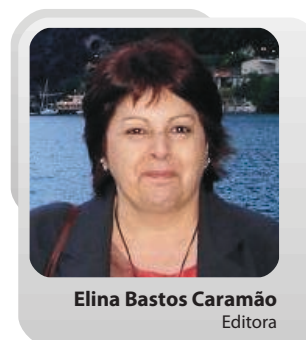


Cromatografia Líquida Bidimensional



Rosângela Assis Jacques*, **Elina Bastos Caramão***

Universidade Federal do Pampa
UNIPAMPA
Bagé, (RS)
Brasil
rosangela.j@globocom

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Química
91501-970 – Porto Alegre (RS)
Brasil
elina@ufrgs.br

Resumo

Este trabalho apresenta alguns aspectos importantes no desenvolvimento da técnica de Cromatografia Líquida Bidimensional. As técnicas cromatográficas multidimensionais surgiram com base na limitação existente nos métodos monodimensionais em aumentar a capacidade de picos de um cromatograma e, também, como alternativa para maximizar a separação cromatográfica. A técnica de cromatografia Líquida Bidimensional pode ser usada *off line* ou *on line* e, por razões de desempenho, a última, também chamada de Abrangente (LC×LC), tem despertado maior interesse pela sua extrema capacidade de resolver amostras complexas. Neste trabalho pretende-se apresentar alguns tópicos relacionados a esta técnica, sem, contudo esgotar o assunto, uma vez que essa é uma técnica em franco desenvolvimento na atualidade.

Palavras-chave

Cromatografia líquida multidimensional, LC×LC, LC-LC.

Abstract

This work presents some important aspects in the development of the technique of Two-dimensional Liquid Chromatography. The multidimensional chromatographic techniques appeared starting from the existent limitation in the one-dimensional methods in increasing the peak capacity of a chromatogram and, also, as alternative to maximize the chromatographic separation. The technique of two-dimensional liquid chromatography can be used offline or online and, for performance reasons, the last, also called Comprehensive (LC×LC), has been waking up the interest due to its high capacity to resolve complex samples. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography (LC×LC) approaches offer high peak capacity which leads to significantly improved analytical performance over single-column liquid chromatography. In this work we intend to present some related topics in this technique, without, however, to saturate the subject, once this is at the present time a technique in great development.

Keywords

Multidimensional Liquid chromatography, LC×LC, LC-LC.

* As autoras agradecem ao CNPq e a FINEP pelo auxílio na forma de bolsa.

1. Introdução

A cromatografia líquida monodimensional (¹D-LC) é largamente aplicada para amostras reais em muitos campos, entretanto, os métodos de separação monodimensionais, frequentemente, não têm poder de resolução satisfatório para amostras complexas, as quais requerem um grande número de pratos teóricos para sua completa caracterização^{1,2}. Estatisticamente, quando o número de componentes de uma amostra excede a 37% da capacidade de picos, a resolução fica comprometida^{2,3}. A melhor solução para este problema está no uso de sistemas multidimensionais (MD), nos quais as dimensões são baseadas em diferentes mecanismos de separação^{4,5}. Os métodos multidimensionais são caracterizados por um grande aumento no poder de resolução se comparados aos monodimensionais.

Particularmente no caso da cromatografia líquida, uma grande variedade de mecanismos de separação pode ser usada com diferentes graus de seletividade, como:³ fase normal (NP), fase reversa (RP), exclusão por tamanho (SEC), troca iônica (IEX) ou afinidade (AC).

Como consequência, a cromatografia líquida bidimensional (2D-LC), quando aplicada a este tipo de amostra, gera um aumento na capacidade de picos, na seletividade e na resolução.

Na cromatografia gasosa, embora diversas fases estacionárias estejam comercialmente disponíveis e com diferentes seletividades, o mecanismo de retenção é dependente, sobretudo, do peso molecular e da temperatura de ebulição do soluto. Na HPLC, entretanto, há uma grande variedade de mecanismos de separação com variadas seletividades. Por esta razão, a ortogonalidade em LC × LC (2D-LC *on line*) é um conceito mais difícil de ser definido e apresenta um maior número de possibilidades teóricas. Deve-se notar também que a combinação de certos modos de LC pode apresentar uma série de dificuldades, tais como imiscibilidade das fases móveis, precipitação de sais usados como tampão, incompatibilidade da fase móvel da primeira dimensão com a fase estacionária da segunda dimensão^{4,5}.

Técnicas de cromatografia líquida multidimensional *offline* (2D-LC *heart-cut*) são, por esta razão, mais usadas no pré-tratamento de matrizes complexas. Neste caso, as frações são coletadas na saída da primeira coluna e são reinjetadas em outra

coluna, podendo fazer isso em outro momento; seria um processo semipreparativo na primeira dimensão. Este método, entretanto, apresenta uma série de desvantagens, como: grande consumo de tempo, dificuldade de automação e possibilidade de contaminação, além de baixa reprodutibilidade.

Um método cromatográfico é considerado multidimensional se os mecanismos de separação nas diferentes dimensões forem diferentes e se os analitos, que são separados em uma dimensão, permanecem separados nas outras dimensões, ou seja, a segunda dimensão não deve afetar a separação obtida na primeira dimensão⁶.

Como já citado, a 2D-LD pode ser realizada *offline* ou *online*. O primeiro tipo (*offline*) é mais fácil de ser executado, mas é geralmente demorado, pouco reprodutível e suscetível a perdas de amostra e contaminação. Já o procedimento *on line* é mais difícil de operar e necessita de interfaces específicas, porém, é mais rápido e mais reprodutivo³.

