João Victor Basolli Borsatto

Colunas empacotadas em cromatografia líquida capilar: desenvolvimento de hardwares e avaliação de suas contribuições no desempenho cromatográfico

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção de título de mestre em ciências.

Área de concentração: Química analítica e inorgânica.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto

São Carlos

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO POR QUALQUER MEIO IMPRESSO OU ELETRÔNICO, DESDE QUE CITADA A FONTE.

DEDICATÓRIA

*À minha mãe Lisete, ao meu pai João e ao meu
irmão Lucas pelo apoio incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Álvaro J. dos Santos Neto pela orientação, dedicação, conhecimentos transmitidos, oportunidade de realizar o mestrado no grupo de cromatografia e apoio ao trabalho descrito nessa dissertação e aos demais trabalhos desenvolvidos durante o período do mestrado.

Ao Prof. Dr. Fernando M. Lanças pelas suas contribuições a esse trabalho durante sua participação na banca do exame de qualificação e em outras ocasiões e por ter disponibilizado a estrutura do grupo de cromatografia.

Ao Prof. Dr. Paulo Clairmont pelas suas contribuições a esse trabalho durante sua participação na banca do exame de qualificação e por ter me recebido gentilmente e disponibilizado a estrutura de seu laboratório.

À Elaine e ao Guilherme pela dedicação ao grupo e empenho em ajudar sempre que solicitados.

Aos colegas do grupo CROMA: Ana, Bruno, Arley, Douglas, Edvaldo, Karen, Lidia, Luis Felipe, Luiz Felipe, Marcela e Marcio. Agradeço, em particular, a Leticia e a Vivane por terem me acompanhado, auxiliado e instruído durante o início de meu projeto e pelas discussões científicas sobre instrumentação e fundamentos teóricos ao longo do mestrado.

Ao CNPq pela bolsa concedida e financiamento à pesquisa.

Ao IQSC e a USP por ter disponibilizado a estrutura para a realização do projeto.

À FAPESP pelo auxílio indireto ao financiamento do projeto.

RESUMO

Essa dissertação de mestrado descreve o desenvolvimento de hardwares de colunas para cromatografia líquida capilar. Visou-se obter hardwares para colunas resistentes a altas pressões, porém capazes de serem aplicados na construção de colunas capilares empacotadas de eficiências apropriadas. O processo de desenvolvimentos desses dispositivos é descrito gradativamente e os pontos fortes e as limitações de cada modelo de hardware são discutidos. O melhor modelo de hardware desenvolvido apresentou produção simples, fácil conexão ao sistema cromatográfico e resistência a pressões superiores a 900 bar. Sucessivamente ao estabelecimento de um modelo de hardware apropriado, os efeitos dos materiais do hardware na eficiência das colunas foram avaliados. Poucos estudos relatam a influência do hardware nas separações em escala capilar, de forma que essa dissertação contribui para o preenchimento dessa lacuna. Capilares de aço inoxidável e sílica fundida e *frits* de aço inoxidável e fibra de vidro foram avaliados. As colunas produzidas foram analisadas em modo isocrático e a eficiência foi o principal parâmetro avaliado. Colunas com eficiências superiores a 100.000 N/m foram produzidas. Em especial, destacam-se as colunas empacotadas com partículas superficialmente porosas de 2,6 μm produzidas com capilares de PEEKsil (50 x 0,3 mm) e *frits* de fibra de vidro, os quais obtiveram eficiências da ordem de 150.000 N/m. A eficiência encontrada nas colunas produzidas nesse trabalho foram superiores a eficiência máxima de 99.800 N/m obtida para a coluna comercial Thermo Fisher Hypersil GOLD aQ C18 (100 x 0,32 mm) empacotada com partículas superficialmente porosas de 1,9 μm utilizada como referência.

ABSTRACT

This master's dissertation describes the development of hardware for capillary liquid chromatography columns. The aim of this work was to obtain high pressure resistant hardware, but capable to be applied in the construction of packaged capillary columns with appropriate efficiencies. The development process of the devices is described gradually and the strengths and limitations of each model of hardware are discussed. The best-developed hardware model presented easy production, practice connection to the chromatographic system and resistance to pressures greater than 900 bar. After the establishment of an appropriate hardware model, the effects of hardware materials on the efficiency of the columns were evaluated. Few studies report the influence of the hardware on capillary scale separations; therefore, this dissertation contributes to fill this gap. Stainless steel and fused silica capillaries and stainless steel and glass fiber frits were evaluated. The columns produced were analyzed in isocratic mode and the efficiency was the main parameter evaluated. Columns with efficiencies greater than 100,000 N/m were produced. Particularly noteworthy are the columns packed with superficially porous particles of 2.6 μm and produced with PEEKsil capillaries (50 x 0.3 mm) and glass fiber frits, which obtained efficiencies about 150 000 N/m. The efficiency found for the columns of this work was greater than the maximum efficiency of 99,800 N/m obtained for the commercial Thermo Fisher Hypersil GOLD aQ C18 (100 x 0,32 mm) commercial column packed with 1.9 μm surface porous particles used as a reference.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representações das colunas empacotada (esquerda), monolítica (centro) e tubular aberta (direita).	15
Figura 2 - Representações das partículas pelicular (esquerda), totalmente porosa (centro) e superficialmente porosas (direita).	16
Figura 3 - Representação das subdivisões do termo A em colunas empacotadas. ...	18
Figura 4 - Representações para os termos B e C. A imagem do termo B ilustrada o espalhamento (difusão) longitudinal da banda de analitos em função do tempo. A imagem do termo C ilustrado a interação dos analitos com as fases móvel e estacionária.	18
Figura 5 - (A) Ilustração representando o modelo I, com (1) o capilar externo, (2) a junção por epóxi, (3) o capilar restritor e (4) o <i>frit</i> . (B) Destaque para a região da junção.	28
Figura 6 - (A) Ilustração representando o modelo II, com (1) o capilar externo, (2) a junção com PEEK e (3) o capilar restritor. (B) Destaque para a região da junção	28
Figura 7 - (A) Ilustração representando o modelo III, com (1) o capilar externo, (2) a junção com FEP e (3) o capilar restritor. (B) Destaque para a região da junção.....	29
Figura 8 - (A) Ilustração representando o modelo IV, com (1) os conectores, (2) a anilha, (3) o capilar, (4) as uniões, (5) o <i>frit</i> e (6) as luvas. (B) Destaque para a região da junção.....	29
Figura 9 - (A) Ilustração representando o modelo V, com (1) os conectores, (2) a anilha, (3) o capilar, (4) as uniões, (5) o <i>frit</i> , (6) as luvas e (7) o tubo metálico. (B) Destaque para a região da junção.	30
Figura 10 - (A) Ilustração representando o modelo VI, com (1) os conectores, (2) a anilha, (3) o capilar de PEEKsil, (4) as uniões e (5) o <i>frit</i> . (B) Destaque para a região da junção. (C) Fotografia de um hardware construído de acordo com o modelo VI..	31
Figura 11 - (A) Fotografia da junção por epóxi do modelo I. (B) Aproximação destacando a irregularidade da aplicação de epóxi.	33
Figura 12 - (A-D) Fotografias da junção por FEP. (E) Curva de rompimento para o modelo III.....	34

Figura 13 - Comparação de ponto de junções e uniões para os modelos I e IV.	35
Figura 14 - Detalhe para a região de interface entre a luva e o tubo de aço inoxidável após o rompimento.....	36
Figura 15 - Distribuição do epóxi ao longo do tubo de teflon demonstrando a redução da quantidade de epóxi ao longo do capilar.....	36
Figura 16 - Curva de rompimento para o hardware modelo I. A rampa de vazão aplicada foi de 0,1 a 2 ml min ⁻¹ em 10 min. Foi bombeado metanol durante o experimento. Ambas as curvas são referentes duplicatas de um único dispositivo. .	37
Figura 17 - Ilustração representando a queda de pressão provocada pelo leito empacotado ao longo da coluna.	38
Figura 18 - Curva de rompimento para o modelo VI. A rampa de vazão aplicada foi de 0,1 a 2 ml min ⁻¹ em 10 min. Foi bombeado metanol durante o experimento.....	38
Figura 19 - Curvas de van Deemter para modelo I (quadrados cinzas) e modelo VI (círculos vermelhos).	39
Figura 20 - Capacidade de pico (<i>n</i>) por tempo de gradiente (<i>t_g</i>) para modelo I (quadrados cinzas) e modelo VI (círculos vermelhos). A rampa de gradiente utilizada foi de 50 a 90 % de ACN, a vazão de 10 µl min ⁻¹ e o volume de injeção foi de 60 nl.	40
Figura 21 - Comparação entre os cromatogramas obtidos pelas colunas <i>homemade</i> e comercial. Uracila (1), naftaleno (2), acenaftileno (3), acenafteno (4), antraceno (5), fluoranteno (6), pireno (7), benzo-a-pireno (8) e dibenzoantraceno (9).....	42
Figura 22 - (A) Representação do sistema de empacotamento. (B) Detalhe para a região do reservatório de fase estacionária e da coluna.	44
Figura 23 - Fotografias representando o procedimento de preparo do <i>frit</i> de fibra de vidro.	45
Figura 24 - (A) SEM das partículas SP. (B) SEM das partículas FP. (C) Separação de uracila e metilparabeno em coluna empacotada com as partículas SP. (D) Separação de uracila e metilparabeno em coluna empacotada com as partículas FP. (E) PSD das partículas SP. (F) PSD das partículas FP. As imagens de microscopias foram ajustadas artificialmente para favorecer suas visualizações em material impresso. .	46

Figura 25 - Eficiência por metro para colunas com capilares de sílica fundida (círculos azuis) e aço inoxidável (triângulos violetas).	47
Figura 26 - Eficiência por metro para colunas produzidas com <i>frits</i> de fibra de vidro (formas abertas) e aço inoxidável (formas preenchidas).....	48
Figura 27 - Microscopia eletrônica de varredura para os <i>frits</i> de fibra de vidro (A) e aço inoxidável (B) com ampliações de 1x (1), 5x (2) e 15x (3). O círculo em vermelho representa a projeção da luz de um capilar de 300 µm de i.d sobre os <i>frits</i>	49
Figura 28 - Eficiência por metro para colunas construídas com capilares de sílica fundida e <i>frits</i> de fibra de vidro e empacotadas com as partículas FP de 3 µm.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação das alturas de prato e eficiências entre a coluna produzida com o modelo VI e dados disponíveis na literatura.	41
Tabela 2 - Comparação entre colunas <i>homemade</i> (modelo VI) e comercial.....	42
Tabela 3 - Detalhes das colunas produzidas.....	44
Tabela 4 - Comparação das colunas produzidas durante o mestrado com colunas comerciais e a dados disponíveis na literatura.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Siglas e abreviaturas	Significado em português	Significado original em inglês
μ	Velocidade linear da fase móvel	
ACN	Acetonitrila	Acetonitrile
A_s	Fator de assimetria	
C18	Octadecilsilano (fase estacionária)	
C8	Octilsilano (fase estacionária)	
CN	Ciano (fase estacionária)	
DAD	Detector por arranjo de diodos	Diode array detector
D_i	Coeficiente de difusão axial	
d_p	Diâmetro (médio) de partícula	
D_p	Coeficiente de difusão dos analitos nos poros da partícula	
ESI	(Fonte de) Ionização por electrospray	Electrospray ionization (source)
F	Razão entre as fases móvel e estacionária	
FEP	Etileno-polietileno fluorado	Fluorinated ethylene propylene
FP	(Partículas) totalmente porosas	Fully porous (particles)
FS	(Capilar) Sílica fundida	Fused silica (capillary)
H	Altura de prato	
h	Altura de prato reduzido ($h=H/d_p$)	
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência	High performance liquid chromatography
i.d.	Diâmetro interno	inner diameter
IPA	Isopropanol	Isopropyl alcohol
k_1	Fator de retenção	
L	Comprimento	Length
LC	Cromatografia líquida	Liquid chromatography
N	Eficiência	
N/m	Eficiência por metro	
o.d.	Diâmetro externo	outer diameter
PEEK	Polieteretercetona	Polyether ether ketone
PEEKsil	Capilar de FS revestido por PEEK	
PLOT	Colunas capilares tubulares abertas com paredes recobertas por camada porosa	Porous layer open tubular (capillary columns)
PSD	Distribuição de tamanho das partículas	Particle size distribution
SEM	Microscopia eletrônica de varredura	Scanning electron microscopy
SiOH	Sílica (fase estacionária)	
SP	(Partículas) superficialmente porosas	Superficially porous (particles)
t_g	Tempo de gradiente	
t_R	Tempo de retenção	
THF	Tetrahidrofurano	Tetrahydrofuran
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra alta eficiência	Ultra high performance liquid chromatography
UV	(Luz/radiação) ultravioleta	Ultra-violet (light/radiation)
Vis	(Luz/radiação) visível	Visible (light/radiation)
$W_{0,5}$	Largura do pico a meia altura	Peak width at half height
WCOT	Colunas capilares tubulares abertas com paredes recobertas por filme fino	Wall coated open tubular (capillary columns)

