, fazendo com que o leito cromatográfico apresente-se homogêneo. A coluna de maior desempenho preparada neste trabalho foi capaz de gerar aproximadamente 140.000 pratos efetivos/metro, sendo a altura reduzida do prato igual a 1,53.

A produção de colunas capilares monolíticas foi demonstrada. Contudo, a reprodutibilidade do método utilizado foi considerada baixa. As colunas confeccionadas apresentaram alta permeabilidade, possibilitando o uso de elevadas vazões de fase móvel. O tempo de análise de quatro compostos foi reduzido em aproximadamente oito vezes quando comparado ao obtido com uma coluna empacotada.

CAPÍTULO 3

**Programação de temperatura
em cLC**

1. Introdução

Em cromatografia líquida (LC) a temperatura da coluna exerce efeito considerável sobre algumas propriedades como, por exemplo, a viscosidade da fase móvel, a solubilidade e a difusibilidade dos analitos. Consequentemente, vários parâmetros de grande importância na cromatografia, incluindo o tempo de retenção, a seletividade, a pressão do sistema, a eficiência da coluna e outras propriedades da fase estacionária, serão mais ou menos influenciados por variações da temperatura⁷³.

Em cromatografia gasosa (GC), considera-se a temperatura da coluna a mais importante variável na obtenção de separações eficientes, assim como em cromatografia com fluído supercrítico (SFC) ela tem sido um importante parâmetro a ser otimizado. Da mesma forma, em LC a temperatura da coluna deve ser considerada importante variável a ser investigada.

Em geral, os efeitos da variação da temperatura em LC são menores que os observados quando realizadas alterações na composição da fase móvel. Contudo a possibilidade de reduzir bastante o tempo das análises cromatográficas quando empregadas altas temperaturas tem despertado cada vez mais o interesse dos pesquisadores⁷⁴.

O fato de a temperatura não ter sido amplamente explorada em LC está relacionado à possível degradação térmica dos analitos quando expostos a alta temperatura e às características apresentadas pelas colunas utilizadas. As propriedades dos materiais empregados no preparo das colunas convencionais e suas dimensões fazem com que a temperatura não seja distribuída de maneira uniforme no interior destas colunas, sendo necessário um tempo relativamente longo

para ocorrer sua estabilização térmica. Desta forma, a aplicabilidade de programação de temperatura (TP) em sistemas convencionais é considerada inviável.

Em cromatografia líquida capilar (cLC), as colunas utilizadas apresentam diâmetro interno (d.i.) bastante reduzido e geralmente são confeccionadas em tubos de sílica fundida recobertos por poliimida. Desta forma, a baixa massa térmica das colunas capilares faz com que a distribuição de calor, quando variações de temperatura são aplicadas, ocorra de forma rápida e uniforme, tornando possível a aplicação da programação de temperatura durante as análises cromatográficas.

1.1. Histórico da programação de temperatura em cLC

Historicamente, o efeito da temperatura na retenção dos compostos em cromatografia líquida foi relatado pela primeira vez por Strain⁷⁵ em 1946. Vinte anos depois, Hesse e Engelhardt⁷⁶ demonstraram pela primeira vez a programação de temperatura em LC, utilizando coluna de fase normal com 11 mm de d.i. e aplicando uma rampa de temperatura de 7°C/hora para separar quatro compostos em 10 horas de análise. Na década seguinte, alguns trabalhos relacionados ao estudo da temperatura em LC foram relatados na literatura^{77,78}.

Os primeiros estudos relacionados aos efeitos da temperatura em LC, utilizando colunas com dimensões reduzidas, realizaram-se na década de 1980 por Takeuchi⁷⁹, Hirata⁸⁰, Bowermaster⁸¹, Jinno⁸² e McNair⁸³. Um pouco mais tarde, o emprego de temperaturas bastante altas (até 200°C) em análises por LC foi demonstrado com a utilização de colunas tubulares abertas com 50 µm de d.i.^{84,85}. Contudo, devido às grandes limitações instrumentais encontradas naquele período

quanto ao emprego de colunas com tais dimensões e a dificuldade em se obter um recobrimento de fase estacionária com boa estabilidade térmica e química, os avanços relacionados ao estudo da temperatura⁸⁶⁻⁸⁹ e ao uso de gradiente de temperatura⁹⁰⁻⁹⁵ foram sendo mais desenvolvidos com o emprego de colunas capilares empacotadas.

Estudos comparativos sobre os efeitos da composição do solvente em relação aos observados quando a temperatura sofria variação foram realizados por Bowermaster e McNair⁹⁶. Segundo os autores, o aumento de 1% na concentração de metanol foi proporcional ao efeito observado quando a temperatura era aumentada em aproximadamente 4°C. Poucos anos depois, Chen e Horvath⁹⁷ relataram um efeito similar em análises de alquilbenzenos em fase móvel contendo acetonitrila e água em sua composição.

1.2. Difusibilidade molecular

A viscosidade da fase móvel (η) em função da temperatura pode ser expressa pela equação

$$\eta = A \exp\left(\frac{E_a}{RT}\right) \quad \text{Equação 10}$$

onde A uma constante dependente da massa e do volume do líquido, E_a a energia de ativação, R a constante dos gases e T a temperatura absoluta.

A difusibilidade molecular (D_m) de um analito em função da temperatura é dada pela equação

$$D_m = \frac{k_B T}{6\pi\eta r}$$

Equação 11

sendo k_B a constante de Boltzmann, T a temperatura absoluta, η a viscosidade da fase móvel e r o raio da molécula.

Desta maneira, a difusibilidade molecular do analito é duplamente afetada pela temperatura, uma vez que sofre influência direta da mesma e indireta, pelo seu efeito sobre a viscosidade da fase móvel.

1.3. Influência da temperatura na pressão

Um dos grandes problemas encontrados em sistemas miniaturizados consiste na excessiva pressão observada devido ao diâmetro interno bastante reduzido das colunas. Aliado a isto, quando a coluna contém partículas muito pequenas de fase estacionária, as pressões de trabalho podem exceder a pressão máxima das diferentes partes que compõem o sistema cromatográfico (bombas, injetores, detectores).

A queda de pressão através de uma coluna empacotada pode ser calculada numericamente utilizando a equação⁹⁸:

$$\Delta P = \frac{\phi L \eta u}{d_p^2}$$

Equação 12

sendo ΔP a queda de pressão, ϕ a resistência ao fluxo, L o comprimento da coluna, η a viscosidade da fase móvel, u a velocidade linear média e d_p o diâmetro da

partícula de fase estacionária. Em análises sob alta temperatura, a viscosidade da fase móvel é diminuída, observando-se conseqüentemente uma menor queda de pressão no sistema. Sendo assim, o uso de colunas mais longas e/ou com partículas menores, visando a obter alta eficiência cromatográfica, torna-se possível.

1.4. Influência da temperatura na eficiência da coluna

A eficiência de uma coluna cromatográfica pode ser expressa numericamente através da determinação do número de pratos (N) ou da altura do prato (H). Sua relação com a velocidade linear média (u) da fase móvel é dada através da equação de van Deemter

$$H = A + \frac{B}{u} + (C_s + C_m)u \quad \text{Equação 13}$$

O termo A é relacionado ao efeito dos múltiplos caminhos que o analito pode percorrer através do leito cromatográfico. Conforme mostrado na Equação 14, este termo é diretamente proporcional à qualidade do empacotamento (λ) e ao tamanho das partículas (d_p).

$$A = 2\lambda d_p \quad \text{Equação 14}$$

A dependência do termo A com a temperatura ainda é incerta, todavia Li e Carr⁹⁹ afirmaram que, ainda que os efeitos não sejam muito significativos, o aumento da temperatura pode melhorar o perfil laminar do fluxo da fase móvel e aumentar a difusão lateral das moléculas dos analitos.

O termo B está relacionado à difusão longitudinal do analito, conforme a equação

$$B = 2\gamma D_m \quad \text{Equação 15}$$

sendo γ uma constante relacionada ao empacotamento da coluna e D_m o coeficiente de difusão do analito na fase móvel. A influência da temperatura neste termo pode ser considerada desprezível, porém o termo pode assumir valores significativos quando alta temperatura é empregada em conjunto com baixa velocidade linear média⁷³.

Os termos C_s e C_m são relacionados ao transporte de massa do analito entre a fase móvel e a fase estacionária, podendo ser expressos pelas equações

$$C_s = \frac{f_s(k)d_f^2}{D_s} \quad \text{Equação 16}$$

e

$$C_m = \frac{f_m(k)d_p^2}{D_m} \quad \text{Equação 17}$$

sendo $f_s(k)$ e $f_m(k)$ funções complexas do fator de retenção k , d_f a espessura da fase estacionária, d_p o diâmetro da partícula, D_s e D_m o coeficiente de difusão do analito na fase estacionária e na fase móvel, respectivamente. Quando a temperatura é elevada, valores dos termos C_s e C_m são reduzidos devido ao aumento do coeficiente de difusão do analito na fase móvel e estacionária.

Molander e colaboradores¹⁰⁰, em 1999, relataram a obtenção de um aumento de 48% na eficiência de uma coluna contendo partículas de sílica quando a temperatura foi aumentada de 25°C para 70°C. Neste mesmo ano, Dolan e colaboradores¹⁰¹ publicaram um trabalho relatando que a elevação da temperatura de 25°C para 65°C em uma coluna empacotada com partículas de zircônia aumentava a eficiência da mesma em 30%.

1.5. Estabilidade térmica dos compostos

Um fator importante a ser considerado quando aplicada elevada temperatura em análises cromatográficas consiste na possível degradabilidade dos compostos. Há mais de 50 anos, Strain⁷⁵ considerou que o emprego de altas temperaturas em cLC não poderia ocasionar a degradação dos analitos, uma vez que estes não ficariam a elas expostos por um longo período de tempo.

Thompson e Carr¹⁰² afirmaram que a maioria das reações químicas que afetam a estabilidade dos analitos, tais como a hidrólise, polimerização, isomerização e epimerização, devem ser consideradas desprezíveis. Analogamente, quando aplicada a programação de temperatura em colunas miniaturizadas, problemas relacionados à estabilidade dos analitos não devem ser evidenciados.

1.6. Aspectos instrumentais

A utilização da programação de temperatura requer o uso de sistemas diferenciados dos comumente empregados em LC. Nas próximas seções, serão apresentadas algumas considerações relacionadas aos fornos e detectores utilizados na técnica, bem como uma breve abordagem sobre a estabilidade térmica das fases estacionárias.

1.6.1. Controle da temperatura

O controle da temperatura da coluna em LC pode ser realizado mediante a utilização dos diversos fornos disponíveis comercialmente para a técnica. Todavia, quando empregada à programação de temperatura, sistemas de aquecimento com alta precisão e boa reprodutibilidade são requeridos para possibilitar a obtenção de bons resultados e fazer com que as análises apresentem repetibilidade aceitável. Entre as alternativas, o emprego de fornos que promovam o aquecimento do ar ao redor da coluna cromatográfica, como os utilizados em GC¹⁰³ e SFC¹⁰⁴, é recomendado para a programação de temperatura, pois são capazes de promover variações térmicas muito altas durante as análises.

Os fornos como banhos termostatizados¹⁰⁵, blocos aquecedores e fitas aquecedoras¹⁰⁶ também têm sido empregados em programação de temperatura. Os banhos termostatizados são considerados bastante eficientes, porém apresentam alguns inconvenientes, como a necessidade de reabastecimento da água ou de outros líquidos quando utilizadas temperaturas acima de 100°C. Quanto ao uso de blocos aquecedores, sua eficiência apresenta grande dependência no que se refere

à área de contato dos mesmos com a coluna cromatográfica. Para a LC convencional, fornos empregando este dispositivo são bastante utilizados para controlar a temperatura da coluna em análises isotérmicas, contudo a programação de temperatura em sistemas miniaturizados requer a utilização de sistemas de aquecimento mais robustos, automatizados e capazes de promover mudanças rápidas de temperatura.

A Figura 27 apresenta um forno desenvolvido em nosso laboratório para utilização da programação de temperatura com colunas capilares¹⁹.

Figura 27 – Forno desenvolvido no Laboratório de Cromatografia (IQSC-USP) para utilização em cromatografia líquida capilar com programação de temperatura¹⁹.

1.6.2. Detecção

Em separações por LC onde a temperatura da coluna é bastante elevada, a temperatura do eluente da coluna deve ser diminuída antes de sua chegada ao

detector, uma vez podem ser inadequadas a alguns destes instrumentos. Dentre os efeitos que podem ser evidenciados devido à alta temperatura do eluente, estão a perda de estabilidade do sinal e perturbações na linha de base. Uma abordagem comparativa entre os principais detectores universais utilizados sob alta temperatura em micro-LC foi publicada por Hazzote e colaboradores¹⁰⁷.

Problemas com a instabilidade da linha de base têm sido relatados¹⁰⁸⁻¹¹¹ quando utilizado gradiente de temperatura em LC, porém sua causa normalmente não está relacionada com as limitações dos detectores, mas sim com as variações de temperatura da fase móvel quando são aplicadas as rampas de temperatura durante a programação. Alguns pesquisadores^{112,113} relataram que este efeito pode ser reduzido através do controle da temperatura dos eluentes na saída da coluna, fazendo com que as propriedades da fase móvel (viscosidade, condutividade, etc.) mantenham-se constantes durante a detecção.

1.6.3. Fases estacionárias destinadas à alta temperatura

Um dos fatores mais importantes quando se empregam altas temperaturas é a estabilidade térmica das fases estacionárias presentes nas colunas cromatográficas. As fases estacionárias a base de sílica usualmente utilizadas em LC apresentam estabilidade térmica bastante limitada e, quando expostas a temperatura maior que a especificada pelos fabricantes, podem apresentar perda de eficiência. No caso das colunas de fase reversa (RP), onde são comumente utilizadas fases móveis contendo água em sua composição, a perda dos grupos funcionais que se encontram quimicamente ligados ao suporte cromatográfico ocorre devido às reações de hidrólise que podem ser mais efetivas em presença de alta

temperatura¹⁰². A Figura 28 esquematiza a reação de hidrólise ocorrida em fases estacionárias octadeciladas (C_{18}).

Figura 28 – Representação da reação de hidrólise ocorrida em fases estacionárias octadeciladas à base de sílica.