No modo *off line*, uma parte da amostra é injetada na segunda coluna, obtendo-se vários cromatogramas correspondentes a cada parte reinjetada. Este sistema é também chamado *heart-cut*, indicando que uma parte importante da amostra é reanalisada^{5,7}, e é representado por um traço de união entre as duas siglas: LC-LC. Quando toda a amostra é reinjetada na segunda dimensão, tem-se a técnica chamada de abrangente (“*comprehensive*”)⁸⁻¹⁰ e é representado por um símbolo de multiplicação entre as duas siglas: LC×LC. A diferença entre essas duas técnicas está, portanto, na análise de uma amostra inteira no processo abrangente e de partes da amostra no processo *heart-cut*.

2. Alguns aspectos da LC-LC

A cromatografia líquida bidimensional tipo *heart-cut* é uma técnica aplicada quando somente uma pequena parte dos componentes (de picos) é selecionada de uma matriz complexa e injetada na segunda coluna (figura 1). Neste caso a primeira dimensão (primeira coluna) é usada como uma forma de *clean-up* da ou pré-concentração da amostra⁶. A LC-LC é, talvez, o método cromatográfico multidimensional mais usado. As principais aplicações da LC-LC são a purificação de analitos, enriquecimento de amostras, e melhoramento da eficiência da separação e da sensibilidade da análise.

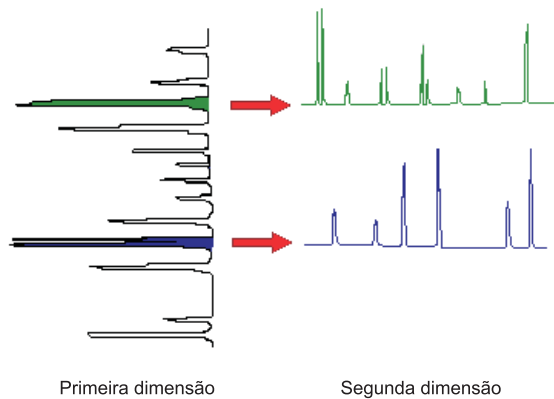


Figura 1. Representação esquemática do processo de LC-LC (*heart-cut*) [baseado na ref. 6]

A instrumentação para LC-LC utiliza equipamentos normais de HPLC, com uma bomba extra e uma válvula de seleção (*switching*) com várias posições conectando as duas colunas. O efluente da primeira coluna pode ser direcionado, movimentando a válvula, para o descarte, para o detector ou para a segunda coluna. Esta válvula pode ser também chamada de *transfer* ou válvula de transferência.

A transferência pode ser realizada de diversas maneiras, dependendo da aplicação. Pode ser realizado pela mudança na configuração das válvulas de injeção de amostra. Tipicamente, uma amostra é injetada em uma pequena coluna da primeira dimensão usando um eluente fraco. Os analitos são retidos na coluna enquanto os componentes da matriz são eluídos para o descarte. Os analitos são então eluídos para a segunda coluna (segunda dimensão) por uma simples troca de posição da válvula usando o mesmo eluente ou outro de maior força. Também é possível transferir mais de uma fração usando o modo de *stopped-flow*.

Os tipos mais comuns de interfaces para o sistema LC-LC (*heart-cut*) usando diferentes configurações de válvula de transferência são: a transferência direta (1); transferência direta com troca de eluente (2) e transferência com *backflush* (3).

As figuras a seguir, obtidas com base na referência 6 com algumas modificações, representam esquematicamente este processo:

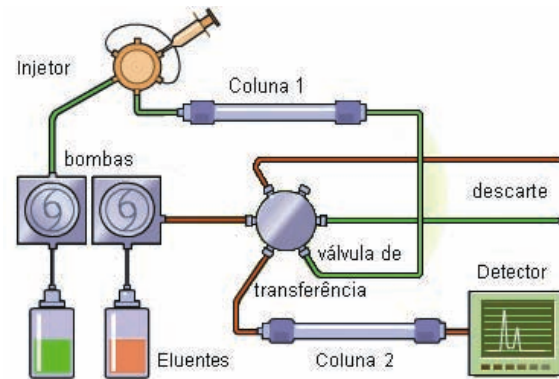


Figura 2. Esquema geral do Equipamento para LC-LC [baseado na ref. 6]

A transferência direta se dá em duas etapas (figura 3). Na primeira etapa (A) a amostra é injetada na coluna 1 e o efluente segue pela coluna até o descarte enquanto o eluente é bombeado para a coluna 2. Na segunda etapa (B), movendo-se a válvula de transferência a fração de interesse é transferida para a Coluna 2. O mesmo eluente é usado para ambas, eluição e separação, na coluna 1. Depois da transferência, a válvula é retornada a posição original.

