

CROMATOGRAFIA UNIFICADA

Carin von Mühlen e Fernando Mauro Lanças*

Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, Av. do Trabalhador São-carlense, 400, 13566-590 São Carlos - SP

Recebido em 21/3/03; aceito em 20/1/04; publicado na web em 17/6/04

UNIFIED CHROMATOGRAPHY. The scope of this study encompasses an overview of the principles of unified chromatography as well as the principles of chromatographic techniques as applied to unified systems, which include gas chromatography, liquid chromatography, supercritical fluid chromatography, high temperature and high pressure liquid chromatography, micro-liquid chromatography, enhanced fluidity chromatography, and solvating gas chromatography. Theoretical considerations and individual instrumental parameters such as mobile phase, sample introduction system, columns, and detection system are also discussed. Future applications of this separation approach are discussed.

Keywords: unified chromatography; instrumentation; separation.

INTRODUÇÃO

Os primeiros artigos envolvendo a cromatografia como uma ciência foram publicados em 1906 por Michael Tswett, um botânico russo, o qual separou algumas substâncias de extratos de plantas¹. Desde então, esta técnica desenvolveu-se e ampliou-se até uma forma instrumental com elevada sofisticação, inicialmente com a cromatografia gasosa (GC), posteriormente, a cromatografia líquida (LC) e, finalmente, a cromatografia com fluido supercrítico² (SFC), concebida nos anos 60, mas empregada muito tempo depois de seu desenvolvimento.

Na década de 70, os sistemas cromatográficos existentes eram a GC e LC, como técnicas bem distintas. Nos anos 80, buscou-se um aumento da resolução nestes modos cromatográficos, consolidando-se a cromatografia gasosa de alta resolução (HRGC) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Nessa década ocorreu também a introdução de sistemas de SFC, porém com adaptações de equipamentos já existentes, utilizando a tecnologia de detecção e colunas importadas da GC, e técnicas de injeção e controle da fase móvel de HPLC². Nos anos 90, ocorreu a miniaturização destas técnicas pela introdução de sistemas μ -HRGC, μ -SFC e μ -LC.

Uma revisão recente sobre cromatografia gasosa³ destaca os avanços em GC de alta temperatura e técnicas multidimensionais. Alguns avanços em sistemas GC portáteis, assim como em detectores, também foram apresentados. Como no passado, a grande maioria dos trabalhos publicados estão relacionados com o desenvolvimento de metodologias analíticas para a aplicação da técnica. Um trabalho extensivo sobre as tendências em GC foi realizado, com 139 referências⁴, e pode ser utilizado tanto com cunho histórico, como para verificar as tendências dos últimos anos. Com base nessas revisões e em trabalhos mais específicos, foi possível verificar que praticamente nenhum trabalho foi relatado buscando a unificação da GC com outras técnicas, em um sistema único nos últimos anos.

Tratando-se de HPLC, uma revisão recente⁴ apresentou importantes avanços, nos últimos três anos, enfocados na miniaturização, velocidade e desenvolvimentos para necessidades específicas, como pesquisas em biotecnologia e química combinatorial. Esse autor também cita uma explosão de artigos tratando de técnicas de microcromatografia, tais como a cromatografia líquida capilar (CLC), a

eletrocromatografia capilar (CEC), e técnicas em “microchip”, incluindo o desenvolvimento de novos detectores. Outro assunto estudado é o efeito da temperatura em cromatografia líquida, o qual será melhor discutido posteriormente.

A cromatografia com fluido supercrítico (SFC), até os dias de hoje, não foi difundida tão largamente como a LC e GC. Poucas empresas produzem equipamentos comerciais e ainda sem muito sucesso. Todavia, o uso da SFC continua crescendo, principalmente com o desenvolvimento de equipamentos para técnicas correlatas, como sistemas para introdução de amostra mais eficientes, equipamentos comerciais para HPLC de alta temperatura, estudos envolvendo SFC e detecção com espectrometria de massas (MS), bombas especificamente desenvolvidas para uso de dióxido de carbono como fase móvel entre outros, o que demonstra um amadurecimento gradual da técnica, a qual poderá abrir as portas para a aplicação da SFC em processos rotineiros de análise. Em revisão recente desta técnica, Chester e Pinkstone¹, em 2002, ressaltam o crescimento de aplicações da SFC em complementação à HPLC na área farmacêutica, o desenvolvimento da HPLC de alta temperatura e estudos envolvendo fases estacionárias e detectores para SFC.

Cada sistema cromatográfico foi desenvolvido separadamente (CG, LC, SFC), de forma que a instrumentação envolvida em cada método é diferente. Entretanto, alguns trabalhos foram desenvolvidos na tentativa de unificar os vários sistemas cromatográficos existentes em um único equipamento, capaz de trabalhar com fases móveis em diferentes estados físicos.

Nesta revisão, serão discutidos trabalhos que englobam aspectos unificados, ou que buscaram a unificação da cromatografia como um todo. Entre eles, serão destacados a HPLC de alta temperatura e alta pressão, LC capilar e técnicas envolvendo fase móvel com fluidez realçada, e a cromatografia a gás solvatante. Estes desenvolvimentos significaram enorme avanço na direção da cromatografia unificada propriamente dita. Serão discutidos, também, alguns aspectos teóricos relevantes para a técnica, e aspectos instrumentais individuais, tais como fase móvel, injetores, colunas e detectores.

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA A ALTA TEMPERATURA

Em cromatografia líquida (LC), a temperatura deve exercer efeito sobre parâmetros físicos como solubilidade, pressão de vapor, viscosidade e difusividade e, conseqüentemente, sobre a retenção, efi-

*e-mail: flancas@iqsc.usp.br

ciência da coluna, seletividade, queda de pressão na coluna e nas propriedades da fase estacionária. Logo, todos os parâmetros importantes em LC são mais ou menos influenciados pela temperatura. Como a LC é usualmente mais robusta a pequenas alterações na temperatura, em comparação a alterações no pH, ou na composição da fase móvel, este parâmetro é, usualmente, negligenciado nesta técnica, o que não deveria ocorrer. Greibrokk e Andersen⁵ comentam que a negligência da utilização da temperatura como parâmetro a ser otimizado está relacionada com o fato de que a LC é uma técnica parcialmente preparativa, e que a programação de temperatura é difícil de ser implementada em colunas grandes, devido ao gradiente radial de temperatura resultante. Assim, muitas pessoas têm estado satisfeitas com os resultados obtidos à temperatura ambiente, antes do surgimento da miniaturização. Apesar da pouca aplicação, historicamente, o efeito da temperatura na retenção foi relatada pela primeira vez há mais de 50 anos atrás⁶.