O desenvolvimento de novos tipos de fases estacionárias com alta estabilidade térmica e química tem tornado possível a aplicabilidade de altas temperaturas e exposição da coluna cromatográfica a condições extremas de pH. Entre as fases termicamente estáveis, grande destaque tem sido dado às baseadas em carbono grafitizado, sílica polidentada, óxidos de zircônio e titânio, fases poliméricas a base de estireno e divinilbenzeno e sílica encapsulada. A Figura 29 mostra a representação estrutural das fases estacionárias sintetizadas a partir dos óxidos de zircônio e titânio.

Figura 29 - Representação estrutural das fases estacionárias à base de zircônia e titânia.

O preparo e a avaliação de fases estacionárias com alta estabilidade térmica¹¹⁴⁻¹¹⁸ e artigos de revisão abordando este assunto¹¹⁹⁻¹²¹ encontram-se disponíveis na literatura. Em 2004, uma edição especial do *Journal of Chromatography A* contendo trabalhos relacionados ao desenvolvimento de fases estacionárias, incluindo a produção de fases termicamente estáveis, foi publicada¹²². Quanto ao desempenho das colunas comerciais destinadas a LC, Vanhoenacker e Sandra¹²³ publicaram uma tabela contendo colunas de diferentes fabricantes e tipos de fases estacionárias. Os valores máximos de temperatura permitida para estas colunas estavam entre 150 a 200°C, sendo consideradas pelos autores como apropriadas para serem empregadas em análises com altas temperaturas e programação de temperatura.

2. Justificativa e objetivos

Em separações cromatográficas, os métodos analíticos desenvolvidos têm buscado reduzir o tempo de duração das análises ao máximo, principalmente em se tratando de análises de rotina. A possibilidade de aplicar programação de temperatura para tais fins constitui uma alternativa bastante atraente em cromatografia líquida capilar, uma vez que pode proporcionar separações bastante rápidas, sem a necessidade do uso de sistemas que operem com gradiente de fase móvel. Este trabalho tem como objetivo estudar qualitativamente a aplicabilidade da programação de temperatura na separação de tetraciclinas e esteróides por cromatografia líquida capilar.

3. Análise de tetraciclinas

Tetraciclinas (TCs) são antibióticos comumente usados em medicina veterinária para a prevenção e tratamento de doenças infecciosas em animais devido ao seu grande espectro e vantagens econômicas. Elas são ativas contra uma grande variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, aeróbicas e anaeróbicas, incluindo *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pneumococcus*, *Spirochete*, *Pertussis*, *Rickettsia*, *Chlamydia*, *Actinomyces*, e *Mycoplasma*. Os compostos mais amplamente utilizados deste grupo são a oxitetraciclina (OTC), tetraciclina (TC), clortetraciclina (CTC) e a doxiciclina (DC). O monitoramento da presença de resíduos desses compostos em alimentos de origem animal torna-se necessário, pois o uso inadequado de tais antibióticos pode causar efeitos adversos à saúde humana.

Entre os métodos utilizados para a separação e determinação das TCs em alimentos, um grande número de trabalhos empregando eletroforese capilar (CE) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) podem ser encontrados na literatura¹²⁴. Recentemente, a cromatografia líquida de alta eficiência tem sido amplamente utilizada em combinação com detectores de massas e detecção ultravioleta¹²⁵⁻¹³¹.

As tetraciclinas são solúveis em álcoois, ácidos, bases e solventes orgânicos polares, porém a estabilidade destes compostos é baixa sob condições ácidas e alcalinas. Uma importante observação sobre a análise das TCs por cromatografia líquida em fase reversa refere-se à sua propensão em formar complexos na presença de íons metálicos e à sua capacidade de adsorver nos grupos silanóis livres presentes nos suportes sólidos à base de sílica. Todavia o uso de colunas

contendo fase estacionária com capeamento (*end-capped*) e o emprego de fases móveis contendo ácidos na sua composição pode contornar estes problemas.

A Figura 30 ilustra a estrutura química das principais tetraciclinas empregadas em uso veterinário.

Oxitetraciclina

Tetraciclina

Clortetraciclina

Doxiciclina

Figura 30 – Estrutura química das principais tetraciclinas utilizadas como fármacos veterinários.

Fonte: The Merck Index®.

3.1. Procedimento experimental

3.1.1. Materiais e reagentes

Os padrões analíticos de tetraciclina (TC) e clortetraciclina (CTC) foram obtidos da Fluka. Oxitetraciclina (OTC) e doxiciclina (DC) foram obtidos da Sigma-Aldrich. ACN e MeOH foram adquiridos da J. T. Baker. Os capilares de sílica fundida foram adquiridos da Polymicro Technologies Inc. e MicroQuartz. Álcool isopropílico foi obtido da Qhemis e tetrahidrofurano (THF 99%) foi obtido da Sigma-Aldrich. Ácido Oxálico foi adquirido da Merck. Água de alta pureza foi obtida de um sistema de purificação Elga. Os cartuchos de extração em fase sólida (Nexus - SPE) foram adquiridos da Varian. Nitrogênio de alta pureza foi obtido da AGA e as membranas para filtrar as amostras, com poros de 0,5 µm e 3,0 µm, são da Millipore.

3.1.2. Sistema cromatográfico

As análises desta etapa do trabalho foram realizadas no sistema cromatográfico descrito na seção 3.1.4. - Capítulo 2. Para estes experimentos, contudo, foi utilizada uma cela capilar comercial com 35 nL (UZ-SHM-CAP) obtida da LC Packings.

3.1.3. Preparo da coluna capilar

A coluna capilar (150 mm x 250 µm d.i.) foi preparada no laboratório através da técnica de empacotamento com partículas em suspensão¹³². A fase estacionária

octadecilada, com 3,5 μm de diâmetro (Kromasil - Eka Chemicals), foi suspensa em uma mistura contendo álcool isopropílico e THF (1:6, v/v), sendo então bombeada por 1 hora a 40 MPa para dentro do capilar de sílica fundida usando MeOH como solvente de empacotamento.

Depois de finalizado o processo de empacotamento e feita a despressurização do sistema, a cabeça da coluna foi conectada a uma união que continha um tubo de sílica na outra extremidade, possibilitando seu acoplamento ao sistema cromatográfico. Antes de realizar as análises, a coluna foi condicionada durante 12 horas pela passagem de uma mistura contendo acetonitrila e água (70:30, v/v).

3.1.4. Preparo das soluções padrão e amostras

As soluções estoque de cada uma das tetraciclinas foram preparadas pela solubilização dos analitos em metanol, à concentração de 500 mg L^{-1} . As soluções foram diluídas separadamente em uma mistura contendo ácido oxálico ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$), MeOH e ACN (70:15:15, v/v/v). Uma mistura, contendo as quatro TCs de interesse, foi feita de modo a apresentar concentração de 100 mg L^{-1} para cada um dos analitos.

As amostras de plasma bovino foram filtradas através de uma membrana de 3,0 μm para limpeza da matriz, sendo posteriormente fortificadas pela adição de 150 μL da solução padrão contendo as TCs de interesse. O procedimento experimental usado na extração em fase sólida foi adaptado da literatura¹³³, apresentando as seguintes etapas: (1) Após condicionados os cartuchos de SPE pela passagem de 2 mL de metanol e 2 mL de água, as amostras de plasma bovino foram introduzidas

nos cartuchos. (2) O sistema de sucção a vácuo foi ligado a baixa pressão para auxiliar a passagem da amostra através do cartucho. (3) A extração foi feita usando uma mistura de ácido oxálico/metanol/acetonitrila (40:30:30, v/v/v) como solvente de eluição. (4) As amostras foram coletadas e secas com nitrogênio para serem posteriormente solubilizadas na fase móvel utilizada no sistema cromatográfico. As soluções padrão e amostras analíticas foram estocadas sob refrigeração e protegidas da luz para evitar a degradação dos compostos.

3.2. Resultados e discussão

3.2.1. Otimização da fase móvel

Dentre as fases móveis utilizadas em cromatografia líquida de fase reversa para promover a separação das tetraciclinas, as que contêm ácido cítrico, tartárico, fosfórico e EDTA em sua composição têm sido amplamente empregadas para evitar a formação de complexos quelatos. No entanto, os picos cromatográficos correspondentes a TCs apresentam cauda acentuada quando fases móveis contendo estes ácidos são usadas¹²⁴. Como alternativa, a utilização de fases móveis contendo ácido oxálico em sua composição tem sido bastante explorada, uma vez que minimiza este problema.

O estudo da composição da fase móvel na separação das quatro tetraciclinas de interesse foi feito sob condições isotérmicas. A porcentagem de modificadores orgânicos (MeOH e ACN) foi variada para verificar seu efeito no tempo de retenção e sua habilidade de separar os compostos.

Nesta etapa do estudo, a temperatura da coluna foi mantida a 30°C durante as análises e foi observado que a ordem de eluição dos compostos (oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina) permaneceu inalterada em todas as condições avaliadas.

Os cromatogramas obtidos, mostrados na Figura 31, indicaram que o decréscimo da quantidade de solventes orgânicos na fase móvel resulta em uma melhor separação das quatro TCs. A composição ideal de separação (fase móvel A) foi obtida usando 10% de metanol, 10% de acetonitrila e 80% de ácido oxálico (0,01 mol L⁻¹). Sob estas condições, os compostos foram completamente separados em

90 minutos de análise. No cromatograma obtido quando utilizada a fase móvel B (12,5% metanol, 12,5% acetonitrila e 75,0% ácido oxálico), a separação foi satisfatória, todavia um dos epímeros presentes foi eluído com tempo de retenção muito próximo ao da oxitetraciclina (OTC). Quando empregada à fase móvel C, com maior quantidade de solventes orgânicos, não foi possível separar completamente todos os compostos presentes na amostra. O tempo de análise foi reduzido a menos de 20 minutos, porém a oxitetraciclina (OTC) e a tetraciclina (TC) coeluíram.

Figura 31 - Cromatogramas mostrando o efeito da composição da fase móvel na separação de uma mistura padrão contendo 100 mg L^{-1} de TCs. Coluna: C_{18} - 150 mm x 250 μm . Volume de injeção: 60 nL. Eluição isotérmica a $3,0 \mu\text{L min}^{-1}$ e detecção a 365 nm. (1) OTC; (2) TC; (3) CTC e (4) DC.

3.2.2. Efeito da temperatura

Após o estudo relacionado à composição da fase móvel, o efeito da variação da temperatura da coluna na separação das tetraciclinas foi avaliado. Usando a fase móvel A (10% de metanol, 10% de acetonitrila e 80% de ácido oxálico), injeções de uma mistura padrão contendo as quatro TCs de interesse foram efetuadas com a coluna a três temperaturas distintas (30°C, 40°C e 50°C). A Figura 32 mostra os cromatogramas obtidos nestes experimentos.

Figura 32 - Cromatogramas mostrando o efeito da temperatura na separação de uma mistura padrão contendo 100 mg L^{-1} de TCs. Coluna: C_{18} - 150 mm x 250 μm . Volume de injeção: 60 nL. Análises a $3,0 \mu\text{L min}^{-1}$ e detecção a 365 nm. (1) OTC; (2) TC; (3) CTC e (4) DC.

Como discutido anteriormente, a fase móvel composta de 10% metanol, 10% de acetonitrila e 80% de ácido oxálico ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) mostrou bons resultados sob temperaturas amenas (30°C). No entanto, após ter sido realizado o estudo do efeito da temperatura da coluna na análise das TCs, os resultados obtidos revelaram que esta classe de compostos pode ser termicamente sensível quando expostos por um longo período de tempo a temperaturas mais elevadas. Conforme mostrado nos cromatogramas da Figura 32, quando a temperatura da coluna é superior a 30°C , os picos correspondentes aos compostos mais retidos (CTC e DC) apresentaram baixa simetria, sendo esta distorção mais acentuada quanto maior a temperatura.

Com relação à fase móvel B, o estudo da influência da temperatura na separação mostrou-se inviável, uma vez que os dois primeiros picos eluídos (OTC e TC) já se encontravam com resolução limitante a 30°C e um aumento na temperatura poderia causar sobreposição dos mesmos.

3.2.3. Programação de temperatura

Com base nos resultados obtidos nos experimentos anteriores, as fases móveis A e B foram selecionadas para serem utilizadas nas análises com programação de temperatura. Para reduzir o tempo das análises em relação às efetuadas sob condições isotérmicas, é necessário considerar os tempos de retenção dos analitos, passo a passo, após cada etapa de gradiente de temperatura.

Conforme discutido anteriormente, quando aplicadas temperaturas acima de 30°C , os picos cromatográficos apresentam assimetria. Considerando isto, as análises foram iniciadas sob baixa temperatura, sendo a mesma aumentada rapidamente durante as análises, de modo que os analitos não ficaram expostos a

altas temperaturas por um longo tempo. Os cromatogramas mostrados na Figura 33 foram obtidos sob condições ótimas de análise isotérmica e com programação de temperatura quando utilizada a fase móvel A. As linhas vermelhas presentes na figura indicam a temperatura da coluna durante as análises.

Figura 33 - Cromatogramas comparativos obtidos em condições isotérmicas e com TP na análise de uma mistura padrão contendo 100 mg L⁻¹ de TCs. Fase móvel A: 10% metanol, 10% acetonitrila e 80% ácido oxálico (0,01 mol L⁻¹). Coluna: C₁₈ - 150 mm x 250 µm. Volume de injeção: 60 nL. Vazão a 3,0 µL min⁻¹ e detecção a 365 nm. (1) OTC; (2) TC; (3) CTC e (4) DC.

Os resultados obtidos com a fase móvel A (Figura 33) mostraram que o uso de gradiente de temperatura foi capaz de reduzir em aproximadamente cinco vezes o tempo das análises quando comparado às análises efetuadas a 30°C. No início das análises cromatográficas com programação de temperatura, a temperatura foi mantida constante (30°C) nos primeiros 10 minutos. Após isto, a temperatura foi

aumentada gradativamente a uma rampa de 20°C/min até a coluna atingir 50°C, permanecendo a esta temperatura por um minuto. A temperatura foi novamente elevada até atingir 110°C, sendo então mantida constante até o término das análises.

Quando utilizada a fase móvel B sob condições isotérmicas, o tempo das análises foi de aproximadamente 40 minutos. Sendo a separação cromatográfica da oxitetraciclina (OTC) e tetraciclina (TC) obtida com resolução aceitável, optou-se pela realização de uma programação onde a temperatura da coluna fosse aumentada abruptamente após a eluição do primeiro pico cromatográfico (Figura 34), usando uma rampa de temperatura de 20°C/min.

