

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA CAPILAR: ESTADO DA ARTE E APLICAÇÕES

Raquel Gomes da Costa Silva, Carol H. Collins e Carla Beatriz Grespan Bottoli*

Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13084-971 Campinas – SP, Brasil

Recebido em 19/8/10; aceito em 29/11/10; publicado na web em 25/2/11

CAPILLARY LIQUID CHROMATOGRAPHY: STATE OF THE ART AND CURRENT APPLICATIONS. This review describes the advantages and disadvantages of using capillary liquid chromatography (CLC), which is considered the newest member in the analytical separation science arsenal. Although CLC has tremendous potential for being the next major innovation in separatory analysis, it has not yet obtained great popularity compared to conventional high performance (and ultra-high performance) liquid chromatography. Comparisons are made between these techniques and some of the reasons that CLC has not yet reached its potential will be advanced.

Keywords: capillary LC; particulate and monolithic stationary phases.

INTRODUÇÃO

A miniaturização dos sistemas cromatográficos tem sido uma convergência predominante na comunidade científica, pois reduz o consumo de solventes e reagentes e melhora consideravelmente o seu desempenho. A miniaturização não é um conceito novo em separações. Em 1958, Golay¹ revolucionou as análises por cromatografia gasosa (GC - *Gas Chromatography*) através da introdução das colunas capilares. A diminuição dos diâmetros internos das colunas utilizadas em cromatografia líquida pressurizada teve seu início em 1967 quando Horváth *et al.*² estudaram a dispersão de um pico (sob as mesmas condições) em duas colunas: uma com 0,3 e outra com 1 mm de diâmetro interno (d.i.). A coluna de 0,3 mm era uma coluna tubular aberta recoberta com filme de resina trocadora de íons, enquanto a de 1 mm de d.i. era recheada com partículas peliculares trocadoras de cátions de 50 μm (pérolas de vidro recobertas com uma camada do mesmo filme). Estes autores concluíram que a coluna recheada apresentou melhor desempenho na separação de nucleotídeos comparada com a coluna tubular aberta,² provavelmente devido à maior quantidade de fase estacionária (FE) presente. Em 1976, Scott e Kucera³ obtiveram eficiências elevadas (125.000 pratos por metro) quando utilizaram colunas de 2 m de comprimento e 1 mm de d.i. recheadas com sílica gel na separação de alquilbenzenos. Porém, para obter altas eficiências era necessário sacrificar o tempo de corrida, que durava, em média, 40 h.

Em 1978, Ishii *et al.*⁴ relataram trabalhos com colunas recheadas, usando colunas de politetrafluoretileno (PTFE) com 0,5 mm de d.i. recheadas com partículas de 30 μm . Ainda em 1978, Tsuda e Novotny⁵ reduziram o diâmetro das colunas para valores entre 30 a 200 μm , recheadas com partículas de alumina de 10 a 100 μm , e concluíram que as colunas com diâmetro de 70 μm recheadas com partículas de 30 μm apresentaram um bom compromisso entre eficiência e pressão. Em 1979, Scott e Kucera⁶ separaram n-alquilbenzenos utilizando cromatografia líquida e colunas com 1 mm de diâmetro interno.

Nos anos seguintes surgiram outros estudos utilizando colunas capilares abertas e recheadas.⁷⁻¹¹ Apesar disso, a miniaturização da cromatografia líquida (LC - *Liquid Chromatography*) ficou estagnada, chamando a atenção dos pesquisadores apenas recentemente.

DEFINIÇÕES E NOMENCLATURAS

Apesar do aumento da disponibilidade das colunas de LC com diferentes diâmetros e comprimentos, não existe uma distinção clara das diferenças entre colunas analíticas, convencionais, micro, semi-micro e capilares.¹² Ainda existe muita discussão a respeito da nomenclatura a ser empregada na classificação da LC.

Um dos primeiros pesquisadores a sugerir uma classificação das colunas foi Ishii,¹³ que classificou as mesmas de acordo com o d.i.. Chevert *et al.*¹⁴ classificaram a LC de acordo com a vazão da fase móvel e Saito *et al.*¹⁵ propuseram uma classificação que distinguiu entre as subdivisões de colunas com diâmetro inferiores a 1 mm. Nesta última classificação as microcolunas têm d.i. variando entre 0,5 a 1 mm, as colunas para cromatografia líquida capilar (CLC - *Capillary Liquid Chromatography*) possuem diâmetros entre 0,1 a 0,5 mm e as nanocolunas variam entre 0,01 a 0,1 mm de d.i. (Tabela 1).

Embora a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*) esteja relacionada ao uso de colunas disponíveis em todos os tamanhos para uso analítico, os termos micro-LC, LC capilar e nano-LC são muito utilizados atualmente, frequentemente erroneamente. A nano-LC foi introduzida para descrever a cromatografia líquida capilar que utiliza vazões de sub-microlitros. Inicialmente ela englobava colunas de até 150 μm de d.i., mas outros autores restringiram-na a colunas de até 75 μm .¹⁶ Também tem sido sugerido que, quando a separação cromatográfica é realizada em colunas com d.i. na faixa entre 10 e 100 μm , a técnica é denominada nano-LC, enquanto separações realizadas em colunas com d.i. entre 100 a 500 μm englobam a técnica de CLC.¹⁷

Para fins de classificação adotaremos que a nano-LC utiliza colunas com d.i. abaixo de 0,1 mm, a CLC colunas com d.i. de 0,1 a 0,5 mm, enquanto que a micro-LC utiliza colunas de 0,5 a 2 mm de d.i..

Em contraste às colunas convencionais (2 a 5 mm d.i.) e às microcolunas (0,5 a 2 mm d.i.), que normalmente utilizam tubos de aço inox, o material utilizado para as colunas capilares e as nanocolunas é basicamente sílica fundida revestida com uma camada de poli-imida ou outro polímero, sendo que algumas colunas com d.i. de 500 μm são feitas utilizando aço inox com camada interna de vidro. Os tubos de sílica fundida revestidos com poli-imida estão disponíveis em várias dimensões e são flexíveis e inertes.¹⁴

*e-mail: carlab@iqm.unicamp.br

Tabela 1. Nomenclatura da LC proposta por Ishii *et al.*,¹³ Chevert *et al.*¹⁴ e Saito *et al.*¹⁵

Diâmetro interno (mm)	Vazão	Nomenclatura
Proposta por Ishii ¹³		
4,6	-	HPLC convencional
1,5	-	Semimicro-LC
0,46	-	Micro-LC
0,15	-	Ultramicro-LC
0,05 a 0,2	-	Colunas microcapilares recheadas
0,006 a 0,06	-	Coluna tubular aberta
Proposta por Chevert <i>et al.</i> ¹⁴		
3,2 a 4,6	0,5 a 2 mL min ⁻¹	HPLC convencional
1,5 a 3,2	100 a 500 µL min ⁻¹	HPLC microbore
0,5 a 1,5	10 a 100 µL min ⁻¹	Micro-LC
0,15 a 0,5	1 a 10 µL min ⁻¹	LC capilar
0,01 a 0,15	10 a 1000 nL min ⁻¹	Nano-LC
Proposta por Saito <i>et al.</i> ¹⁵		
3 a 5	-	HPLC convencional
< 2	-	<i>Narrow-bore</i> HPLC
0,5 a 1	-	Micro-LC
0,1 a 0,5	-	LC capilar
0,01 a 0,1	-	Nano-LC
0,005 a 0,05	-	LC tubular aberta

LC: cromatografia líquida; HPLC: cromatografia líquida de ultraeficiência

INSTRUMENTAÇÃO

Quando se trabalha com CLC, toda a instrumentação (convencional) deve ser redimensionada, celas de detecção, bombas, injetores, conexões, tubulações, assim como ocorre quando se trabalha com cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC - *Ultra Performance Liquid Chromatography*). As amostras e fases móveis devem ser filtradas para evitar entupimento no sistema cromatográfico, assim como na HPLC convencional.