Outro ponto importante levantado por Strain⁶ é a discussão sobre a decomposição dos analitos a temperaturas mais altas. Este autor considera que o tempo de exposição dos analitos a altas temperaturas é muito pequeno para ocorrer a degradação, dado o tempo curto das corridas cromatográficas neste modo. Thompson e Carr⁷ afirmam que a maioria das reações químicas que afetam a estabilidade dos analitos, tais como hidrólise, oxidação, isomerização e epimerização, é considerada desprezível. Este ponto é muito importante, visto que muitos justificam a não utilização da temperatura devido à degradabilidade dos analitos sem, no entanto, comprovarem experimentalmente que essa degradação ocorre.

Cui e Olesik⁸ discutem que a HPLC é geralmente utilizada para a separação de compostos não voláteis, porém, não há restrições para outros compostos. A HPLC geralmente apresenta maior tempo de análise e menor eficiência do que SFC. A razão está na baixa difusão dos compostos em líquidos, comparada com fluido supercrítico. Os líquidos apresentam coeficientes de difusão na ordem de 10^{-5} cm² s⁻¹, comparado a 10^{-4} a 10^{-3} cm² s⁻¹ para fluidos supercríticos.

Thompson e Carr⁷ afirmam que as vantagens da utilização de altas temperaturas em cromatografia líquida são claras. Acima de 100 °C, a diminuição de 5 a 10 vezes na viscosidade do eluente e o aumento concomitante da difusividade dos analitos contribuem para um aumento drástico na velocidade de análise. A menor viscosidade diminui a queda de pressão ao longo da coluna, o que permite maiores velocidades lineares na pressão limite da bomba.

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PRESSÃO

MacNair e colaboradores^{9,10} introduziram a cromatografia líquida capilar com ultra-alta pressão (UHPLC) em 1997, buscando resolver as limitações que a utilização de partículas de diâmetro pequeno impunham para sistemas de bombeamento convencionais. Em seu primeiro trabalho, MacNair e colaboradores⁹ utilizaram partículas de 1,5 µm de diâmetro, com a pressão chegando a 4100 bar (60.000 psi), obtendo até 300.000 pratos para os compostos menos retidos e 200.000 pratos para os compostos mais retidos. Em trabalho mais recente, MacNair e colaboradores¹⁰ utilizaram partículas de 1 µm de diâmetro, com a pressão chegando a 5000 bar (72.000 psi), obtendo até 200.000 pratos para analitos orgânicos pequenos em 6 min de análise, em condições isocráticas. Estes resultados promissores, mesmo que ainda recentes, demonstram que a utilização de altas pressões é bastante vantajosa porém, muitos estudos devem ser realizados, buscando uma sedimentação desta técnica.

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA MINIATURIZADA

As técnicas de micro-LC são fundamentadas na miniaturização

das colunas de HPLC. Conseqüentemente, torna-se necessária a redução do tamanho da válvula de injeção, cela de detecção e qualquer outro volume extra coluna, de forma a minimizar perdas na resolução ocorridas pelo espalhamento da banda. Estas reduções resultam em um grande aumento na eficiência de separação. Em função destas modificações, as colunas de micro-LC apresentam, tipicamente, 10 vezes mais pratos que as colunas de HPLC convencionais¹¹. Existe muita discussão sobre classificação de dimensões da coluna e vazões que abrangem a HPLC convencional, micro-LC, LC capilar e a nano-LC. A maioria das técnicas tem sido nomeada com base no tipo ou diâmetro interno do tubo utilizado para a coluna cromatográfica, todavia, com o uso de novos materiais para a manufatura dos tubos, como capilares de sílica fundida, tubos poliméricos, tubos de aço inoxidável, tubos micro torneados em placas de silicone, etc., esta nomenclatura torna-se insuficientemente precisa. Por este motivo, Chervet *et al.*¹² sugeriram uma nomenclatura considerando também a vazão da fase móvel empregada, seguida do diâmetro interno da coluna, ou seu material de fabricação. Esta nomenclatura está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Nomes e definições para as técnicas de HPLC segundo Chervet¹²

| Diâmetro interno da coluna | Vazão da fase móvel | Nome |
|----------------------------|---------------------|-------------------|
| 3,2 – 4,6 mm | 0,5 – 2,0 mL/min | HPLC convencional |
| 1,5 – 3,2 mm | 100 – 500 µL/min | HPLC microbore |
| 0,5 – 1,5 mm | 10 – 100 µL/min | micro-LC |
| 150 – 500 µm | 1 – 10 µL/min | LC capilar |
| 10 – 150 µm | 10 – 1000 nL/min | nano-LC |

TÉCNICAS ENVOLVENDO FASE MÓVEL COM FLUIDEZ REALÇADA

Os primeiros estudos realizados com fase móvel com fluidez realçada são atribuídos a Cui e Olesik¹³, em 1991. Neste trabalho, estudaram o efeito da diminuição da viscosidade pela adição de CO₂ em uma fase móvel comumente empregada em HPLC, o metanol, a 25 °C e 170 bar (2500 psi) de pressão, concluindo que o tempo de análise para a separação de uma mistura teste diminuiu quando grandes proporções de CO₂ foram adicionadas. Estes mesmos autores continuaram a pesquisa nesta área, publicando em 1995⁸ o primeiro trabalho aplicando líquidos com fluidez realçada à HPLC de fase reversa. Neste trabalho, utilizaram como fase móvel uma mistura de metanol e água, adicionaram CO₂ como realçador de fluidez e uma coluna capilar contendo octadecil polissiloxano ligado a partículas de sílica de 5 µm de diâmetro e 80 Å de tamanho de poro, obtendo menores alturas equivalentes a um prato e menor tempo de análise com a adição do CO₂. Lee e Olesik¹⁴ apresentaram um trabalho no mesmo ano, aplicando a fase móvel com fluidez realçada para HPLC com fase normal, utilizando n-hexano enriquecido com CO₂ como fase móvel, e uma coluna com fase estacionária 3-cianopropil polissiloxano. Neste trabalho, obtiveram também melhora na eficiência e constataram uma diminuição na assimetria dos picos, com a adição de CO₂. Entretanto, também constataram que existia uma quantidade limite de CO₂ a ser adicionada para causar estes efeitos.