Figura 34 - Cromatogramas comparativos obtidos em condições isotérmicas e com TP na análise de uma mistura padrão contendo 100 mg L⁻¹ de TCs. Fase móvel B: 12,5% metanol, 12,5% acetonitrila e 75% ácido oxálico (0,01 mol L⁻¹). Coluna: C₁₈ - 150 mm x 250 µm. Volume de injeção: 60 nL. Vazão a 3,0 µL min⁻¹ e detecção a 365 nm. (1) OTC; (2) TC; (3) CTC e (4) DC.

Conforme mostrado nos cromatogramas comparativos da Figura 34, a programação de temperatura foi capaz de reduzir o tempo de análise para 12 minutos, sem que houvesse a sobreposição dos picos correspondentes às quatro TCs de interesse.

Uma das vantagens da aplicação da programação de temperatura em LC é o possível aumento da intensidade dos picos cromatográficos. Obviamente, se os analitos passam através do sistema com maior rapidez sob alta temperatura, a dispersão da banda cromatográfica será menos pronunciada, podendo haver um ganho considerável de sensibilidade. Este efeito pode ser visualizado quando comparados os cromatogramas sob condições isotérmicas e com programação de temperatura, mostrados nas Figuras 33 e 34.

Apesar da relativamente baixa estabilidade térmica das fases octadeciladas à base de sílica, a coluna utilizada nesta aplicação apresentou desempenho satisfatório, suportando seu uso a elevadas temperaturas sem que fosse observada qualquer perda de eficiência ou seletividade.

3.2.4. Separação de tetraciclinas em plasma bovino

Sob as condições ótimas encontradas para minimizar o tempo das análises, amostras de plasma bovino contendo as quatro TCs investigadas foram injetadas no sistema cromatográfico. A comparação entre os cromatogramas obtidos para as injeções de solução padrão, plasma bovino extraído e solução branco, usando as fases móveis A e B, são mostradas nas Figuras 35 e 36, respectivamente.

Figura 35 - Cromatogramas obtidos durante a análise de TCs em plasma bovino por TP-cLC. Fase móvel A: 10% metanol, 10% acetonitrila e 80% ácido oxálico ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$). Coluna: C_{18} - 150 mm x 250 μm . Volume de injeção: 60 nL. Análise isocrática a $3,0 \mu\text{L min}^{-1}$ e detecção a 365 nm. Ordem de eluição: (1) OTC; (2) TC; (3) CTC e (4) DC.

As análises das tetraciclinas extraídas do plasma bovino fortificado revelaram que esta matriz não causa efeito significativo na separação. O método de extração dos analitos (SPE) mostrou-se satisfatório para as quatro TCs de interesse, contudo, quando utilizadas matrizes biológicas de maior complexidade, as impurezas presentes nas amostras podem coeluir com os picos dos analitos, tornando necessário que as condições de separação e a programação de temperatura sejam novamente otimizadas.

Figura 36 - Cromatogramas obtidos durante a análise de TCs em plasma bovino por TP-cLC. Fase móvel B: 12,5% metanol, 12,5% acetonitrila e 75% ácido oxálico ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$). Coluna: C_{18} - 150 mm x 250 μm . Volume de injeção: 60 nL. Análise isocrática a $3,0 \mu\text{L min}^{-1}$ e detecção a 365 nm. Ordem de eluição: (1) OTC; (2) TC; (3) CTC e (4) DC.

4. Análise de esteróides

Os esteróides, também conhecidos como hormônios, compreendem um grande grupo de compostos orgânicos naturais e sintéticos que possuem estrutura química similar composta por 17 átomos de carbono que se encontram dispostos sob a forma de quatro anéis ligados entre si¹³⁴.

Durante muitas décadas, os hormônios foram utilizados na pecuária para promover o crescimento dos animais e aumentar seu rendimento, contudo seus possíveis efeitos prejudiciais à saúde humana fizeram com que seu uso fosse proibido em diversos países. Apesar disto os hormônios ainda continuam sendo utilizados por alguns criadores, fazendo com que seja necessário o monitoramento destas substâncias em alimentos de origem animal e o desenvolvimento de novos métodos analíticos que propiciem sua análise em diferentes matrizes biológicas¹³⁵.

A cromatografia líquida (LC) e gasosa (GC) são técnicas bastante apropriadas para promover a separação dos esteróides. Vários trabalhos relacionados à análise destas substâncias através destas técnicas podem ser encontrados na literatura, incluindo uma revisão voltada principalmente à análise de fluidos biológicos humanos^{136, 137}.

Recentemente, Smith e colaboradores¹³⁸ estudaram os efeitos da temperatura e da composição da fase móvel na separação isotérmica de esteróides por HPLC. O desempenho cromatográfico de uma fase estacionária híbrida foi avaliado pelos autores e os resultados obtidos indicaram que, sob alta temperatura, a eficiência cromatográfica revelou-se maior para os analitos mais retidos. Para os analitos pouco retidos, houve grande perda de eficiência quanto maior a temperatura aplicada à coluna.

As estruturas químicas dos esteróides analisados por TP-cLC nesta etapa do trabalho são mostradas na Figura 37.

Figura 37 – Estrutura química dos esteróides analisados neste trabalho por TP-cLC. Fonte: *ChemINDEX*.

4.1. Procedimento experimental

4.1.1. Materiais e reagentes

Os padrões analíticos de estriol, estrona, progesterona, acetato de cortisona e acetato de hidrocortisona foram obtidos da Sigma-Aldrich e Alfa Aesar. Na composição da fase móvel e preparo das soluções padrão foi utilizada acetonitrila (ACN), com alto grau de pureza, fornecida pela Tedia. Os capilares de sílica fundida foram obtidos da Polymicro Technologies Inc. e MicroQuartz. Água de alta pureza foi adquirida de um sistema de purificação Elga e as membranas para filtrar as amostras padrão, com poros de 0,5 µm, foram obtidas da Millipore.

4.1.2. Sistema cromatográfico e coluna capilar

O sistema cromatográfico e a coluna capilar utilizados nestes experimentos foram os mesmos empregados na separação e análise de tetraciclinas por TP-cLC. As especificações do sistema e da coluna capilar encontram-se previamente descritas nas seções 3.1.2. e 3.1.3. deste capítulo.

4.1.3. Preparo das soluções padrão

As soluções estoque de cada um dos esteróides empregados neste estudo foram preparadas pela solubilização dos analitos em uma mistura contendo acetonitrila e água (60:40, v/v). Alíquotas de cada uma das soluções estoque foram coletadas em frascos separados e diluídas em acetonitrila, resultando em cinco

soluções padrão com 50 mg L^{-1} do analito correspondente. Estas soluções foram utilizadas para confirmar a identidade dos analitos durante os experimentos realizados. A partir das soluções estoque, preparou-se também uma mistura padrão contendo todos os analitos de interesse. As soluções e a mistura padrão foram filtradas através de membranas apropriadas, para remover possíveis impurezas presentes nas amostras.

4.2. Resultados e discussão

4.2.1. Otimização da fase móvel

Os esteróides não apresentam boa resposta quando monitorados por um detector UV e este problema é agravado quando a quantidade de amostra e/ou a concentração destes analitos são relativamente baixas. Além disto, em sistemas cromatográficos miniaturizados, o caminho óptico das celas de detecção empregadas é geralmente bastante limitado, fazendo com que o sinal analítico obtido seja bem menor do que em sistemas convencionais. Devido a estes fatores, tornou-se necessária a realização de um estudo prévio com a finalidade de determinar qual o comprimento de onda mais apropriado para detectar simultaneamente todos os esteróides de interesse.

O estudo da composição da fase móvel na separação dos cinco esteróides de interesse foi realizado sob condições isotérmicas. Para todos os experimentos, a vazão de trabalho empregada foi mantida fixa em $3 \mu\text{L min}^{-1}$ e o volume de injeção utilizado foi de 60 nL. Foram avaliadas três composições de fases móveis, todas contendo porções distintas de acetonitrila e água. A Figura 38 ilustra os

cromatogramas gerados quando a mistura padrão de esteróides foi injetada no sistema e o monitoramento dos analitos eluídos da coluna foi feito a 234 nm.

Figura 38 - Cromatogramas mostrando o efeito da composição da fase móvel na separação de uma mistura padrão contendo 50 mg L⁻¹ de cada um dos esteróides analisados. Coluna: C₁₈ - 150 mm x 250 µm. Volume de injeção: 60 nL. Eluição isotérmica a 3,0 µL min⁻¹ e detecção a 234 nm.

Como pode ser observado no primeiro cromatograma da Figura 38, a fase móvel com a composição 70% acetonitrila (ACN) e 30% de água (H₂O) mostrou-se incapaz de promover a separação dos picos correspondentes a hidrocortisona e cortisona, fazendo com que os mesmos se apresentassem totalmente sobrepostos

no cromatograma. O tempo total de análise utilizando esta fase foi de aproximadamente 7,5 minutos.

No cromatograma obtido quando empregada a segunda fase móvel testada, constituída por uma mistura com iguais proporções de ACN e H₂O, o tempo de análise foi de aproximadamente 18 minutos. A separação entre os picos de hidro cortisona e cortisona ocorreu de maneira mais efetiva, porém a fase móvel não foi capaz de separá-los totalmente.

Quando utilizada a fase móvel de composição 40% ACN e 60% H₂O, a separação total de todos os picos cromatográficos correspondentes aos esteróides analisados foi observada. Esta foi a melhor composição de fase móvel encontrada para promover a separação dos analitos de estudo, sendo assim escolhida para ser empregada nos experimentos posteriores. Todavia, como pode ser visto no último cromatograma, o tempo total de análise quando utilizada esta fase foi bastante elevado, em torno de 50 minutos, e os dois últimos picos eluídos (estrona e progesterona) encontram-se excessivamente distantes, fazendo com que a aplicação da programação de temperatura seja uma alternativa bastante atrativa para a redução do tempo de análise.

4.2.2. Efeito da temperatura

Depois de concluído o estudo relacionado à composição da fase móvel, foi avaliado o efeito da variação da temperatura da coluna na separação dos esteróides. Usando a fase móvel previamente otimizada, contendo 40% de ACN e 60% de H₂O, foram realizadas injeções da mistura padrão contendo os cinco esteróides de interesse. Ao término de cada uma das análises isotérmicas, a

temperatura da coluna era alterada e novos experimentos foram realizados para avaliar a retenção dos analitos. Os resultados obtidos quando testadas três temperaturas distintas são apresentados nos cromatogramas que compõem a Figura 39.

Figura 39 - Cromatogramas mostrando o efeito da temperatura na separação de uma mistura padrão contendo 50 mg L⁻¹ de cada um dos esteróides analisados. Coluna: C₁₈ - 150 mm x 250 µm. Volume de injeção: 60 nL. Vazão a 3,0 µL min⁻¹ e detecção a 234 nm.

Conforme mostrado no segundo cromatograma da Figura 39, a separação dos esteróides continua sendo realizada de forma efetiva quando a temperatura da coluna é mantida a 60°C, não havendo a sobreposição de qualquer um dos picos cromatográficos. Nesta temperatura, a resolução entre os picos correspondentes a

hidrocortisona e cortisona continua sendo satisfatória e o tempo total de análise mostra-se consideravelmente inferior quando comparado à mesma análise realizada a 30°C, ilustrada no primeiro cromatograma.

A análise dos esteróides realizada a 80°C indicou que a esta temperatura o tempo total de análise foi reduzido a aproximadamente 27 minutos, porém os picos relativos à hidrocortisona e à cortisona apresentaram-se parcialmente sobrepostos, impossibilitando análises isotérmicas sob estas condições.

Ainda em relação à Figura 39, é possível observar pela comparação dos cromatogramas que o aumento da temperatura não provocou qualquer distúrbio na linha de base ou indício de possível degradação térmica dos esteróides no decorrer das análises.

4.2.3. Programação de temperatura

Conforme demonstrado anteriormente, o aumento da temperatura da coluna nas análises de esteróides por cLC reduz consideravelmente o tempo das mesmas. À temperatura de 60°C, a separação dos compostos ocorre de forma satisfatória, contudo alguns dos picos cromatográficos ainda se mostram com resolução bastante alta e/ou muito retidos pela coluna cromatográfica.

Com o objetivo de reduzir ainda mais o tempo destas análises, diversas condições de programação de temperatura foram estudadas e aplicadas. A Figura 40 ilustra uma comparação entre um cromatograma obtido de uma análise isotérmica e um obtido com programação de temperatura, sob condições otimizadas.

Figura 40 - Cromatogramas comparativos obtidos em condições isotérmicas e com TP na análise de uma mistura padrão contendo 50 mg L⁻¹ de esteróides. Coluna: C₁₈ - 150 mm x 250 µm. Volume de injeção: 60 nL. Vazão a 3,0 µL min⁻¹ e detecção a 234 nm.

O primeiro cromatograma mostrado na Figura 40 correspondente a uma análise isotérmica realizada para promover a separação dos esteróides. A programação de temperatura ideal encontrada para promover a rápida separação dos cinco esteróides de interesse é ilustrada pela linha vermelha presente no segundo cromatograma. A análise iniciou-se à temperatura de 60°C e, após o decorrer de 7 minutos, foi elevada bruscamente até atingir 100°C, permanecendo assim até o término da análise.

Comparando os dois cromatogramas da Figura 40, pode-se observar que o uso da programação de temperatura durante as separações foi capaz de promover

análises duas vezes mais rápidas. Quanto à eficiência da coluna cromatográfica, obteve-se o valor de 58.612 pratos/metro para a estrona quando analisada sob condições isotérmicas. Já quando aplicada a programação de temperatura, este valor chega até 91.023 pratos/metro, demonstrando assim ter havido um ganho considerável de eficiência.

Ainda que o tempo de retenção deste analito tenha sido menor do que quando analisado sob condições isotérmicas, a menor dispersão da banda cromatográfica obtida por TP-cLC, reduzindo assim a largura da base do pico, fez com que o desempenho da coluna fosse maior. Entretanto a eficiência da coluna não pode ser considerada maior para todo ou qualquer composto analisado por TP-cLC. Para que isto seja válido, é necessário que o valor obtido para a largura da base do pico seja tão baixo que supere a redução do tempo de retenção do analito.