Tubulações

Os tubos são utilizados para conectar as diferentes partes do equipamento de CLC, sendo que eles contribuem linearmente para o alargamento da banda cromatográfica quanto ao comprimento e à quarta potência quanto ao seu raio. Portanto, uma seleção adequada da tubulação empregada é de extrema importância para o bom funcionamento do sistema.¹⁸ Para colunas de 500 µm a 1 mm de d.i. podem ser utilizadas tubulações de aço inox de 0,25 ou 0,125 mm de d.i.. Tubos de poli-éter-éter-cetona (PEEK) ou sílica fundida têm sido utilizados com mais frequência, principalmente em equipamentos comerciais. Para uso de colunas com d.i. inferiores a 500 µm, o uso dos tubos deve ser evitado, sendo mais adequado conectar diretamente a coluna ao detector e injetor.¹⁹

Bombas

Com relação ao sistema de bombeamento, este deve fornecer vazões que variam desde nanolitros até microlitros por minuto. As bombas mais atrativas são as do tipo duplo pistão recíprocante e as do tipo seringa, sendo que a primeira é mais favorável do que a segunda devido ao rápido equilíbrio da vazão, facilidade na criação de

gradiente e boa compensação da pressão da coluna.²⁰⁻²² Para vazões da ordem de 50 a 150 µL min⁻¹, as bombas recíprocante e seringa estão disponíveis comercialmente, incluindo dispositivos para formação de gradientes binários, terciários ou quaternários. As vazões da ordem de nanolitros e microlitros por minuto para colunas com d.i. inferiores a 500 µm não podem ser obtidas por essas bombas. Para essas vazões podem-se utilizar sistemas de divisão de fluxo (*splitters*). A utilização desses divisores possui desvantagens como, por exemplo, a não diminuição do consumo de fase móvel. A bomba de CLC bombeia líquidos na faixa de µL por minuto.²³ Já a UPLC, que utiliza microcolunas (1-2 mm de d.i. recheadas com partículas de diâmetros inferiores a 2 µm), necessita de bombas que tenham a capacidade de trabalhar a pressões muito mais altas (da ordem de 100 MPa), também com erro absoluto baixo.²⁴

Injetores

Os injetores empregados nos cromatógrafos a líquido capilares devem ser adaptados com relação aos dispositivos de injeção utilizados comercialmente para HPLC convencionais já que, quando se utilizam colunas com d.i. menores, os volumes de injeção são reduzidos para a ordem de nanolitros. Enquanto que a HPLC convencional utiliza até 100 µL como volume de injeção, em CLC o volume de injeção é menor que 60 nL. Quando se trabalha com UPLC, o volume de injeção de amostra também deve ser reduzido, evitando o espalhamento da amostra e, conseqüentemente, o alargamento do pico cromatográfico. Por isto, os equipamentos de UPLC possuem uma faixa de volume de injeção de 0,1-50 µL.²⁴

A maioria dos sistemas de injeção de HPLC utiliza válvulas rotatórias, tanto para injeções manuais quanto para automatizadas, sendo que nas injeções manuais são empregadas válvulas de microinjeção equipadas com uma alça de amostragem substituível. As injeções automatizadas na ordem de microlitros podem ser feitas utilizando-se injetores automáticos disponíveis comercialmente e as injeções automatizadas na ordem de nanolitros requerem somente um ajuste do injetor automático. É importante ressaltar que o volume de amostra que deve ser injetado nas colunas utilizadas em CLC deve ser proporcional ao quadrado do d.i. da coluna.²⁵ Pode-se encontrar disponível no mercado válvulas com volumes típicos de 4 nL. Um problema que ocorre com certa frequência quando se trabalha com CLC é uma perda na detectabilidade devido à injeção de pequenos volumes ou massas. Na maioria das vezes esse problema pode ser solucionado utilizando-se técnicas de focalização *on-column*.²⁶

Detectores

A maioria dos detectores utilizados na HPLC convencional pode ser empregado na CLC, porém todos devem ser modificados de modo que se adaptem ao baixo volume de injeção e da fase móvel, evitando possíveis alargamentos da banda cromatográfica.²⁷ O volume da cela do detector deve ser diminuído com relação às celas utilizadas na HPLC convencional. Enquanto que a HPLC convencional frequentemente emprega celas de detecção com cerca de 8 a 10 µL, a CLC utiliza celas da ordem de nanolitros. Assim como na cromatografia líquida convencional, sem dúvida, um dos detectores mais utilizados em CLC é o detector de absorvância no ultravioleta (UV), devido à sua simplicidade e grande área de aplicação. Para prevenir efeitos de alargamento da banda cromatográfica (mantendo volumes de detecção na ordem de nanolitros), a detecção *on-column* tem sido uma das opções. Nesse modo, uma parte da coluna (sem fase estacionária) é usada como cela do detector.²⁸ Porém, uma das desvantagens do uso da detecção *on-column* é a baixa detectabilidade devido ao pequeno caminho ótico. Recentemente, a detecção por espectrometria de massas (MS - *Mass Spectrometry*) tem chamado atenção quando se trabalha no campo da miniaturização,¹⁷ já que ela

pode ser facilmente acoplada com a instrumentação da cromatografia líquida capilar utilizando-se diferentes interfaces. O uso da MS é uma ferramenta importante para resolver diferentes problemas analíticos como identificação de compostos, aumento de detectabilidade, resolução de problemas de coeluição, entre outros. A técnica de CLC acoplada a um espectrômetro de massas tem sido aplicada em diversas áreas, mas com grande destaque para a bioanálise, especialmente na identificação de proteínas com elevada precisão, quando muitas proteínas estão presentes na amostra.²⁹ Como exemplo, Roland *et al.*³⁰ desenvolveram e validaram um método para determinar tióis presentes em aromas de vinhos, usando CLC-MS, sem a necessidade de utilizar etapas de derivatização.

Detectores menos convencionais como o detector por espalhamento de luz (ELSD - *Evaporative Light Scattering Detector*) também podem ser utilizados em CLC. Este detector é empregado na detecção de analitos pouco voláteis e termicamente estáveis. De Andres *et al.*³¹ descreveram um método para a determinação de aminas aromáticas heterocíclicas em amostras de urina humana com um cromatógrafo a líquido capilar com detecção por espalhamento de luz (CLC-ELSD). Foram obtidas boas repetitividades das respostas, assim como alta detectabilidade dos compostos estudados. Os detectores por condutividade e eletroquímico, assim como em HPLC convencional, são empregados em CLC no modo de separação de troca iônica e são comercializados pela Dionex® em equipamentos de cromatografia de íons capilar. A Tabela 2 ilustra algumas aplicações da CLC usando diferentes detectores.

Tabela 2. Aplicações da CLC utilizando diferentes detectores

Detector	Aplicação	Ref.
Por espalhamento de luz (ELSD)	Fármacos	32
Fluorescência	Hidrocarbonetos aromáticos	33
Amperostático – potenciométrico (ASPEN)	Fenol, <i>o</i> -clorofenol, 2,4 dimetilfenol	34
Termoiônico (TID)	<i>o</i> -Etil, 2-di-isopropilaminoetil fosfotioato	35
Eletroquímico	Isômeros de nitrofenol	36
Massas	Cetamina e norcetamina	37
Ultravioleta	Clorofenol	38

FASES MÓVEIS E ESTACIONÁRIAS

Sem dúvida, uma das grandes vantagens na utilização das colunas capilares é o menor consumo de fase móvel. Em condições típicas, a vazão empregada em HPLC convencional é da ordem de 1 mL min⁻¹, e em CLC a vazão típica é de 1 µL min⁻¹ (1000 vezes menor). Um laboratório que utiliza um HPLC convencional por 8 h tem um consumo médio de 0,5 L de solvente, em contrapartida, se for utilizado um CLC, o consumo pode ser de 0,5 mL de solvente.