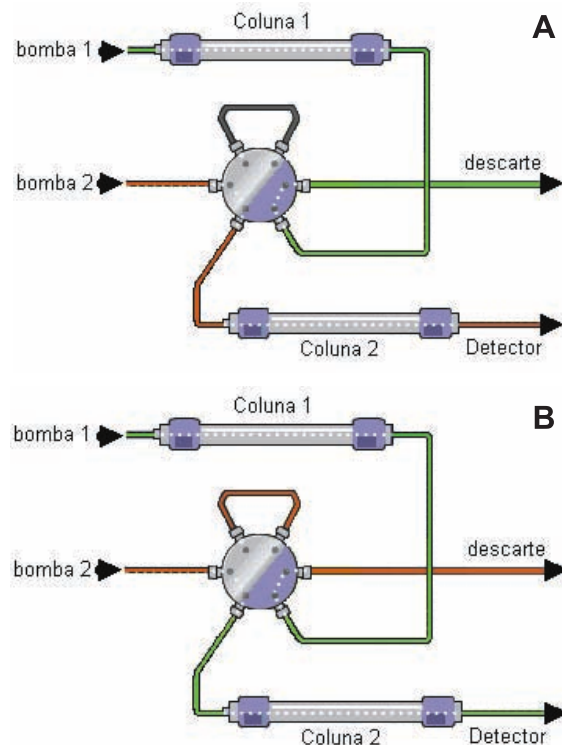


Figura 3. Esquema da LC-LC com transferência direta da primeira para a segunda coluna – (A) alimentação inicial e (B) transferência para a segunda coluna. [baseado na ref. 6]

A transferência direta com troca de eluente (figura 4) também pode ser descrita em duas etapas: (A) a amostra é injetada na coluna 1 pela bomba 1 e o efluente segue pela coluna até o descarte enquanto o eluente é bombeado para a coluna 2 e (B) movendo-se a válvula de transferência, a fração de interesse é transferida para a coluna 2. O eluente da bomba 2 é usado para a coluna 2. Depois da transferência, a válvula é retornada à posição original

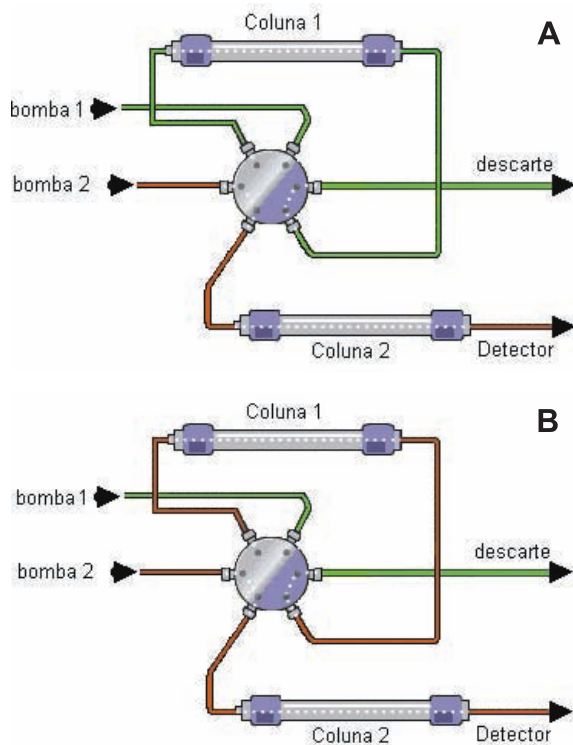


Figura 4. Esquema da LC-LC com transferência com troca de eluente da primeira para a segunda coluna – (A) alimentação inicial e (B) transferência para a segunda coluna. [baseado na ref. 6]

As duas etapas para a transferência com *backflush* estão representadas na figura 5, na primeira etapa, (A) a amostra é injetada na coluna 1 pela bomba 1 e o efluente segue pela coluna até o descarte enquanto o eluente é bombeado para a coluna 2 pela bomba 2, e (B) movendo-se a válvula de transferência, a fração de interesse é transferida para a Coluna 2. O eluente é enviado na direção oposta da separação na coluna 1.

Habitualmente, somente um detector é usado em LC-LC, embora seja possível usar dois. O primeiro, para monitorar a separação na primeira coluna, e o outro, para a segunda coluna. Durante o processo de otimização, entretanto, o segundo detector é também conectado à primeira coluna para permitir a separação e para que a fração seja transferida. A fração eluída deve ser a mais estreita possível (pico estreito) para tornar o volume transferido bastante reduzido.

Um parâmetro importante que afeta diretamente o volume de fração transferida é o diâmetro da primeira coluna. Quanto mais estreita (menor diâmetro) for a coluna da primeira dimensão, menor será o volume a ser transferido para a segunda dimensão.

Por exemplo: se o diâmetro da coluna decresce de 4,6 mm para 2,1 mm, o tamanho da fração transferida diminui de 1 mL para 0,2 mL. Entretanto, a capacidade da coluna também decresce com o diâmetro interno. Um bom compromisso entre diâmetro e fração transferida é atingido com colunas de 2-3 mm de d.i. na primeira dimensão. As dimensões da segunda coluna não são críticas, mas esta não deve apresentar diâmetro menor que a coluna usada na primeira dimensão.

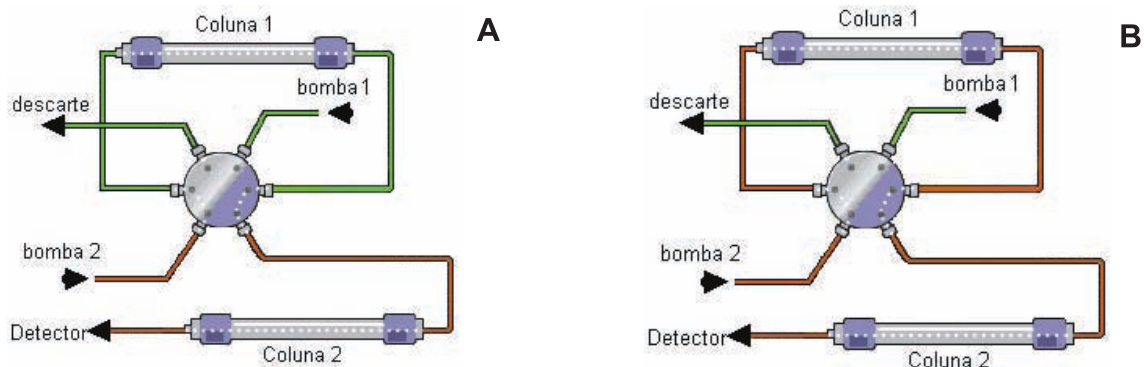


Figura 5. Esquema da LC-LC com transferência com *backflush* da primeira para a segunda coluna – (A) alimentação inicial e (B) transferência para a segunda coluna. [baseado na ref. 6]