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Principais fatores que afetam a eficiência de colunas capilares empacotadas.....	19
1.2 Vantagens do uso de colunas capilares.....	21
1.3 Colunas capilares produzidas pelo grupo CROMA	22
2. OBJETIVOS.....	24
2.1 Objetivo geral.....	24
2.2 Objetivos específicos da Parte 1 – Desenvolvimento de hardware resistente a altas pressões	24
2.3 Objetivos específicos da Parte 2 – Avaliação do efeito dos materiais do hardware na eficiência das colunas.....	24
3. PARTE EXPERIMENTAL GERAL	25
3.1 Equipamentos	25
3.2 Reagentes e consumíveis	25
Solventes	25
Padrões	26
Fases estacionárias	26
Componentes dos hardwares das colunas	26
4. DESENVOLVIMENTO PARTE 1: DESENVOLVIMENTO DE HARDWARE RESISTENTE À ALTAS PRESSÕES.....	27

4.1 Desenvolvimento experimental da parte 1	27
Construção dos hardwares	27
Empacotamento das colunas.....	31
Análises cromatográficas.....	31
4.2 Resultados e discussão da parte 1	33
4.2.1 Evolução dos modelos de hardware	33
4.2.1 O modelo VI	36
5. DESENVOLVIMENTO PARTE 2: AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS MATERIAIS DOS HARDWARE NA EFICIÊNCIA DAS COLUNAS.....	43
5.1 Desenvolvimento experimental da parte 1	43
5.2 Resultados e discussão da parte 2	45
Fases estacionárias	45
Efeito do material do hardware no desempenho cromatográfico	46
Comparação entre colunas produzidas com o hardware otimizado, colunas comerciais e dados disponíveis na literatura.....	50
6. CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS.....	54

1. INTRODUÇÃO

A cromatografia líquida capilar é objeto de estudo há décadas; todavia, ainda consiste em tema atual, apresentando limitações a serem superadas (DESMET; EELTINK, 2013). A cromatografia líquida capilar mantém as principais características da cromatografia líquida convencional, porém com consumo menor de fase móvel, fase estacionária e amostra. Adicionalmente, a cromatografia líquida capilar apresenta maior variedade de formas de colunas (Figura 1). Enquanto a escala convencional utiliza exclusivamente colunas preenchidas (majoritariamente empacotadas e poucas monolíticas), a escala capilar permite a utilização de colunas (i) monolíticas, (ii) tubulares abertas, (iii) empacotadas e (iv) em formato de *chip*.

Figura 1- Representações das colunas empacotada (esquerda), monolítica (centro) e tubular aberta (direita).

FONTE: Autoria própria.

Colunas monolíticas apresentam um único bloco poroso de fase estacionária (monolito) preenchendo todo o espaço da coluna. Essas colunas podem ser produzidas com monolitos a base de sílica ou polímeros (MOTOKAWA et al., 2002; ROZENBRAND; VAN BENNEKOM, 2011). As colunas monolíticas, embora presentes na escala convencional, possuem melhor compatibilidade com a escala capilar (GU et al., 2007; MONTEIRO, 2010; PIRES, 2017). A distribuição do monolito em um capilar é favorecida, pois reduz as possibilidades de espaços vazios dentro da coluna.

As colunas tubulares abertas para cromatografia líquida apresentam a fase estacionária fixada às paredes da coluna na forma de um filme fino, denominadas colunas WCOT, ou de uma camada espessa e porosa, denominadas colunas PLOT (LEAL; SILVA; LANÇAS, 2017). A aplicação desse tipo de coluna para LC foi

explorada no passado (TSUDA et al., 1968; CREGO; DIEZ-MASA; DABRIO ', 1993) e voltou a ganhar destaque na última década devido aos avanços da instrumentação para nano LC (EGHBALI; DESMET, 2007; FORSTER; KOLMAR; ALTMAIER, 2012, 2013; CHEONG et al., 2013; LI et al., 2017). As colunas tubulares abertas são compatíveis com a escala nano capilar¹ (vazões inferiores a $1\mu\text{L min}^{-1}$), uma vez que a vazão extremamente baixa é compatível com o diâmetro pequeno (inferior a $50\mu\text{m}$) favorável para esse tipo de coluna (SAITO; JINNO; GREIBROKK, 2004).

As colunas empacotadas são as principais colunas em HPLC. Fáceis de serem produzidas, permitem a utilização de uma série de diferentes fases estacionárias: C18, C8, CN, Fenil, SiOH, fases modificadas, fases com seletos quirais e outras (WAHAB et al., 2017). Colunas empacotadas foram inicialmente produzidas com partículas peliculares compostas por um núcleo sólido e um filme fino de fase estacionária (HORVATH; PREISS; LIPSKY, 1967). Atualmente, as colunas são empacotadas com dois tipos de partículas, as totalmente porosas (FP) e as superficialmente porosas (SP) (SONG et al., 2009; GUIOCHON; GRITTI, 2011; DOLZAN et al., 2014). A Figura 2 ilustra os tipos de partículas utilizadas em colunas empacotadas para LC.

Figura 2 - Representações das partículas pelicular (esquerda), totalmente porosa (centro) e superficialmente porosa (direita).

FONTE: Autoria própria.

Os *chips* para LC estão disponíveis nas três outras formas de colunas capilares descritas (KUTTER, 2012). Um dispositivo com pilares de silício espaçados entre si e

¹ Optou-se por classificar as colunas capilares de acordo com a faixa de vazão ótima esperada, para simplificar a classificação. O termo "micro-" é relativo a colunas com i.d. entre 100 e $500\mu\text{m}$ (faixa de vazão ótima esperada entre 1 e $10\mu\text{L min}^{-1}$) e o termo "nano-" é referente a colunas com i.d. entre 25 e $100\mu\text{m}$ (faixa de vazão ótima esperada entre 200 e 1000 nL min^{-1}); quando ambas as escalas são referidas juntas é utilizado o termo "capilar". Outras classificações são sumarizadas por Coutinho e Lanças (2011).

recobertos com fases estacionárias, o qual se assemelha às colunas tubulares abertas, foi descrito por Desmet e colaboradores (DE MALSCHE et al., 2007). *Chips* empacotados foram produzidos por Gilar, McDonald e Gritti, os quais utilizaram esses dispositivos para avaliar o efeito da forma do canal na eficiência cromatográfica. (GILAR; MCDONALD; GRITTI, 2016). *Chips* preenchidos com monolitos também encontram-se descritos na literatura (LEVKIN et al., 2008).

O desempenho cromatográfico da escala capilar é afetado por diversos fatores que podem ser controlados, similarmente à cromatografia líquida em escala convencional (HPLC). A influência desses fatores é avaliada, comumente, por meio do alargamento de banda, o qual foi estudado (principalmente) por van Deemter para colunas empacotadas de cromatografia gasosa (PRESSLTD; DEEMTER, 1956). O alargamento de banda é diretamente relacionado à altura do prato H . Quanto menor a altura do prato, menor é o alargamento de banda e, conseqüentemente, maior é a eficiência da separação. Embora van Deemter tenha apresentado sua teoria há mais de meio século, ela continua válida para as condições ordinárias de análise (GRITTI; GUIOCHON, 2010a).

A equação de van Deemter pode ser representada de forma genérica pela Equação 1. Nela, H é a altura equivalente a um prato, A representa o efeito dos múltiplos caminhos, B representa a difusão longitudinal do analito na fase móvel, C representa a resistência à transferência de massa e μ representa a velocidade linear da fase móvel.

$$H=A+\frac{B}{\mu}+C\mu \quad (\text{Equação 1})$$

O efeito dos múltiplos caminhos (termo A) compreende as diferentes possibilidades de caminhos para um analito percorrer dentro da coluna (GIDDINGS, 1959; GRITTI; GUIOCHON, 2010a, 2012). Esse efeito pode ser subdividido em cinco componentes: (i) a difusão trans-coluna, a qual ocorre entre as paredes da coluna; (ii) a difusão trans-partícula, a qual ocorre nos poros das partículas; (iii) a difusão trans-canal, a qual ocorre nos interstícios formados pelo empacotamento e as difusões inter-canaís de (iv) curtas e (v) longas distâncias, as quais ocorrem devido a defeitos na homogeneidade do leito empacotado (Figura 3).

Figura 3 - Representação das subdivisões do termo A em colunas empacotadas.

FONTE: Autoria própria.

A difusão longitudinal (termo B) possui maior contribuição em vazões baixas, sendo desprezível em velocidades lineares elevadas de fase móvel. Por outro lado, a transferência de massa (termo C) é melhorada em velocidades lineares reduzidas, pois os analitos têm mais tempo para interagirem com as fases (GRITTI; GUIOCHON, 2010b). A figura 4 ilustra simplificada os termos B e C da equação de van Deemter.

Figura 4 - Representações para os termos B e C. A imagem do termo B ilustrada o espalhamento (difusão) longitudinal da banda de analitos em função do tempo. A imagem do termo C ilustrado a interação dos analitos com as fases móvel e estacionária.

FONTE Autoria própria.

A equação de van Deemter foi adaptada para relacionar o tamanho das partículas com a altura do prato H (Equação 2) (HORVÁTH et al., 2014). D_l é o coeficiente de difusão axial, k_1 é o fator de retenção, F é a razão entre as fases, D_p é o coeficiente de difusão do analito nos poros da partícula, k_f é relacionado à transferência de massa e r_p é o raio da partícula.

$$H = \frac{2D_l}{\mu} + 2 \left(\frac{k_1^2}{1+k_1^2} \right) \left(\frac{\mu r_p^2}{15FD_p} + \frac{r_p}{3Fk_f} \right) \quad (\text{Equação 2})$$

1.1 Principais fatores que afetam a eficiência de colunas capilares empacotadas

O diâmetro (médio) das partículas é o principal fator que afeta a eficiência da separação. Amplamente estudado por gerações de cromatografistas, possui seu efeito bem definido em relação à eficiência de uma coluna (ENDELE; SZ; UNGER, 1974; MAJORS, 1973; NOVÁKOVÁ; MATYSOVÁ; SOLICH, 2006). Partículas menores apresentam um desempenho superior na separação. A redução do tamanho das partículas aumenta a densidade de empacotamento e consequentemente melhora a interação entre os analitos e a fase estacionária. A redução no tamanho das partículas também reduz o volume vazio entre elas, o qual reduz a difusão transcanal.