Uma das técnicas existentes que aplicam fases móveis com fluidez realçada é a cromatografia líquida na condição crítica, LCCC, mais popularmente conhecida por cromatografia com fluido supercrítico. A variável mais comumente manipulada para atingir a condição crítica nestes sistemas é a composição da fase móvel, utili-

zando misturas de até três líquidos diferentes. Líquidos com fluidez realçada são comumente solventes orgânicos, como tetraidrofurano (THF), misturados com uma grande proporção de gases liquefeitos, como CO_2 . Líquidos com a fluidez realçada mantêm a força do solvente vinculada à proporção de solvente orgânico, enquanto que as propriedades de viscosidade estão vinculadas ao modificador de fluidez. A alta compressibilidade destes líquidos permite a manipulação da força do solvente pela mudança da pressão ou temperatura, variáveis que são inatingíveis para fases móveis compostas por líquidos puros¹⁵.

Conforme o levantamento realizado na base de dados da Web of Science em 2002, foram encontrados apenas 23 trabalhos publicados envolvendo fase móvel com fluidez realçada, sendo que todos foram realizados pelo mesmo grupo de pesquisa, liderado por Olesik. Assim, podemos concluir que esta técnica está em sua infância, e muitos estudos a este respeito devem ainda ser realizados.

CROMATOGRAFIA A GÁS SOLVATANTE (SGC)

A cromatografia a gás solvatante é assim chamada quando a fase móvel que entra na coluna cromatográfica encontra-se no estado supercrítico, e na saída, no estado gasoso. Esta técnica também é bastante recente, sendo que o primeiro trabalho envolvendo a cromatografia a gás solvatante foi publicado em 1997 por Shen e Lee¹⁶. Segundo a pesquisa bibliográfica realizada na base de dados Web of Science, em 2002, foram encontradas apenas 18 publicações envolvendo esta técnica, sendo que todas apresentam os pesquisadores que a conceberam como co-autores.

No primeiro trabalho, foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida, contendo partículas de octadecil sílica (10 μm de diâmetro), com dimensões 336 cm X 250 μm i.d., utilizando CO_2 com fase móvel. Para a temperatura de 130 °C, foram obtidos 264.000 pratos, com uma pressão de entrada de CO_2 de 260 atm. Os autores concluíram que o fator de retenção é dependente da pressão de entrada da coluna, porém independente do gradiente de pressão ao longo da coluna¹⁶.

Um trabalho mais recente¹⁷ apresenta a cromatografia a gás solvatante utilizando água acima do ponto de ebulição como fase móvel, e uma coluna empacotada com partículas de zircônio com 3 μm de diâmetro médio, encapsuladas com polibutadieno. Com este sistema, os autores realizaram uma série de considerações quanto à transferência de massa, ao fator de retenção e estudos com a temperatura.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

As equações mais utilizadas para definir parâmetros cromatográficos, tais como eficiência de uma coluna cromatográfica, resolução, número de pratos, entre outros, já estão bastante estabelecidas, desde o início dos anos 60¹⁸. Os modos cromatográficos de separação (GC, LC e SFC) são ainda classificados de acordo com o estado físico da fase móvel (gás, líquido ou fluido supercrítico) na coluna. Em 1965, Giddings já discutira a inexistência de limites teóricos entre os modos de separação cromatográfica, considerando estas distinções como arbitrarias, artificiais e contraproduzidas¹⁹.

Os princípios da cromatografia unificada podem ser explicados pela teoria das fases para um fluido puro. Um diagrama de fases para um fluido puro (Figura 1) é um diagrama bidimensional de pressão em função da temperatura, no qual os estados sólido, líquido e vapor estão separados por linhas representando a transição de fase da sublimação, fusão e ebulição. As fases sólida, líquida e gasosa coexistem em equilíbrio apenas no ponto triplo. A medida em que a linha da ebulição é estendida do ponto triplo para maiores pressões e temperaturas, onde as fases líquida e vapor coexistem no equilíbrio, as

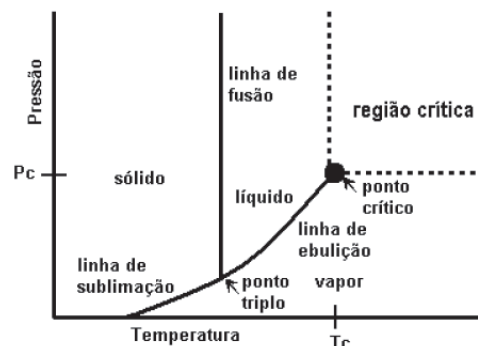


Figura 1. Diagrama de fases de uma substância pura

diferenças entre as propriedades que distinguem líquido de vapor vão diminuindo, até um ponto em que convergem. Este ponto é o ponto crítico, onde a linha de ebulição termina. Para valores de pressão e temperatura maiores do que do ponto crítico, existe apenas uma fase fluida, que é compressível como um vapor, mas que solvata e dissolve outras substâncias como um líquido. Um fluido sob condições acima do ponto crítico, neste diagrama, é chamado de fluido supercrítico²⁰.

Baseando-se neste diagrama, pode-se perceber que a fronteira que separa um gás de um líquido e ambos de um fluido supercrítico é inexistente, e que cada estado pode ser alcançado apenas pela variação das condições de temperatura e pressão.

Em 1988, Martire²¹ derivou a teoria unificada da cromatografia de adsorção, utilizando termodinâmica estatística e um modelo de campo auto-consistente. Essas equações apresentam uma complexidade desnecessária a este trabalho, porém revelam que as variáveis de estados naturais para qualquer fase móvel são a temperatura e a densidade reduzidas.

Outro estudo importante é baseado nas curvas de eficiência de Van Deemter construídas a partir da combinação de vários parâmetros cromatográficos, sob condições de GC, SFC e HPLC²².

A Figura 2 indica que velocidades ótimas para diferentes técnicas são diferentes, o que é uma das maiores dificuldades da cromatografia unificada²². Outros fatores importantes a serem considerados são os parâmetros operacionais tradicionalmente aplicados a cada técnica. Para a GC, os efeitos mais importantes são a temperatura e a vazão da fase móvel, para HPLC é a composição da fase móvel, e para SFC, a pressão, temperatura e composição da fase móvel. Entretanto, como será discutido posteriormente, todos estes parâmetros são importantes em todos os casos, e devem ser considerados em um sistema unificado, além de outros parâmetros, tal como a compressibilidade da fase móvel.