3. Alguns aspectos da LC×LC

A Cromatografia líquida bidimensional abrangente (LC×LC) é a técnica na qual toda a amostra é separada nas duas dimensões conforme se pode ver na figura 6⁶.

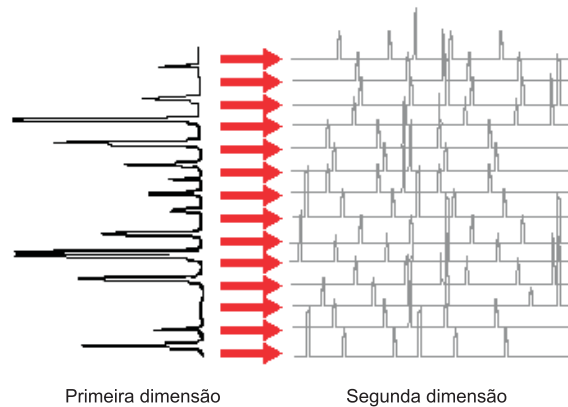


Figura 6. Representação esquemática do processo de LC×LC (abrangente) [baseado na ref. 6]

Uma separação bidimensional só pode ser chamada de abrangente se:

- Todas as partes da amostra são submetidas aos dois diferentes processos de separação cromatográfica;
- Percentagens iguais de todos os componentes da amostra (perto de 100 % ou menos) passam pelas duas colunas e, eventualmente, chegam ao detector;
- A separação (resolução) obtida na primeira dimensão é essencialmente mantida.

A Cromatografia Líquida Bidimensional Abrangente (LC×LC) é usada quando se quer informação analítica de todos os componentes da amostra e não de apenas uma parte desta.

A técnica de LC×LC é geralmente desenvolvida usando um ou dois sistemas de HPLC equipados com colunas conectadas por um sistema de transferência (chamado de *transfer* ou modulador) localizado entre os dois sistemas. O modulador corta as frações do efluente da primeira coluna e localiza-as na segunda coluna, na qual ocorre um processo mais rápido de separação. A fração injetada na segunda coluna deve ser completamente analisada antes de ocorrer nova modulação. O tempo de separação na segunda coluna deve ser igual ou menor que a duração de um período de modulação. É também importante que sejam realizadas pelo menos três ou quatro modulações (cortes) para cada pico que elui da primeira dimensão, a fim de evitar perda de informação na separação no sistema bidimensional. Possibilitando ganho em seletividade, sensibilidade e reprodutibilidade⁹.

Tipicamente, um sistema LC×LC combina duas colunas com diferentes mecanismos de separação a fim de alcançar uma boa separação, confiável identificação e quantificação^{11,12}.

Um típico sistema de LC×LC está esquematizado na figura 7¹³

Normalmente, são usados dois tipos de configurações de válvulas de transferência (ou moduladores): um utiliza três colunas para fazer a separação simultânea, sendo duas colunas iguais na segunda dimensão e o outro com apenas duas colunas. As figuras a seguir, obtidas também com base na referência 6 com algumas modificações, representam esquematicamente este processo.

A figura 8 apresenta um sistema com apenas duas colunas. Neste sistema o efluente passa pela coluna 1 (A) e segue para um dos *loops* (1 ou 2). Enquanto a fração é coletada no *loop* 1, a fração no *loop* 2 está sendo encaminhada para a separação na coluna 2. Após esta separação, a válvula é então modificada (B) e a fração no *loop* 1 é transferida para a

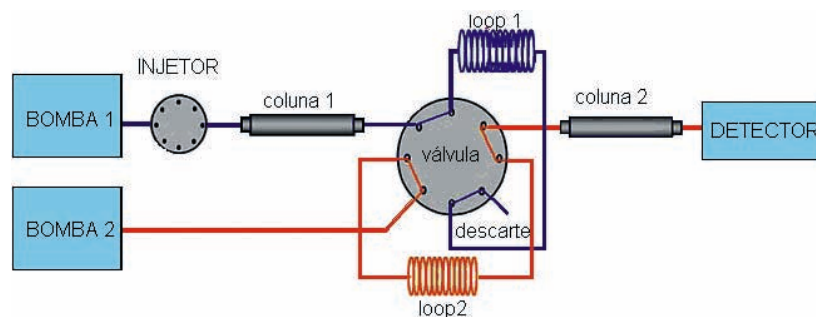


Figura 7. Sistema típico de LC×LC consistindo de duas bombas de HPLC, um injetador, duas colunas interfaciadas por uma válvula de transferência com dois *loops* de amostragem idênticos e um detector [baseado na ref. 13].