A distribuição dos tamanhos de partículas (PSD) também afeta o desempenho cromatográfico. Fases estacionárias de diâmetros diferentes foram misturadas em várias proporções para avaliar o efeito da homogeneidade dos diâmetros de partículas na eficiência de uma separação (GRITTI et al., 2011; HORVÁTH et al., 2014; CATANI et al., 2016). A diferença de eficiência é mínima quando a variação entre os diâmetros das partículas é pequena. Como exemplo, destaca-se o trabalho de Liekens e colaboradores (LIEKENS et al., 2011), no qual partículas de 3 e 5 μm foram adicionadas a partículas de 1,9 μm em três proporções (25, 50 e 75%). A adição 25% de partículas de 3 μm às partículas de 1,9 μm provocou apenas uma pequena variação na altura do prato. Em contrapartida, a altura do prato foi significativamente elevada com o aumento da proporção de partículas de 3 μm para 50 e 75%. O aumento na altura do prato também foi observado com a adição de 25% de partículas de 5 μm às partículas de 1,9 μm .

Alternativamente, Cabooter e colaboradores (CABOOTER et al., 2010) estudaram o efeito da PSD no desempenho cromatográfico. Foram utilizadas fases estacionárias de diferentes fabricantes (incluindo totalmente porosas e superficialmente porosas). Uma distribuição muito próxima à linearidade foi encontrada entre a variação na PSD e a eficiência cromatográfica. O termo A, e por consequência a altura do prato, foram os principais fatores melhorados quando foi reduzida a variação no tamanho das partículas. É muito importante destacar que nesse estudo não foram considerados outros fatores que afetam a separação cromatográfica, como a porosidade e o tipo de ligação da fase.

Partículas superficialmente porosas apresentam uma homogeneidade maior na PSD em comparação as partículas totalmente porosas (CABOOTER et al., 2010). Adicionalmente, a presença do núcleo sólido melhora a difusão trans-partícula e a transferência de massa. Autores descrevem o empacotamento de partículas SP em colunas capilares de eficiências elevadas (PATEL et al., 2004; BRUNS; TALLAREK, 2011; TREADWAY; WYNDHAM; JORGENSEN, 2015), porém alguns pesquisadores relatam dificuldades na produção de colunas capilares empacotadas com as partículas SP.

O diâmetro da coluna é outro fator que influencia a eficiência. A redução do diâmetro das colunas, da escala *narrow-bore* (2,1 mm) para a escala capilar (<0,5 mm), apresenta vantagens (GRITTI; MCDONALD; GILAR, 2016). Por outro lado, o efeito do diâmetro interno na eficiência das colunas capilares é um assunto controverso.

Kennedy e Jorgenson (KENNEDY; JORGENSEN, 1989) estudaram o efeito da redução do diâmetro em colunas capilares na faixa de 21 a 50 μm de i.d. Foi observado uma relação direta entre a redução do i.d. e a diminuição da altura do prato reduzido h ; definido como a razão entre a altura do prato H pelo diâmetro médio das partículas d_p . Hsieh e Jorgenson (HSIEH; JORGENSEN, 1996) avaliaram a relação entre os diâmetro dos capilares e os termos A, B e C da equação de van Deemter. Foi observado que o termo A é reduzido em função da redução do i.d. da coluna. Isso é atribuído a minimização do efeito de parede (*wall effect*). O termo C apresentou uma leve dependência inversamente proporcional ao diâmetro da coluna. A redução no i.d. levou a um aumento na resistência à transferência de massa (aumento de C). Colunas

maiores (i.d. maiores) permitem um empacotamento mais denso, o que garante uma maior área superficial, assim, melhorando a transferência de massa. O termo B não foi afetado. Adversamente, Eeltink e colaboradores (EELTINK et al., 2004) avaliaram faixas de i.d. similares em colunas capilares empacotadas, para as quais não foi observado efeito do diâmetro interno da coluna na eficiência. Os trabalhos que obtiveram resultados discrepantes utilizaram partículas de diâmetros diferentes, as quais podem ter influenciado no resultado.

Bruns e colaboradores avaliaram o efeito de parede (*wall effect*) em colunas de 20 a 74 μm de i.d. por meio de um dispositivo óptico que permite a reconstrução do leito cromatográfico (BRUNS et al., 2010; BRUNS; TALLAREK, 2011). A porosidade foi mensurada em função do diâmetro da coluna. Foi observado que esse efeito se estende por cerca de 5 diâmetros de partícula, porém pode variar de acordo com a razão id/dp. Adicionalmente, foi observado que colunas de diâmetros menores apresentaram uma maior homogeneidade no empacotamento. Por outro lado, colunas de diâmetros maiores apresentaram maior discriminação entre os diâmetros de partículas nas regiões do centro e das paredes da coluna (BRUNS et al., 2012a, 2012b).

O *frit* escolhido e o material do capilar também podem afetar a separação. A escolha apropriada de um *frit* é fundamental para uma separação adequada, pois ele pode interagir com os compostos separados ou causar turbulência no fluxo laminar; provocando alargamento de banda e reduzindo a eficiência da separação (FRANC et al., 2014; LAMBERT et al., 2016).

1.2 Vantagens do uso de colunas capilares

Colunas capilares utilizam um volume reduzido de fase móvel, o qual pode gerar uma redução consideráveis dos custos. Um cromatógrafo líquido convencional, operando a $0,5 \text{ ml min}^{-1}$, consome aproximadamente 263 litros de solvente por ano, enquanto um cromatógrafo capilar, operando a $1 \mu\text{l min}^{-1}$, consome apenas cerca de 0,53 litros ao ano (operando 24h/dia e 7dias/semana). Adicionalmente, a quantidade de amostra requerida para cromatografia líquida capilar é muito pequena (volume de injeção inferior a 100 nl), o que a torna uma ferramenta bastante oportuna para análise de amostras disponíveis em pequenas quantidades. Para ser capaz de operar

volumes tão pequenos, os sistemas cromatográficos devem ser redimensionados. Isso inclui bombas, injetores, tubulações e celas de detecção UV-vis ou fonte de ionização para espectrometria de massas (NAZARIO et al., 2015; BOCELLI; BORSATTO; SANTOS-NETO, 2018).

A vazão reduzida de fase móvel propicia um acoplamento mais vantajoso com o espectrômetro de massas (fonte ESI), pois a redução na vazão melhora significativamente a eficiência de amostragem, ou seja, aumenta a porcentagem de analitos ionizados e levados a detecção (COVEY; THOMSON; SCHNEIDER, 2009). Outra vantagem nesse acoplamento está no fato de se conservar o espectrômetro de massas por mais tempo, uma vez que os componentes do sistema serão expostos a menores quantidade de analitos e demais componentes da matriz da amostra.

Adicionalmente, o uso de colunas capilares possibilita a aplicação de programação de temperatura. A redução do diâmetro permite que a temperatura no interior da coluna seja próxima àquela nas paredes do capilar, permitindo a aplicação efetiva de gradientes de temperatura (CHEN; HORVÁTH, 1997; MOLANDER et al., 2003).

Do mesmo modo que colunas capilares equilibram sua temperatura rapidamente quando aquecidas, essas dispersam melhor o calor gerado pelo aquecimento friccional² e evitam a formação de gradientes radiais e axiais de temperatura (GRITTI; MARTIN; GUIOCHON, 2009). Devido a esse fato, colunas capilares são mais vantajosas do que colunas *narrow-bore* para análises em UHPLC (GRITTI; MCDONALD; GILAR, 2016).

1.3 Colunas capilares produzidas pelo grupo CROMA

O grupo CROMA (IQSC/USP) realizou diversos trabalhos com colunas capilares (COUTINHO et al., 2014; MONTEIRO, 2010; SANTOS-NETO et al., 2006, 2007, 2008;). As colunas produzidas no grupo (*homemade*) apresentavam eficiências apropriadas, porém possuíam fragilidade mecânica. Adicionalmente, essas colunas também apresentavam como desvantagem a necessidade de produção artesanal,

---

² Aquecimento gerado pelo atrito entre as fases móvel e estacionária. Esse aquecimento é favorecido quando a fase móvel é bombeada sob alta pressão por uma coluna empacotada com partículas de diâmetros pequenos, comumente partículas sub 2µm.

dependendo da habilidade de quem a produzisse para a obtenção de qualidade e reprodutibilidade.

Esse estudo visou aprimorar a produção dessas colunas com o intuito de garantir maior resistência mecânica e simplificar o processo de produção dos hardwares. O hardware obtido é resistente a altas pressões, simples de conectar ao sistema e fácil de produzir (secção 4 – DESENVOLVIMENTO PARTE 1). A influência dos materiais do hardware na eficiência também foi avaliada a fim de se produzir colunas capilares mais eficientes (secção 5 – DESENVOLVIMENTO PARTE 2).

A resistência mecânica de uma coluna é um fator essencial para sua qualidade, em especial para colunas empacotadas, as quais precisam manter-se intactas durante o processo de empacotamento e manuseio.

A eficiência de colunas empacotadas depende principalmente da qualidade de seu leito cromatográfico. O empacotamento de colunas comerciais geralmente é realizado sob pressões extremamente altas, sendo esse processo fundamental para reduzir os espaços vazios entre as partículas. Produzir hardwares de colunas capazes de suportar pressões mais altas era necessário para a obtenção de colunas ainda mais eficientes devido a um empacotamento superior.

A robustez no manuseio é essencial para garantir uma vida longa para a coluna e assegurar que toda uma validação poderá ser feita na mesma coluna, sem a necessidade de troca devido a danos.

Avaliar como o material do hardware influencia na separação também é importante para a obtenção de colunas eficientes. Esses estudos são raros na literatura e trabalhos atuais avaliando como o material do capilar interfere na qualidade da coluna não foram encontrados.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Otimizar o método de preparo de hardwares para colunas empacotadas de cromatografia líquida capilar de alta eficiência.

2.2 Objetivos específicos da Parte 1 – Desenvolvimento de hardware resistente a altas pressões

1 - Construir hardwares com resistência mecânica elevada e aplicáveis a altas pressões;

2 - construir hardwares com resistência química apropriada a solventes comumente utilizados em LC;

3 - desenvolver hardwares de produção simples;

4 - desenvolver hardwares de conexão prática e eficiente ao sistema cromatográfico.

2.3 Objetivos específicos da Parte 2 – Avaliação do efeito dos materiais do hardware na eficiência das colunas

1 - Aprimorar o desempenho cromatográfico de colunas produzidas com o melhor modelo de hardware desenvolvido;

2 - comparar as eficiências das colunas produzidas com capilares de aço inoxidável e sílica fundida (PEEKsil);

3 - comparar as eficiências das colunas produzidas com *frits* de aço inoxidável e fibra de vidro;

4 - avaliar a repetitividade das colunas produzidas com os diferentes materiais.

3. PARTE EXPERIMENTAL GERAL

Nessa secção estão descritos os equipamentos e consumíveis utilizados durante a execução dos experimentos. Os procedimentos experimentais são relatados separadamente, de acordo com suas especificidades, dentro das secções de desenvolvimento (partes 1 e 2).

3.1 Equipamentos

Micro/nanoLC (série UltiMate 3000 - Thermo Fisher) equipado com bombas NCS 3500RS, detector UV-vis VWD 3x00(RS), válvulas de 10 e 6 posições localizadas no módulo do forno e amostrador automático WPS 3000 TPLRS;

UHPLC (série UltiMate 3000 - Thermo Fisher) equipado com conjunto de bombas HPG-3200 RS, detector DAD-UV-Vis UltiMate 3000 RS. Esse sistema compartilha do mesmo sistema de injeção, forno e válvulas de 10 e 6 posições do micro/nanoLC UltiMate 3000;

Cromatógrafo capilar desenvolvido pelo grupo (COUTINHO et al., 2014), com bomba tipo seringa e detector DAD-UV-Vis;

HPLC Shimadzu, equipado com bombas modelo LC-20AD, detector UV-vis modelo SPD-20A, amostrador automático modelo SIL-20A e forno modelo CTO 20A;

Bomba Shimadzu modelo LC-20AD;

Bomba para empacotamento Haskel (*air-driven liquid pump*), modelo DSF-122;

Webcam 16M adaptada, modelo Night Vision 16 MP02 Multilaser, Brasil;

Microscópio eletrônico de varredura (SEM) marca LEO, modelo 440.