5. Conclusões

O estudo realizado nesta etapa demonstrou que o emprego de colunas capilares na separação e determinação de tetraciclinas e esteróides quando utilizados sistemas capazes de operar com programação de temperatura é uma boa alternativa para reduzir bastante o tempo das análises sem que se faça necessário o uso de gradiente de fase móvel. O tempo de duração das análises de tetraciclinas por TP-cLC foi até cinco vezes mais rápido quando comparado ao tempo das análises realizadas sob condições isotérmicas. A separação das tetraciclinas extraídas de amostras de plasma fortificado demonstrou a possibilidade de serem analisadas amostras reais de plasma bovino. Demonstrou-se também que a análise de cinco esteróides por TP-cLC pode ser realizada em menos da metade do tempo, quando comparada a uma análise isotérmica sob as mesmas condições.

CAPÍTULO 4

**Desenvolvimento de celas
capilares para detecção UV**

1. Introdução

Em LC, a detecção baseada na absorção de luz ultravioleta (UV) tem sido amplamente empregada para o monitoramento dos compostos separados e eluídos pela coluna cromatográfica^{139,140}. Porém um dos grandes problemas encontrados quando utilizada a detecção UV em sistemas miniaturizados, fazendo com que seu uso não seja devidamente apropriado a estes, reside na baixa sensibilidade observada.

Diferente do que ocorre nos sistemas cromatográficos convencionais, as colunas utilizadas em cLC podem ser confeccionadas em tubos de sílica fundida que tornam possível o monitoramento dos analitos em regiões da própria coluna. Este modo de detecção, realizado tanto em regiões onde ocorre a presença da fase estacionária (*in-column*) ou logo após o término da extensão preenchida da coluna (*on-column*), pode ser considerado bastante atrativo, pois elimina o efeito de alargamento da banda cromatográfica que ocorre devido ao volume da cela de detecção¹⁴¹⁻¹⁴³. Contudo o ganho de sensibilidade que poderia ser obtido devido à baixa dispersão dos picos não é evidenciado, uma vez que os tubos capilares comumente empregados fazem com que o caminho ótico seja bastante limitado.

De forma análoga, a sensibilidade alcançada quando a detecção UV-VIS é promovida através do uso de celas será diretamente proporcional ao comprimento do caminho percorrido pela luz, conforme descrito pela lei de Lambert-Beer¹⁴⁴.

Um detector UV adequado para promover o monitoramento dos analitos separados por cLC deve apresentar, entre outros requisitos, uma cela com volume bastante reduzido para que os efeitos de dispersão dos picos sejam minimizados nesta região. Entretanto, ainda que o comprimento do caminho ótico seja

equivalente ao de uma cela comumente usada em sistemas cromatográficos convencionais (HPLC), celas com estruturas mal dimensionadas poderão exercer efeitos indesejáveis como, por exemplo, a baixa sensibilidade na detecção. Desta forma, no desenvolvimento de uma cela capilar é de suma importância que suas particularidades estruturais e óticas sejam ponderadas e simultaneamente arranjadas de modo a propiciar a obtenção de um bom sinal analítico sem que haja, com isto, perda significativa de desempenho cromatográfico.

As primeiras celas de fluxo empregadas em cLC baseavam-se principalmente na focalização pontual da luz UV na superfície de um tubo contido em sua estrutura. Nestas celas, o efeito de dispersão das bandas cromatográficas era significativo e fazia com que o limite de detecção de um determinado analito fosse menor em relação ao obtido com o uso da detecção *on-column*¹⁴⁵.

O mais importante avanço instrumental relacionado às celas de detecção UV empregadas em micro separações foi dado por Chervet e colaboradores¹⁴⁶ em 1989, quando demonstraram experimentalmente que um ganho bastante expressivo de sensibilidade poderia ser obtido com a utilização de uma cela que permitisse a detecção de forma longitudinal ao fluxo. A geometria da cela apresentada pelos autores, na qual o tubo capilar encontra-se disposto em formato de “Z”¹⁴⁷ ou “U”, pode ser considerada até o presente momento como a mais adequada para uso em sistemas cromatográficos miniaturizados.

Atualmente poucas empresas de instrumentação cromatográfica têm disponibilizado celas de detecção UV destinadas exclusivamente a cLC. O custo relativamente alto das celas capilares comerciais e seu desempenho pouco satisfatório fazem com que os projetos de pesquisa destinados ao desenvolvimento e aprimoramento de tais celas sejam considerados de grande importância.

1.1. Lei de Lambert-Beer

A espectrometria de absorção UV-VIS baseia-se na comparação da intensidade de luz incidente (I_0) e emergente (I) que passa através de uma solução^{148,149}. A razão entre as intensidades de luz medidas, chamada de transmitância (T), é dada pela equação

$$T = \frac{I}{I_0} \quad \text{Equação 18}$$

Quando o comprimento do caminho ótico de uma cela é mantido constante durante a detecção, a absorbância (A) torna-se diretamente proporcional à concentração de um analito presente na solução exposta à radiação, e sua relação com a medida da transmitância pode ser descrita através da equação

$$A = \log \frac{1}{T} \quad \text{Equação 19}$$

Substituindo a primeira equação apresentada na Equação 19, obtém-se a equação que relaciona a absorbância e as intensidades de luz, expressa por

$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad \text{Equação 20}$$

A relação expressa na lei de Lambert-Beer considera que o comprimento do caminho ótico (d) e a concentração (c) são diretamente proporcionais à absorbância, conforme descrito na seguinte equação

$$A = \varepsilon.c.d$$

Equação 21

sendo ε a absortividade molar ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) quando c é dado em mol L^{-1} e d é dado em cm. Desta forma, quando se deseja obter um maior sinal analítico em sistemas cromatográficos onde o monitoramento dos compostos é feito com um detector UV, a concentração dos analitos deverá ser aumentada e/ou a cela empregada no sistema deve ser trocada por uma que apresente maior caminho ótico.

1.2. Detectores de absorção UV

Os detectores de absorção UV são amplamente utilizados em análises cromatográficas para o monitoramento de compostos que absorvem luz UV. Entre os compostos possíveis de serem detectados, incluem-se as substâncias que apresentam dupla ligação ou elétrons compartilhados, como as oleofinas e compostos aromáticos¹⁵⁰.

1.2.1. Detector com comprimento de onda fixo

Nos detectores com comprimento de onda fixo, o monitoramento dos compostos realiza-se através da absorção da luz irradiada a um comprimento de onda. No entanto é importante ressaltar que, uma vez que nenhuma lâmpada é

estritamente monocromática, uma intensidade significativamente menor de luz com outros comprimentos de onda sempre estará presente durante a detecção.

Entre as lâmpadas empregadas neste tipo de detector, a mais utilizada é a de vapor de mercúrio de alta pressão, na qual o comprimento de onda da luz é de 254 nm. As lâmpadas de cádmio e zinco são utilizadas em menor frequência e a luz emitida por elas apresenta, respectivamente, 229 e 214 nm¹⁴⁵.

O detector de comprimento de onda fixo é um dos mais empregados em LC devido a sua boa sensibilidade, linearidade e baixo custo. A detecção nestes equipamentos processa-se quando a luz UV proveniente de uma fonte é colimada para as células de detecção e referência. A intensidade de luz que atravessa estas células é direcionada a um sensor fotoelétrico ligado a um amplificador de sinal. Os sinais luminosos que chegam ao sensor serão adequadamente convertidos para que as informações possam ser coletadas e armazenadas em um sistema de tratamento de dados.

A Figura 41 mostra um esquema bastante simplificado de um detector com comprimento de onda fixo.

Figura 41 – Esquema simplificado de um detector com comprimento de onda fixo.

É importante lembrar que nem todos os detectores UV apresentam uma cela de referência que possibilite registrar a absorção de luz ocorrida pela fase móvel. Quando presente, a resposta obtida através desta cela é empregada para determinar unicamente a absorção apresentada pelos analitos.

1.2.2. Detector com arranjo de diodos

Os detectores com arranjo de diodos utilizam lâmpadas de deutério ou xenônio para a emissão de luz de todos os comprimentos de onda compreendidos na faixa do espectro UV.

A capacidade de fornecer informações espectrais para auxiliar na identificação dos compostos e a possibilidade de verificar a pureza dos picos cromatográficos são algumas das vantagens apresentadas pelos detectores com arranjo de diodos. Além disto, não havendo a necessidade de realizar várias corridas para se obter cromatogramas em diferentes comprimentos de onda, a economia de tempo, solvente e amostra é real.

Estes detectores, no entanto, apresentam como grande desvantagem a baixa sensibilidade ocasionada devido à necessidade de ser realizada uma varredura para obtenção de dados correspondentes aos diversos comprimentos de onda. Apesar disto, sua utilização em sistemas cromatográficos miniaturizados pode ser evidenciada em trabalhos encontrados na literatura¹⁵¹⁻¹⁵³.

Durante uma análise, a luz UV emitida permanece centralizada na cela por intermédio de um sistema de lentes e de uma grade holográfica. A luz que emerge da cela de detecção e chega até a grade holográfica é então dispersada e direcionada ao arranjo de diodos. Ao término de uma análise, os dados obtidos a

partir dos diodos podem ser acionados, possibilitando a obtenção dos cromatogramas correspondentes a qualquer comprimento de onda do espectro UV.

A Figura 42 mostra um esquema simplificado do que ocorre em um detector com arranjo de diodos.

Figura 42 – Esquema simplificado de um detector com arranjo de diodos.

1.2.3. Detector com comprimento de onda variável

O detector com comprimento de onda variável utiliza uma lâmpada de deutério para fornecer luz UV de forma análoga à previamente descrita para um detector com arranjo de diodos. Neste tipo de detector, contudo, o monitoramento dos analitos realiza-se apenas no comprimento de onda selecionado pelo analista.

Devido ao custo relativamente baixo e à boa sensibilidade apresentada por estes detectores, são os mais utilizados atualmente em LC para a realização de análises quantitativas e testes de rotina.

A Figura 43 mostra um esquema simplificado de um detector com comprimento de onda variável.

Figura 43 – Esquema simplificado de um detector com comprimento de onda variável.

Conforme esquematizado na Figura 43, os detectores com comprimento de onda variável baseiam-se em um sistema contendo fendas para a passagem da luz e uma grade móvel. O movimento ordenado desta grade torna possível que somente a parcela de luz com comprimento de onda desejado seja direcionada até a cela de detecção.

1.3. Geometria das celas capilares

A transparência ótica na região UV-VIS e a excelente condutividade térmica dos tubos de sílica fundida justificam sua grande utilização no preparo do caminho ótico de celas de detecção¹⁵⁴ e na confecção de colunas analíticas para cLC.

Nos detectores onde a incidência de luz UV é feita perpendicularmente à superfície de uma coluna capilar, em uma região denominada janela de detecção, as lentes de focalização da luz encontram-se acopladas a um dispositivo que permite a fixação das colunas. Para estes detectores, bastante utilizados em eletroforese capilar e cLC, o formato dos capilares de sílica pode ser considerado uma desvantagem, podendo provocar espalhamento e indesejada reflexão da luz UV na superfície externa e interna dos tubos. Entretanto, quando se deseja minimizar este problema, o uso de tubos capilares com superfície interna quadrada pode vir a ocasionar um considerável ganho de sensibilidade.

A Figura 44 ilustra o posicionamento da janela de detecção em diferentes regiões de uma coluna capilar quando é realizada a detecção *in-column* e *on-column*.

Figura 44 – Ilustração de colunas capilares utilizadas na detecção *in-column* (A) e *on-column* (B).

As celas empregadas na detecção UV para sistemas cromatográficos miniaturizados podem ser classificadas em duas categorias: celas com detecção perpendicular ao fluxo e celas com detecção paralela ao fluxo da fase móvel. Para ambas as geometrias, o formato interno e externo dos tubos utilizados na confecção do caminho ótico interfere na sensibilidade da detecção.

A Figura 45 ilustra as diferentes geometrias apresentadas por celas capilares de detecção UV empregadas em cLC.

Figura 45 – Ilustração da geometria das diferentes celas empregadas em cLC/UV.

Em uma cela onde a detecção realiza-se perpendicularmente ao fluxo, o alargamento de banda pode ser considerado desprezível quando sua tubulação tem d.i. bastante pequeno. Sob esta condição, a sensibilidade alcançada como uso desta cela é bastante baixa devido ao caminho ótico muito reduzido. Para as celas com geometria longitudinal ao fluxo, a sensibilidade pode ser relativamente alta se o caminho ótico foi suficientemente longo, contudo o efeito de dispersão dos picos neste caso será maior^{155,156}.

1.4. Volume da cela

Segundo Sternberg¹⁵⁷, a variância volumétrica ocorrida devido à dispersão ocorrida em uma cela de detecção pode ser representada pela equação

$$\sigma_{V,d}^2 = V_d^2 \quad \text{Equação 22}$$

onde V_d é o volume da cela.

Considerando que o volume de uma cela de detecção deve ser proporcional ao volume máximo de injeção (V_{sm}), Guiochon¹⁵⁸ sugeriu que o volume máximo da cela (V_{dM}) pode ser encontrado pela equação

$$V_{dM} = \frac{V_{sm}}{K} \quad \text{Equação 23}$$

onde K é uma constante relacionada ao projeto do injetor, sendo que esta constante geralmente apresenta valor numérico igual a 2. Desta forma, o valor do V_{dM} pode ser facilmente calculado através da equação

$$V_{dM} = \frac{V_{sm}}{2} \quad \text{Equação 24}$$

A Equação 24 indica que o volume máximo de uma cela de detecção deve ser igual à metade do volume máximo de injeção permitido por uma coluna cromatográfica. Todavia, nos casos em que o volume de injeção do sistema é bem menor do que o volume máximo permitido para determinada coluna analítica, indica-se o uso de uma cela com menor volume para a obtenção de melhor desempenho cromatográfico.

1.5. Durabilidade das celas capilares

O problema mais evidente quando se pensa em utilizar uma cela capilar de detecção consiste na fragilidade apresentada por tais dispositivos. A quebra do tubo capilar na região do caminho ótico, onde o recobrimento de poliimida foi retirado, pode ocorrer quando seu manuseio se faz de forma inadequada. Desta forma, ainda que algumas celas apresentem esta região protegida por uma estrutura metálica e um jogo de lentes focais, impactos mecânicos devem ser evitados para não ocasionar sua ruptura.

Quando instaladas no interior dos detectores e empregadas durante muito tempo, a manutenção das diferentes partes de uma cela de detecção pode ser

exigida. Por apresentarem dimensões bastante reduzidas em relação às celas convencionais, a falta de limpeza das lentes focais e/ou do caminho ótico é um dos principais fatores que podem ocasionar perdas significativas de sinal analítico.