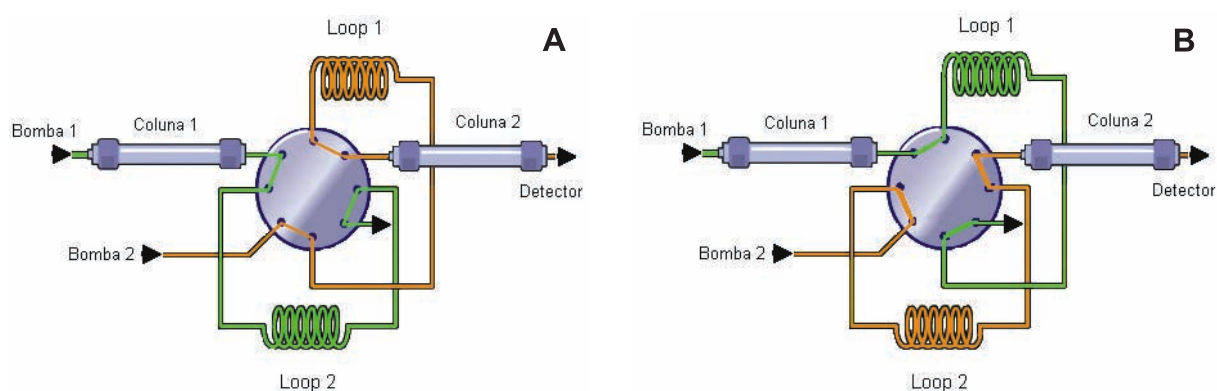


Figura 8. Representação geral do sistema LC×LC com apenas duas colunas, uma na primeira dimensão e outra na segunda dimensão [baseado na referência 6]

coluna 2 enquanto a próxima fração é coletada no *loop* 2. Este procedimento é repetido durante toda a análise. O tempo de análise na segunda dimensão deve ser o mesmo usado para preencher o *loop* (1 ou 2).

A figura 9 apresenta um sistema LC×LC usando duas colunas na segunda dimensão. Neste sistema o efluente passa pela primeira coluna e segue para a coluna 2a ou 2b, que são idênticas (A). Enquanto uma fração é transferida para a coluna 2a a fração anterior está sendo separada na coluna 2b. A válvula é então modificada (B) e a próxima fração segue para a coluna 2b, enquanto a fração anterior é separada na coluna 2a. Este procedimento é repetido durante toda a análise. O tempo de análise na segunda dimensão deve ser o mesmo para as duas colunas e igual ao tempo necessário para fazer a modificação da válvula. O volume injetado nas duas colunas deve ser, portanto, igual.

O principal requisito para que um sistema bidimensional seja abrangente é que quaisquer dois compostos separados na primeira dimensão

mantenham-se separados após passar pela segunda dimensão, isto é, o mecanismo de separação na segunda coluna não deve afetar a separação atingida pela primeira coluna⁷⁻¹⁰.

Karger et al.¹⁴, Giddings⁹ e Guiochon et al.¹⁵ foram os primeiros a atentarem para o fato de que a capacidade de picos em uma separação abrangente ($n_{c,2D}$) corresponde não à soma das capacidades individuais nas duas dimensões, mas ao produto destas capacidades de picos (1n_c and 2n_c , respectivamente), de forma semelhante a GC×GC

$$n_{c,2D} = {}^1n_c \times {}^2n_c$$

A história do desenvolvimento da teoria e da prática da LC×LC foi recentemente revisada por Stoll e colaboradores¹⁶.

O primeiro sistema de LC×LC foi introduzido por Erni e Frei¹⁷, seguidos por Bushey e Jorgenson¹⁸ nos anos 80 e seus trabalhos foram baseados em dois métodos principais: uso de uma válvula de 8- a 10-canais, equipada com dois *loops* de amostragem, os

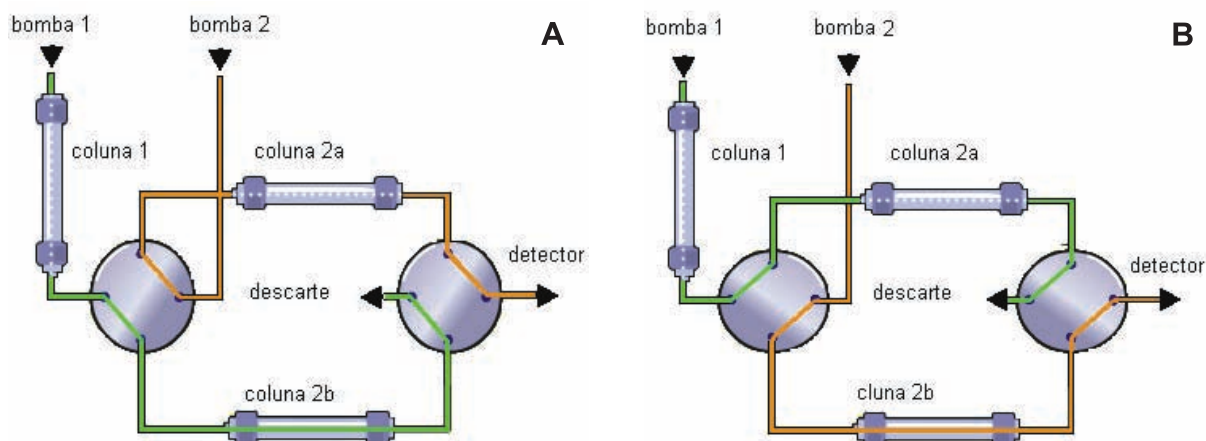


Figura 9. Representação geral do sistema LC×LC com duas colunas na segunda dimensão [baseado na referência 6]

quais permitem a transferência contínua da primeira para segunda coluna cromatográfica¹⁹. A primeira coluna é geralmente uma *microbore* e a segunda é uma coluna rápida. Também usaram transferência de uma coluna convencional para duas colunas de cromatografia rápida em paralelo, sem a utilização de *loop* de estocagem intermediário.