A coluna cromatográfica, mais especificamente o seu recheio, a FE, é o componente de maior importância para a realização das separações cromatográficas. De nada adiantam excelentes detectores e bombas de alta precisão se a FE não for de boa qualidade. No início do seu desenvolvimento, a eficiência das colunas de HPLC que utilizavam recheio de partículas com tamanho irregulares era baixa, porém, com o desenvolvimento das FE microparticuladas de sílica porosa e esférica, há cerca de 35 anos, o poder de separação e a eficiência das colunas cromatográficas melhoraram significativamente.²⁷ Muitos esforços têm sido feitos para o desenvolvimento de FE para CLC com destaque para o aumento da estabilidade, resolução, seletividade e flexibilidade, principalmente, para acoplamento de cromatógrafos com espectrômetro de massas.

Existem três tipos básicos de colunas utilizadas em CLC: tubular aberta, colunas recheadas com partículas e colunas monolíticas, sendo estas últimas desenvolvidas recentemente. É importante ressaltar que as colunas recheadas com partículas utilizadas em CLC apresentam, tipicamente, 10 vezes mais pratos que as colunas recheadas de HPLC convencionais.³⁹ Esse fato pode ser explicado pela equação de van Deemter, a qual mostra que o alargamento de uma banda cromatográfica é resultado de vários efeitos interdependentes: recheio da coluna, difusão do soluto e equilíbrio entre FM e FE. Quanto menor for o diâmetro da coluna, menor será a contribuição de percursos não ideais (feitos pelo analito através da coluna), aumentando-se a eficiência da mesma.¹⁰

Colunas tubulares abertas

Nas colunas tubulares abertas a parede capilar é apropriadamente modificada com cadeias orgânicas através de ligações covalentes ou por adsorção, que é a fase estacionária. Knox e Gilbert⁴⁰ demonstraram que as colunas capilares tubulares abertas para LC com d.i. variando entre 10-30 µm podem produzir eficiências comparáveis às colunas recheadas. Jorgenson e Guthrie,⁴¹ em 1983, previram que as colunas capilares tubulares abertas mais eficientes para LC seriam as de aproximadamente 2 µm de d.i. e 2 m de comprimento (podendo alcançar 10⁶ pratos).

Em teoria, as colunas capilares tubulares abertas podem apresentar uma maior eficiência devido à grande permeabilidade da coluna e à menor eficiência dos processos de dispersão convectiva. Porém, o diâmetro da coluna ideal deve ser inferior a 5 µm.⁴² As colunas capilares tubulares abertas têm menor capacidade de amostra, pois a FE possui uma pequena área superficial onde ocorre a interação analito-fase estacionária. A injeção de grandes quantidades de amostra pode resultar em sobrecarga da coluna, causando assimetria do pico e baixa eficiência.^{43,44}

Colunas recheadas com partículas

Apesar de existirem colunas recheadas com materiais poliméricos para CLC, a sílica é o suporte mais empregado devido à sua alta estabilidade mecânica e à rigidez de suas partículas.

As colunas recheadas são preparadas preenchendo-se o capilar com partículas de sílica modificada, frequentemente partículas de 3 a 5 µm, que são as mesmas empregadas em HPLC convencional. Entretanto, partículas de tamanho menor (alguns fabricantes utilizam 1,8 µm, enquanto outros utilizam 2 µm) são empregadas com sucesso em UPLC³⁸ e são também encontradas nas colunas recheadas para CLC. Todas essas partículas de sílica são preparadas pelo processo sol-gel (PSG).⁴⁵

A tecnologia sol-gel surgiu em meados de 1800, porém somente foi utilizada um século depois por uma indústria de vidros alemã (*Schott Glass Company*) que descobriu a viabilidade em se preparar vidros através de reações controladas de hidrólise e policondensação de alcóxidos metálicos.⁴⁵ No PSG ocorre a transição de um sistema líquido (sol) para uma fase de gel. Um sol é definido como uma suspensão coloidal de partículas sólidas (com dimensões variando entre 1 e 100 nm) estável em um líquido. Um gel pode ser definido como um sistema formado pela estrutura rígida de partículas coloidais que imobilizam fase líquida nos seus interstícios.⁴⁵ O PSG tem sido utilizado para o preparo de materiais com os mais diferentes formatos e propriedades, sendo utilizado no preparo e deposição de novos materiais sorventes para a aplicação nas técnicas de separação e preparo de amostras (Figura 1). Através do PSG, podem-se produzir partículas de sílica pura ou de sílica híbrida (orgânico-inorgânica), todas mesoporosas e esféricas. A sílica pura utiliza tetraetoxissilano

(TEOS) e a híbrida utiliza uma mistura de TEOS e metiltrietoxissilano (MTEOS) ou similares em solventes apropriados, que contêm um agente porogênico. No caso das sílicas híbridas, uma porção das hidroxilas é substituída por grupos metila ou etílenos e a concentração final de grupos silanóis é menor, quando comparadas com as sílicas sol-gel preparadas somente a partir de TEOS. Após modificação dos híbridos com grupos C18 e posterior capeamento, a concentração de grupos silanóis residuais é bem inferior, o que leva à geração de picos simétricos em uma separação cromatográfica de compostos básicos.⁴⁶ Outra vantagem do número limitado de grupos silanóis na superfície de sílica híbrida é a elevada estabilidade hidrolítica em pH elevado, já que os silanóis que não reagiram são o ponto de partida para a dissolução do suporte.⁴⁶

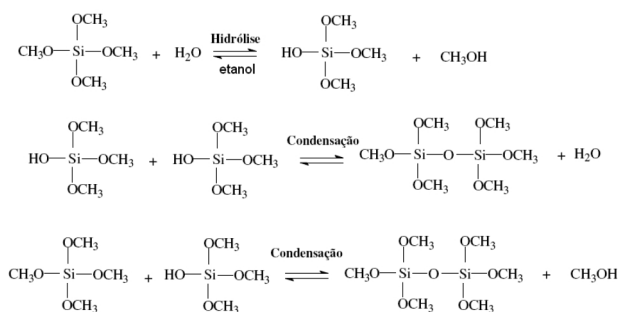


Figura 1. Reações químicas que ocorrem durante o processo sol-gel

As FE particuladas mais usadas em CLC são as quimicamente ligadas do tipo C8 e C18 (fase reversa), sendo que as partículas de poros maiores, 300 Å, são mais empregadas em análises de biomoléculas, especialmente no mapeamento de peptídeos e sequenciamento de proteínas. Atualmente existem no mercado várias opções de colunas do tipo C8 e C18 para uso em nano-LC e CLC, principalmente com partículas de 3 e 3,5 µm. Também estão disponíveis partículas de sílica modificadas com antibióticos de glicopeptídeos, ciclodextrinas ou outros seletores quirais, as quais são aplicadas na separação de compostos enantioméricos.

Uma das colunas capilares recheadas com partículas para uso em CLC e nano-LC e disponível comercialmente é a Zorbax Stable Bond® C18 (Agilent Technologies). Ela possui uma FE C18 com isopropila ou isobutílica ligadas diretamente ao átomo de silício, conhecida como fase estericamente protegida.⁴⁷ A tecnologia de inserir grupos hidrofóbicos e volumosos próximos à superfície da sílica permite que ela fique mais protegida principalmente em FM com pH abaixo de 3, evitando a quebra das ligações do tipo silício-carbono, que são responsáveis por manter os grupos orgânicos imobilizados na sua superfície. Outro tipo de FE disponível para CLC é a Zorbax Extend® C18, que possui uma FE sintetizada a partir da modificação da sílica cromatográfica com agentes sililantes bidentados formados por dois átomos de silício.⁴⁷ Estas fases são denominadas bidentadas por apresentarem um grupo propila ligado a dois átomos de silício do agente sililante. Este tipo de FE possui a vantagem de ter uma estabilidade química relativamente maior que as FE C18 convencionais, em fases móveis agressivas com pH acima de 8.