A Figura 46 mostra imagens obtidas de uma cela capilar comercial antes e depois de ser efetuada a limpeza do caminho ótico pela passagem de ácido nítrico.

Figura 46 – Imagens obtidas de uma cela capilar comercial (LC Packings) após uso prolongado (A e B) e depois de ser realizada a limpeza do caminho ótico (C e D).

O uso prolongado de celas de detecção capilares pode vir a causar danos permanentes ao caminho ótico. Quando os procedimentos de limpeza das celas não forem capazes de reverter a perda de sensibilidade comumente observada nestes casos, a troca do tubo capilar de sílica fundida apresenta-se como a única opção para solucionar o problema. Contudo a estrutura fechada da maioria das celas

comerciais não permite que seu reparo seja realizado com facilidade em laboratório, tornando necessário, na maioria das vezes, o reenvio da cela ao fabricante.

Um exemplo do que pode ocorrer quando se utiliza uma cela capilar danificada em sistemas cLC/UV é mostrado na Figura 47.

Figura 47 – Cromatogramas obtidos de análises consecutivas realizadas sob mesmas condições cromatográficas e com o uso de uma cela capilar comercial danificada.

A cela de detecção capilar usada no sistema que promoveu as análises mostradas na Figura 47 havia sido previamente submetida ao procedimento de limpeza. Os cromatogramas presentes na imagem demonstram que o sinal analítico pode decair gradativamente entre a realização de análises consecutivas de uma mesma amostra.

2. Justificativa e objetivos

O desempenho insatisfatório e a baixa sensibilidade apresentada quando células capilares são empregadas em sistemas para cLC/UV faz com que seja necessário o desenvolvimento de pesquisas instrumentais nesta área. Esta etapa do trabalho tem como objetivo a construção de células capilares apropriadas para uso em detectores UV com arranjo de diodos. Uma comparação entre o sinal analítico obtido com o uso das células desenvolvidas e o apresentado por duas células comercialmente disponíveis para cLC será apresentada.

3. Procedimento experimental

3.1. Materiais e reagentes

O preparo das celas de detecção foi feito empregando um bloco de alumínio de alta qualidade, um tubo de aço inox com 250 µm de diâmetro interno, parafusos de aço devidamente apropriados e tubos de sílica fundida com 75 µm de d.i. e 225 µm de d.e., sendo estes obtidos da MicroQuartz. Os padrões analíticos de naftaleno, fenantreno e antraceno, empregados nos testes de desempenho das celas confeccionadas e comerciais, foram cedidos pela Supelco. A uracila utilizada como marcador de tempo morto em todas as análises cromatográficas foi obtida da Sigma. Acetonitrila grau HPLC foi adquirida da J. T. Baker e a água com alta pureza foi obtida de um sistema de purificação Elga. As duas celas comerciais avaliadas foram obtidas da Shimadzu e LC Packings.

3.2. Projeto e desenvolvimento das celas capilares

As celas de detecção que serão apresentadas neste trabalho foram projetadas para uso exclusivo em um detector UV com arranjo de diodos da marca Shimadzu (SPD-M10A_{VP}). Contudo, caso seja desejável o uso destas celas em diferentes modelos de detectores UV do mesmo fabricante, simples alterações no suporte das celas e seus encaixes tornam possível a instalação nos mesmos. As Figuras 48, 49 e 50 mostram com detalhes o projeto matriz das celas de detecção confeccionadas no presente trabalho.

Bloco I

Símbolos de superfícies - rugosidade admissível (µm)

250	63	16	4	1,6		
Variações toleráveis - DIN 7168						
Acima		6	30	120	315	1000
Até	6	30	120	315	1000	2000
mm	±0,1	±0,2	±0,3	±0,5	±0,8	±1,2

Figura 48 – Ilustração parcial do projeto destinado ao desenvolvimento de celas capilares. Bloco I: Peça suporte para encaixe da estrutura central da cela.

Bloco II

Figura 49 – Ilustração parcial do projeto destinado ao desenvolvimento de celas capilares. Bloco II: Primeiro componente da estrutura central da cela.

Bloco III

Figura 50 – Ilustração parcial do projeto destinado ao desenvolvimento de celas capilares. Bloco III: Segundo componente da estrutura central da cela.

Com base no projeto mostrado anteriormente, as partes constituintes das celas de detecção foram confeccionadas em duplicata por uma oficina especializada no preparo e usinagem de peças com alto grau de precisão. Com o objetivo de evitar a reflexão da luz UV pelo alumínio com o qual foram preparadas, todas as peças foram submetidas ao processo de anodização para escurecimento de suas superfícies. Para as duas celas confeccionadas foram adicionados dois pinos guia a um dos blocos, de forma a garantir que o alinhamento entre as peças que compõem sua estrutura central seja perfeito. A Figura 51 mostra uma imagem das duas peças componentes da parte central de uma das celas desenvolvidas.

Figura 51 – Imagem das duas peças que compõem a estrutura central de uma das celas de detecção desenvolvidas no laboratório de cromatografia.

Na primeira cela confeccionada (cela A) neste trabalho, a estrutura central que irá dar suporte ao caminho ótico em seu interior foi feita exatamente de acordo com as especificações do projeto matriz. Nesta estrutura, um orifício com 400 μm de diâmetro foi feito entre a junção das duas peças constituintes, conforme mostrado na Figura 52.

Figura 52 – Imagem da junção dos dois blocos constituintes da estrutura central que compõe a cela A.

Para o preparo das peças constituintes da segunda cela capilar (cela B) produzida neste trabalho, uma pequena alteração no projeto foi realizada. Um tubo de aço inox foi apropriadamente colocado entre as peças da estrutura central para servir de guia ao tubo capilar de sílica fundida destinado a funcionar como caminho ótico. A Figura 53 mostra uma imagem obtida da estrutura central desta cela.

Figura 53 – Imagem do tubo de aço inox e da estrutura central presente na cela B.

3.3. Confeção do caminho ótico

O caminho ótico das celas desenvolvidas foi feito empregando tubos capilares de sílica fundida, sendo o comprimento dos tubos mantido fixo (31 cm) para todas as celas produzidas.

Com o auxílio de um suporte e duas agulhas empregadas em seringas farmacêuticas, os capilares foram expostos com a chama proveniente de um isqueiro tipo maçarico. A moldagem dos tubos de sílica fundida foi realizada de modo que dois ângulos com 90 graus delimitassem a extensão do caminho ótico a aproximadamente 7,92 mm. Após o término deste procedimento, todos os capilares

foram cuidadosamente limpos com acetonitrila para garantir a retirada completa da camada de poliimida carbonizada nas superfícies.

A Figura 54 mostra imagens adquiridas durante a confecção do caminho ótico e após o término deste procedimento.

Figura 54 – Imagens obtidas durante a confecção do caminho ótico (A) e após o término deste procedimento (B).

Para fins de comparação, uma cela capilar comercial que estava com seu caminho ótico danificado foi restaurada. Substituiu-se o tubo capilar originalmente presente nesta cela por outro com d.i. idêntico ao empregado pelo fabricante. O processo de moldagem do tubo capilar foi feito com o mesmo já instalado na cela de detecção, uma vez que esta não possuía um sistema de abertura da estrutura central. A estrutura restaurada, daqui por diante denominada cela C, e sua comparação estrutural com as demais celas produzidas é mostrada na Figura 55.

Figura 55 – Imagem comparativa entre as três celas capilares utilizadas neste trabalho.

3.4. Montagem das celas

O processo de montagem das celas iniciou-se pelo encaixe das peças de metal anodizado e instalação dos tubos capilares previamente preparados para servirem como caminho ótico. A fixação do tubo capilar nas celas foi feita com o uso de uma resina adesiva epóxi com resistência moderada.

Para todas as celas capilares testadas durante esse trabalho foram utilizadas lentes focais provenientes de uma cela capilar comercial (LC Packings).

A Figura 56 mostra uma imagem obtida após a montagem de uma das celas de detecção produzidas neste trabalho.

Figura 56 – Imagem de uma das celas de detecção desenvolvidas neste trabalho.

4. Resultados e Discussão

Os resultados mostrados a seguir foram obtidos com a utilização do sistema cromatográfico previamente descrito no Capítulo 3. Com exceção da troca das celas entre a realização dos experimentos, nenhuma outra alteração instrumental foi efetuada no sistema.

A fase móvel empregada em todos os experimentos realizados era composta por uma mistura com 70% de acetonitrila e 30% de água. A vazão da fase móvel foi de $3,0 \mu\text{L min}^{-1}$ e o volume de injeção de amostra foi de 60 nL, sendo as análises realizadas sob condição isotérmica (30°C). O comprimento de onda selecionado para monitorar simultaneamente todos os analitos foi de 254 nm. A amostra injetada no sistema continha uracila, empregada para atuar como marcador de tempo morto, e padrões analíticos de naftaleno, fenantreno e antraceno.

4.1. Comparação entre as celas desenvolvidas

Nesta etapa de estudo, o desempenho das diferentes celas desenvolvidas e da cela capilar restaurada foi avaliado. Durante a realização de todos os experimentos, a temperatura da sala foi mantida estável a 24°C para que não fosse observada nenhuma alteração no tempo de retenção dos analitos.

Os cromatogramas mostrados na Figura 57 foram obtidos através de análises realizadas com as celas A, B e C. Todas as condições cromatográficas foram reproduzidas nestes experimentos.

Figura 57 – Cromatogramas obtidos utilizando as Celas A, B e C. Volume das celas: 35 nL. Fluxo: 3 $\mu\text{L min}^{-1}$. Volume de injeção: 60 nL. Ordem de eluição: (1) naftaleno, (2) fenantreno e (3) antraceno; Concentração dos analitos: 25 mg L^{-1} .

O primeiro e segundo cromatogramas mostrados na Figura 57 correspondem aos testes realizados com as duas celas desenvolvidas neste trabalho. Nestes cromatogramas, pode ser observado que o sinal analítico gerado pela cela B foi bem maior que o gerado pelo uso da cela A, quando a mesma quantidade de amostra é injetada no sistema.

O sinal analítico relativamente alto constatado quando a cela B foi empregada no sistema deve-se à presença do tubo de aço inox (250 μm de d.i.) na estrutura desta cela. Este tubo metálico permite que seja feita uma melhor centralização do capilar de sílica na estrutura da cela e diminui a intensidade de luz que chega ao sensor sem atravessar pelo caminho ótico. Esta relação estabelecida pode ser considerada válida para outras celas, como é o caso da cela A, que continha um orifício de 400 μm de diâmetro, e da comercial restaurada (último cromatograma mostrado na Figura 57), na qual sua estrutura contém um tubo metálico com dimensão interna de 320 μm . Desta forma, o sinal analítico obtido será mais pronunciado quanto menor o espaço vago entre o capilar de sílica e a estrutura metálica da cela.

A Tabela 13 expõe os valores numéricos que expressam a qualidade do sinal analítico obtido com o uso das diferentes celas capilares avaliadas. Estes valores correspondem à área e à altura dos picos presentes nos cromatogramas mostrados na Figura 57.

A avaliação de diferentes celas em um sistema cromatográfico pode ser demonstrada quando se mantêm fixas as demais condições instrumentais e experimentais entre as análises. Para complementar esta etapa do trabalho, alguns parâmetros cromatográficos foram calculados (Tabela 14) para permitir avaliação do desempenho das celas.

Tabela 13 – Área e altura dos picos cromatográficos quando utilizadas celas com diferentes estruturas e caminho ótico similar.

PAHs - 25 mg/L	Área dos picos		
	Cela A	Cela B	Cela C
Naftaleno (1)	58667,40	218118,60	75360,00
Fenantreno (2)	1298224,20	4860974,10	1610359,20
Antraceno (3)	1273533,50	4577100,50	1570676,00
PAHs - 25 mg/L	Altura dos picos (mAU)		
	Cela A	Cela B	Cela C
Naftaleno (1)	6,20	24,00	8,20
Fenantreno (2)	69,20	295,00	90,00
Antraceno (3)	60,20	245,00	79,00

Tabela 14 - Parâmetros cromatográficos obtidos quando utilizadas diferentes celas de detecção com caminho ótico similar.

Parâmetros cromatográficos	Cela A		
	Naftaleno (1)	Fenantreno (2)	Antraceno (3)
t _r '	6,23	12,88	14,59
w _b	0,26	0,49	0,55
N _{ef.} /metro	61243,23	73700,14	75060,93
R _(2,3)	----	3,29	
Parâmetros cromatográficos	Cela B		
	Naftaleno (1)	Fenantreno (2)	Antraceno (3)
t _r '	5,94	12,28	13,91
w _b	0,24	0,43	0,49
N _{ef.} /metro	65340,00	86993,85	85958,89
R _(2,3)	----	3,54	
Parâmetros cromatográficos	Cela C		
	Naftaleno (1)	Fenantreno (2)	Antraceno (3)
t _r '	6,02	12,52	14,22
w _b	0,24	0,47	0,49
N _{ef.} /metro	67111,85	75690,55	89832,97
R _(2,3)	----	3,54	

Os resultados mostrados na Tabela 13 demonstraram que, mesmo possuindo caminho ótico similar, as pequenas diferenças estruturais presentes nas celas de detecção podem interferir drasticamente na área e na altura dos picos cromatográficos. Os dados obtidos a partir dos cromatogramas indicaram a superioridade do sinal analítico obtido com o uso da cela B. Para o composto fenantreno, a área encontrada para seu pico correspondente foi mais que três vezes superior quando comparada à área do mesmo pico obtido com a utilização das demais celas. Para este mesmo composto, a intensidade do sinal gerado pela cela B é aproximadamente quatro vezes maior do que quando utilizada a cela A e três vezes maior em relação à cela C.

Os valores apresentados na Tabela 14 indicam que as diferenças estruturais entre as celas não afetaram significativamente os parâmetros comumente empregados para avaliar o desempenho cromatográfico. A maior área e intensidade dos picos obtidos com o uso da cela B refletem sua superioridade frente às demais celas, porém isto ocorreu sem que houvesse alargamento da base dos picos cromatográficos. Todavia, quando celas com diferentes volumes e estruturas bastante distintas são empregadas em um mesmo sistema cromatográfico, o desempenho observado para uma mesma coluna cromatográfica pode ser drasticamente afetado. Desta forma, a escolha de uma cela de detecção UV para uso em um sistema cromatográfico deve levar em consideração tanto a sensibilidade analítica como o desempenho cromatográfico que se deseja obter.