3.2 Reagentes e consumíveis

Solventes

Os solventes (grau HPLC) utilizados foram: acetonitrila (Tedia, Fairfield, EUA); metanol (Tedia, Fairfield, EUA), isopropanol (Honeywell, Muskegon, EUA) e tetrahidrofurano (Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA). Os solventes utilizados foram

filtrados com filtros de celulose regenerada com poros de 0,2 μm (Sartorius, Göttingen, Alemanha). A água deionizada foi preparada utilizando um sistema de purificação de água Millipore Milli-Q (Millipore, EUA).

Padrões

Os padrões utilizados foram naftaleno, acenaftileno, acenafteno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo-a-pireno e dibenzoantraceno (Supelco, Bellefont, EUA); metilparabeno (Sigma-Aldrich, St. Luis, EUA) e uracila (Sigma-Aldrich, St. Luis, EUA).

Fases estacionárias

As partículas superficialmente porosas de C18 2,6 μm foram obtidas a partir do desempacotamento de uma coluna Speedcore de 2,1 x 100 mm (Fortis Technologies, Neston, Reino Unido). As partículas totalmente porosas de C18 3 μm foram obtidas da Chromatorex (Fuji-Silysia, Kasugai, Japão).

Componentes dos hardwares das colunas

Os seguintes materiais foram utilizados para a construção dos hardwares: resina epóxi (Araldite Hobby 10 min, Brascola, São Paulo, Brasil), tubos de etileno-polietileno fluorado (FEP) de 0,38 mm i.d. e 1/16 polegadas o.d. (Luvas-verdes - Upchurch Microtight, Oak Harbor, EUA), conectores de aço inoxidável ZN1 (VICI-Valco, Houston, EUA), anilhas de aço inoxidável ZF156 (VICI-Valco, Houston, EUA), uniões de aço inoxidável JR-ZU1XCS6 com i.d. 0,15 mm e rosca para conectores de 1/16 polegadas (VICI-Valco, Houston, EUA), capilares de aço inoxidável T5C10 de 0,254 mm i.d., 1/16 polegadas o.d. e 50 mm L (VICI-Valco, Houston, EUA), capilares de PEEKsil de 0,300 mm i.d., 1/16 polegadas o.d. e 50 mm L (SGE Analytical Science, Ringwood, Austrália) e capilares de FS de 0,32, 0,25 e 0,05 mm i.d. e comprimentos variados (Polymicro Technologie, Phoenix, EUA).

Materiais dos frits

Filtros de aço inoxidável (tipo *screen*) 1SR1 de 1 μm de poro, 0,05 mm de espessura e diâmetro de 1/16 polegadas (VICI-Valco, Houston, EUA) e filtros de fibra de vidro das marcas Filtrak (Göttingen, Alemanha) e Whatman GF/A (Balston, UK) foram utilizados como materiais para os *frits*.

4. DESENVOLVIMENTO PARTE 1: DESENVOLVIMENTO DE HARDWARE RESISTENTE À ALTAS PRESSÕES

Nessa primeira secção de desenvolvimento é discutida a evolução do método de preparo de hardwares para colunas empacotas de cromatografia líquida capilar. O desenvolvimento dos dispositivos ocorreu na direção de obter-se hardwares resistentes a pressões elevadas, de conexão prática ao sistema cromatográfico e de produção simples.

4.1 Desenvolvimento experimental da parte 1

A partir de um modelo inicial (modelo I) os hardwares subsequentes foram aprimorados com o objetivo de superar as limitações apresentadas pelos seus antecessores.

Construção dos hardwares

O modelo I (Figura 5) foi preparado pelo procedimento padrão utilizado no grupo CROMA (SANTOS-NETO et al., 2007). Os capilares de sílica fundida de 250 μm (capilares externos), nos quais as colunas são empacotadas, foram passados por um filtro de fibra de vidro (Whatman) para formar um *frit* de aproximadamente 2 mm no interior do capilar. Em seguida, cerca de 5 mm de um capilar de diâmetro inferior (50 μm i.d., 184 μm o.d. e 7 cm de comprimento), denominado capilar restritor, foram inseridos no interior dos capilares de diâmetro maior (250 μm i.d.). A junção foi vedada por meio de resina epóxi (Araldite Hobby 10 min, Brascola, São Paulo, Brasil).

Figura 5 - (A) Ilustração representando o modelo I, com (1) o capilar externo, (2) a junção por epóxi, (3) o capilar restritor e (4) o *frit*. (B) Destaque para a região da junção.

FONTE: Autoria própria.

O modelo II (Figura 5) foi construído de forma bastante similar ao anterior, porém a resina epóxi foi substituída por um segmento 1 cm de PEEK (320 μm de i.d. e 1/32 polegadas de diâmetro externo) posicionado sobre a região de junção entre os capilares. O conjunto foi aquecido a 350 $^{\circ}\text{C}$ durante 20 min para garantir a adesão do PEEK aos capilares. Um tubo de vidro (pipeta de Pasteur de vidro) foi utilizado como molde para evitar o contato do PEEK com a superfície do forno.

Figura 6 - (A) Ilustração representando o modelo II, com (1) o capilar externo, (2) a junção com PEEK e (3) o capilar restritor. (B) Destaque para a região da junção

FONTE: Autoria própria.

Similarmente ao modelo anterior, o modelo III (Figura 7) também utilizou um segmento de polímero para fazer a adesão entre os capilares. Cerca de 0,5 cm de um tubo de FEP de 380 µm de i.d. e 1/16 polegadas de o.d. foram utilizados para substituir o seguimento de PEEK. O conjunto foi aquecido a 300 °C por 20 min.

Figura 7 - (A) Ilustração representando o modelo III, com (1) o capilar externo, (2) a junção com FEP e (3) o capilar restritor. (B) Destaque para a região da junção.

FONTE: Autoria própria.

O modelo IV (Figura 8) foi desenvolvido com o intuito de simplificar a produção dos hardwares e minimizar o número de conexões pós-coluna. Conjuntos de conectores, luvas e anilhas foram utilizados para fixar o capilar às uniões contendo *frits* de aço inoxidável. Os conectores foram rosqueados à união para garantir a resistência a altas pressões.

Figura 8 - (A) Ilustração representando o modelo IV, com (1) os conectores, (2) a anilha, (3) o capilar, (4) as uniões, (5) o *frit* e (6) as luvas. (B) Destaque para a região da junção.

FONTE: Autoria própria.

O modelo V (Figura 9) foi produzido de forma similar ao modelo anterior, porém com a adição de um tubo de aço inoxidável (500 μm i.d. e 1/16 polegadas o.d.) posicionado entre as extremidades do hardware e fixado por epóxi. Era esperado que a presença do tubo de aço inoxidável elevasse a resistência mecânica do hardware.

Figura 9 - (A) Ilustração representando o modelo V, com (1) os conectores, (2) a anilha, (3) o capilar, (4) as uniões, (5) o *frit*, (6) as luvas e (7) o tubo metálico. (B) Destaque para a região da junção.

FONTE: Autoria própria.

O modelo VI (Figura 10) é de mais fácil produção e o último desenvolvido. Um capilar de sílica fundida revestido de PEEK, comercialmente denominado de PEEKsil (SGE Analytical Science), de 5 cm, 300 μm de i.d. e 1/16 polegadas de o.d. foi fixado às uniões por meio de um conjunto de conectores e anilhas. Esse material foi escolhido (PEEKsil), pois combina a inércia química do capilar de sílica fundida (FS) com a resistência mecânica do revestimento por PEEK. *Frits* de aço inoxidável foram utilizados dentro das uniões.

Figura 10 - (A) Ilustração representando o modelo VI, com (1) os conectores, (2) a anilha, (3) o capilar de PEEKsil, (4) as uniões e (5) o *frit*. (B) Destaque para a região da junção. (C) Fotografia de um hardware construído de acordo com o modelo VI. Em (B), 3i representa o capilar de sílica fundida (azul claro) recoberto por poliimida (laranja) e 3ii representa o revestimento de PEEK.

FONTE: Autoria própria.

Empacotamento das colunas

Cerca de 4 mg de partículas de C18 (Chromatorex, C18 de 3 μm FP) foram suspensas em 0,75 ml de uma mistura de THF:IPA 1:6. Essa suspensão foi inserida em uma coluna vazia de HPLC (4,6 x 50 mm), a qual funciona como reservatório de fase estacionária para o empacotamento. O reservatório foi conectado por um tubo de PEEK (0,5 x 50mm) ao hardware da coluna. A pressão de empacotamento foi de 100 bar (1450 psi) para as colunas construídas com os modelos de hardwares I e IV. Para o modelo VI, a pressão de empacotamento utilizada foi de 620 bar (8992 psi), fazendo-se necessário conectar o hardware da coluna diretamente no reservatório de fase estacionária (sem o uso do tubo de PEEK).

Análises cromatográficas

Para as curvas de van Deemter foram utilizadas as proporções de 50:50 $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ e 60:40 $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ em vazões de 2 a 14 $\mu\text{l min}^{-1}$. O volume de injeção foi de 60 nL, os comprimentos de onda de detecção foram de 254 e 280 nm e a temperatura foi de 31 $^{\circ}\text{C}$. Os compostos utilizados foram uracila e naftaleno. Os cálculos foram feitos de acordo com as Equações 3 e 4, nas quais N é a eficiência, t_R é o tempo de

retenção (naftaleno), $w_{0,5}$ é a largura do pico à meia altura, H representa a altura do prato e L o comprimento da coluna. A velocidade linear da fase móvel foi calculada pela razão entre o comprimento da coluna e o tempo que a uracila (composto não retido) levou para percorrer esse comprimento.

$$N = 5,545 \left(\frac{t_R}{w_{0,5}} \right)^2 \quad (\text{Equação 3})$$

$$H = \frac{L}{N} \quad (\text{Equação 4})$$

As capacidades de pico das colunas foram avaliadas nos tempos de gradiente de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 15 min. A rampa de gradiente utilizada foi de 50 a 90% de ACN a $10 \mu\text{l min}^{-1}$ e o volume de injeção foi de 60 nl. Os compostos utilizados foram uracila, naftaleno, fenantreno e pireno. O cálculo da capacidade de pico foi realizado de acordo com a Equação 5, na qual n representa a capacidade de pico, t_g o tempo de gradiente, e $w_{0,5}$ a largura do pico à meia altura média dos compostos separados.

$$n = 1 + \left(\frac{t_g}{w_{0,5}} \right) \quad (\text{Equação 5})$$

A coluna comercial Dionex C18 Acclaim PepMAp RSLC 50 x 0,3 mm, com partículas FP de 2 μm foi utilizada para a comparação com a coluna produzida com o hardware modelo VI. Os padrões utilizados foram naftaleno, acenaftileno, acenafteno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo-a-pireno e dibenzoantraceno; eluidos nessa ordem. Padrão de uracila foi utilizado como composto não retido (pouco retido). Para as análises em ambas as colunas, a vazão foi de $8 \mu\text{l ml}^{-1}$, a proporção da fase móvel foi de 30:70 H₂O/ACN e a temperatura do forno foi mantida em 31 °C. O volume de injeção foi de 200 nl e os comprimentos de onda de detecção foram de 254 e 280 nm.

O fator de assimetria A_s foi calculado pela Equação 6. Nessa equação a representa a distância (em min) entre a borda esquerda e o centro do pico (tempo de retenção) e b representa a distância entre a borda direita e o centro do pico. Os valores de a e b foram calculados a 10% da altura do pico.

$$A_s = \frac{b}{a} \quad (\text{Equação 6})$$

4.2 Resultados e discussão da parte 1

Nessa subsecção é discutida a evolução gradativa dos modelos dos hardwares. Os modelos de I a V são discutidos sucessivamente na subsecção 4.2.1. O modelo VI é discutido e comparado com o modelo I, separadamente, na subsecção 4.2.2.