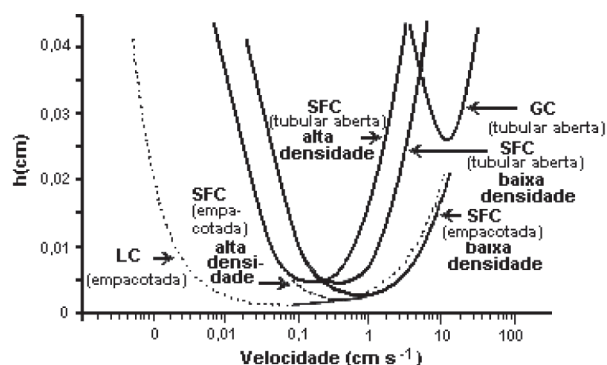


Figura 2. Curvas de eficiência de Van Deemter. Reproduzida da ref. 22 com permissão da Elsevier

INSTRUMENTAÇÃO PARA CROMATOGRAFIA UNIFICADA

Takeuchi e colaboradores²³ realizaram o trabalho prático pioneiro em cromatografia unificada em 1987, construindo um sistema que utilizava duas bombas e uma coluna empacotada no interior de um forno, conforme o esquema ilustrado na Figura 3. Eles investigaram os efeitos de temperatura e pressão da coluna na retenção relativa entre hidrocarbonetos aromáticos, empregando metanol e éter dietílico como fases móveis. Pela variação de pressão e temperatura, o sistema poderia operar sob condições de GC e LC²⁴. Com este sistema, Ishii e Takeuchi²⁵ estudaram o efeito da fase móvel na separação de alguns compostos. Foi realizada a separação de mistura artificial de hidrocarbonetos aromáticos e oligômeros de estireno (Figura 4), tanto em coluna capilar de sílica fundida microempacotada, quanto em capilar tubular aberta, utilizando éter etílico como fase móvel. Os hidrocarbonetos foram separados no modo GC e os oligômeros foram separados no modo SFC, isotermicamente na temperatura supercrítica, utilizando uma programação de pressão.

Davies e Yang²⁶ estudaram os aspectos teóricos da técnica com respeito às características da fase móvel, velocidades lineares ótimas e capacidade máxima, utilizando um sistema relativamente simples (Figura 5) constituído de um forno Lee Scientific Series 600, bomba e controlador, modificando apenas o sistema de injeção e o sistema de seleção da fase móvel, utilizando uma válvula Valco, de 200 nL. Foi utilizada coluna tubular aberta de 10 m de comprimento e 100 µm de diâmetro interno, e um restritor de 50 µm de diâmetro interno. A fase móvel empregada no modo SFC foi dióxido de carbono, inserido no sistema por uma bomba seringa, e no modo GC foi hélio pressurizado. Com este sistema, foi analisada mistura de gasolina e petróleo cru e uma amostra de verniz incolor, no modo sequencial GC-SFC.

Steenackers e Sandra²⁷ realizaram experimentos com colunas microempacotadas, visando a cromatografia unificada. Para tal, utilizaram um instrumento Carlo Erba SFC 3000 equipado com um injetor pneumático Valco C14W de 60 nL, e um detector de ionização de chama (FID). Como fase móvel foi utilizado CO₂, e como restritor, tubos capilares de sílica fundida com 10 a 30 cm de comprimento e 5 a 10 µm de diâmetro interno. Foram utilizadas colunas de sílica fundida "homemade" empacotadas com três tipos de fases. Com este sistema, foram analisados vários hidrocarbonetos, inicialmente em condições de GC de alta pressão, seguido de SFC de alta temperatura.

Liu e Yang²⁸ realizaram um estudo da cromatografia gasosa de alta pressão unificada com SFC empregando colunas microbore empacotadas. Para tal, utilizaram um sistema SFC Lee Scientific

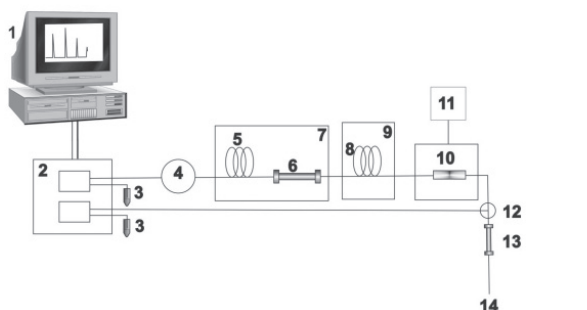


Figura 3. Esquema do sistema de cromatografia unificada pioneiro, desenvolvido por Takeuchi e colaboradores: 1- microcomputador; 2- bomba HPLC; 3- solventes; 4- válvula de injeção; 5- capilar para pré-aquecimento; 6- coluna de separação; 7- forno GC; 8- capilar para esfriamento; 9- banho de água; 10- detector UV; 11- aquisição de dados; 12- União T 1/32 in. (Valco); 13- coluna restritora e 14- saída

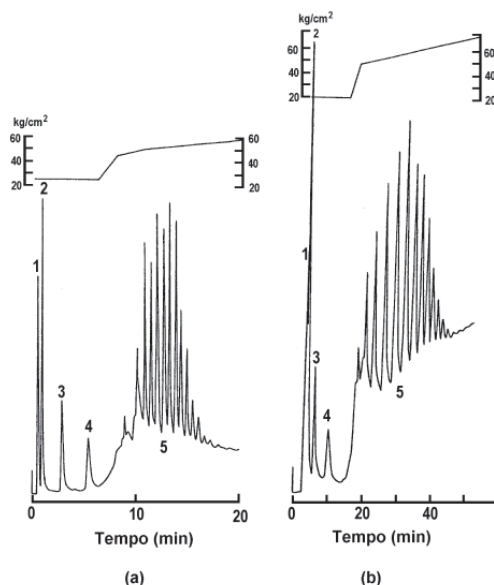


Figura 4. Cromatogramas representativos da separação sequencial GC e SFC de mistura artificial de hidrocarbonetos aromáticos e oligômeros de estireno²⁵, (a) em coluna capilar microempacotada com Develosil 5 µm, de dimensões 15 m X 0,5 mm I.D.; (b) em coluna capilar (tubular aberta) de sílica fundida, 13 m X 53 µm, tratada com hidróxido de sódio. Picos: 1- benzeno; 2- naftaleno; 3- antraceno; 4- pireno e 5- poliestireno. Reproduzida da ref 25 com permissão do JCS