Apesar da disponibilidade comercial de colunas capilares com diferentes características, a variedade de colunas ainda é bem menor que para colunas analíticas, fazendo com que muitos pesquisadores produzam suas próprias colunas capilares. O enchimento de colunas ou tubos capilares pode ser feito mediante o uso de fluido supercrítico⁴⁸ ou através da técnica de suspensão.⁴⁹ Nesta última técnica, uma suspensão contendo a FE a ser recheada é bombeada para dentro do capilar através de um solvente, também chamado de solvente de pressurização.¹⁰

Colunas monolíticas

O bom desempenho das colunas atuais é resultado da diminuição do tamanho das partículas. Paralelamente, ocorreu a diminuição das dimensões das colunas (diâmetro e comprimento). No entanto, as colunas recheadas com materiais particulados alcançaram o limite do seu desempenho, no que diz respeito ao seu uso nos equipamentos de cromatografia líquida convencionais. O uso de partículas muito pequenas restringe a passagem da fase móvel pela coluna, o que pode ocasionar queda na pressão do sistema cromatográfico e, conseqüentemente, em separações pouco eficientes. Para contornar esse problema e permitir o uso de partículas com diâmetros menores que 2 µm, foram desenvolvidos sistemas cromatográficos que possibilitam separações a pressões superiores (UPLC).²⁴ Porém, uma alternativa ao uso desses sistemas cromatográficos seria o uso de colunas monolíticas, que podem ser utilizadas em cromatógrafos convencionais, equipados com bombas que operam em menores pressões.

Um monolito é um meio contínuo de separação (partícula porosa e única com dimensões elevadas) e possui formato do molde no qual é produzida, geralmente cilíndrico. As fases monolíticas vêm sendo muito utilizadas devido à facilidade de incorporação de diferentes grupos durante o seu preparo.⁵⁰ Uma fase monolítica possui uma estrutura sólida com pequenos domínios e canais com tamanho elevado (da ordem de micrômetros) que geram grande permeabilidade e altas eficiências quando utilizadas em colunas cromatográficas (Figura 2).⁵¹ O formato desses canais oferece uma menor resistência à passagem da fase móvel, comparada aos materiais particulados utilizados nas colunas convencionais. Pode-se com isso realizar análises com vazões elevadas, sem perdas na eficiência de separação, além da redução do tempo de análise, o que é imprescindível nos tempos modernos.

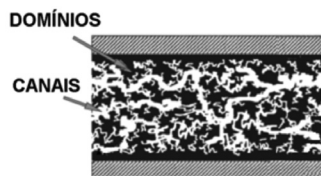


Figura 2. Esquema de uma fase estacionária monolítica. Adaptado da ref. 51

Os primeiros trabalhos descrevendo o emprego de monolitos em colunas capilares foram relatados em 1970, quando Ross e Jefferson⁵² desenvolveram a primeira aplicação de fases monolíticas. Eles utilizaram poliuretana como fase estacionária para GC e HPLC. Como essas fases não se mostraram satisfatórias, já que em presença de solventes orgânicos elas intumesciam, foram abandonadas. Somente ao final de 1980 Hjertén *et al.*⁵³ aplicaram géis de poliacrilamida de baixo grau de entrecruzamento como fase estacionária contínua em separações de proteínas por HPLC. Em 2000, Ishizuka *et al.*⁵⁴ utilizaram a tecnologia do PSG para preparar monolitos de sílica com grupos C18 para serem utilizados como FE. A solução sol foi introduzida no interior de um tubo capilar e, após gelificação, o monolito foi derivatizado com grupos C18. A estrutura formada apresentou elevada porosidade, sendo que o desempenho cromatográfico alcançado foi razoável.

Podem-se classificar as fases monolíticas (quanto à natureza do material) em duas categorias:⁵⁰ baseadas em polímeros orgânicos e baseadas em sílica. Os monolitos de polímeros são os mais empregados em separações de biomoléculas, quando comparados com os materiais baseados em sílica. Isso ocorre devido às vantagens de se utilizar esses materiais com maior facilidade e rapidez no preparo, entretanto eles sofrem com problemas de dilatação na presença de solventes orgânicos, constituintes das FM para separação da maioria dos compostos orgânicos. Por outro lado, os monolitos de sílica são estáveis frente às

fases móveis orgânicas e os poros de diâmetros menores são mais úteis para as separações de moléculas de menor massa molar.

Com relação à porosidade dos monolitos, pode-se mencionar que as colunas monolíticas convencionais possuem porosidade em torno de 80%, enquanto que as colunas monolíticas capilares apresentam uma porosidade um pouco maior, de 90%. Para fins comparativos, em uma coluna analítica recheada com partículas de sílica-C18 de 5 µm a porosidade varia em torno de 40%. Com isso, as áreas superficiais de colunas monolíticas são menores, quando comparadas com colunas convencionais.⁵⁰ Em se tratando de propriedades cromatográficas, pode-se afirmar que são similares às dos materiais particulados. Como exemplo, a atividade silanofílica dos monolitos de sílica é muito similar, sendo em algumas ocasiões até maior do que em colunas recheadas. As colunas monolíticas apresentam eficiências similares às colunas recheadas, porém, a grande vantagem é que elas podem ser utilizadas em vazões (no sistema cromatográfico) seis vezes maiores, sendo que as separações ficam significativamente mais rápidas.⁵⁵

A sílica monolítica utilizada como suporte cromatográfico para HPLC é preparada no formato cilíndrico, utilizando-se o PSG. Essas fases não podem ser preparadas diretamente no interior das colunas cromatográficas convencionais de aço inoxidável, devido ao fato que na etapa de secagem o cilindro monolítico sofre um encolhimento, se desligando das paredes da coluna.⁵⁶ Já os monolitos preparados no interior de colunas capilares de sílica fundida não apresentam esse problema porque estas colunas recebem um pré-tratamento em sua superfície interna, fazendo com que o monolito fique quimicamente aderido a ela.

A popularização das fases monolíticas de sílica iniciou-se em 2000, quando monolitos de sílica foram disponibilizados no mercado. Cerca de 95% das aplicações das colunas monolíticas de sílica estão concentradas para HPLC, sendo recentemente aplicada para CLC e para eletrocromatografia capilar.⁵⁷ Isso está relacionado ao fato que a preparação das fases estacionárias monolíticas com dimensões convencionais (d.i. variando entre 2 a 5 mm) é diferente das colunas com dimensões reduzidas, como as capilares (diâmetro inferior a 1 mm). Similarmente, colunas monolíticas poliméricas foram comercializadas na mesma época, com ampla aplicação para biomoléculas.⁵⁷

Colunas monolíticas de troca iônica também foram preparadas para aplicação em cromatografia de íons capilar. Suzuki *et al.*⁵⁸ introduziram brometo de cetiltrimetilamônio sobre um monolito de sílica para aplicação em cromatografia de íons capilar. Devido à permeabilidade do monolito de sílica, separações rápidas de cinco ânions foram obtidas com esta coluna a baixas pressões. Além disso, a estabilidade da coluna preparada foi aumentada pela adição de pequenas quantidades de brometo de cetiltrimetilamônio no eluente. Wieder *et al.*⁵⁹ apresentaram uma coluna capilar de troca iônica de poli(glicildimetacrilato-co-divinilbenzeno) para a separação de nucleotídeos e oligonucleotídeos. A introdução dos grupos de troca aniônica na superfície do monolito incluiu duas etapas: abertura do anel do grupo epóxido pela dietilamina e a posterior alquilação da amina terciária para produzir uma funcionalidade de amônia quaternária. O aumento nos valores de pH da fase móvel levou ao aumento na retenção dos oligonucleotídeos, revelando a forte interação eletrostática entre a FE de troca iônica e os oligonucleotídeos desprotonados em altos valores de pH.