4.2.1 Evolução dos modelos de hardware

O modelo I foi bastante utilizado para o preparo de colunas no grupo CROMA, porém ele apresentava a fragilidade mecânica acentuada e a produção altamente artesanal como suas principais limitações. A qualidade do hardware desse modelo dependia das habilidades manuais de quem o construísse.

Mesmo trabalhando cuidadosamente, o epóxi (colorido em vermelho) é distribuído de maneira heterogênea no espaço entre o capilar da coluna e o capilar restritor (Figura 11). Essa irregularidade pode provocar alargamento de banda e também prejudicar a reprodutibilidade entre as colunas. Adicionalmente, colegas, os quais trabalharam por longos períodos com colunas construídas com base nesse modelo de hardware I, reportaram a fragilização da junção de epóxi com o tempo. Esse enfraquecimento foi atribuído à exposição da resina epóxi a solventes orgânicos.

Figura 11 - (A) Fotografia da junção por epóxi do modelo I. (B) Aproximação destacando a irregularidade da aplicação de epóxi.

FONTE: Autoria própria.

Com o intuito de melhorar a resistência química da resina utilizada na junção ante solventes orgânicos, foi proposta a utilização de PEEK para aderir o capilar da coluna ao capilar restritor. Embora o PEEK apresente resistência química adequada

aos solventes comumente utilizados em cromatografia líquida, ele não apresentou grau de adesão apropriado entre os capilares. A junção foi facilmente rompida com a aplicação de água por uma seringa (manualmente).

O PEEK foi substituído pelo FEP a fim de melhorar a adesão entre os capilares. O modelo III aparentou ser bastante promissor. O FEP ficou homogeneamente distribuído no espaço entre o capilar da coluna e o capilar restritor (Figura 12 A-D), porém esse modelo apresentou como principal limitação a baixa resistência a pressão. A pressão máxima suportada por esse hardware foi inferior a 180 bar (2610 psi), o que o torna inaplicável para HPLC capilar. Além disso, as oscilações na curva de rompimento são indicativos que a junção de polímero deformou em baixas pressões (Figura 12 E).

Figura 12 - (A-D) Fotografias da junção por FEP. (E) Curva de rompimento para o modelo III.

FONTE: Autoria própria.

O modelo IV foi desenvolvido com o intuito de simplificar o processo de fabricação dos dispositivos e reduzir o número de conexões (junções) pós-coluna, as quais podem causar alargamento de banda. O modelo I necessita de uma segunda conexão (união) posicionada após o final do capilar restritor para ser conectada ao sistema cromatográfico. O modelo IV utiliza apenas uma união, na qual está posicionado o *frit*. Esse desenho é bastante interessante, pois minimiza o número de

conexões pós-coluna, o que, intuitivamente, reduz o alargamento de banda extracoluna.

Figura 13 - Comparação dos pontos de junções e uniões para os modelos I e IV.

FONTE: Autoria própria.

O hardware do modelo IV precisou ser empacotado para a avaliação da resistência a pressão. A coluna produzida com base nesse modelo apresentou resistência superior a 530 bar (7687 psi).

Após essa etapa, passou-se a explorar formas de melhorar a resistência ao manuseio dos dispositivos. Os capilares de sílica fundida utilizados nos hardwares modelo IV são bastante frágeis e podem romper ao serem curvados ou receberem leves choques mecânicos. Com o intuito de melhorar a resistência mecânica dos hardwares, optou-se por revestir o capilar de FS com um tubo de aço inoxidável fixado por epóxi.

Embora o suporte de aço inoxidável aparentasse garantir resistência ao capilar, o modelo V não apresentou vantagens sobre nenhum outro modelo. Ocorreram quebras nas regiões de interface entre o tubo de aço e as luvas durante o manuseio (Figura 14).

Figura 14 - Detalhe para a região de interface entre a luva e o tubo de aço inoxidável após o rompimento.

FONTE: Autoria própria.

Outro problema encontrado nesse modelo foi a aplicação pouco homogênea de epóxi ao longo do tubo. Foi utilizado um tubo de teflon transparente como modelo para observar a distribuição do epóxi ao longo do capilar (Figura 15).

Figura 15 - Distribuição do epóxi ao longo do tubo de teflon demonstrando a redução da quantidade de epóxi ao longo do capilar.

FONTE: Autoria própria.

4.2.1 O modelo VI

A robustez do hardware é extremamente importante, pois possui efeitos tanto na separação cromatográfica, quanto no manuseio da coluna. Curvas na coluna reduzem o desempenho cromatográfico (GILAR; MCDONALD; GRITTI, 2016) e torções na coluna podem danificar o leito empacotado. Adicionalmente, quebras nas extremidades da coluna geram superfícies reativas, as quais podem sorver analitos.

O modelo VI apresentou elevada robustez. Os hardware's desse modelo foram utilizados diversas vezes para produzir colunas cromatográficas (secção 5.2). Por outro lado, o hardware do modelo I é extremamente frágil e flexível. Durante a execução desse projeto, foram produzidos vários hardware's desse modelo, dos quais muitos foram quebrados durante a conexão com o sistema cromatográfico ou durante o processo de empacotamento. É importante ressaltar que esses hardware's foram manuseados cuidadosamente para minimizar o risco de quebras.

A pressão máxima suportada por esses dispositivos foi avaliada por meio de curvas de rompimento. Uma rampa de vazão foi estabelecida e a variação da pressão ante o incremento da vazão da fase móvel foi registrada. O hardware do modelo I (Figura 16) precisou ser empacotado previamente a avaliação da sua resistência a pressão. A pressão máxima suportada por esse modelo foi de 573 bar (8340 psi).

Figura 16 - Curva de rompimento para o hardware modelo I. A rampa de vazão aplicada foi de 0,1 a 2 ml min⁻¹ em 10 min. Foi bombeado metanol durante o experimento. Ambas as curvas são referentes a duplicatas de um único dispositivo.

FONTE: Autoria própria.

O rompimento ocorreu na região próxima à entrada da coluna, no trecho sem empacotamento. Isso aconteceu, pois, esse trecho está submetido a maior pressão. O empacotamento suaviza a pressão ao longo do capilar, de forma que a pressão na junção seja quase mínima (Figura 17). Durante as análises cromatográficas no modelo I, a entrada da coluna estava posicionada junto ao início do leito empacotado sem que houvesse espaço vazio no começo da coluna.

Figura 17 - Ilustração representando a queda de pressão provocada pelo leito empacotado ao longo da coluna.

FONTE: Autoria própria.

A pressão máxima suportada pelo modelo VI foi avaliada sem a necessidade de empacotamento, pois a pressão foi rapidamente elevada por um restritor de vazão conectado na saída do dispositivo. O modelo VI apresentou resistência a pressão extremamente alta, suportou 947 bar (13735 psi), na qual ocorreu o rompimento do PEEKsil (Figura 18).

Figura 18 - Curva de rompimento para o modelo VI. A rampa de vazão aplicada foi de 0,1 a 2 ml min⁻¹ em 10 min. Foi bombeado metanol durante o experimento.

FONTE: Autoria própria.

As eficiências cromatográficas de ambos os modelos foram avaliadas. Duas colunas, uma baseada no modelo I e outra com base no modelo VI, foram preparadas. Ambas possuíam 5 cm de comprimento e foram empacotadas com as partículas FP de 3 µm.

Inicialmente, curvas de van Deemter foram empregadas para avaliar e comparar as colunas. A curva de van Deemter para o modelo VI apresentou altura de prato mínima de 11 μm (Figura 8), equivalente a uma eficiência de 91.160 pratos por metro. A coluna produzida tradicionalmente (modelo I), apresentou altura de prato de 17,5 μm (Figura 8) equivalente a 57.143 pratos por metro.

Figura 19 - Curvas de van Deemter para modelo I (quadrados cinzas) e modelo VI (círculos vermelhos).

FONTE: Autoria própria.

As colunas também foram comparadas no modo gradiente por meio de gráficos de capacidade de pico n por tempo de gradiente t_g (Figura 9). A coluna construída com o modelo de hardware VI foi superior a coluna construída com o modelo de hardware I, pois possui maior capacidade de pico nos tempos de gradiente apresentados.

Figura 20 - Capacidade de pico (n) por tempo de gradiente (t_g) para modelo I (quadrados cinzas) e modelo VI (círculos vermelhos). A rampa de gradiente utilizada foi de 50 a 90 % de ACN, a vazão de $10 \mu\text{l min}^{-1}$ e o volume de injeção foi de 60 nl.

FONTE: Autoria própria.

O desempenho superior da coluna produzida com o hardware modelo VI foi atribuído a diferença de pressão de empacotamento entre as colunas. A coluna construída com o hardware modelo I foi empacotada sob uma pressão de 100 bar (1450 psi) e a coluna construída com o modelo de hardware VI sob uma pressão de 620 bar (9000 psi), o que resultou em um empacotamento mais denso. O hardware construído com o modelo I não permite empacotamento em pressões elevadas devido a sua fragilidade mecânica.

A influência da densidade de empacotamento na separação cromatográfica é similar ao uso de partículas de d_p pequenos (discutido na introdução). O aumento do número de partículas em um determinado volume gera um aumento na área superficial total, o que permite maior interação entre os analitos e a fase estacionária. O termo A também é afetado, pois os espaços vazios na coluna são reduzidos pela compactação do empacotamento; minimizando diretamente a difusão trans-canal.

O modelo VI foi comparado com resultados descritos na literatura para uma coluna semelhante (HETZEL et al., 2016). A proporção da fase móvel foi ajustada para uma comparação mais adequada. A coluna produzida com base no modelo VI apresentou altura de prato menor e, conseqüentemente, eficiência superior a coluna comercial (YMC C18 50 x 0,3mm, 3 μ m) descrita na literatura (Tabela 1). Esse resultado demonstrou a aplicabilidade do modelo VI para a produção de colunas cromatográficas eficientes. É relevante destacar que Hetzel e colaboradores (HETZEL et al., 2016) caracterizaram e compararam diferentes colunas capilares, portanto as condições das análises foram otimizadas.

Tabela 1 - Comparação das alturas de prato e eficiências entre a coluna produzida com o modelo VI e dados disponíveis na literatura.

Parâmetro	VI	Literatura (HETZEL et al., 2016)
<i>L</i> /cm; (i.d. /mm)	5 (0,3)	5 (0,3)
Fase móvel	60:40 H ₂ O/ACN	59,8:40,2 H ₂ O/ACN
Fase estacionária	C ₁₈ 3 μ m FP	C ₁₈ 3 μ m FP
Analito (fator de retenção)	Naftaleno (10)	Naftaleno (11)
<i>H</i> / μ m (N)	10,97 (4558)	14,86 (3365)
μ /mm s ⁻¹	1,39	2,42

FONTE: Autoria própria.

A coluna produzida com o hardware VI (*homemade*) também foi comparada a uma coluna comercial (C18 Acclaim PepMAp RSLC 50 x 0,3 mm, 2 μ m) disponível no laboratório. A análise foi feita a 8 μ l ml⁻¹, com 70:30 acetonitrila:água e os compostos separados foram uracila, naftaleno, acenaftileno, acenafteno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo-a-pireno e dibenzoantraceno, eluidos nessa ordem. É importante destacar que a coluna comercial utilizada possui diâmetro de partícula de 2 μ m, de forma a esperar-se um desempenho superior em comparação com a coluna empacotada com partículas de 3 μ m.