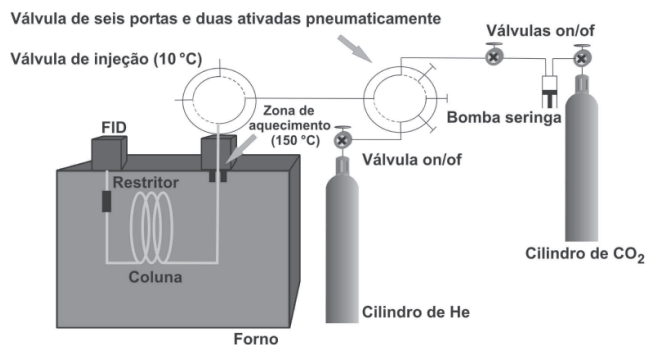


Figura 5. Sistema utilizado por Davies e Yang para cromatografia unificada

Series Modelo 622, com detector FID, e uma válvula de injeção automatizada Rheodyne 7520, com uma alça de amostragem interna de 0,5 µL. O volume de amostra injetado foi controlado pelo tempo de injeção. Para a seleção da fase móvel foi utilizada uma válvula Rheodyne 7010. Como fase móvel foram utilizados CO₂ e hélio. Foram demonstradas aplicações deste sistema para a separação de componentes voláteis e não voláteis em amostras complexas, como mistura sintética de n-alcenos, de álcoois e mistura de gasolina e petróleo bruto.

Bartle e colaboradores²⁹ estudaram a otimização das velocidades lineares em corridas de GC e SFC, em um sistema para cromatografia unificada (Figura 6) construído com uma válvula rotatória pós coluna para direcionar o efluente da coluna para o FID através de um tubo de sílica fundida de 50 µm ID, durante a separação por GC, ou através de um restritor metálico, durante o modo SFC. Neste sistema foi utilizada uma coluna tubular aberta de 10 m X 100 µm de diâmetro interno, para GC, SFC e GC-SFC em seqüência. A seção GC da corrida foi realizada com hélio na pressão normal do gás, seguida pela separação SFC com CO₂.

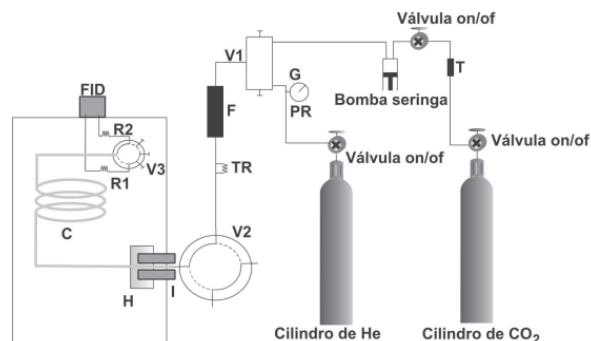


Figura 6. Diagrama esquemático de sistema utilizado para GC-SFC: C - coluna analítica; F - união metálica; G - indicador de pressão; H - revestimento resistente à temperatura; I - aquecedor de injeção; PR - regulador de alta pressão; R1 - tubo de sílica fundida; R2 - restritor metálico; T - trap de carvão ativado; TR - restritor de transformação; V1 - válvula de três vias e duas posições; V2 - válvula de injeção e V3 - válvula rotatória

O mesmo grupo desenvolveu ainda um sistema para cromatografia unificada (Figura 7) utilizando um cromatógrafo Lee Scientific Series 600 SFC/GC modificado. A aparelhagem foi composta por um cilindro de hélio pressurizado, um cilindro de CO₂, uma bomba seringa Lee Scientific 600, um forno com detector de ionização de chama (FID) e um detector Lee Scientific 501 UV/VIS com uma cela "homemade" de baixo volume, uma bomba de pistão recíprocante Merk-Hitachi, com regulagem de vazão de líquido na faixa de microlitros, uma válvula de injeção com um propulsor pneumático, uma válvula Valco digital de seis portas e duas posições, com baixo volume morto, programada em seqüência de alta temperatura, e coluna analítica (coluna microtubular aberta ou coluna capilar). Com esta aparelhagem, os autores realizaram análises seqüenciais GC-SFC para amostras de óleos vegetais e de cera doméstica contaminados com pesticidas²⁹, e no modo GC, analisaram óleo lubrificante de motor a gasolina³⁰.

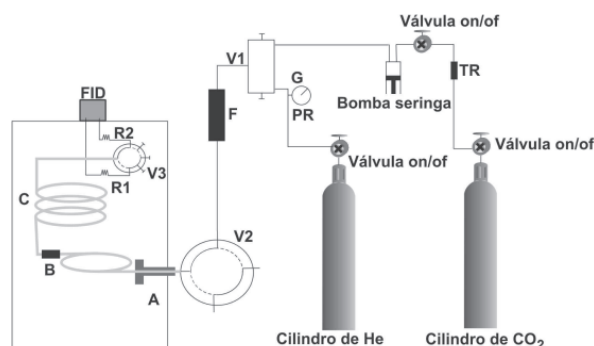


Figura 7. Diagrama esquemático do sistema desenvolvido por Tong e colaboradores utilizado para GC-SFC com coluna tubular aberta: A - luva de alumínio; B - conector; C - coluna cromatográfica; F - união metálica; G - indicador de pressão; PR - regulador de alta pressão; R1 - tubo de sílica fundida; R2 - restritor metálico; RG - coluna de retenção; TR - trap de carvão ativado; V1 - válvula de três vias e duas posições; V2 - válvula de injeção e V3 - válvula rotatória

Os mesmos autores²⁹ desenvolveram outro sistema (Figura 8), consistindo de apenas uma válvula rotatória de 6 portas para a seleção da fase móvel, com o efluente da coluna indo diretamente para o detector. Exceto pela válvula de injeção, todos os elementos que afetam o processo de transformação foram instalados dentro do forno, para acelerar o processo de mudança de um modo para outro, prin-

cipalmente para HPLC. Este foi o mais recente sistema instrumental para cromatografia unificada encontrado na literatura. A limitação deste sistema está associada à inexistência de válvulas comerciais que resistam simultaneamente à temperatura exigida para GC e as pressões de trabalho de LC e SFC. Os autores utilizaram uma válvula seletora de alta temperatura, o que limita a utilização do sistema para altas pressões.