Várias FE quirais baseadas em monolitos de sílica também foram desenvolvidas nos últimos anos. Chanknetadze *et al.*⁶⁰ modificaram um monolito de sílica com amilase tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) para formar uma FE quiral para enantioseparação em CLC. A FE foi avaliada com 10 racematos selecionados, sendo obtida uma boa separação. Separações rápidas de 1,2,2,2-tetrafenil-etanol e 2,2-dihidroxi-6,6-dimetilbifenol foram alcançadas dentro de 1 min, devido às propriedades hidrodinâmicas favoráveis do monolito de sílica.

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM INTERAÇÕES HIDROFÍLICAS

A cromatografia líquida de alta eficiência com fase reversa (RP-HPLC - *Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography*) é uma das técnicas analíticas de separação mais utilizadas, com várias aplicações nos campos industrial, ambiental, farmacêutico, entre outros.⁶¹

Uma das limitações do uso da fase reversa é a baixa retenção de moléculas polares. O uso de cromatografia líquida no modo fase normal (NP-HPLC - *Normal Phase High Performance Liquid Chromatography*), na qual se empregam fases estacionárias mais polares que as fases móveis, pode solucionar essa limitação. No entanto, a solubilidade de moléculas polares em fases móveis apolares não aquosas é limitada, restringindo a aplicabilidade desta. Para minimizar esse problema de solubilidade, Alpert⁶² introduziu a cromatografia com interações hidrofílicas (HILIC - *Hydrophilic-Interaction Chromatography*). A HILIC é uma modalidade de separação na qual são empregadas FE mais polares do que em RP-HPLC e FM com pouco conteúdo de água.⁶¹ A cromatografia com interação hidrofílica combina os mecanismos de adsorção e partição entre a FM e a FE.⁶³ A alta polaridade da FE associada ao uso de uma FM contendo pouca água induz à formação de uma camada de água difusa na superfície da FE, estabelecendo equilíbrios entre esta camada de água, a superfície da FE e a FM.

A literatura tem também definido a HILIC como fase normal aquosa (ANP - *Aqueous Normal Phase*).⁶¹ Entretanto, Pesek e Matyska⁶³ propuseram uma distinção entre estes dois modos de separação baseados nos mecanismos de interação entre a FE e os solutos. Para estes pesquisadores, algumas FE proporcionam maior retenção para compostos hidrofílicos e, nestes casos, o modo de separação dominante é a HILIC, enquanto outras FE combinam tanto as propriedades de retenção hidrofóbica quanto hidrofílica e para estas FE, o modo de separação é a ANP.

A HILIC ou a ANP podem ser empregadas para a separação de compostos polares não ionizados, uma vez que a FM consiste de uma solução contendo altas proporções de solventes orgânicos, tipicamente acetonitrila, podendo também ser usado metanol e acetona, e baixas concentrações de água. Quando são separados compostos ionizáveis, é necessário empregar tampões nas composições das FM, para evitar variações nos tempos de retenção desses compostos, uma vez que pequenas alterações nos valores de pH podem resultar em mudanças no fator de retenção (k).

Uma das áreas que utiliza a HILIC é a de desenvolvimento farmacêutico. Em 1998, Stregge⁶⁴ utilizou a HILIC acoplada a um espectrômetro de massas para análises de compostos naturais. Como fase móvel foram empregadas misturas de acetonitrila e água, com e sem uso de solução tampão. Uma limitação desse trabalho foi que a análise de misturas de compostos polares desconhecidos ficou comprometida pela solubilidade dos analitos na solução com composição de solvente orgânico maior do que 60%.

A maioria das aplicações no modo HILIC é realizada empregando-se colunas particuladas. Porém, houve um aumento no uso de HILIC com colunas monolíticas em CLC. Isso se deve ao fato de que a maioria dos capilares usados em CLC são do tipo monolítico.⁶⁵ Randon *et al.*⁵⁰ prepararam uma coluna capilar monolítica baseada em sílica e a utilizaram com sucesso na separação de cinco metilxantinas: cafeína, teofilina, 7-hidroxi-etil-teofilina, teobromina e paraxantina, com picos bem resolvidos. Lu *et al.*⁶⁶ prepararam colunas monolíticas baseadas na modificação química de carboximetil quitosana para separação de diferentes compostos polares ácidos utilizando como FM uma mistura de 85% de acetonitrila contendo 30 mmol L⁻¹ de tampão fosfato (pH 5). A mistura foi separada com boa resolução entre os

picos cromatográficos. Jandera *et al.*⁶⁷ prepararam colunas híbridas particuladas (3 a 5 μm) e colunas monolíticas de polimetacrilato para uso em CLC. Essas colunas foram operadas no modo HILIC na separação de uma mistura contendo acetona, benzeno, tolueno, etilbenzeno, propilbenzeno, butilbenzeno e amilbenzeno (Figura 3). Com uso de uma mistura de 65% de acetonitrila, obteve-se boa separação dos compostos da mistura em menos de 5 min. Ikegami *et al.*⁶⁸ analisaram carboidratos (glucose, maltose, maltotetraose, maltotriose, maltopentaose e malto-heptaose) usando colunas monolíticas capilares preparadas em laboratório, baseadas em sílica modificada utilizando o modo HILIC. A coluna de sílica foi modificada com (3-metacrilamidopropil)trietoxissilano, seguido de um recobrimento polimérico com acrilamida. A coluna apresentou boa eficiência, apresentando 14000 pratos m^{-1} com velocidade linear de 7,6 mm s^{-1} . Outras aplicações são sumarizadas na Tabela 3.

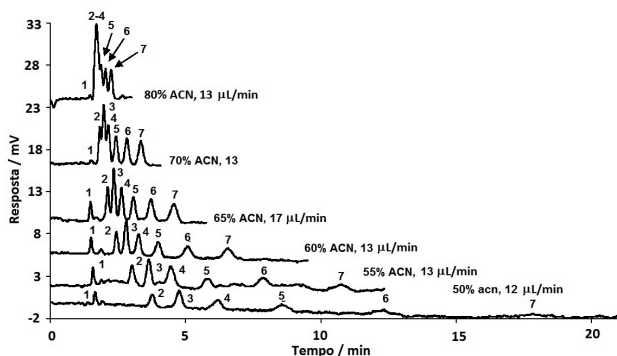


Figura 3. Separação de alquilbenzenos utilizando coluna híbrida capilar (3 μm d.i., $L = 20$ cm). FM: acetonitrila:água em diferentes concentrações. Detecção UV a 254 nm. Analitos: (1) acetona, (2) benzeno, (3) tolueno, (4) etilbenzeno, (5) propilbenzeno, (6) butilbenzeno e (7) amilbenzeno. Adaptada da ref. 67

ALGUMAS APLICAÇÕES

A CLC pode ser aplicada a vários compostos em diferentes áreas de aplicação, como farmacêutica e ambiental, entre outras. Como o número de colunas produzidas para CLC ainda é pequeno, comparado com HPLC convencional, existe um número limitado de trabalhos descritos na literatura. Uma das principais áreas em que a CLC tem sido aplicada é o campo de proteômicas, especialmente no que diz respeito ao mapeamento de peptídeos e sequenciamento de proteínas.⁷³⁻⁷⁶ Luo *et al.*⁷⁷ desenvolveram uma coluna capilar monolítica de sílica (25 cm x 10 μm d.i.) para análise de proteomas. A coluna foi preparada com TEOS e octadeciltrietoxissilano e capeada posteriormente para reduzir os silanóis residuais. As análises foram reprodutíveis.