4.2. Celas comerciais

Nesta etapa do trabalho, duas celas comerciais comumente empregadas em sistemas cromatográficos miniaturizados foram avaliadas. Os resultados obtidos com estas celas e sua comparação com dados obtidos com a cela B serão mostrados a seguir.

4.2.1. Cella micro

A avaliação da cela micro comercial e sua comparação frente ao desempenho da cela B foram efetuadas a partir de cromatogramas obtidos de análises sob mesmas condições, mostrados na Figura 58.

Figura 58 - Cromatogramas obtidos com o uso de uma cela micro (Shimadzu) e uma cela capilar desenvolvida neste trabalho. Volume da cela micro: não especificado pelo fabricante. Volume da cela B: 35 nL. Fluxo: 3 $\mu\text{L min}^{-1}$. Volume de injeção: 60 nL. Ordem de eluição: (1) naftaleno, (2) fenantreno e (3) antraceno. Concentração dos analitos: 30 mg L^{-1} .

A comparação entre os cromatogramas exibidos na Figura 58 mostra que o tempo de retenção dos analitos permaneceu bem próximo quando a cela micro comercial e a cela B foram empregadas. Ainda que o fabricante da cela comercial não tenha disponibilizado tal informação, provavelmente o d.i. do tubo contido nesta cela apresenta dimensão bem próxima à do tubo capilar utilizado na confecção do caminho ótico da cela B.

A Tabela 15 mostra os valores encontrados para a área e altura de alguns dos picos cromatográficos mostrados nos cromatogramas da Figura 58.

Tabela 15 - Área e altura obtida dos picos cromatográficos quando utilizadas celas de detecção diferentes.

PAHs - 30 mg/L	Área dos picos	
	Cela micro	Cela B
Naftaleno (1)	181224,70	202436,80
Fenantreno (2)	5897277,60	4748276,10
Antraceno (3)	2749920,60	5379031,10
PAHs - 30 mg/L	Altura dos picos (mAU)	
	Cela micro	Cela B
Naftaleno (1)	13,20	25,00
Fenantreno (2)	350,00	350,00
Antraceno (3)	160,00	340,00

Os dados contidos na Tabela 15 indicam que o uso da cela B proporcionou um ganho de sinal analítico em relação à cela micro comercial. Com exceção do pico correspondente ao fenantreno, a utilização da cela B mostrou-se capaz de proporcionar a obtenção de picos cromatográficos com maior área e altura.

Os cromatogramas mostrados na Figura 58 foram também utilizados para calcular alguns parâmetros cromatográficos (Tabela 16) que servirão para avaliar e comparar o desempenho das celas empregadas nesta etapa de estudo.

Tabela 16 - Parâmetros cromatográficos obtidos quando utilizada nas análises uma cela micro comercial (Shimadzu) e a cela B.

Parâmetros cromatográficos	Cela micro		
	Naftaleno (1)	Fenantreno (2)	Antraceno (3)
t _r '	4,98	9,82	11,05
w _b	0,34	0,44	0,47
N _{ef.} /metro	22883,88	53130,80	58960,01
R _(2,3)	----	2,70	
Parâmetros cromatográficos	Cela B		
	Naftaleno (1)	Fenantreno (2)	Antraceno (3)
t _r '	4,98	10,04	11,40
w _b	0,22	0,36	0,42
N _{ef.} /metro	54656,53	82964,28	78585,03
R _(2,3)	----	3,49	

Conforme mostrado na Tabela 16, ainda que o tempo de retenção ajustado dos analitos (t_r') não tenha sofrido grandes variações quanto utilizadas diferentes celas, a menor dispersão dos picos cromatográficos obtidos com o uso da cela B tornou possível a obtenção de análises com maior eficiência e resolução cromatográfica.

4.2.2. Cela capilar

Nesta etapa de estudo, serão apresentados os resultados obtidos na avaliação de uma cela comercializada pra uso exclusivo em sistemas destinados a cLC. Para fins de comparação, a cela B desenvolvida no laboratório foi testada e os cromatogramas obtidos com o uso destas celas, que apresentavam mesmo volume, são mostrados na Figura 59.

Figura 59 - Cromatogramas obtidos com o uso de uma cela capilar comercial (LC Packings) e uma cela capilar desenvolvida neste trabalho. Volume das celas: 35 nL. Fluxo: 3 $\mu\text{L min}^{-1}$. Volume de injeção: 60 nL. Ordem de eluição: (1) naftaleno, (2) fenantreno e (3) antraceno. Concentração dos analitos: 25 mg L^{-1} .

Os experimentos realizados com a cela capilar comercial foram feitos logo após sua aquisição, não havendo portanto qualquer fator que pudesse vir a alterar a qualidade do sinal analítico, como o baixo sinal que poderia ser observado quando este tipo de cela apresenta seu caminho ótico impregnado por impurezas após prolongado uso.

Os cromatogramas apresentados na Figura 59 mostram que, para um mesmo analito, os tempos de retenção observados para os picos correspondentes foram bem distintos com o uso das diferentes celas. De fato, ainda que as condições cromatográficas tenham sido reproduzidas entre as análises, o uso de colunas analíticas diferentes nestes experimentos refletiu no tempo de retenção dos compostos. Neste caso específico, isto não apresenta qualquer relação com as dispersões cromatográficas ocorridas nas tubulações presentes nas celas, uma vez que ambas continham tubos capilares de mesmo diâmetro interno.

Em análises cromatográficas, o tempo em que os compostos ficam retidos pela coluna pode interferir na intensidade do sinal analítico. Geralmente, quando a coluna analítica é trocada ou as condições cromatográficas são alteradas de modo a reter por mais tempo um determinado analito, a tendência é que o pico cromatográfico apresente maior alargamento em sua base e sua intensidade seja reduzida. A comparação entre os picos presentes nos cromatogramas da Figura 59 mostra que a intensidade dos picos foi maior com o uso da cela B, ainda que a coluna analítica usada com esta cela tenha retido por maior tempo os analitos.

Os valores correspondentes a área e altura dos picos presentes nos cromatogramas da Figura 59 são mostrados na Tabela 17.

Tabela 17 - Área e altura obtida dos picos cromatográficos quando utilizadas celas de detecção diferentes (cela capilar comercial e cela B).

PAHs - 25 mg/L	Área dos picos	
	Cela capilar	Cela B
Naftaleno	99694,90	218118,60
Fenantreno	2558420,50	4860974,10
Antraceno	2697488,00	4577100,50
PAHs - 25 mg/L	Altura dos picos (mAU)	
	Cela capilar	Cela B
Naftaleno	10,70	24,00
Fenantreno	166,00	295,00
Antraceno	156,00	245,00

Os dados contidos na Tabela 17 mostram que a área e a altura encontradas para os picos quando utilizada a cela B foram bastante superiores às obtidas quando utilizada a cela capilar comercial. Para o pico correspondente ao naftaleno, a área encontrada com o uso da cela B foi mais que duas vezes maior quando comparada à área do mesmo pico obtido com a utilização da cela comercial. Para este mesmo composto, a intensidade do sinal gerado pela cela B foi praticamente duplicada em relação à intensidade do pico obtido com a cela capilar comercial.

A Tabela 18 contém alguns dos parâmetros cromatográficos utilizados para avaliar a cela capilar comercial e a cela B desenvolvida neste trabalho.

Tabela 18 - Parâmetros cromatográficos obtidos quando utilizada uma cela de detecção capilar comercial e a cela B.

Parâmetros cromatográficos	Cela capilar comercial		
	Naftaleno (1)	Fenantreno (2)	Antraceno (3)
t _r '	5,13	10,28	11,58
w _b	0,27	0,43	0,48
N _{ef.} /metro	38506,67	60964,64	62081,67
R _(2,3)	----	2,86	
Parâmetros cromatográficos	Cela B		
	Naftaleno (1)	Fenantreno (2)	Antraceno (3)
t _r '	5,94	12,28	13,91
w _b	0,24	0,43	0,49
N _{ef.} /metro	65340,00	86993,85	85958,89
R _(2,3)	----	3,54	

Os parâmetros cromatográficos mostrados na Tabela 18 indicam que o aumento no tempo de retenção dos analitos devido ao uso de uma coluna cromatográfica diferente da empregada nas análises com a cela comercial não foi acompanhado por um significativo alargamento na largura da base (w_b) dos picos. Sob tais condições, o número de pratos efetivos obtido para qualquer um dos analitos contidos na amostra foi maior com o uso da cela B.

A comparação entre o desempenho das celas não pode ser concluída totalmente devido ao emprego das diferentes colunas, contudo os dados mostrados na Tabela 17 indicam que, ainda que as celas utilizadas apresentassem mesmo comprimento e volume do caminho ótico, as propriedades particulares da estrutura da cela B proporcionaram grande aumento de sensibilidade na detecção. De fato, a confecção do caminho ótico presente na cela B foi realizada de modo a minimizar a reflexão da luz UV durante a detecção, sendo isto possível somente devido a esta cela permitir a moldagem dos capilares fora de sua estrutura. Além disto, o tubo de aço inox presente na estrutura central da cela B apresentava d.i. menor que o contido na cela comercial, fazendo com que uma menor intensidade de luz percorresse a cela por regiões externas ao caminho ótico.

5. Conclusões

A possibilidade de preparo de células capilares de detecção UV em laboratório foi demonstrada com sucesso. O estudo da influência da estrutura das diferentes células produzidas sobre a qualidade do sinal analítico foi realizado. Entre as células desenvolvidas, a estrutura presente na célula B fez com que a sensibilidade alcançada com esta célula fosse bastante satisfatória, sendo seu desempenho considerado superior quando comparado a uma célula capilar comercial.

CAPÍTULO 5

Conclusões gerais

A confecção de colunas capilares para LC com alta eficiência, através da técnica de empacotamento com partículas em suspensão, e o estudo da influência dos parâmetros de preparo no desempenho destas colunas foi realizado com sucesso. Os testes efetuados com amostras contendo hidrocarbonetos aromáticos polinucleares revelaram que colunas com grande eficiência podem ser produzidas sob baixa pressão de empacotamento. A produção de colunas monolíticas foi realizada em laboratório e a possibilidade de obter análises bastante rápidas com estas colunas foi demonstrada neste trabalho.

A aplicação da programação de temperatura em colunas capilares foi considerada uma boa alternativa para reduzir o tempo das análises, sem que se faça necessário o uso de gradiente de fase móvel. O tempo de duração das análises de tetraciclinas e esteróides por TP-cLC foi bastante pequeno quando comparado ao obtido em análises sob condições isotérmicas. O uso de alta temperatura durante estas análises não ocasionou perda de eficiência cromatográfica ou degradação térmica dos analitos.

A produção em laboratório de celas capilares de detecção UV com bom desempenho foi demonstrada. O sinal analítico obtido com uma das celas confeccionadas foi considerado superior ao obtido com o uso de duas celas de detecção comumente empregadas em sistemas cromatográficos miniaturizados.

CAPÍTULO 6

Referências bibliográficas

1. COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: UNICAMP, 1995. 279 p.
2. GOLAY, M. J. E. **Gas chromatography**. London: Butterworths, 1958. 36 p.
3. HORVÁTH, C.G.; PREISS, B.A.; LIPSKY, S.R. Fast liquid chromatography - an investigation of operating parameters and separation of nucleotides on pellicular ion exchangers. **Analytical Chemistry**, v. 39, n.12, p. 1422- 1428, 1967.
4. HORVÁTH, C.G.; LIPSKY, S.R. Rapid analysis of ribonucleosides and bases at picomole level using pellicular cation exchange resin in narrow bore columns. **Analytical Chemistry**, v. 41, n. 10, p.1227-1234, 1969.
5. ISHII, D.; ASAI, K.; HIBI, K.; JONOKUCHI, T.; NAGAYA, M. Study of micro-high-performance liquid-chromatography .1. development of technique for miniaturization of high-performance liquid-chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 144, n. 2, p. 157-168, 1977.
6. ISHII, D.; HIBI, K.; ASAI, K.; JONOKUCHI, T. Studies of micro high-performance liquid-chromatography .2. application to gel-permeation chromatography of techniques developed for micro high-performance liquid-chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 151, n. 2, p. 147-154, 1978.
7. SCOTT, R. P. W.; KUCERA, P. Exclusion properties of some commercially available silica-gels. **Journal of Chromatography**, v. 125, n. 1, p. 251-263, 1976.
8. SCOTT, R. P. W; KUCERA, P. Mode of operation and performance-characteristics of microbore columns for use in liquid-chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 169, p. 51-72, 1979.
9. TSUDA, T.; NOVOTNY, M. Packed microcapillary columns in high performance liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 50, n. 2, p. 271-275, 1978.
10. 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.
11. TAKEUCHI, T.; ISHII, D. High-performance micro packed flexible columns in liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 213, p. 25-32, 1981.

12. TAKEUCHI, T.; ISHII, D. Micro-high-performance liquid chromatography with long micro-packed flexible fused-silica columns. **Journal of Chromatography**, v. 238, p. 409-418, 1982.
13. ISHII, D. **Introduction to microscale high-performance liquid chromatograph**. New York: VCH, 1988. 208 p.
14. 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**, v. 10, n. 5, p. 280-287, 1987.
15. BARTH, H. G.; BARBER, W. E.; LOCHMUELLER, C. H.; MAJORS, R. E.; REGNIER, F. E. Column liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 60, n. 12, p. 387-435, 1988.
16. MEYER, V. R. **Practical high-performance liquid chromatography**. New York: John Wiley, 1992. 300 p.
17. CHERVET, J. P.; URSEM, M.; SALZMANN, J. P. Instrumental requirements for nanoscale liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 9, p. 1507-1512, 1996.
18. VERZELE, M.; DE WEERDT, M.; DEWAELE, C.; DE JONG, G. J.; LAMMERS, N.; SPRUIT, F. Microcolumn lc: Is it worth it? **LC-GC**, v. 4, n. 12, p. 1162-1177, 1986.
19. COUTINHO, Lincoln Figueira Marins. **Desenvolvimento de instrumentação dedicada à cromatografia líquida capilar**. 2008. 219 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
20. LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: Rima, 2004. 62 p.
21. NEUE, U. D. **HPLC columns**. New York: Wiley-VCH, 1997. 393 p.
22. PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. S.; REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1190-1198, 2008.