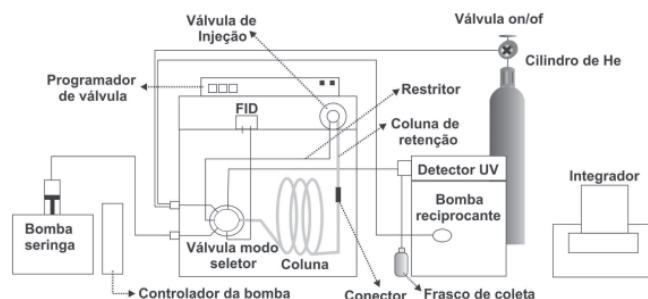


Figura 8. Sistema desenvolvido por Tong e colaboradores para cromatografia unificada

Conforme o levantamento bibliográfico realizado, até os dias de hoje, apenas sete sistemas visando a cromatografia unificada foram desenvolvidos, dos quais apenas dois apresentaram algum resultado operando nos três modos, e os demais, apenas em GC e SFC.

SISTEMAS APLICÁVEIS À CROMATOGRAFIA UNIFICADA

Fases móveis

A escolha da fase móvel pode ser considerada a etapa mais importante do processo cromatográfico. São as especificidades da fase móvel que caracterizarão o tipo de cromatografia empregada (GC, LC, SFC, etc.), com as características e peculiaridades intrínsecas para cada sistema, geralmente caracterizado por instrumentação completamente diferente. Isto é principalmente evidente no que tange aos métodos para detecção mais usuais, como detector de índice de refração ou UV para LC e FID, ECD, NPD e outros específicos para GC ou SFC. Outro ponto importante que a fase móvel define é o tipo de interações predominantes no sistema fase estacionária-fase móvel-analito, e quais as condições ideais para manipular estas interações da melhor forma possível, como gradientes de pressão, temperatura ou composição. Por essas razões, é impossível estudar a cromatografia unificada sem estudar as características das fases móveis.

Para facilitar a escolha de uma mistura de fases móveis que seja ideal para um determinado sistema, sem a necessidade de testar experimentalmente uma enorme variedade de solventes e suas proporções, podem ser empregados cálculos teóricos utilizando estudos de propriedades físico-químicas já realizados para uma variedade de misturas, mesmo que não tenham sido levadas em considerações as propriedades cromatográficas das mesmas, como estudo de equilíbrios entre fases, viscosidade e densidade³¹⁻³⁴, entre outros.

Nos sistemas unificados, desenvolvidos até então, foram empregados hélio para GC e CO₂ para SFC, independentemente²⁶⁻³⁰, metanol e éter dietílico como gás e líquido²⁴, ou éter etílico como gás e fluido supercrítico²⁵. Portanto, percebe-se que muito pouco foi testado e desenvolvido nesta área, sendo que, nos dias de hoje, contamos com o desenvolvimento de outras técnicas empregando fases móveis distintas, como a fase móvel com fluidez realçada, anteriormente apresentada.

Injetores

O volume de amostra a ser injetado irá depender de vários fatores, como diâmetro da coluna, coeficiente de partição dos analitos, fase móvel, entre outros. Logo, procura-se utilizar os métodos de injeção universalmente empregados, satisfazendo estas condições. Outro fator considerado é a maior sensibilidade da cromatografia gasosa em relação aos métodos de introdução de amostra, frente às outras técnicas.

A maioria das técnicas de introdução de amostra³⁵ para GC envolvem a vaporização da amostra e, conseqüentemente, o uso de câmaras de vaporização. É importante fazer a distinção entre técnicas de vaporização e injeção/transferência "on column". O significado inicial de introdução "on column" era a injeção diretamente na coluna de separação, porém atualmente a utilização de pré-colunas não empacotadas tem sido comum. Quando um sistema de saída de vapor ("vapor exit") é utilizado, freqüentemente ele é retido na pré-coluna, surgindo o termo injeção "on-precolum". Este termo parece mais apropriado para definir injeção/transferência "on column" através da vaporização da amostra pelas paredes do capilar na temperatura do forno. Em GC capilar, na injeção "on column" necessariamente a amostra é introduzida como um líquido, sendo que o injetor e a cabeça da coluna estão a uma temperatura abaixo do ponto de ebulição do solvente, com correção de pressão. Para distinguir entre este método e a injeção "on column" em colunas empacotadas (quente), é utilizado o termo "injeção fria na coluna" ("cold on column"). As técnicas de vaporização envolvem uma câmara termostatizada independente do forno, estando com a temperatura permanentemente acima da temperatura do forno, ou com programação de temperatura no vaporizador (PTV)³⁵.

Numerosas técnicas para a introdução de grandes volumes de amostras são descritas na literatura. A técnica de injeção "on column" com lacuna de retenção é considerada a primeira escolha para qualquer aplicação. Tem sido utilizada com sucesso para injeção com seringa de grande volume em cromatografia líquida e cromatografia gasosa "on-line" HPLC-GC, há mais de uma década. Recentemente, foram introduzidos sistemas com injeção "on-column" com volumes acima de 500 µL³⁵. Estes sistemas têm sido de rápida aceitação para a análise de micropoluentes orgânicos em água e outras análises de traços envolvendo amostras limpas, ou para aplicações envolvendo "clean-up" eficiente. Injeção "on-column" não pode ser utilizada com amostras que contenham grande quantidade de subprodutos não voláteis e que apresentem adsorção nos sítios da coluna cromatográfica. Concentrações substanciais de água podem desativar a pré-coluna, ocasionando adsorção. Amostras problemáticas podem ser introduzidas através de uma câmara de vaporização, que atua como um filtro, retendo materiais não voláteis e prevenindo a condensação de água pelo contato com as paredes da pré-coluna ou da coluna de separação³⁵.

A introdução de amostra por válvula, aplicada à GC, foi estudada no contexto da cromatografia unificada, existindo um trabalho envolvendo injeção por válvula, específico para GC³⁶, que apresentou resultados promissores. Nesse trabalho, os autores estudaram quatro sistemas de injeção com válvula (com uma alça de amostragem interna de 60 nL): injeção "splitless" com lacuna de retenção, injeção "split" com lacuna de retenção, conexão direta com a coluna utilizando um sistema de aquecimento entre a coluna e a válvula, uma lacuna de retenção e o sistema de aquecimento, concomitantemente. Esses autores constataram que o sistema utilizando uma lacuna de retenção e a zona de aquecimento apresentou um aumento na resolução, frente aos outros sistemas. Esse sistema está ilustrado na Figura 9.