A separação realizada demonstrou que a coluna produzida com o hardware VI possuía desempenho comparável à comercial, pois ambas apresentaram cromatogramas com separações similares (Figura 21). Os parâmetros *N*, *H*, e *h* foram calculados com base nos primeiros e oitavos picos (Tabela 2). Esses parâmetros devem ser analisados com cautela, pois comparam colunas diferentes. O fator de assimetria *A_s* foi calculada para os picos 6 e 8. A coluna comercial apresentou *A_s* de

1,25 para o pico 8 e a coluna *homemade* apresentou A_s de 1,33 para o mesmo pico, porém, para o pico 6, ambas as colunas apresentaram o mesmo fator de assimetria (1,0).³ Quando as eficiências foram comparadas, a coluna comercial apresentou melhor desempenho que a coluna produzida com o hardware modelo VI. Essa diferença de desempenho foi atribuída ao diâmetro inferior das partículas da coluna comercial. O mesmo raciocínio foi empregado para comparar as alturas dos pratos. A diferença nos valores de h entre as colunas comercial e *homemade* foi pequena. Em suma, esse tipo de comparação teve unicamente o objetivo de mostrar que o modelo de hardware VI poderia ser aplicado na construção de colunas comparáveis às comerciais e que o desenvolvimento do hardware estava sendo encaminhado na direção correta. Ao final da seção 5.2 é apresentada uma nova comparação das melhores colunas *homemade* produzidas (otimizadas) com colunas comerciais e colunas descritas na literatura.

Figura 21 - Comparação entre os cromatogramas obtidos pelas colunas *homemade* e comercial. Uracila (1), naftaleno (2), acenaftileno (3), acenafteno (4), antraceno (5), fluoranteno (6), pireno (7), benzo-a-pireno (8) e dibenzoantraceno (9).

FONTE: Autoria própria.

Tabela 2 - Comparação entre colunas *homemade* (modelo VI) e comercial.

Parâmetro	Modelo VI	Acclaim (comercial)
N pico 1	558	1124
$H/\mu\text{m}$ (h) pico 1	16,8 (5,6)	12,2 (6,1)
N pico 8	4305	7942
$H/\mu\text{m}$ (h) pico 8	11,6 (3,8)	6,29 (3,1)
A_s pico 8	1,33	1,25

FONTE: Autoria própria.

³ O fator de assimetria (A_s), é calculado a partir da razão entre a largura da banda à 10% da metade esquerda do pico pela largura da banda à 10% da metade direita do pico. Valores de A_s superiores a 1 indicam *tailing* e valores de A_s inferiores a 1 indicam *fronting*, ambos fenômenos que deterioram a resolução. Valores de A_s muito próximos ou iguais a 1 indicam simetria de pico ideal.

5. DESENVOLVIMENTO PARTE 2: AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS MATERIAIS DOS HARDWARE NA EFICIÊNCIA DAS COLUNAS

Uma vez definido o modelo de hardware resistente a pressões elevadas e capaz de produzir colunas com eficiências adequadas, decidiu-se estudar o efeito dos materiais do hardware no desempenho da coluna. Foram comparados capilares de sílica fundida e aço inoxidável e *frits* produzidos com fibra de vidro e aço inoxidável.

5.1 Desenvolvimento experimental da parte 2

Os hardwares foram construídos seguindo o procedimento estabelecido para o modelo VI. Detalhes sobre a composição das colunas são apresentados na Tabela 3. As colunas receberam numeração arábica para facilitar suas apresentações.

A maior parte das colunas descritas nessa secção foram empacotadas com partículas superficialmente porosas, essas de melhor qualidade do que as partículas totalmente porosas utilizadas durante os experimentos descritos na secção anterior. As fases estacionárias foram avaliadas por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura (SEM). O software livre ImageJ⁴ foi utilizado para calcular as áreas das partículas a partir de uma imagem de SEM. Uma vez obtida a área de cada partícula, esses dados foram transferidos para o Excel (Excel 2013, Microsoft) e então convertidos em diâmetros de partícula. Os dados dos diâmetros das partículas foram transferidos para software Origin (Origin 2018, Originlab corp.) para a obtenção dos histogramas representando as PSD das fases.

Empacotamento por suspensão foi utilizado para a produção das colunas. Os hardwares das colunas foram conectados ao reservatório de suspensão por um tubo de sílica fundida revestida de aço (0,5 x 50 mm). O reservatório de 0,75 ml foi preenchido com 10 mg ml⁻¹ de suspensão de fase estacionária em THF:IPA 1:6. As colunas foram empacotadas sob uma pressão de 622 bar (9021 psi) e não foram sonicadas durante o empacotamento. O solvente de empacotamento foi metanol. Durante o empacotamento, os *frits* de aço inoxidável foram posicionados na saída de todas as colunas.

---

⁴ Fonte para download: <https://imagej.nih.gov/ij/download.html> (acesso 28/06/2018).

Figura 22 - (A) Representação do sistema de empacotamento. (B) Detalhe para a região do reservatório de fase estacionária e da coluna.

FONTE: Autoria própria.

Tabela 3 - Detalhes das colunas produzidas.

Coluna	Material do capilar	i.d. (µm)	L (cm)	Material do frit	Partículas e D _p (µm)	Tempo de empacotamento (hora)	Tempo de despressurização (hora)
1	PEEKsil	300	5	Aço inoxidável	SP 2,6	1,67	1
2	PEEKsil	300	5	Aço inoxidável	SP 2,6	1,67	1
3	Aço inoxidável	254	5	Aço inoxidável	SP 2,6	1,67	1
4	Aço inoxidável	254	5	Aço inoxidável	SP 2,6	1,67	1
5 ^{a)}	PEEKsil	300	5	Fibra de vidro	SP 2,6	1,67	1
6 ^{b)}	PEEKsil	300	5	Fibra de vidro	SP 2,6	1,67	1
7 ^{c)}	Aço inoxidável	254	5	Fibra de vidro	SP 2,6	1,67	1
8	PEEKsil	300	5	Fibra de vidro	FP 3,0	1	1
9	PEEKsil	300	5	Fibra de vidro	FP 3,0	1	1

a) derivada da coluna 1; b) derivada da coluna 2; c) derivada da coluna 3.

FONTE: Autoria própria.

Para comparar os *frits*, as uniões contendo os *frits* de aço inoxidável foram substituídas por uniões contendo os *frits* de fibra de vidro, porém foi mantido o mesmo leito empacotado. Isso foi feito para garantir que a única diferença entre as colunas fosse a mudança do material do *frit*. Os *frits* de fibra de vidro foram avaliados após as análises das colunas contendo os *frits* metálicos.

Os *frits* de fibra de vidro foram produzidos a partir de um filtro de fibra de vidro (Filtrark). Um disco de 1/16 polegadas de diâmetro foi cortado pressionando um conector de PEEK de mesmo diâmetro sobre o filtro. Três camadas de filtro foram cortadas e então inseridas dentro de uma união com o auxílio de um tubo de 1/16 polegadas de o.d. (Figura 23).

Figura 23 - Fotografias representando o procedimento de preparo do *frit* de fibra de vidro.

FONTE: Autoria própria.

5.2 Resultados e discussão da parte 2

Fases estacionárias

Primeiramente, realizou-se uma avaliação da qualidade das fases estacionária disponíveis. Especulava-se que a fase FP 3,0 μm apresentava uma ampla faixa de PSD, portanto optou-se por compará-la com uma fase SP desempacotada de uma coluna comercial. Em conformidade com o esperado, a fase FP apresentou uma PSD muito menos homogênea em comparação com a fase SP (Figura 24). Adicionalmente a fase FP apresentou partículas quebradas e aparentemente ocas. Também foi observado diferença de desempenho cromatográfico entre as fases. Enquanto as colunas empacotadas com as partículas SP apresentaram A_s de 1,47 para o metilparabeno, a coluna empacotada com as partículas FP apresentou A_s de 2,15 para o mesmo composto. Essas análises foram feitas a 2 $\mu\text{l min}^{-1}$ e a proporção da

fase móvel foi de 75/25 H₂O:ACN. Devido as melhores características da fase SP, optou-se por utilizá-la durante a avaliação do efeito do material do hardware no desempenho cromatográfico.

Figura 24 - (A) SEM das partículas SP. (B) SEM das partículas FP. (C) Separação de uracila e metilparabeno em coluna empacotada com as partículas SP. (D) Separação de uracila e metilparabeno em coluna empacotada com as partículas FP. (E) PSD das partículas SP. (F) PSD das partículas FP. As imagens de microscopias foram ajustadas artificialmente para favorecer suas visualizações em material impresso. Condições de análise, 75/25 H₂O:ACN, vazão de 2 µl min⁻¹, temperatura de 31°C e volume de injeção de 60 nl.

FONTE: Autoria própria.

Efeito do material do hardware no desempenho cromatográfico

As colunas produzidas com capilares de sílica fundida (PEEKsil) apresentaram desempenho superior às colunas produzidas com capilares de aço inoxidável (Figura 25). Colunas com capilares de sílica fundida apresentaram eficiências em torno de 150.000 pratos por metro (N/m) e h mínimo de apenas 2,66 e 2,25 para as colunas 1 e 2, respectivamente. As colunas produzidas com capilares metálicos apresentaram desempenho inferior, foi registrada eficiência máxima de 89.589 N/m e h mínimos de 4,26 (coluna 4) e 5,76 (coluna 3). As colunas produzidas com capilares de sílica fundida também apresentaram maior repetitividade (Figura 25). Optou-se por representações de N/m versus tempo de retenção para facilitar a visualização dos resultados.

Figura 25 - Eficiência por metro para colunas com capilares de sílica fundida (círculos azuis) e aço inoxidável (triângulos violetas).

FONTE: Autoria própria.

O aço inoxidável também resultou em desempenho inferior para os *frits* (Figura 26). Nas colunas produzidas com capilares de sílica fundida (PEEKsil), os *frits* de fibra de vidro foram sutilmente superiores aos *frits* metálicos, porém o desempenho dos *frits* de fibra de vidro foi significativamente melhor na coluna produzida com capilar de aço inoxidável (coluna 7). Esses resultados corroboram com o apresentado por Franc e colaboradores (FRANC et al., 2014), os quais avaliaram diversos *frits* para colunas empacotadas. Embora pudesse ser esperado algum dano ao leito cromatográfico devido ao processo de troca do *frit* metálico para o *frit* de fibra de vidro, não foi observado nenhum dano decorrente desse procedimento.

Figura 26 - Eficiência por metro para colunas produzidas com *frits* de fibra de vidro (formas abertas) e aço inoxidável (formas preenchidas).

FONTE: Autoria própria.

O desempenho superior dos *frits* de fibra de vidro foi atribuído (hipótese) a minimização da difusão trans-canal, a qual ocorre dentro dos poros do *frit*. O *frit* de fibra de vidro apresenta uma estrutura mais porosa, porém com poros de menor tamanho. O *frit* de aço inoxidável apresenta poros maiores e em menor quantidade (Figura 27), os quais exigem que os analitos percorram um caminho maior até encontrá-los e passem mais tempo dentro deles. Não foi possível comprovar essa hipótese com os meios disponíveis durante a realização do mestrado, porém essa é a explicação mais provável para a melhora na eficiência com a utilização dos *frits* de fibra de vidro. Na literatura, é relatado que os *frits* e os distribuidores de vazão podem provocar distúrbios no fluxo laminar, causando alargamento de banda (SMITS; DERIDDER; DESMET, 2014; GRITTI; MCDONALD; GILAR, 2015). É improvável que a superfície do material tenha interagido com os analitos, uma vez que ambos os materiais utilizados, fibra de vidro e aço inoxidável, são, idealmente, inertes aos analitos utilizados.

Figura 27 - Microscopia eletrônica de varredura para os *frits* de fibra de vidro (A) e aço inoxidável (B) com ampliações de 1x (1), 5x (2) e 15x (3). O círculo em vermelho representa a projeção da luz de um capilar de 300 μm de i.d sobre os *frits*.

FONTE: Autoria própria.

Definiu-se que os melhores materiais para a produção de colunas capilares empacotadas seriam os capilares de sílica fundida (PEEKsil) e os *frits* de fibra de vidro. Para confirmar que esses materiais poderiam ser aplicados na produção de colunas eficientes e repetíveis, outras colunas foram produzidas utilizando essa configuração de hardware.