23. YANG, F. J. Fused-silica narrow-bore microparticle-packed-column high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 236, p. 265-277, 1982.
24. ANDREOLINI, F.; BORRA, C.; NOVOTNY, M. Preparation and evaluation of slurry-packed capillary columns for normal-phase liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 59, p. 2428-2432, 1987.
25. KARLSSON, K. E.; NOVOTNY, M. Separation efficiency of slurry-packed liquid chromatography microcolumns with very small inner diameters. **Analytical Chemistry**, v. 60, p. 1662-1665, 1988.
26. ZIMINA, T.; SMITH, R. M.; HIGHFIELD, J. C.; MYERS, P.; KING, B. W. Study of the flow development during the slurry packing of microcolumns for liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 728, p. 33-45, 1996.
27. CRESCENTINI, G.; BRUNER, F.; MANGANI, F.; YAFENG, G. Preparation and evaluation of dry-packed capillary columns for high-performance liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 60, p. 1659-1662, 1988.
28. MALIK, A.; LI, W.; LEE, M. L. J. Preparation of long packed capillary columns using carbon dioxide slurries. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 5, p. 361-369, 1993.
29. TONG, D.; BARTLE, K. D.; CLIFFORD, A. A. Preparation and evaluation of supercritical carbon dioxide-packed capillary columns for HPLC and SFC. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 6, p. 249-255, 1994.
30. KOIVISTO, P.; DANIELSSON, R.; MARKIDES, K. E. Factors affecting the preparation of packed capillary columns in supercritical carbon dioxide media. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 9, p. 97-103, 1997.
31. PLANETA, J.; KARASEK, P.; VEJROSTA, J. Development of packed capillary columns using carbon dioxide slurries. **Journal of Separation Science**, v. 26, p. 525-530, 2003.
32. REZEMINI, Andrea Lucia. **Estudo do empacotamento e avaliação de colunas para cromatografia líquida capilar**. 1997. 104 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997.

33. PRETORIUS, V.; SMUTS, T.W. Turbulent flow chromatography: a new approach to faster analysis. **Analytical Chemistry**, v. 38, p. 274-281, 1966.
34. KNOX, J.H.; GILBERT, M.T. Kinetic optimization of straight open-tubular liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.186, p. 405-418, 1979.
35. LIU, G.; DJORDJEVIC, N.M.; ERNI, F. High-temperature open-tubular capillary column liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 592, p. 239-247, 1992.
36. LIU, G.; DJORDJEVIC, N.M.; ERNI, F. Reversed- and normal-phase separations by high-temperature open-tubular column liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 598, p. 153-158, 1992.
37. ROSS, W. D.; JEFFERSON, R. T. In situ-formed open-pore polyurethane as chromatography supports. **Journal Chromatographic Science**, v. 8, p. 386–395, 1970.
38. HJERTÉN, S.; LIAO, J. L. Simultaneous determination of nine food additives using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 457, p. 333-343, 1988.
39. SVEC, F.; FRÉCHET, J. M. J. Novel continuous rods of macroporous polymer as High-Performance Liquid Chromatography Separation Media. **Analytical Chemistry**, v. 64, p. 820-822, 1992.
40. MINAKUCHI, H.; NAKANISHI, K.; SOGA, N.; ISHISUKA, N.; TANAKA, N. Octadecylsilylated porous silica rods as separation media for reversed-phase liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 3498-3501, 1996.
41. ASIAIE, R.; HUANG, X.; FARNAN, D.; HORVATH, C. Sintered octadecylsilica as monolithic column packing in capillary electrochromatography and micro high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 806, p. 251-263, 1998.
42. DULAY, M. T.; KULKARNI, R. P.; ZARE, R. N. Preparation and Characterization of Monolithic Porous Capillary Columns Loaded with Chromatographic Particles. **Analytical Chemistry**, v. 70, p. 5103-5107, 1998.

43. ZHANG, X.; HUANG, S. Single step on-column frit making for capillary high-performance liquid chromatography using sol-gel technology. **Journal of Chromatography A**, v. 910, p. 13-18, 2001.
44. CHANNER, B.; UHL, P. U.; EUEBY, M. R.; MCKEOWN, A. P.; LOMAX, H.; SKELLERN, G. G.; WATSON, D. G. Practical evaluation of sol-gel and hydrothermal fritting technologies for rapid column fabrication and its application in capillary electrochromatography and micro-liquid chromatography. **Chromatographia**, v. 58, p. 135-144, 2003.
45. PIRAINO, S. M.; DORSEY, J. G. Comparison of frits used in the preparation of packed capillaries for capillary electrochromatography. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 4292-4296, 2003.
46. SVEC, F. Preparation and HPLC applications of rigid macroporous organic polymer monoliths. **Journal of Separation Science**, v. 27, p. 747-766, 2004.
47. SVEC, F. Organic polymer monoliths as stationary phases for capillary HPLC. **Journal of Separation Science**, v. 27, p. 1419-1430, 2004.
48. SVEC, F. Recent developments in the field of monolithic stationary phases for capillary electrochromatography. **Journal of Separation Science**, v. 28, p. 729-745, 2005.
49. KŁODZINSKA, E.; MORAVCOVA, D.; JANDERA, P.; BUSZEWSKI, B. Monolithic continuous beds as a new generation of stationary phase for chromatographic and electro-driven separations. **Journal of Chromatography A**, v. 1109, p. 51-9, 2006.
50. JANDERA, P.; URBAN, J.; MORAVCOVÁ, D. Polymetacrylate and hybrid interparticle monolithic columns for fast separations of proteins by capillary liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1109, p. 60-73, 2006.
51. HUANG, X.; ZHANG, S.; SCHULTZ, G. A.; HENION, J. Surface-alkylated polystyrene monolithic columns for peptide analysis in capillary liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 2336-2344, 2002.
52. SIOUFFI, M. A. Silica gel-based monoliths prepared by the sol-gel method: facts and figures. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 801-818, 2003.

53. GAO, W.; YANH, G.; YANG, J.; LIU, H. Formation of the monolithic silica gel column with bimodal pore structure. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 28, p. 379-386, 2004.
54. LI, W.; FRIES, D. P.; MALIK, A. Sol-gel stationary phases for capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1044, p. 23-52, 2004.
55. KANG, J.; WISTUBA, D.; SCHURIG, V. A silica monolithic column prepared by the sol-gel process for enantiomeric separation by capillary electrochromatography. **Electrophoresis**, v. 23, p. 1116-1120, 2002.
56. MOTOKAWA, M.; KOBAYASHI, H.; ISHIZUKA, N.; MINAKUCHI, H.; NAKANISHI, K.; JINNAI, H.; HOSOYA, K.; IKEGAMI, T.; TANAKA, N. Monolithic silica columns with various skeleton sizes and through-pore sizes for capillary liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 96, p. 53-63, 2002.
57. KOBAYASHI, H.; KAJIWARA, W.; INUI, Y.; HARA, T.; HOSOYA, K.; IKEGAMI, T.; TANAKA, N. Chromatographic properties of monolithic silica capillary columns for polar and nonpolar compounds in reversed-phase HPLC. **Chromatographia**, v. 60, p. S19-S25, 2004.
58. ADAM, T.; UNGER, K. K.; DITTMANN, M. M.; ROZING, G. P. Towards the column bed stabilization of columns in capillary electroendosmotic chromatography. Immobilization of microparticulate silica columns to a continuous bed. **Journal of Chromatography A**, v. 887, p. 327-337, 2000.
59. TANG, Q.; XIN, B.; LEE, M. L. Monolithic columns containing sol-gel bonded octadecylsilica for capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 837, p. 35-50, 1999.
60. CABRERA, K. Applications of silica-based monolithic HPLC columns. **Journal of Separation Science**, v. 27, p. 843-852, 2004.
61. RIEUX, L., NIEDERLANDER, H., VERPOORTE, E.; BISCHOFF, R. Silica monolithic columns: synthesis, characterisation and applications to the analysis of biological molecules. **Journal of Separation Science**, v. 28, p. 1628-1641, 2005.
62. ZOU, H.; HUANG, X.; YE, M.; LUO, Q. Monolithic stationary phases for liquid chromatography and capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 954, p. 5-32, 2002.

63. GUSEV, I.; HUANG, X.; HORVATH, C. Capillary columns with in situ formed porous monolithic packing for micro high-performance liquid chromatography and capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 855, p. 273-290, 1999.
64. QUIGLEY, C. L.; MARLIN, N.; SMITH, N. W. Comparison of styrene-divinylbenzene-based monoliths and vydac nano-liquid chromatography columns for protein analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1030, p. 195-200, 2004.
65. LEE, D.; SVEC, F.; FRÉCHET, J. M. J. Photopolymerized monolithic capillary columns for rapid μ -HPLC separation of proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 1051, p. 53-60, 2004.
66. HOBO, T.; UCHIYAMA, K.; CHEN, Z. Chemically modified chiral monolithic silica column for the enantioseparation by μ -HPLC. **Journal of Chromatography A**, v. 942, p. 83-91, 2002.
67. YIN, J. F.; YANG, G. L.; CHEN, Y. Rapid and efficient chiral separation of nateglinide and its L-enantiomer on monolithic molecularly imprinted polymers. **Journal of Chromatography A**, v. 1090, p. 68-75, 2005.
68. LIU, H.; ROW, K. H.; YANG, G. Monolithic molecularly imprinted columns for chromatographic separation. **Chromatographia**, v. 61, p. 429-432, 2005.
69. NAWROCKI, J.; DUNLAP, C.; MCCORMICK, A.; CARR, P. W. Part I. Chromatography Using Ultra-Stable Metal Oxide-Based Stationary Phases for HPLC. **Journal of Chromatography A**, v. 1028, p. 1-31, 2004.
70. Nawrocki, J.; Dunlap, C.; Li, J.; Zhao, J.; McNeff, C. V.; McCormick, A.; Carr, P. W.; Part II. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC. **Journal of Chromatography A**, v. 1028, p. 31-61, 2004.
71. HOTH, D. C.; RIVERA, J. G.; COLÓN, L. A. Metal oxide monolithic columns. **Journal of Chromatography A**, v. 1079, p. 392-396, 2005.
72. RANDON, J.; HUGUET, S.; PIRAM, A.; PUY, G.; DEMESMAY, C.; ROCCA, J. L. Synthesis of zirconia monoliths for chromatographic separation. **Journal of Chromatography A**, v. 1109, p. 19-25, 2006.

73. GREIBROKK, T.; ANDERSEN, T. Temperature programming in liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 24, p. 899-909, 2001.
74. HOLM, A.; MOLANDER, P.; LUNDANES, E.; GREIBROKK, T. Novel column oven concept for cold spot large volume sample enrichment in high throughput temperature gradient capillary liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 26, p. 1147-1153, 2003.
75. STRAIN, H. H. Conditions affecting the sequence of organic compounds in tswett adsorption columns. **Industrial and Engineering Chemistry- Analytical Edition**, v. 18, n. 10, p. 605-609, 1946.
76. HENSSE, G.; ENGELHARDT, H. Temperaturprogrammierung bei der adsorptionschromatographie von lösungen. **Journal of Chromatography**, v. 21, p. 228-238, 1966.
77. GRUSHKA, E.; KIKTA, E. J. New polar bonded liquid chromatography phase. **Analytical Chemistry**, v. 46, n. 11, p. 1370-1375, 1974.
78. KARGER, B. L.; GANT, J. R.; MARTKOPF, A.; WEINER, P. H. Hydrophobic effects in reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 128, n. 1, p. 65-78, 1976.
79. TAKEUCHI, T.; WATANABE, Y.; ISHII, D. Role of column temperature in micro high performance liquid chromatography. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 4, n. 6, p. 300-302, 1981.
80. HIRATA, Y.; SUMIYA, E. Temperature-programmed reversed-phase liquid chromatography with packed fused-silica columns. **Journal of Chromatography**, v. 267, p. 125-131, 1983.
81. BOWERMASTER, J.; MCNAIR, H. Microbore high-performance liquid chromatographic columns: speed, efficiency, sensitivity and temperature programming. **Journal of Chromatography**, v. 279, p. 431-438, 1983.
82. JINNO, K.; PHILLIPS, J. B.; CARNEY, D. P. Temperature-controlled high-speed microcolumn liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 57, n. 2, p. 574-576, 1985.

83. MCNAIR, H.; BOWERMASTER, J. Microbore hplc column performance and temperature programming capabilities. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 10, n. 1, p. 27-31, 1987.
84. LIU, G.; DJORDJEVIC, N. M.; ERNI, F. High-temperature open-tubular capillary column liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 592, p. 239-247, 1992.
85. DJORDJEVIC, N. M.; STEGEHUIS, D.; LUI, G.; ERNI, F. Improved ultraviolet detection in high-temperature open-tubular liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 629, p. 135-141, 1993.
86. MOLANDER, P.; OMMUNDSEN, E.; GREIBROKK, T. High temperature injection in capillary high temperature liquid chromatography. **Journal of Microcolumn Separation**, v. 11, p. 612-619, 1999.
87. TRONES, R.; TANGEN, A.; LUND, W.; GREIBROKK, T. Packed capillary high-temperature liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 835, p. 105-112, 1999.
88. MOLANDER, P.; TRONES, R.; HAUGLAND, K.; GREIBROKK, T. Aspects and applications of non-aqueous high temperature packed capillary liquid chromatography. **Analyst**, v. 124, p. 1137-1141, 1999.
89. HAZOTTE, A.; LIBONG, D.; MATOGA, M.; CHAMINADE, P. High-temperature micro liquid chromatography for lipid molecular species analysis with evaporative light scattering detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1140, p. 131-139, 2007.
90. MOLANDER, P.; THOMMENSEN, S. J.; BRUHEIM, I. A.; TRONES, R.; GREIBROKK, T.; LUNDANES, E.; GUNDERSEN, T. E. Temperature-programmed packed capillary liquid chromatography separation with large volume on-column focussing of retinyl esters. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 22, n. 9, p. 490-494, 1999.
91. NORDSTROM, O.; MOLANDER, P.; GREIBROKK, T.; BLOMHOFF, R.; LUNDANES, E. Evaluation of temperature programming for gradient elution in packed capillary liquid chromatography coupled to electrochemical detection. **Journal of Microcolumn Separation**, v. 13, n. 5, p. 179-185, 2001.