A utilização de válvula para introdução de amostras em HPLC já está bastante estabelecida. Logo, esse método mostra-se o mais con-

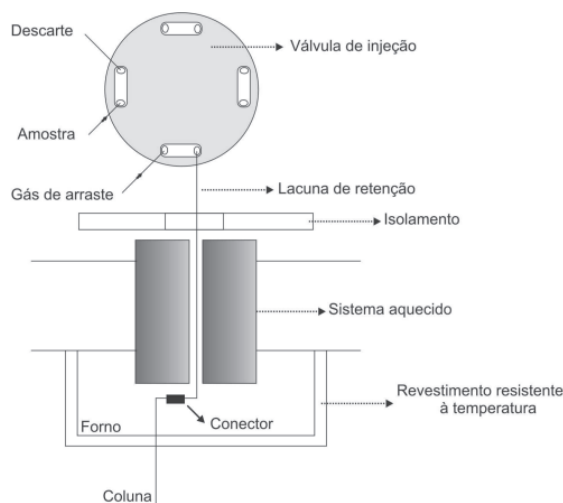


Figura 9. Diagrama esquemático do sistema de injeção por válvula para GC

veniente para o sistema proposto, uma vez que já foi constatado o seu funcionamento para todas as técnicas envolvidas, além de ser o sistema aplicado nos trabalhos envolvendo a cromatografia unificada desenvolvidos até então, como descrito anteriormente.

Colunas

Como o sistema para cromatografia unificada visa a maior versatilidade possível, teoricamente, qualquer tipo de coluna cromatográfica poderia ser empregada. Entretanto, o restante do sistema instrumental deve ser desenvolvido com dimensões compatíveis à coluna utilizada. Como a tendência em cromatografia é a miniaturização dos sistemas analíticos, não teria sentido desenvolver um sistema novo com dimensões que brevemente cairão em desuso, ainda mais que os novos detectores estão surgindo também para sistemas miniaturizados, e novas tecnologias de fabricação de colunas estão surgindo nas menores dimensões compatíveis com os sistemas existentes. Outro ponto importante está relacionado ao aumento da eficiência de colunas capilares quando comparadas com as dimensões maiores, além de possibilitar melhores resultados, quando se trata de sistemas de altas pressões⁹, pois colunas cromatográficas com dimensões grandes apresentam um calor friccional gerado com vazões altas, que pode ser minimizado com a diminuição do diâmetro da coluna.

O único trabalho encontrado buscando o desenvolvimento de colunas cromatográficas para cromatografia unificada foi desenvolvido por Steenackers e Sandra³⁷. Esses autores realizaram alguns experimentos com colunas capilares de sílica fundida com dimensões entre 50 e 70 cm de comprimento, 50 e 100 µm de diâmetro interno, recheadas com partículas de octadecilsilano Spherisorb de 5 µm de diâmetro, Nucleosil 10-100 de 5 µm de diâmetro ou sílica 10-100 ligada com silicone 40:60 difenil:dimetil terminada em silanol, também com 10 µm de diâmetro. Estas colunas foram empacotadas pelo método de "slurry packing", sendo obtidos bons resultados em condições de alta pressão ou alta temperatura.

Estudos teóricos envolvendo a preparação de colunas empacotadas para cromatografia foram realizados por Tong e colaboradores³⁸. Nesse trabalho foram discutidos vários parâmetros utilizando CO₂ para o empacotamento.

Como a tecnologia de colunas existente utiliza colunas tubulares abertas para GC e colunas empacotadas para HPLC, buscamos centralizar o estudo em colunas empregadas em SFC, que abrangem estas duas áreas. Virtualmente, todas as pesquisas contemporâneas

em colunas empacotadas para SFC são realizadas com recheios e dimensões de colunas de HPLC³⁹. O desenvolvimento de colunas recheadas com polímeros encapsulados, inicialmente em HPLC, tem apresentado um grande impacto no desenvolvimento de colunas para SFC. Estes materiais são geralmente utilizados para a separação de compostos polares, por apresentarem propriedades cromatográficas mais favoráveis³⁹. Assim como para HPLC, a maioria dos materiais para empacotamento é à base de sílica quimicamente ligada ou sorventes encapsulados, que são largamente avaliados quanto aos tamanhos de poro e à química de ligação envolvida. Outros sorventes à base de óxidos inorgânicos como Alumina, Zircônio ou Titânio são raramente utilizados⁴⁰. Em cromatografia líquida em fase normal, estes sorventes apresentam propriedades contrastantes com a sílica. Compostos básicos exibem tempos de retenção pequenos e picos simétricos, ao passo que, para a sílica, os mesmos compostos apresentam picos largos e longos tempos de retenção³⁹. Entretanto, Alumina, Zircônio e Titânio são suportes pobres para a preparação de fases quimicamente ligadas, e trabalhos com este tipo de fase encapsulada estão apenas começando³⁹.

O uso de colunas tubulares abertas para SFC declinou durante os anos 90, sendo que as expectativas de um ressurgimento de interesse são pequenas³⁹. Este desinteresse está ligado aos resultados limitados obtidos, pois a necessidade de colunas com diâmetro interno muito pequeno combinada com as baixas vazões de fase móvel requeridas impediram, de certa forma, o desenvolvimento instrumental. O CO₂ é, aparentemente, a única fase móvel compatível com detectores à base de chama, restringindo a aplicação destes sistemas a compostos que apresentem uma solubilidade adequada nesse solvente, e que sejam relativamente não polares no meio solvatante³⁹. Contudo, acreditamos que o avanço tecnológico no preparo de colunas tubulares abertas e o desenvolvimento instrumental ao longo dos anos, principalmente no que tange à miniaturização das técnicas, promoverão o ressurgimento da SFC com colunas tubulares abertas, aumentando a faixa de aplicabilidade da mesma.

DETECTORES

Vários detectores têm sido estudados para aplicação em vários modos cromatográficos²⁴. Espectrometria de massas (MS), espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), detecção de absorção (UV), detecção de ionização de chama (FID), detector termoiônico (TID), detector fotométrico de chama (FPD) e espectrometria de mobilidade iônica (IMS) foram investigados como métodos de detecção para GC, SFC ou HPLC. Comumente, cada detector tem obtido sucesso quando aplicado a um ou dois modos de separação.