Jorgenson e Bushey¹⁸ utilizaram LC×LC para separação de proteínas, com um tempo de análise total de 6 horas. Desde então, a técnica vem crescendo com aplicações, variando desde meio ambiente até proteínas¹⁶⁻¹⁹.

Sistemas bidimensionais abrangentes têm sido utilizados na análise de Biomoléculas²⁰⁻²⁴, polímeros²⁵, ácidos orgânicos^{26,27}, essências e aromas^{28,29}, antioxidantes³⁰⁻³², fármacos^{33,34} etc.

Em sistemas 2-D, diferentes modos cromatográficos são combinados para aumentar o número de compostos separados em amostras complexas de acordo com a distribuição das diferentes propriedades das amostras. Em LC×LC, o efluente da primeira dimensão é transferido *online* para a segunda dimensão para ter um máximo aumento da capacidade de picos em amostras multicomponente³⁵⁻³⁷.

3.1. Variáveis importantes em um sistema LC×LC

3.1.1. Seletividade, ortogonalidade e capacidade de picos

A seletividade da coluna é o primeiro conceito a ser considerado quando se propõe uma separação bidimensional, uma vez que esta propriedade é diretamente relacionada com a ortogonalidade e com a capacidade de picos. As seletividades das colunas usadas nas duas dimensões devem ser diferentes para que se tenha um ganho na capacidade de picos. Além disso, a composição da fase móvel, o tipo de eluição (isocrática ou por gradiente), o fluxo do eluente e, em alguns casos, a temperatura são alguns parâmetros que requerem cuidadosa definição durante o processo de otimização. Os melhores resultados são obtidos nos sistemas chamados ortogonais, ou seja, sem correlação entre os tempos de retenção nas duas dimensões.

A capacidade de picos (*n2D*) do sistema LC×LC, como já foi discutido anteriormente, é definida pelo produto da capacidade de picos da primeira dimensão e da segunda dimensão^{9,38,14}. Para misturas complexas, caracterizadas pela distribuição aleatória de picos, necessita-se de uma alta

capacidade de picos para resolver todos os componentes. Alguns métodos para calcular o valor de *n2D* foram propostos e revisados recentemente por Dixon e Perrett³⁹. Independente do método usado, é importante ressaltar que o cálculo de *n2D* é complexo, e, na prática, o seu valor teórico é difícil, se não impossível, de ser determinado.

Sistemas bidimensionais com seletividades não correlacionadas raramente são encontrados na prática e, por consequência, para se obter um expressivo aumento na resolução, as condições operacionais em ambas as dimensões devem ser cuidadosamente otimizadas. Os aspectos mais importantes que afetam os resultados de uma separação bidimensional abrangente incluem³:

- escolha da fase estacionária, da fase móvel e da temperatura e seus efeitos sobre a seletividade na separação;
- definição dos gradientes de temperatura ou de solvente na primeira e na segunda dimensão visando o aumento na capacidade de picos;
- compatibilidade entre as fases móveis da primeira e da segunda dimensão e o seu efeito sobre a fração transferida entre as duas dimensões;
- definição das dimensões da coluna e do fluxo na primeira e na segunda dimensão, do volume das frações transferidas e da frequência dos ciclos de transferência de amostra;
- definição da modulação de transferência da amostra com o objetivo de reduzir o alargamento do pico e aumento da focalização do mesmo.

3.1.2. Resolução e velocidade de amostragem

O aumento no poder de resolução da LC×LC é expresso também pela equação da resolução. Giddings³⁸ mostrou que em um sistema multidimensional, no qual R_{sD1} e R_{sD2} são as resoluções entre um par de picos em cada dimensão, a resolução global R_s pode ser dada por:

$$R_s \cong (R_{sD1} + R_{sD2})^{1/2}$$

Uma condição fundamental para um sistema 2D abrangente é manter a resolução na primeira dimensão, o que pode ser atingido produzindo um número suficiente de amostragens (modulações) por pico (3 ou 4, segundo Murphy et al.)⁴⁰.

Isto é particularmente importante se a contribuição da primeira dimensão para a separação

multidimensional como um todo for alta. Na prática, separações 2D devem ser bastante rápidas para assegurar um número adequado de amostragens (ciclos de modulação). O tempo de amostragem deve ser 1,5 vezes menor que o desvio padrão do tempo de retenção na primeira dimensão⁴¹.

Depois de determinar o tempo de análise na segunda dimensão (\cong igual ao tempo de amostragem), o fluxo da fase móvel na primeira dimensão pode ser otimizado para permitir 3 ou 4 amostragens por pico. Isso é idealmente atingido usando um programa de gradiente de eluição que mantém as larguras de pico constantes durante toda a análise.

3.2. Desenvolvimento do método para LC×LC

A resolução, assim como o tempo de análise na segunda dimensão, é limitada pelo volume dos *loops* de amostragem na válvula da interface³. O pequeno volume do *loop* é necessário para que chegue uma banda estreita na cabeça da segunda coluna. Além disso, se a fase móvel usada na primeira dimensão é menos forte que a fase móvel da segunda dimensão, ocorre a reconcentração da fração da primeira coluna em uma zona estreita na cabeça da segunda coluna (focalização na coluna - *on-column focusing*)⁴².