A separação de compostos quirais é um tema desafiador em química analítica. No campo farmacêutico quase metade dos me-

dicamentos em uso são quirais e o efeito farmacológico é restrito, na maioria dos casos, a um dos enantiômeros. Meyring *et al.*⁷⁸ prepararam colunas capilares à base de aminopropilsílica recobertas com diferentes polissacarídeos: 20% Chiralpak AD (amilose-tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) ou 16% Chiralpak AD + 4% Chiracel OD (celulose-tris(4-metilbenzoato)), e aplicaram na separação dos enantiômeros de talidomida e seus produtos de biotransformação (enantiômeros da *cis*-5'-hidroxitalidomida e da 5-hidroxitalidomida) (Figura 4). A coluna Chiralpak AD com Chiracel OD apresentou maior resolução dos picos em comparação com a coluna contendo somente Chiralpak AD.

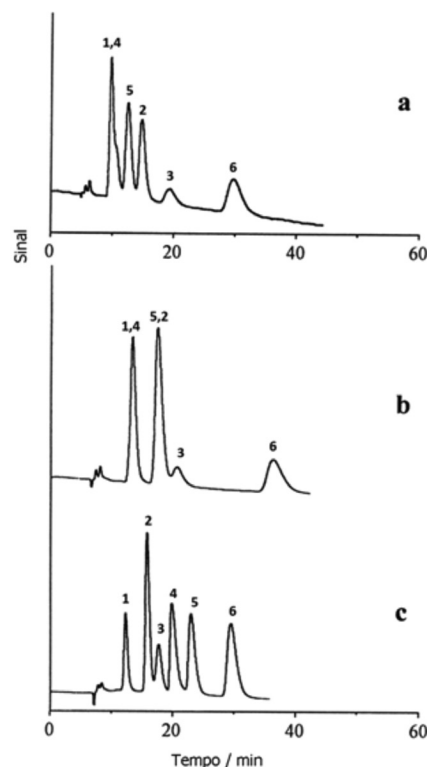


Figura 4. Separação de talidomida e seus produtos de biotransformação em capilares recheados com aminopropilsílica recoberta com (a,b) 20% Chiralpak AD e (c) 16% Chiralpak AD + 4% Chiracel OD. Dimensões das colunas: 30 cm, d.i. 100 μm . FM: (a) MeOH/EtOH (75:25 v/v), (b,c) MeOH/ACN (99:1 v/v); vazão: (a) 0,3 mL min^{-1} , (b, c) 0,2 mL min^{-1} , detecção a 230 nm. Compostos 2 e 6: enantiômeros de talidomida (2 = S(-), 6 = R(+)); 1 e 3: enantiômeros de *cis*-5'-hidroxitalidomida; 4 e 5: enantiômeros de 5-hidroxitalidomida. Adaptada da ref. 74

A CLC, assim como a nano-LC, tem sido aplicada com sucesso em várias áreas, como nutrição e toxicologia, entre outras (Tabela 4).

Tabela 3. Algumas aplicações da HILIC em CLC

Aplicação	Preparo da coluna	Fase Móvel	Ref.
Compostos ácidos, básicos e neutros	Copolimerização de derivados de betaína com etileno dimetacrilato	ACN:H ₂ O (60:40 v/v)	67
Xantinas	Monolitos de titânia	CH ₃ CN:Tris 10 mmol L ⁻¹ pH 7,9 (95:5 v/v)	68
Carboidratos	Monolitos de sílica modificada com poli(acrilamida)	CH ₃ CN:H ₂ O (80:20 v/v)	66
Peptídeos	Monolitos de sílica modificada com ácido poli(acrílico)	ACN:H ₂ O (75:25) com ácido fórmico 0,2%	69
Oligonucleotídeos	Monolitos baseado em hidroximetacrilato	Gradiente de A e B A: 100 mmol L ⁻¹ TEAA em H ₂ O B: 100 mmol L ⁻¹ TEAA em ACN	70

Song *et al.*⁷⁹ desenvolveram um método utilizando CLC para determinação de histamina (amina envolvida em processos bioquímicos de respostas imunológicas) em água e bebidas. Nesse experimento foi utilizada uma coluna C18 de 75 μm de d.i. e mistura de água e acetonitrila como fase móvel. Os limites de detecção encontrados foram baixos (0,1 ng mL^{-1}).

Lubbad e Buchmeiser⁸⁰ prepararam uma coluna polimérica que utilizou um suporte baseado em tetrakis(4-vinilbenzil)silano para separação de uma mistura com analitos de baixa massa molar. Nesse trabalho eles prepararam quatro tipos de colunas poliméricas monolíticas, variando as condições experimentais (concentração de monômeros e temperatura). Após seleção das melhores condições de preparo das colunas monolíticas os autores conseguiram separar uma mistura de alquilbenzenos (Figura 5).

Gu *et al.*⁸¹ sintetizaram uma coluna monolítica polimérica baseada na copolimerização do ácido 11-acrilaminoundecanoico e dimetacrilato de etilenoglicol para CLC e caracterizaram a mesma para uma posterior aplicação. A Figura 6a ilustra uma micrografia obtida por

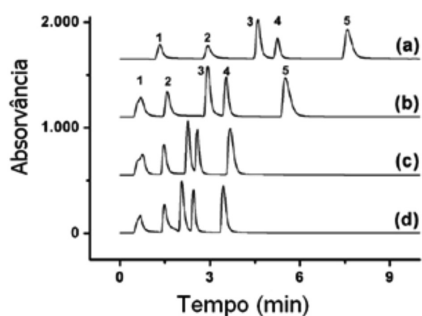


Figura 5. Cromatogramas de uma mistura contendo aminas separadas em coluna monolítica baseada na copolimerização de ácido 11-acrilaminoundecanoico e dimetacrilato de etilenoglicol. Condições cromatográficas: FM: 0,1% TFA:H₂O, B: 0,1% TFA:ACN; T=25 °C (a-c), 50 °C (d); detecção UV a 220 nm; injeção: 5 ng de cada analito. Identificação dos picos: (1) toluidina, (2) 4-bromoanilina, (3) 2,3,4,5,6-pentafluoroanilina, (4) difenilamina, (5) 4-nitroanilina. Vazões: (a) 5 $\mu\text{L min}^{-1}$; gradiente 5-100% B em 7 min; (b) 10 $\mu\text{L min}^{-1}$; gradiente 5-100% B em 7 min; (c) 10 $\mu\text{L min}^{-1}$; gradiente 5-100% B em 3,5 min; (d) 10 $\mu\text{L min}^{-1}$; gradiente 5-100% B em 3,5 min. Adaptado da ref. 80

microscopia eletrônica de varredura que mostra a caracterização morfológica da fase estacionária monolítica preparada. Essa coluna foi aplicada com sucesso na separação de proteínas (Figura 6b).

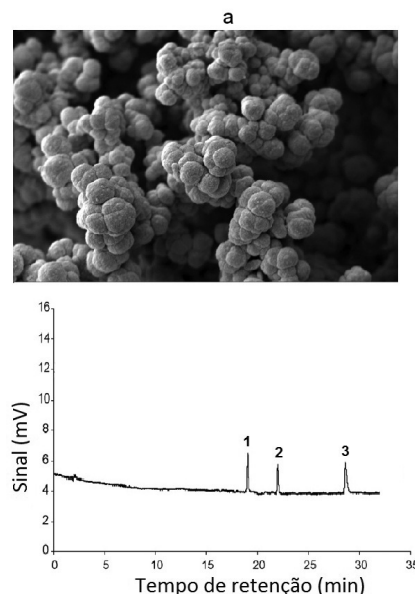


Figura 6. (a) Micrografia da coluna monolítica polimérica preparada pela copolimerização de ácido 11-acrilaminoundecanoico com dimetacrilato de etilenoglicol, (b) cromatograma obtido com coluna monolítica (30 cm x 100 μm d.i.) em CLC para separação de: (1) ribonuclease A, (2) citocroma c, (3) mioglobina (0,3 mg mL^{-1}) em água. Detecção: UV a 214 nm. Adaptado da ref. 81