92. MOLANDER, P.; GREIBROKK, T.; IVELAND, A.; OMMUNDSEN, E. Simultaneous dual-mechanism separation of a semicrystalline polymers blend on large-pore silica by temperature-programmed packed capillary chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 24, p. 136-140, 2001.
93. ANDERSEN, T.; HOLM, A.; SKULAND, I. L.; TRONES, R.; GREIBROKK, T. Characterization of complex mixtures of polyglycerol fatty acid esters using temperature and solvent gradients in packed capillary lc. **Journal of Separation Science**, v. 26, p. 1133-1140, 2003.
94. ANDERSEN, T.; SKULAND, I. L.; HOLM, A.; TRONES, R.; GREIBROKK, T. Temperature-programmed packed capillary liquid chromatography coupled to evaporative light-scattering detection and electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry for characterization of high-molecular-weight hindered amine light stabilizers. **Journal of Chromatography A**, v. 1029, p. 49-56, 2004.
95. TIAN, H.; XU, J.; GUAN, Y. Axial temperature gradient and mobile phase gradient in microcolumn high-performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 72, n. 2, p. 813-818, 2007.
96. BOWERMASTER, J.; MCNAIR, H. Temperature programmed microbore hplc - part i. **Journal of Chromatographic Science**, v. 22, p. 165-170, 1984.
97. CHEN, M. H.; HORVÀTH, C. Temperature programming and gradient elution in reversed-phase chromatography with packed capillary columns. **Journal of Chromatography A**, v. 788, p. 51-61, 1997.
98. SNYDER, L.; KIRKLAND, J. J. **Introduction to modern liquid chromatography**. 2. ed. New York: Wiley, 1979. 863 p.
99. LI, J.; CARR, P.W. Effect of temperature on the thermodynamic properties, kinetic performance, and stability of polybutadiene-coated zirconia. **Analytical Chemistry**, v. 69, p. 837-843, 1997.
100. MOLANDER, P.; GUNDERSEN, T. E.; HAAS, C.; GREIBROKK, T.; BLOMHOFF, R.; LUNDANES, E. Determination of retinoids by packed-capillary liquid chromatography with large-volume on-column focusing and temperature optimization. **Journal of Chromatography A**, v. 847, p. 59-68, 1999.

101. DOLAN, J. W.; SNYDER, L. R.; DJORDJEVIC, N. M.; WOLCOTT, R. G.; BACZEK, T.; KALISZAN, R.; SANDER, L. C. Reversed-phase liquid chromatographic separation of complex samples by optimizing temperature and gradient time iii. Improving the accuracy of computer simulation. **Journal of Chromatography A**, v. 857, p. 41-68, 1999.
102. THOMPSON, J.; CARR, P. W. A study of the critical criteria for analyte stability in high-temperature liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 1017-1023, 2002.
103. TRONES, R.; ANDERSEN, T.; GREIBROKK, T.; HEGNA, D. R. Hindered amine stabilizers investigated by the use of packed capillary temperature-programmed liquid chromatography: i. Poly ((6-((1,1,3,3-tetramethylbutyl)-amino) - 1,3,5-triazine-2,4-diyl) (2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidyl)imino)-1,6-hexanediyl((2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidyl)imino)). **Journal of Chromatography A**, v. 874, p. 65-71, 2000.
104. SHENG, G.; SHEN, Y.; LEE, M. L. Elevated temperature liquid chromatography using reversed-phase packed capillary columns. **Journal of Microcolumn Separation**, v. 9, n. 2, p. 63-72, 1997.
105. BULLOCK, J. High-temperature reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of a synthetic copolymer on a non-porous support. **Journal of Chromatography A**, v. 694, n. 2, p. 415-423, 1995.
106. KEPHART, T. S.; DASGUPTA, P. K. Hot eluent capillary liquid chromatography using zirconia and titania based stationary phases. **Analytica Chimica Acta**, v. 414, p. 71-78, 2000.
107. HAZOTTE, A.; LIBONG, D.; MATOGA, M.; CHAMINADE, P. Comparison of universal detectors for high-temperature micro liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1170, p. 52-61, 2007.
108. MOLANDER, P.; THOMASSEN, A.; KRISTOFFERSEN, L.; GREIBROKK, T.; LUNANDES, E. Simultaneous determination of citalopram, fluoxetine, paroxetine and theirs metabolites in plasma by temperature-programmed packed capillary liquid chromatography with on-column focusing of larges volume injection. **Journal of Chromatography B**, v. 766, p. 77-87, 2002.
109. BRUHEIM, I.; MOLANDER, P.; OMMUNDSEN, E.; LUNANDES, E.; GREIBROKK, T. Temperature-programmed packed capillary liquid chromatography coupled to fourier-transform infrared spectroscopy. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 23, n. 9, p. 525-530, 2000.

110. TRONES, R.; ANDERSEN, T.; HUNNES, I.; GREIBROKK, T. Modified laser light scattering detector for use in high temperature micro liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 814, p. 55-61, 1998.
111. DJORDJEVIC, N. M.; HOUDIERE, F.; FOWLER, P.; NATT, F. Hplc separation of oligonucleotides in isocratic and temperature-programmed mode. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 9, p. 1921-1925, 1998.
112. TRONES, R.; ANDERSEN, T.; GREIBROKK, T. Improved modification of laser light-scattering detector for use in packed capillary high temperature liquid chromatography. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 22, n. 5, p. 283-286, 1999.
113. OPENHAIM, G.; GRUSHKA, E. Temperature dependent refractive index issues using uv-visible detector in high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 942, p. 63-71, 2002.
114. ANDERSEN, T.; HOLM, A.; SKULAND, I. L.; TRONES, R.; GREIBROKK, T. Mesoporous butadiene-modified zirconia for high-temperature packed capillary liquid chromatography: column preparation and temperature programming stability. **Journal of Chromatography A**, v. 1018, p. 7-18, 2003.
115. YANG, X.; MA, L.; CARR, P. W. High temperature fast chromatography of proteins using silica-based stationary phase with greatly enhanced low pH stability. **Journal of Chromatography A**, v. 1079, p. 213-220, 2005.
116. SANAGI, M. M.; SEE, H. H. High temperature liquid chromatography on a poly(styrene-divinylbenzene) stationary phase. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 28, p. 3065-3076, 2005.
117. SANAGI, M. M.; SEE, H. H.; IBRAHIM, W. A. W.; ABU NAIM, A. High temperature liquid chromatography of tocol-derivatives on polybutadiene-coated zirconia stationary phase. **Chromatographia**, v. 61, p. 567-571, 2005.
118. J. NYHOLM, L. M.; MARKIDES, K. E. Column preparation for reversed- phase high - temperature open tubular column liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 813, p. 11-20, 1998.
119. C. YANG, Y. Stationary phases for lc separations at elevated temperatures. **LCGC North America**, v. 24, p. 53-58, 2006.

120. CLAESSENS, H. A.; VAN STRATEN, M. A. Review on the chemical and thermal stability of stationary phase for reverse-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1060, p. 23-41, 2004.
121. E. NAWROCKI, J.; DUNLAP, L.; MCCORMICK, A.; CARR, P. W. Part I. Chromatography using ultra-stable metals oxide-based stationary phase for hplc. **Journal of Chromatography A**, v. 1028, p. 1-30, 2004.
122. JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, v. 1060, december, 2004. 257 p. edition special.
123. VANHOENACKER, G.; SANDRA, P. Elevated temperature and temperature programming in conventional liquid chromatography – fundamentals and applications. **Journal of Separation Science**, v. 29, p. 1822-1835, 2006.
124. OKA, H.; ITO, Y.; MATSUMOTO, H. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotic in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 882, p. 109-133, 2000.
125. TSAI, W-H.; HUANG, T-C.; HUANG, J-J.; HSUE, Y-H.; CHUANG, H-Y. Dispersive solid-phase microextraction method for sample extraction in the analysis of four tetracyclines in water and milk samples by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 2263-2269, 2009.
126. CARRASCO-PANCORBO, A.; CASADO-TERRONES, S.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNANDEZ-GUTIERREZ, A. Reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to ultraviolet and electrospray time-of-flight mass spectrometry on-line detection for the separation of eight tetracyclines in honey samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1195, p. 107-116, 2008.
127. BLASCO, C.; DI CORCIA, A.; PICO, Y. Determination of tetracyclines in multi-specie animal tissues by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, p. 116, p. 1005-1012, 2009.
128. MAMANI, M. C. V.; REYES, F. G.; RATH, S. Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using hplc-dad. **Food Chemistry**, v. 117, p. 545-552, 2009.

129. CRISTOFANI, E.; ANTONINI, C.; TOYO, G.; FIORONI, L.; PIERSANTI, A.; GALARINI, R. A confirmatory method for the determination of tetracyclines in muscle using high-performance liquid chromatography with diode-array detection. **Analytica Chimica Acta**, n. 637, p. 40-46, 2009.
130. ANDREU, V.; VAZQUEZ-REIG, P.; BLASCO, C.; PICO, Y. Determination of tetracycline residues in soil by pressurized liquid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical & Bioanalytical Chemistry**, v. 394, p. 1329-1339, 2009.
131. XU, J.; DING, T.; WU, B.; YANG, W.; ZANG, X.; LIU, Y.; SHEN, C.; JIANG, Y. Analysis of tetracycline residues in royal jelly by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 868, p. 42-48, 2008.
132. LANÇAS, F. M.; RODRIGUES, J. C.; FREITAS, S. S. Preparation and use of packed capillary columns in chromatographic and related techniques. **Journal of Separation Science**, v. 27, p. 1475-1482, 2004.
133. NIKOLAIDOU, K. I.; SAMANIDOU, V. F.; PAPAIOYANNIS, I. N. Development and validation of an hplc confirmatory method for the determination of seven tetracyclines antibiotics residues in bovine and porcine muscle tissues according to 2002/657/ EC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 31, p. 3032-3054, 2008.
134. SNAPE, C. E.; MEREDITH, W.; GOMES, R. L. Conjugated steroids: analytical approaches and applications. **Analytical & Bioanalytical Chemistry**, v. 393, p. 453-458, 2009.
135. PETEGHEM, C. V.; POUCKE, C. V.; BLASCO, C. Analysis of meat samples for anabolic steroids residues by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1154, p. 230-239, 2007.
136. GROWIK, P.; STACHEL, C. S.; SCHMIDT, K. S. In-house validation and factorial effect analysis of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of steroids in bovine muscle. **Analytica Chimica Acta**, n. 637, p. 156-164, 2009.
137. HIGASHI, T.; MITAMURA, K.; SHIMADA, K. Gas chromatography and high-performance liquid chromatography of natural steroids. **Journal of Chromatography A**, v. 935, p. 141-172, 2001.

138. SMITH, R. M.; AL-KHATEEB, L. A. High-temperature liquid chromatography of steroids on a bonded hybrid column. **Analytical & Bioanalytical Chemistry**, v. 394, p. 1255-1260, 2009.
139. JONES, K.; MALCOLME-LAWES, D. J. High-performance ultraviolet absorption detector for liquid chromatography – i. preliminary experiments. **Journal of Chromatography**, v. 329, p. 25-32, 1985.
140. JONES, K.; MALCOLME-LAWES, D. J. High-performance ultraviolet absorption detector for liquid chromatography – ii. a prototype detector. **Journal of Chromatography**, v. 441, p. 387-393, 1988.
141. ENAMI, T.; NAGAE, N. UV absorption detection with a packed flow cell in microcolumn liquid chromatography. **Analisis Magazine**, v. 26, n. 5, p. 31-33, 1998.
142. PRUB, A.; KEMPTER, C.; GYSLER, J.; JIRA, T. Extracolumn band broadening in capillary liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1016, p. 129-141, 2003.
143. BANHOLCZER, A.; PYELL, U. In-column versus on-column photometric detection in capillary electrochromatography with capillaries packed with octadecylsilica gel. **Journal of Microcolumn Separation**, v. 10, n. 4, p. 321-328, 1998.
144. KAMAHORI, M.; WATANABE, Y.; MIURA, J.; TAKI, M. High-sensitivity micro ultraviolet absorption detector for high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 465, p. 227-232, 1989.
145. VISSERS, Johannes Petrus Cornelis. **Capillary lc columns – packing techniques and applications**. 1998. 207 f. Thesis (doctoral) - Technische Universiteit Eindhoven, Holanda, 1998.
146. CHERVET, J. P.; URSEM, M.; VANNOORT, R. W.; SALZMANN, J. P. Ultra-sensitive uv detection in micro separation. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 12, n. 5, p. 278-281, 1989.
147. MORING, S. E.; REEL, R. T. Optical improvements of a z-shaped cell for high-sensitivity uv absorbance detection in capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 65, p. 3454-3459, 1993.

148. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Editora Bookman, 2002. 836 p.
149. LENDI, B. E.; MEYER, V. R. The uv detector for hplc – a ongoing success story. **LCGC Europe**, v. 3, p. 156-163, 2005.
150. SCOTT, R. P. W. **Liquid chromatography detectors**. Amsterdam: Elsevier, 1986. 271 p.
151. TAKEUCHI, T.; ISHII, D. A multichannel photodiode array ultraviolet-visible detector for micro high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 288, p. 451-456, 1984.
152. ISHII, D.; GOTO, M.; TAKEUCHI, T. Multichannel detectors for micro high-performance liquid chromatography: examination of flow cell structures. **Journal of Chromatography**, v. 316, p. 441-449, 1984.
153. VERZELE, M.; STEENBEKE, G.; VINDEVOGEL, J. Micro-liquid chromatography with diode array detection. **Journal of Chromatography**, v. 447, p. 87-93, 1989.
154. BORING, B. C.; DASGUPTA, P. K. An affordable high-performance optical absorbance detector for capillary systems. **Analytica Chimica Acta**, n. 342, p. 123-132, 1997.
155. MARTIN, M.; EON, C.; GUIOCHON, G. Study of the pertinency of pressure in liquid chromatography – ii. problems in equipment design. **Journal of Chromatography**, v. 108, p. 229-241, 1975.
156. GRAFNETTER, J.; COUFAL, P.; SUCHÁNKOVÁ, J.; STULÍK, K. Influence of the spectrophotometric detection mode on the separation performance of systems with monolithic capillary columns: on-column and external-cell detection modes. **Journal of Chromatography A**, v. 1121, p. 76-82, 2006.
157. STERNBERG, J. C. Extra column contributions to chromatographic band broadening. In: GIDDINGS, J. C.; KELLER, R. A. (Ed.). **Advances in chromatography**. New York: Marcel Dekker, 1966. v. 2, p. 205-270.
158. GUIOCHON, G.; COLIN, H. Microcolumn high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography Library**, v. 28, p. 1-38, 1984.