Com este objetivo, é conveniente o uso de uma coluna de HPLC microbore na primeira dimensão, operando com um baixo fluxo, e uma coluna de tamanho convencional na segunda dimensão, operando com um alto fluxo.

Neste caso, o pequeno diâmetro da coluna em 1D garante a minimização da diluição e produz um fluxo compatível com o volume injetado na 2D. A etapa de pré-concentração na cabeça da coluna em 2D não é necessária e se evita a incompatibilidade entre os solventes usados nas duas dimensões^{7,43}. Outra vantagem está no menor consumo de solvente ao se usar coluna *microbore*, além de sua alta eficiência na separação. A principal desvantagem destas colunas está na sua menor capacidade, embora seja possível um grande volume de injeção, com uma diminuição tolerável na eficiência.

Um efeito maior da fração transferida é encontrado quando se usam colunas em vez de *loops* na transferência para a segunda dimensão^{11,44-47}.

Seja qual for a configuração do sistema LC×LC usado, a separação na segunda dimensão tem que ser completada antes que a próxima fração seja transferida. Análises rápidas na segunda dimensão podem ser conseguidas usando-se colunas monolíticas, as quais permitem altos fluxos de fase

móvel sem perda significativa de resolução, com gradiente de fase móvel tanto na primeira como na segunda dimensão^{11,43,47,49}.

Uma alternativa ao uso de colunas monolíticas é o uso de elevadas temperaturas^{50,51}. O decréscimo na viscosidade do eluente permite um rápido reequilíbrio da coluna em razão do alto fluxo na mesma pressão máxima. Além disso, altas temperaturas reduzem a perda na eficiência que ocorre em elevados fluxos.

Colunas curtas convencionais têm sido empregadas, mas o tempo de reequilíbrio da coluna é alto e a reprodutibilidade do gradiente é comprometida. Neste caso a segunda coluna pode ser maior e o número de amostragens para cada pico da primeira dimensão fica muito baixo^{11,31,47}. Com esta configuração, usa-se somente um gradiente de solvente em todo o processo e durante todo o tempo de análise^{47,52}.

3.2.1. Tratamento dos dados obtidos em LC×LC

Em LC×LC usa-se, normalmente, um único detector instalado depois da segunda coluna. O detector pode ser acoplado à primeira dimensão durante o desenvolvimento do método. A maioria dos detectores de HPLC podem ser usados em LC×LC. Se a separação na segunda dimensão é muito rápida, a aquisição dos dados tem que ser suficientemente rápida para garantir picos estreitos. Detectores de arranjo de diodos (UV-DAD) e de massas (MS) podem adicionar uma terceira dimensão à análise, fornecendo informações sobre a estrutura dos compostos³. O sistema LC×LC produz um número muito grande de dados, com informações das duas dimensões, e este número é grandemente aumentado ao usar estes dois detectores, de tal forma que os dados precisam ser tratados por softwares específicos, gerando gráficos bi ou mesmo tridimensionais.

As dificuldades aumentam quando se quer a uma análise quantitativa. A integração dos picos é feita pela soma das áreas de cada pico na segunda dimensão correspondente a um dado analito, os quais são integrados usando um algoritmo de integração específico.

Até o momento, a área de software dedicado para LC×LC não está bem desenvolvida³ e um único software que faça esta integração ainda não está disponível comercialmente. Um software dedicado deveria processar os dados adquiridos automaticamente e então transformá-los em um cromatograma bidimensional, permitindo toda a informação necessária para executar análise qualitativa e quantitativa³⁹.

4. Conclusões

O processo de LC×LC pode ser realizado pela simples adição de uma válvula de vários canais entre dois sistemas de HPLC convencionais. Muitas configurações diferentes têm sido desenvolvidas e aplicadas à análise de amostras complexas reais de diferentes origens, porém, o desenvolvimento de método em LC×LC pode ser mais difícil e demorado que os sistemas 1D-LC ou LC-LC *off line* (*heart-cut*). Entretanto, o grande potencial em termos de separação e identificação justifica o uso da LC×LC. Um número grande de publicações já existentes na literatura confirma que a tecnologia ainda se encontra em um estágio exploratório, mas evolui para uso em análises de rotina.

Progressos no desenvolvimento de instrumentos comercialmente disponíveis, com softwares dedicados para a conversão direta de dados crus em cromatogramas bi ou tridimensionais, e para análise qualitativa e quantitativa irão, sem dúvida, permitir avanços consideráveis na análise de amostras complexas não passíveis de análise por HPLC ou GC monodimensionais.