CONCLUSÕES

A CLC apresenta inúmeras vantagens, destacando-se o menor consumo de fase móvel, maior simplicidade no interfaceamento com outras técnicas, facilidade em se utilizar programação de temperatura, entre outras. Apesar das vantagens que a CLC apresenta, ela ainda não atingiu um grau de popularidade comparado com a HPLC convencional. Isso se deve ao fato que desde a introdução da cromatografia líquida quase nenhuma atenção foi dada à miniaturização

Tabela 4. Algumas aplicações variadas da cromatografia líquida capilar

Analito	Coluna	Detector	Fase Móvel	Ref.
uracil, naftaleno, fluoreno, antraceno, fluoranteno	C18 (15 cm x 75 μm d.i.), $d_p = 5 \mu\text{m}$	UV (220, 254 nm)	0,1% TFA em H ₂ O:ACN (90:10 v/v)	82
cafeína, fenol	C8 (16 cm x 50 μm d.i.)	UV (254 nm)	tampão fosfato 25 mmol L^{-1} pH 2,5/ ACN (98:2 v/v)	83
hidroquinona, catecol	C18, (39-50 cm x 10 a 150 μm d.i.), $d_p = 10 \mu\text{m}$	UV (235 nm)	0,1% TFA em água e 0,1%	84
nitrito, nitrito, tiourea	troca iônica AS5A (3,5 cm x 50 μm d.i.)	UV (214 nm)	1 mmol L^{-1} KCl	85
propranolol, terbutalina, alprenolol	C18 (23 cm x 75 μm d.i.) $d_p = 5 \mu\text{m}$	UV (205 nm), MS	500 mmol L^{-1} C ₂ H ₅ NO ₂ :H ₂ O: MeOH pH 4,5 (1:8:91 v/v/v)	86
flavonóis, flavanonas, glicosídeos	C18 (150 mm x 300 μm d.i.) $d_p = 3 \mu\text{m}$	MS	gradiente de A e B A: H ₂ O:MeOH (92,5:7,5 v/v) com 0,1% CH ₂ O ₂ e solvente B: ACN com 0,1% CH ₂ O ₂	87
aminas aromáticas heterocíclicas	C8 (150 mm x 300 μm d.i.) $d_p = 3 \mu\text{m}$	UV (250 e 265 nm)	30 mmol L^{-1} CH ₃ COONH ₄ pH 4,5	88
penicilina, amoxicilina, oxacilina, piperacilina	C18 (150 mm x 500 μm d.i.) $d_p = 5 \mu\text{m}$ 100 Å	DAD (230 nm)	gradiente de A a B A: H ₂ O com 0,01% TFA e B: ACN com 0,01% TFA	89

d_p : diâmetro de partícula; d.i.: diâmetro interno

desta técnica. Com o desenvolvimento de sistemas adequados de detecção, especialmente os baseados em espectrometria de massas em série e a redução dos custos, a CLC tende a se tornar mais popular, apresentando a grande vantagem de requisitar menor quantidade de FM e, como resultado, menos problemas de descarte. O desenvolvimento de novas fases estacionárias também tem acelerado essa popularização da LC capilar.

Apesar dessas vantagens, existem algumas limitações a serem superadas. Uma delas é a necessidade de instrumentação dedicada, tornando-se necessária a redução do tamanho da válvula de injeção, cela de detecção e qualquer outro volume extra coluna, minimizando perdas na resolução ocorridas pelo espalhamento da banda. Por outro lado, estas reduções resultam em um grande aumento na eficiência de separação. Outro ponto a ser destacado é a baixa oferta de colunas capilares no mercado, sendo que as colunas são restritas às fases mais populares, como C18. Além disso, há uma falta de similaridade entre as colunas disponibilizadas pelos diferentes fabricantes (o que também ocorre com as colunas de HPLC convencional). Como consequência dos fatos descritos anteriormente, um número reduzido de aplicações foi descrito até agora, com falta de aplicações a amostras reais.

Os prospectos para o futuro são mais animadores, com nova instrumentação sendo disponibilizada e um número mais amplo de colunas (com diversas FE) sendo colocadas no mercado. Certamente, as diferentes áreas que podem utilizar a CLC, devido às suas vantagens, adotarão a técnica.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP e CNPq pelas bolsas e auxílios financeiros. Esta é uma contribuição do Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Bioanalítica e do Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas.