Duas colunas foram empacotadas com partículas FP de 3,0 μm , as mesmas utilizadas durante os experimentos descritos na parte 1 do desenvolvimento. Ambas as colunas produzidas foram similares, confirmando que esse hardware pode ser utilizado para a produção de colunas capilares com eficiências adequadas e repetíveis (Figura 28). Embora produzidas com partículas de qualidade inferior, essas colunas apresentaram H de 8,7 μm e h de 2,9 (medido experimentalmente), valores considerados adequados para colunas capilares. Adicionalmente, demonstrou-se a capacidade de reuso dos hardwares desenvolvidos, uma vez que foram reutilizados os capilares e as uniões das colunas 5 e 6.

Figura 28 - Eficiência por metro para colunas construídas com capilares de sílica fundida e *frits* de fibra de vidro e empacotadas com as partículas FP de 3 μm .

FONTE: Autoria própria.

Comparação entre colunas produzidas com o hardware otimizado, colunas comerciais e dados disponíveis na literatura

Por fim, as colunas produzidas durante a execução do mestrado foram comparadas com colunas comerciais e dados sobre colunas capilares disponíveis na literatura (Tabela 4). É importante destacar que foram selecionadas apenas publicações de qualidade notável. Ambos os tipos de colunas produzidas nesse trabalho (SP e FP) obtiveram desempenhos superiores em todos os quesitos em comparação com as colunas comerciais FP (YMC C18 50 x 0,3 mm, 3 μm) e SP (YMC C18 50 x 0,3 mm 2,7 μm) avaliadas por Hetzel e colaboradores (HETZEL et al., 2016).

A coluna 6, produzida com partículas de 2,6 μm SP também apresentou um desempenho próximo à coluna e ao *chip* (ambos com partículas FP de 1,8 μm) apresentados por Gilar, McDonald e Gritti (GILAR; MCDONALD; GRITTI, 2016). A altura do prato reduzido (h) da coluna 6 foi inferior (melhor) ao h dos dois dispositivos apresentados por Gilar, McDonald e Gritti. É importante dizer que Gilar, McDonald e Gritti são pesquisadores da Waters, uma das líderes de mercado em cromatografia.

Tabela 4 - Comparação das colunas produzidas durante o mestrado, com colunas comerciais e a dados disponíveis na literatura.

Fonte dos dados	Dados apresentados nessa dissertação				Hetzel et al., J. Sep. Sci. 2016		Gilar, McDonald e Gritt, JCA, 2016		Treadway, Wyndham e Jorgenson, JCA, 2015
Coluna	Coluna 6	Coluna 9	Hypersil GOLD aQ	Acclaim	YMC	YMC	Chip de titânio	Coluna produzida pelos autores com capilar de FS	Coluna produzida pelos autores com capilar de FS
i.d. x L (mm)	0,3 x 50	0,3x50	0,32 x 100	0,3 x 50	0,3 x 50	0,3 x 50	0,3 x 100	0,15 x 100	0,03 x 317
Partícula (dp-µm)	C18 SP (2,6)	C18 FP (3,0)	C18 SP (1,9)	C18 FP (2,0)	C18 SP (2,7)	C18 FP (3,0)	C18 FP (1,8)	C18 FP (1,8)	SP (1,45)
Analito(s)	Naftaleno	Metilparabeno	Naftaleno	Naftaleno	Naftaleno	Naftaleno	Uracila, acetofenona, propiofenona, butirofenona, valerofenona, hexanofenona, reserpina e bombesina	Uracila, acetofenona, propiofenona, butirofenona, valerofenona, hexanofenona, reserpina e bombesina	Hidroquinona
H (µm)	5,76	8,45	10,02	6,29	7,26	14,80	*4,35	*4,09	1,79*
h	2,21	2,81	5,27	3,1	2,69	4,92	*2,41	*2,27	1,24

*Valores calculados a partir de dados disponíveis nas publicações.

FONTE: Autoria própria.

Os dados apresentados por Treadway, Wyndham e Jorgenson (TREADWAY; WYNDHAM; JORGENSEN, 2015) são muito superiores aos apresentados pelas colunas produzidas nesse trabalho. Esses dados são referentes as colunas capilares empacotadas com partículas SP de maiores eficiências já registradas na literatura (segundo os autores). Variáveis importantes distinguem o estudo de Treadway, Wyndham e Jorgenson do estudo apresentado nessa dissertação: (i) os i.d. da coluna apresentada por Treadway, Wyndham e Jorgenson são dez vezes menores que o i.d. da coluna 6, o que melhora o desempenho das colunas (KENNEDY; JORGENSEN, 1989; PATEL et al., 2004); (ii) o diâmetro das partículas utilizadas por Treadway, Wyndham e Jorgenson são inferiores as partículas utilizadas na coluna 6 e (iii) as concentrações das suspensões para empacotamento de Treadway, Wyndham e Jorgenson são cerca de 3 vezes maiores do que a concentração da suspensão para empacotamento utilizada para o empacotamento da coluna 6; o empacotamento de C18 em escala capilar é favorecido em suspensões concentradas e contendo aglomerados (BRUNS et al., 2013; WAHAB et al., 2017).

Os dados apresentados na literatura, embora comparáveis, podem apresentar diferenças consideráveis devido a variações nas tubulações entre os cromatógrafos utilizados. Para contornar essas possíveis variações e comparar as colunas *homemade* ante colunas comerciais sem que existissem dúvidas a respeito da influência do sistema cromatográfico, as colunas 6 e 8 foram comparadas com as melhores colunas capilares disponíveis no laboratório, uma FP (Dionex C18 Acclaim PepMAp RSLC 50 x 0,3 mm, 2 μ m) e outra SP (Thermo Fisher Hypersil GOLD aQ C18 100 x 0,32 mm, 1,9 μ m). Ambas as colunas *homemade* apresentaram h inferiores as colunas comerciais (Tabela 4). A coluna comercial Acclaim apresentou H menor que a coluna 9; resultado esperado pois o d_p das partículas da coluna comercial é inferior ao d_p das partículas da coluna 9. A coluna 6, produzida com partículas SP 2,6 μ m apresentou H inferior as colunas comerciais empacotadas com partículas de d_p menores (SP 1,9 μ m e FP 2 μ m). Esses resultados são muito interessantes, pois demonstram que os hardwares desenvolvidos e apresentados nessa dissertação são capazes de serem empregados na construção de colunas com eficiências apropriadas e equivalentes ou superiores às eficiências das colunas comerciais.

6. CONCLUSÃO

Nessa dissertação de mestrado foi descrita a otimização do preparo de hardwares resistentes a altas pressões para colunas capilares empacotadas aplicáveis em cromatografia líquida. Os modelos de hardwares evoluíram gradativamente, superando as limitações dos modelos anteriores. O melhor modelo desenvolvido, composto por um capilar de PEEKsil (50 x 0.3 mm) fixado por um conjunto de conectores e anilhas às uniões (entrada e saída da coluna) contendo *frits*, foi capaz de suportar pressões próximas a 1000 bar. Isso o torna aplicável a UHPLC capilar. Esse modelo também apresentou elevada resistência mecânica, praticidade em conectá-lo ao sistema cromatográfico, facilidade na sua montagem e capacidade de reuso.

O efeito do material do hardware na eficiência de colunas capilares foi avaliado. Colunas produzidas com capilares de sílica fundida (PEEKsil) e *frits* de fibra de vidro apresentaram maior eficiência ante colunas compostas por capilares e *frits* de aço inoxidável. As colunas produzidas com o hardware otimizado e empacotadas com partículas SP e FP apresentaram eficiência da ordem de 150.000 e 115.000 pratos por metros, respectivamente. Esses valores estão próximos aos encontrados na literatura especializada em colunas empacotadas, em especial para a escala capilar.

Os resultados descritos nessa dissertação de mestrado possibilitam visualizar uma ampla faixa de aplicações futuras para essas colunas. A resistência mecânica do hardware desenvolvido permite a construção de colunas para UHPLC capilar para diversas aplicações analíticas. Esses hardwares também são aplicáveis para estudos sobre fatores causadores de alargamento de banda intracoluna em escala capilar, pois permitem o preparo de colunas com uma variedade de fases, i.d., comprimentos e partículas indisponíveis comercialmente. A baixa contribuição desses hardwares no alargamento de banda, verificada pela sua equivalência ou superioridade a colunas comerciais, faz com que esse hardware seja bastante interessante para essas aplicações.

REFERÊNCIAS

BOCELLI, M. D.; BORSATTO, J. V. B.; SANTOS-NETO, A. J. HPLC UHPLC capilar : aspectos teóricos e práticos. **Scientia Chromatografica**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2018.

BRUNS, S.; FRANKLIN, E. G.; GRINIAS, J. P.; GODINHO, J. M.; JORGENSEN, J. W.; TALLAREK, U. Slurry concentration effects on the bed morphology and separation efficiency of capillaries packed with sub-2 μ m particles. **Journal of Chromatography A**, v. 1318, p. 189-197, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.017>>.

BRUNS, S.; GRINIAS, J. P.; BLUE, L. E.; JORGENSEN, J. W.; TALLAREK, U. Morphology and separation efficiency of low-aspect-ratio capillary ultrahigh pressure liquid chromatography columns. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 10, p. 4496-4503, 2012a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22519681>>.

BRUNS, S.; MU, T.; KOLLMANN, M.; SCHACHTNER, J.; HO, A.; TALLAREK, U. Confocal laser scanning microscopy method for quantitative characterization of silica monolith morphology. **Journal of Chromatography A**, v. 82, n. 15, p. 6569-6575, 2010.

BRUNS, S.; STOECKEL, D.; SMARSLY, B. M.; TALLAREK, U. Influence of particle properties on the wall region in packed capillaries. **Journal of Chromatography A**, v. 1268, p. 53-63, 2012b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.10.027>>.

BRUNS, S.; TALLAREK, U. Physical reconstruction of packed beds and their morphological analysis: Core-shell packings as an example. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 14, p. 1849-1860, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.013>>.

CABOOTER, D.; FANIGLIULO, A.; BELLAZZI, G.; ALLIERI, B.; ROTTIGNI, A.; DESMET, G. Relationship between the particle size distribution of commercial fully porous and superficially porous high-performance liquid chromatography column packings and their chromatographic performance. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 45, p. 7074-7081, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.09.008>>.

CATANI, M.; ISMAIL, O. H.; CAVAZZINI, A.; CIOGLI, A.; VILLANI, C.; PASTI, L.; BERGANTIN, C.; CABOOTER, D.; DESMET, G.; GASPARRINI, F.; BELL, D. S. Rationale behind the optimum efficiency of columns packed with new 1.9 μ m fully porous particles of narrow particle size distribution. **Journal of Chromatography A**, v. 1454, p. 78-85, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.05.038>>.

CHEN, M. H.; HORVÁTH, C. Temperature programming and gradient elution in reversed-phase chromatography with packed capillary columns. **Journal of chromatography. A**, v. 788, n. 1-2, p. 51-61, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9419873>>.

CHEONG, W. J.; ALI, F.; KIM, Y. S.; LEE, J. W. Comprehensive overview of recent preparation and application trends of various open tubular capillary columns in separation science. **Journal of Chromatography A**, v. 1308, p. 1-24, 2013.
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.107>>.

COUTINHO, L. F.; DOMINGUES NAZARIO, C. E.; MONTEIRO, A. M.; LANÇAS, F. M. Novel devices for solvent delivery and temperature programming designed for capillary liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 15, p. 1903-1910, 2014.

COUTINHO, L. F. M.; LANÇAS, F. M. Cromatografia líquida capilar1. principais características da técnica. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 2, p. 115-130, 2011.
Disponível em: <<http://doi.editoracubo.com.br/10.4322/sc.2011.007>>.

COVEY, T. R.; THOMSON, B. A.; SCHNEIDER, B. B. Atmospheric pressure ion sources. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 28, n. 6, p. 870-897, 1 nov. 2009.
Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/mas.20246>>. Acesso em: 17 jul. 2017.