5. Referências Bibliográficas

- G. Guichon, *J. Chromatogr. A* 1126 (2006) 6.
- J.M. Davis, J.C. Giddings, *Anal. Chem.* 55 (1983) 418.
- P. Dugo, F. Cacciola, T. Kumm, G. Dugo, L. Mondello, *J. Chromatogr. A*, 1184 (2008) 353.
- H.J. Cortes (Ed.), *Multidimensional Chromatography: Techniques and Applications*, Marcel Dekker, New York, 1990.
- L. Mondello, A.C. Lewis, K.D. Bartle (Eds.), *Multidimensional Chromatography*, Wiley, Chichester, UK, 2002.
- T. Hyotylainen, *Sep. Sci.*, 1 (2009) 30, disponível em www.sepscience.com, abril 2009.
- H.J. Cortes, *J. Chromatogr.* 626 (1992) 3.
- P. Schoenmakers, P. Marriott, J. Beens, *LC-GC Eur.* 16 (2003) 335.
- J.C. Giddings, *Anal. Chem.* 56 (1984) 1258A.
- F. Cacciola, P. Jandera, L. Mondello, *Chromatographia* 66 (2007) 661.
- F. Cacciola, P. Jandera, E. Blahová, L. Mondello, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 2500.
- E.P. Troups, M.J. Gray, G.R. Dennis, N. Reddy, M.A. Wilson, R.A. Shalliker, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 481.
- J. Pól, T. Hyötyläinen, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 21.
- B.L. Karger, L.R. Snyder, C. Horvath, *An Introduction to Separation Science*, John Wiley and Sons, New York, 1973.
- G. Guiochon, L.A. Beaver, M.F. Gonnord, A.M. Siouffi, M. Zakaria, *J. Chromatogr.* 255 (1983) 415.
- D. R. Stoll, X. Li, X. Wang, P. W. Carr, S. E.G. Porter, S. C. Rutan, *J. Chromatogr. A*, 1168 (2007) 3.
- F. Erni, R.W. Frei, *J. Chromatogr.* 149 (1978) 561.
- M. Bushey, J.W. Jorgenson, *Anal. Chem.* 62 (1990) 161.
- P. Q. Tranchida, P. Dugo, G. Dugo, L. Mondello, *J. Chromatogr. A*, 1054 (2004) 3.
- G. J. Opiteck, K. C. Lewis, J. W. Jorgenson, R. J. Anderegg, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 1518.
- Y. Wang, L. Kong, X. Lei, L. Hu, H.Zou, E. Welbeck, S.W. A.Bligh, Z.Wang, *J. Chromatogr. A* 1137 (2006) 42.
- A.J. Link, J. Eng, D.M. Schieltz, E. Carmack, G.J. Mize, D.R. Morris, B.M. Garvik, J.R. Yates, *Nat. Biotechnol.* 17 (1999) 676.
- W. Yu, Y. Li, C. Deng, X. Zhang, *Electrophoresis* 27 (2006) 2100.
- M.R. Lee, S.M. Bae, T.S. Kim, K.J. Lee, *J. Microbiol.* 44 (2006) 375.
- P. Jandera, J. Fischer, H. Lahovska, K. Novotna, P. Cesla, L. Kolarova, *J. Chromatogr. A* 1119 (2006) 3.
- I. François, P. Sandra, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 4005.
- P. Q. Tranchida, P. Donato, P. Dugo, G. Dugo, L. Mondello, *Trends in Anal. Chem.*, 26 (2007) 191.
- P. Dugo, M. Herrero, T. Kumm, D. Giuffrida, G. Dugo, L. Mondello, *J. Chromatogr. A*, 1189 (2008) 196.
- P. Dugo, M. Herrero, D. Giuffrida, T. Kumm, G. Dugo, L. Mondello, *J. Agric. Food Chem.*, 56 (2008) 3478.
- M. Kivilompolo, T. Hyotylainen, *J. Chromatogr. A* 1145 (2007) 155.
- F. Cacciola, P. Jandera, L. Mondello, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 462.
- P. Jandera, K. Vynuchalová, T. Hájek, P. Cesla, and G. Vohralik, *J. Chemometrics*, 22 (2008) 203.
- Y. Wang, L. Kong, X. Lei, L. Hu, H. a Zou, E. Welbeck, S.W. Annie Bligh, Z.Wang, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 2185.
- A. J. Alexander, L. Ma, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 1338.

35. R.A. Shellie, P.R. Haddad, *Anal Bioanal Chem.* 386 (2006) 405.
36. C.J. Venkatramani, A. Patel, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 510.
37. G. Guichon, N. Merchetti, K. Mriziq, R.A. Shalliker, *J. Chromatogr. A* 1189 (2008) 109.
38. J.C. Giddings, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 10 (1987) 319.
39. S.P. Dixon, I.A.D. Perrett, *Biomed. Chromatogr.* 20 (2006) 508.
40. R.E. Murphy, M.R. Schure, J.P. Foley, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1585.
41. J.V. Selley, *J. Chromatogr. A* 962 (2002) 21.
42. N.E. Hoffman, S.-L. Pan, A.M. Rustum, *J. Chromatogr.* 465 (1989) 189.
43. P. Dugo, O. Favoino, R. Luppino, G. Dugo, L. Mondello, *Anal. Chem.* 76 (2004) 2525.
44. G. Mitulovic, R. Swart, R. van Ling, T. Jakob, J.P. Chervet, *LC Packings* (2004) 61.
45. M. Pepaj, S.R. Wilson, K. Novotna, E. Lundanes, T. Greibrokk, *J. Chromatogr. A* 1120 (2006) 132.
46. M. Pepaj, A. Holm, B. Fleckenstein, E. Lundanes, T. Greibrokk, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 519.
47. F. Cacciola, P. Jandera, Z. Hajdú, P. Cesla, L. Mondello, *J. Chromatogr. A* 1149 (2007) 73.
48. I. François, A. de Villiers, P. Sandra, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 492.
49. N. Tanaka, H. Kobayashi, N. Ishizuka, H. Minatuchi, K. Nakanishi, K. Hosoya, T. Ikegami, *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 35.
50. D.R. Stoll, P.W. Carr, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 5034.
51. D.R. Stoll, J.D. Cohen, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* 1122 (2006) 123.
52. C.J. Venkatramani, Y. Zelechnook, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3484.