REFERÊNCIAS

- Golay, M.; *Gas Chromatography* Butterworths: London, 1958.
- Horvath, C.G.; Preiss, B. A.; Lipsky, S. R.; *Anal. Chem.* **1967**, *39*, 1227.
- Scott, R.P.W.; Kucera, P.; *J. Chromatogr.* **1976**, *125*, 251.
- Ishii, D.; Hibi, K.; Asai, K.; Jonokuchi, T.; *J. Chromatogr.* **1978**, *151*, 147.
- Tsuda, T.; Novotny, M. V.; *Anal. Chem.* **1978**, *50*, 632.
- Scott, R. P. W.; Kucera, P.; *J. Chromatogr.* **1979**, *169*, 51.
- Hibi, K.; Ishii, D.; Fujishima, I.; Takeuchi, T.; Nakanishi, T.; *J. High Resol. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* **1978**, *1*, 21.
- Tsuda, T.; Hibi, K.; Nakanishi, T.; Takeuchi, T.; Ishii, D.; *J. Chromatogr.* **1978**, *158*, 227.
- Takeuchi, T.; Hirata, Y.; Okumura, Y.; *Anal. Chem.* **1978**, *50*, 659.
- Ishii, D.; Hibi, K.; Asai, K.; Nagaya, M.; *J. Chromatogr.* **1978**, *152*, 341.
- Dewaele, C.; Verzele, M.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1978**, *1*, 174.
- Saito, Y.; Jinno, K.; Greibrokk, T.; *J. Sep. Sci.* **2004**, *27*, 1379.
- Ishii, D.; *Introduction to microscale high-performance liquid chromatography*, VCH: New York 1988, p. 208.
- Chevert, J. P.; Ursem, M.; Salzman, J. P.; *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1507
- Saito, Y.; Jinno, K.; Greibrokk, T.; *J. Sep. Sci.* **2004**, *27*, 1379.
- Shen, Y.; Zhao, R.; Berger, S. J.; Anderson, G. A.; Rodriguez, N.; Smith, R. D.; *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 4235.
- Hernandez-Borges, J.; Aturki, Z.; Rocco, A.; Fanali, S.; *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 1589.
- Vissers, J. P. C.; *J. Chromatogr., A* **1999**, *856*, 117.
- Vissers, J. P. C.; Claessens, H. A.; Cramers, C. A.; *J. Chromatogr., A* **1997**, *779*, 1.
- Huang, E. C.; Wachs, T.; Conboy, J.; Henion, J. D.; *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 713.
- Flurer, C. L.; Borra, C.; Andreolini, F.; Novotny, M. V.; *J. Chromatogr.* **1988**, *448*, 73.
- Banks, F. J.; Novotny, M. V.; *J. Microcol. Sep.* **1990**, *2*, 84.
- Simpson, R. C.; *J. Chromatogr., A* **1995**, *691*, 163.
- Maldaner, L.; Jardim, I. C. S. F.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 214.
- Kamperman, G.; Kraak, J. C.; *J. Chromatogr.* **1985**, *337*, 384.
- Fujimoto, C.; Morita, T.; Jinno, K.; *Chromatographia* **1986**, *22*, 91.
- Lanças, F. M. Em *Encyclopedia of Chromatography*; Cazes, J., ed.; Marcel Dekker: New York, 2000, vol. 1.
- Fujimoto, C.; Morita, T.; Jinno, K.; *J. High Resolut. Chromatogr. Commun.* **1986**, *9*, 623.
- Yu, N. H.; Ho, E. N. M.; Wan, S. M.; Wong, A. S. Y.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *396*, 2513.
- Roland, A.; Vialaret, J.; Moniatte, M.; Rigou, P.; Razungles, A.; Schneider, R.; *J. Chromatogr., A* **2010**, *1217*, 1626.
- De Andres, F.; Zougagh, M.; Castaneda, G.; Ríos, A.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 223.
- Guillarme, D.; Rudaz, S.; Schelling, C.; Dreux, M.; Verthey, J. L.; *J. Chromatogr., A* **2008**, *1192*, 103
- Abbas, A. A.; Shelly, D. C.; *J. Chromatogr., A* **1995**, *691*, 37.
- Siddiqui, A.; Shelly, D. C.; *J. Chromatogr., A* **1995**, *691*, 55.
- Kientz, C. E.; Langenberg, J. P.; Brinkman, U. A. T.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1994**, *17*, 95.
- Ruban, V. F.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1993**, *16*, 633.
- Legrand, T.; Roy, S.; Monchaud, C.; Grondin, C.; Duval, M.; Jaqz-Algrain, E.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *48*, 171.
- Ruiz-Jimenez, J.; Castro, L.; *J. Chromatogr., A* **2007**, *1174*, 78.
- Vo-Dinh, T. (ed.); *Chemical Analysis of Polycyclic Aromatic Compounds*, John Wiley & Sons: New York, 1989.
- Knox, J. H.; Gilbert, M. T.; *J. Chromatogr.* **1979**, *786*, 405.
- Jorgenson, J. W.; Guthrie, E. J.; *J. Chromatogr.* **1983**, *255*, 335.
- Toyohide, T.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *375*, 26.
- He, B.; Tait, N.; Regnier, F.; *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3790.
- Guillarme, D.; Grata, E.; Glauser, G.; Wolfender, J.; Veuthey, J.; Rudaz, S.; *J. Chromatogr., A* **2009**, *1216*, 3232.
- Brinker, C. J.; Scherer, G. W.; *Sol-Gel Science. The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Academic Press: San Diego, 1990.
- Cheng, Y. F.; Walter, T. H.; Lu, Z.; Iraneta, P.; Alden, B. A.; Genderau, C.; Neue, U. D.; Grassi, J. M.; Carmody, J. L.; O'Gara, J. E.; Fish, R. P.; *LCGC North Am.* **2000**, *18*, 1162.
- Silva, C. R.; Jardim, I. C. S. F.; Collins, C. H.; Airoidi, C.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 270.
- Crescentini, G.; Mastrogioacomo, A. R.; *J. Microcol. Sep.* **1991**, *3*, 539.
- Fonseca, F. N.; *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2002.
- Randon, J.; Huguet, S.; Demesmay, C.; Berthod, A.; *J. Chromatogr., A* **2010**, *1217*, 1496.
- Faria, A. M.; Bottoli, C. B. G.; Jardim, I. C. S. F.; Collins, C. H.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 300.
- Ross, W. D.; Jefferson, R. T.; *J. Chromatogr. Sci.* **1970**, *8*, 386.
- Hjertén, S.; Liao, J. L.; Zang, R.; *J. Chromatogr.* **1989**, *473*.
- Ishizuca, N.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Soga, N.; Nagayama, H.; Hosoya, K.; Tanaka, N.; *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1275.
- McCalley, D.; *J. Chromatogr., A* **2002**, *965*, 51.
- Gusev, I.; Huang, X.; Horváth, C.; *J. Chromatogr., A* **1999**, *855*, 273.
- Engelhardt, A.; Gotzinger A.; *Chromatographia* **2004**, *60*, 207.
- Suzuki, A.; Lim, L. W.; Hiroi, T.; Takeuchi, T.; *Talanta* **2006**, *70*, 190.
- Wieder, W.; Bisjak, C. P.; Huck, C. W.; Bakry, R.; Bonn, G. K.; *J. Sep. Sci.* **2006**, *29*, 2478.
- Chankvetadze, B.; Yamamoto, C.; Kamigaito, M.; Tanaka, N.; Nakanishi, K.; Okamoto, Y.; *J. Chromatogr., A* **2006**, *1110*, 46.
- Maldaner, L.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; *Quim. Nova* **2010**, *33*, 1559.

62. Alpert, A. J.; *J. Chromatogr.* **1990**, *499*, 177.
63. Pesek, J.; Matyska, M. T.; *LCGC North Am.* **2007**, *25*, 480.
64. Strege, M. A.; *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2439.
65. Li, Y. M.; Liao, J. L.; Nakazato, K.; Mohammad, J.; Terenius, L.; Hjerten, S.; *Anal. Biochem.* **1994**, *223*, 153.
66. Lu, Z.; Zhang, P.; Jia, L.; *J. Chromatogr., A* **2010**, *1217*, 4958.
67. Jandera, P.; Urban, J.; Skoriková, V.; Langmaur, P.; Kubickova, R.; Planeta, J.; *J. Chromatogr., A* **2010**, *1217*, 22.
68. Ikegami, T.; Horie, K.; Saad, N.; Hosoya, K.; Fiehn, O.; Tanaka, N.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 2533.
69. Jiang, W.; Fischer, G.; Girmay, Y.; Irgum, K.; *J. Chromatogr., A* **2006**, *1127*, 82.
70. Randon, J.; Guerrin, J.; Rocca, J.; *J. Chromatogr., A* **2008**, *1214*, 183.
71. Horie, K.; Kagami, T.; Hosoya, K.; Saad, N.; Fiehn, O.; Tanaka, N.; *J. Chromatogr.* **2007**, *1164*, 198.
72. Holdsvendova, P.; Suchankova, J.; Buncek, M.; Backovska, V.; *Biochem. Methods* **2007**, *70*, 23.
73. Duan, J.; Sun, L.; Liang, Z.; Zhang, J.; *J. Chromatogr., A* **2006**, *1106*, 165.
74. Okanda, F. M.; El-Rassi, Z.; *Electrophoresis* **2006**, *27*, 1020.
75. Weber, D.; Raymond, P.; Ben-Rejeb, S.; Lau, B.; *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 1604.
76. Schurig, V.; Jung, M.; Mayer, S.; Fluck, M.; Segura, S.; Jakubetz, H.; *J. Chromatogr., A* **1995**, *694*, 119.
77. Luo, Q.; Shen, Y.; Hixson, K.; Zhao, R.; Yang, F.; Moore, R. J.; Mottaz, H. M.; Smith, R. D.; *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 5028.
78. Meyring, M.; Chankvetadze, B.; Blaschke, G.; *J. Chromatogr., A* **2000**, *876*, 157.
79. Song, Y.; Quan, Z.; Liu, Y. M.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 2818.
80. Lubbad, S. H.; Buchmeiser, M. R.; *J. Chromatogr., A* **2010**, *1217*, 3223.
81. Gu, C.; Hea, J.; Jia, J.; Fang, N.; Simmons, R.; Shamsi, S. A.; *J. Chromatogr., A* **2010**, *1217*, 530.
82. Chervet, J. P.; Ursem, M.; Salzmann, J. P.; *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1507.
83. McEnery, M.; Tan, A.; Alderman, J.; Glennon, J. D.; *Analyst* **2000**, *125*, 25.
84. Patel, K. D.; Jerkovich, A. D.; Link, J. C.; Jorgenson, J. W.; *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 5777.
85. Murrphy, J. P.; Breadmore, M. C.; Tan, A.; McEnery, M.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *924*, 233.
86. Fanali, S.; Aturki, Z.; D'Orazio, G.; Rocco, A.; *J. Chromatogr., A* **2007**, *1150*, 252.
87. Hughey, C. A.; Wilcox, B.; Minardi, C. S.; Takehara, C. W.; Sundaraman, M.; Were, L. M.; *J. Chromatogr., A* **2008**, *1192*, 259.
88. Rosales-Conrado, N.; León-González, M. E.; Pérez-Arribas, L. V.; Polo-Díez, L. M.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 1433.
89. Bailón-Pérez, M. I.; García-Capana, A. M.; Olmo-Iruela, M.; Gámiz-Gracia, L.; Cruces-Blanco, C.; *J. Chromatogr., A* **2009**, *1216*, 8355.