CREGO, A. L.; DIEZ-MASA, J. C.; DABRIO, M. V. Preparation of open tubular columns for high-performance liquid chromatography reversed-phase. **Analytical Chemistry**, v. 65, n. 18, p. 1615-1621, 1993.

DE MALSCHE, W.; EGHBALI, H.; CLICQ, D.; VANGELOOVEN, J.; GARDENIERS, H.; DESMET, G. Pressure-driven reverse-phase liquid chromatography separations in ordered nonporous pillar array columns. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 15, p. 5915-5926, 2007.

DESMET, G.; EELTINK, S. Fundamentals for LC miniaturization. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 543-556, 2013.

DOLZAN, M. D.; SPUDEIT, D. A.; BREITBACH, Z. S.; BARBER, W. E.; MICKE, G. A.; ARMSTRONG, D. W. Comparison of superficially porous and fully porous silica supports used for a cyclofructan 6 hydrophilic interaction liquid chromatographic stationary phase. **Journal of Chromatography A**, v. 1365, p. 124-130, 2014.
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.09.010>>.

EELTINK, S.; ROZING, G. P.; SCHOENMAKERS, P. J.; KOK, W. T. Study of the influence of the aspect ratio on efficiency, flow resistance and retention factors of packed capillary columns in pressure- and electrically-driven liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1044, n. 1-2, p. 311-316, 2004.

EGHBALI, H.; DESMET, G. Optimum kinetic performance of open-tubular separations in microfluidic devices. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 10, p. 1377-1397, 2007.

ENDELE, R.; HALÁZ, I.; UNGER, K. Influence of the particle size (5-35 μm) of spherical silica on column efficiencies in high-pressure liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 99, p. 377-393, 1974.

FORSTER, S.; KOLMAR, H.; ALTMAIER, S. Synthesis and characterization of new generation open tubular silica capillaries for liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1265, p. 88-94, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.09.054>>.

FORSTER, S.; KOLMAR, H.; ALTMAIER, S. Performance evaluation of thick film open tubular silica capillary by reversed phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1283, p. 110-115, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.107>>.

FRANC, M.; SOBOTNÍKOVÁ, J.; COUFAL, P.; BOSÁKOVÁ, Z. Comparison of different types of outlet frits in slurry-packed capillary columns. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 17, p. 2278-2283, 2014.

GIDDINGS, J. C. Eddy diffusion in chromatography. **Nature**, v. 184, n. 4683, p. 357-358, 1959.

GILAR, M.; MCDONALD, T. S.; GRITTI, F. Experimental evaluation of chromatographic performance of capillary and microfluidic columns with linear or curved channels. **Journal of Chromatography A**, v. 1470, p. 76-83, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.10.004>>.

GRITTI, F.; FARKAS, T.; HENG, J.; GUIOCHON, G. On the relationship between band broadening and the particle-size distribution of the packing material in liquid chromatography: Theory and practice. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 45, p. 8209-8221, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.09.034>>.

GRITTI, F.; GUIOCHON, G. Relationship between trans-column eddy diffusion and retention in liquid chromatography: Theory and experimental evidence. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 41, p. 6350-6365, 2010a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.07.029>>.

GRITTI, F.; GUIOCHON, G. Mass transfer mechanism in liquid chromatography columns packed with shell particles: Would there be an optimum shell structure? **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 52, p. 8167-8180, 2010b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.075>>.

GRITTI, F.; GUIOCHON, G. Theoretical and experimental impact of the bed aspect ratio on the axial dispersion coefficient of columns packed with 2.5µm particles. **Journal of Chromatography A**, v. 1262, p. 107-121, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.09.001>>.

GRITTI, F.; MARTIN, M.; GUIOCHON, G. Influence of viscous friction heating on the efficiency of columns operated under very high pressures. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 9, p. 3365-3384, 2009.

GRITTI, F.; MCDONALD, T.; GILAR, M. Impact of the column hardware volume on resolution in very high pressure liquid chromatography non-invasive investigations. **Journal of Chromatography A**, v. 1420, p. 54-65, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.09.079>>.

GRITTI, F.; MCDONALD, T.; GILAR, M. Intrinsic advantages of packed capillaries over narrow-bore columns in very high-pressure gradient liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1451, p. 107-119, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.05.035>>.

GU, C.; LIN, L.; CHEN, X.; JIA, J.; REN, J.; FANG, N. Effects of inner diameter of monolithic column on separation of proteins in capillary-liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1170, n. 1-2, p. 15-22, 2007.

GUIOCHON, G.; GRITTI, F. Shell particles, trials, tribulations and triumphs. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 15, p. 1915-1938, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.01.080>>.

HETZEL, T.; LOEKER, D.; TEUTENBERG, T.; SCHMIDT, T. C. Characterization of the efficiency of microbore liquid chromatography columns by van Deemter and kinetic plot analysis. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 20, p. 3889-3897, 2016.

HORVATH, C. G.; PREISS, B. A.; LIPSKY, S. R. Fast liquid chromatography: an investigation of operating parameters and the separation of nucleotides on pellicular ion exchangers. **Analytical Chemistry**, v. 39, n. 12, p. 1422-1428, 1967.

HORVÁTH, K.; LUKÁCS, D.; SEPSEY, A.; FELINGER, A. Effect of particle size distribution on the separation efficiency in liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1361, p. 203-208, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.08.017>>.

HSIEH, S.; JORGENSEN, J. W. Preparation and evaluation of slurry-packed liquid chromatography microcolumns with inner diameters from 12 to 33 microns. **Analytical chemistry**, v. 68, n. 7, p. 1212-1217, 1996.

KENNEDY, R. T.; JORGENSEN, J. W. Preparation and Evaluation of Packed Capillary Liquid Chromatography Columns with Inner Diameters from 20 to 50 μm . **Analytical Chemistry**, v. 61, n. 10, p. 1128-1135, 1989. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00185a016>>.

KUTTER, J. P. Liquid phase chromatography on microchips. **Journal of Chromatography A**, v. 1221, p. 72-82, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.10.044>>.

LAMBERT, N.; MIYAZAKI, S.; OHIRA, M.; TANAKA, N.; FELINGER, A. Comparison of the kinetic performance of different columns for fast liquid chromatography, emphasizing the contributions of column end structure. **Journal of Chromatography A**, v. 1473, p. 99-108, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.10.052>>.

LEAL, V. L.; SILVA, M. R. da; LANÇAS, F. M. Avanços recentes na miniaturização de colunas para cromatografia líquida. **Scientia Chromatographica**, v. 9, n. 2, p. 117-133, 2017. Disponível em: <<http://www.scientiachromatographica.com/doi/10.4322/sc.2017.010>>.

LEVKIN, P. A.; EELTINK, S.; STRATTON, T. R.; BRENNEN, R.; ROBOTTI, K.; YIN, H.; KILLEEN, K.; SVEC, F.; FRÉCHET, J. M. J. Monolithic porous polymer stationary phases in polyimide chips for the fast high-performance liquid chromatography separation of proteins and peptides. **Journal of Chromatography A**, v. 1200, n. 1, p. 55-61, 2008.

LI, R. N.; WANG, Y. N.; PENG, M. H.; WANG, X. Y.; GUO, G. S. Preparation and application of porous layer open tubular capillary columns with narrow bore in liquid chromatography. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 1865-1873, 2017.

LIEKENS, A.; BILLEN, J.; SHERANT, R.; RITCHIE, H.; DENAYER, J.; DESMET, G. High performance liquid chromatography column packings with deliberately broadened particle size distribution: Relation between column performance and packing structure. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 38, p. 6654-6662, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.055>>.

MAJORS, R. E. Effect of Particle Size on Particle Eddy Diffusivity. **JOURNAL OF CHROMATOGRAPHIC SCIENCE**, v. 11, p. 88-95, ago. 1973.

MOLANDER, P.; OLSEN, R.; LUNDANES, E.; GREIBROKK, T. The impact of column inner diameter on chromatographic performance in temperature gradient liquid chromatography. **Analyst**, v. 128, n. 11, p. 1341-1345, 2003. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0346847611&partnerID=40&md5=95531698b12133c5a45aa9f22f720c59>>.

MONTEIRO, Alessandra. **Cromatografia líquida capilar: desenvolvimento de colunas empacotadas e monolíticas, celas de detecção UV e aplicação da programação de temperatura**. 2010. 188 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

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. 961, n. 1, p. 53-63, 2002.

NOVÁKOVÁ, L.; MATYSOVÁ, L.; SOLICH, P. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. **Talanta**, v. 68, p. 908-918, 2006.

PATEL, K. D.; JERKOVICH, A. D.; LINK, J. C.; JORGENSEN, J. W. In-Depth Characterization of Slurry Packed Capillary Columns with 1.0- μm Nonporous Particles Using Reversed-Phase Isocratic Ultrahigh-Pressure Liquid Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 19, p. 5777-5786, out. 2004. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac049756x>>.

PIRES, Fabiane. **Preparação e avaliação de colunas capilares monolíticas à base de sílica modificadas com poldimetilsiloxano (PDMS) para uso em cromatografia líquida capilar**. 2017. 85 f. Dissertação (Mestrado em Química) Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

P PRESSLTD, P.; DEEMTER, V. A. N. diffusion and resistance to mass transfer nonideality in chromatography. **Chemical Egeenng Science**, v. 6, 1956.

ROZENBRAND, J.; VAN BENNEKOM, W. P. Silica-based and organic monolithic capillary columns for LC: Recent trends in proteomics. **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 16-17, p. 1934-1944, 2011.

SAITO, Y.; JINNO, K.; GREIBROKK, T. Capillary columns in liquid chromatography: between conventional columns and microchips. **Journal of Separation Science**, v. 27, n. 17-18, p. 1379-1390, dez. 2004. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200401902>>.

SANTOS-NETO, A. J.; BERGQUIST, J.; LANÇAS, F. M.; SJÖBERG, P. J. R. Simultaneous analysis of five antidepressant drugs using direct injection of biofluids in a capillary restricted-access media-liquid chromatography-tandem mass spectrometry system. **Journal of Chromatography A**, v. 1189, n. 1-2, p. 514-522, 2008.

SANTOS-NETO, A. J.; MARKIDES, K. E.; SJO, P. J. R.; BERGQUIST, J.; LANÇAS, F. M.; BOX, P. O.; CARLOS, S. Capillary column switching restricted-access ionization-tandem mass spectrometry system for biofluids. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 16, p. 6359-6367, 2007.

SANTOS NETO, A. J.; RODRIGUES, J. C.; FERNANDES, C.; TITATO, G. M.; ALVES, C.; LANÇAS, F. M. Automated microcolumn-switching system for drug analysis by direct injection of human plasma. **Journal of Chromatography A**, v. 1105, n. 1-2 SPEC. ISS., p. 71-76, 2006.

SMITS, W.; DERIDDER, S.; DESMET, G. The impact of flow distribution on column performance: A computational fluid dynamics study. **Journal of Chromatography A**, v. 1369, p. 125-130, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.10.024>>.

SONG, W.; PABBISETTY, D.; GROEBER, E. A.; STEENWYK, R. C.; FAST, D. M. Comparison of fused-core and conventional particle size columns by LC-MS/MS and UV: Application to pharmacokinetic study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 50, n. 3, p. 491-500, 2009.

TREADWAY, J. W.; WYNDHAM, K. D.; JORGENSEN, J. W. Highly efficient capillary columns packed with superficially porous particles via sequential column packing. **Journal of Chromatography A**, v. 1422, p. 345-349, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.10.013>>.

TSUDA, T.; HIBI, K.; NAKANISHI, T.; TAKEUCHI, T.; ISHII, D. Studies of open-tubular micro-capillary liquid chromatography. II. Chemically bonded octadecylsilane stationary phase. **Journal of Chromatography A**, v. 158, n. C, p. 227-232, 1968.

WAHAB, M. F.; PATEL, D. C.; WIMALASINGHE, R. M.; ARMSTRONG, D. W. Fundamental and practical insights on the packing of modern high-efficiency analytical and capillary columns. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 16, p. 8177-8191, 2017.