Dentre os métodos de detecção acima citados, o que apresenta maiores expectativas para aplicação em cromatografia unificada é a espectrometria de massas. Esta técnica, além de fornecer informações estruturais sobre os analitos, é largamente empregada em GC, HPLC, e tem apresentado bons resultados em SFC⁴¹. Entretanto, a maior dificuldade no emprego da MS está na interface, pois as interfaces mais adequadas para cada modo cromatográfico são bem diferentes. Para HPLC, a maior incompatibilidade com o detector de massas, sem necessidade de uma interface, está relacionada às elevadas vazões de fase móvel que saem da coluna, o que não seria um problema tão grande com a utilização de colunas capilares e vazões na ordem de microlitros por minuto. Desta forma, seria possível acoplar MS à LC sem necessidade de uma interface, como ocorre para GC, e o sistema poderia operar nos vários modos cromatográficos com o mesmo sistema de detecção. Teoricamente este sistema é apli-

cável, porém não existem resultados experimentais satisfatórios que comprovem esta hipótese, de forma que muito estudo ainda deve ser feito a esse respeito.

CONCLUSÕES

A presente revisão discutiu os recentes avanços nas técnicas cromatográficas em direção a sua unificação. Observa-se que a miniaturização dos sistemas, particularmente das colunas, permite o uso de componentes do sistema em diferentes modos. No presente, uma das principais limitações para o desenvolvimento de um sistema integrado para a cromatografia unificada é o sistema de detecção. Espera-se que com os avanços atuais no acoplamento entre cromatografia líquida e espectrometria de massas (LC/MS), novos desenvolvimentos nesta área sejam disponibilizados em breve. Este deve ser o elo que falta para a realização do sonho da maioria dos cromatografistas: a cromatografia unificada.

REFERÊNCIAS

- Chester, T. L.; Pinkstone, J. D.; *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2801.
- Poole, C. F.; *J. Biochem. Biophys. Methods* **2000**, *43*, 3.
- Eiceman, G. A.; *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2771.
- Yashin, Y. I.; Yashin, A. Y.; *J. Anal. Chem.* **2001**, *56*, 200.
- Greibrokk, T.; Andersen, T.; *J. Sep. Sci.* **2001**, *24*, 899.
- Strain, H. H.; *Ind. Eng. Chem. – Anal. Ed.* **1946**, *18*, 605.
- Thompson, J. D.; Carr, P. W.; *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1017.
- Cui, Y.; Olesik, S. V.; *J. Chromatogr., A* **1995**, *691*, 151.
- Macnair, J. E.; Lewis, K. C.; Jorgenson, J. W.; *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 983.
- Macnair, J. E.; Patel, K. D.; Jorgenson, J. W.; *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 700.
- V-Dinh, T.; *Chemical Analysis of Polycyclic Aromatic Compounds*, John Wiley & Sons: New York, 1989.
- Chervet, J. P.; Ursem, M.; Salzmann, J. P.; *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1507.
- Cui, Y.; Olesik, S. V.; *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 1812.
- Lee, S. T.; Olesik, S. V.; *J. Chromatogr., A* **1995**, *707*, 217.
- Philips, S.; Olesik, S. V.; *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 799.
- Shen, Y.; Lee, M. L.; *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2541.
- Wu, N. J.; Tang, Q. L.; Lippert, J. A.; Lee, M. L.; *J. Microcol. Sep.* **2001**, *13*, 41.
- Lanças, F. M.; *Cromatografia em Fase Gasosa*, Acta: São Carlos, 1993.
- Giddings, J. C.; *Dynamics of Chromatography*, Marcel Dekker: New York, 1965.
- Chester, T. L.; *Microchem. J.* **1999**, *61*, 12.
- Martire, D. E.; *J. Chromatogr.* **1988**, *452*, 17.
- Tong, D.; Bartle, K. D.; Clifford, A. A.; *J. Chromatogr., A* **1995**, *703*, 17.
- Takeuchi, T.; Niwa, T.; Ishii, D.; *Chromatographia* **1987**, *23*, 929.
- Ishii, D.; Niwa, K.; Ohta, K.; Takeuchi, T.; *J. High Res. Chromatogr.* **1988**, *11*, 800.
- Ishii, D.; Takeuchi, T.; *J. Chromatogr. Sci.* **1989**, *27*, 71.
- Davies, L.; Yang, F. J.; *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 1242.
- Steenackers, D.; Sandra, P.; *J. High Res. Chromatogr.* **1991**, *14*, 842.
- Liu, Y.; Yang, F. J.; *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 926.
- Tong, D.; Bartle, K. D.; Clifford, A. A.; Robinson, R. E.; *Analyst* **1995**, *120*, 2461.
- Tong, D.; Bartle, K. D.; Clifford, A. A.; *J. High Res. Chromatogr.* **1992**, *15*, 505.
- Seo, J.; Lee, J.; Kim, H.; *Fluid Phase Equilib.* **2000**, *172*, 211.
- Audonnet, F.; Pádua, A. A. H.; *Fluid Phase Equilib.* **2001**, *181*, 147.
- Tochigi, K.; Hasegawa, K.; Asano, N.; Kojima, K.; *J. Chem. Eng. Data* **1998**, *43*, 954.
- Jou, F. Y.; Mather, A. E.; *J. Chem. Eng. Data* **2000**, *45*, 728.
- Grob, K.; Biedermann, M.; *J. Chromatogr., A* **1996**, *750*, 11.
- Tong, D.; Barnes, A. M.; Bartle, K. D.; Clifford, A. A.; *J. Microcol. Sep.* **1996**, *8*, 353.
- Steenackers, D.; Sandra, P.; *J. High Res. Chromatogr.* **1991**, *14*, 842.
- Tong, D.; Bartle, K. D.; Clifford, A. A.; Edge, A. M.; *J. Microcol. Sep.* **1995**, *7*, 265.
- Phinney, K. W.; *Anal.* **2000**, *72*, 204A.
- Jaroniec, C. P.; Jaroniec, M.; Kruk, M.; *J. Chromatogr., A* **1998**, *797*, 93.
- Sjoberg, P. J. R.; Markides, K. E.; *J. Chromatogr., A* **1999**, *855*, 317.