

Alberto dos Santos Pereira* e Francisco Radler de Aquino Neto

Instituto de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro - Ilha do Fundão - Centro de Tecnologia - Bloco A - 21949-900 - Rio de Janeiro - RJ

Recebido em 27/1/99; aceito em 29/7/99

STATE OF THE ART OF HIGH TEMPERATURE HIGH RESOLUTION GAS CHROMATOGRAPHY. The developments in stationary phase synthesis and capillary column technology, have opened new perspectives in analysis of high molecular mass compounds (≥ 600 daltons) and thermolabile organic compounds by High Temperature High Resolution Gas Chromatography (HT-HRGC). HT-HRGC is a new analytical borderline and its application to the analysis of high molecular mass compounds is still in its infancy. The apolar and medium polar gum phases can now be operated at temperatures up to 400-480°C, being used for the analysis of n-alkanes up to C-100, lipids, oligosaccharides, industrial resins, polyglycerols, cyclodextrins, porphyrins, etc. This technique should play a leading role as a powerful tool, for many different analysis types, in multidisciplinary fields of Science.

Keywords: high temperature high resolution gas chromatography; natural product chemistry; environmental chemistry; high molecular mass compounds.

HISTÓRICO

Em setembro de 1959, Desty (trabalhando na British Petroleum, Inglaterra) produziu a primeira coluna capilar de vidro. Com a superfície interna recoberta com um filme de esqualeno atuando como fase estacionária, alcançou um nível de separação de hidrocarbonetos em naftas de petróleo, verdadeiramente inacreditável para a época. Um marco na história da cromatografia. Contudo após algumas análises, a coluna perdia quase totalmente suas características e se tornava imprestável. Desty continuou na tentativa de produzir filmes estáveis de fases estacionárias sobre vidro até a primavera de 1960. Concluindo, então, que o problema não oferecia perspectivas, abandonou completamente o vidro como superfície apropriada para fabricação de colunas capilares¹.

Em Zurique, desconhecendo que Desty já havia desistido, Grob continuou tentando o aparentemente impossível. Em 1964, Grob produziu colunas capilares de vidro com recobrimento interno carbonizado (pirólise de CH_2Cl_2 a alta temperatura) sobre o qual era possível depositar eficientemente filmes de fase estacionária. Subsidiado por uma empresa suíça de cigarros, Grob aplicou as colunas recém preparadas na análise de fumaça de cigarros, conseguindo a separação de mais de 300 compostos, numa das mais extraordinárias separações de misturas complexas daquela época. O sucesso da análise levou-o a acoplar a coluna a um espectrômetro de massas para a identificação dos compostos, sendo a primeira ocasião em que se acoplou uma coluna capilar a um espectrômetro de massas. Até 1965, Prof. Grob e sua esposa permaneciam os únicos a trabalhar com colunas capilares de vidro (com a possível exceção de Catoni, na Itália)¹.

O grande avanço ocorrido ao final da década de 70, no desenvolvimento e fabricação comercial de colunas capilares de alto desempenho (Tabela 1) e de equipamentos para sua eficiente utilização, criou uma extraordinária expansão da cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR). Trata-se, hoje, de uma técnica indispensável à pesquisa, desenvolvimento, ou simples controle de qualidade, em uma grande variedade de

áreas da Ciência, como a Química, Medicina, a extração e prospecção de petróleo, o monitoramento de pesticidas e agrotóxicos, entre outras. De particular importância na rápida popularização da técnica se encontra sem dúvida a sua simplicidade de uso, aplicabilidade a um grande número de situações e substratos, aliada a uma notável capacidade de separação, particularmente útil na abordagem de misturas complexas. A temperatura (e, em menor escala, a vazão de gás carreador) são os parâmetros operacionais tradicionalmente empregados na utilização da CGAR. O uso de temperaturas acima de 300°C encontrava, até o começo da década de 90, dificuldades de ordem prática, devido notadamente à inexistência no mercado de fases estacionárias, tubos capilares de alta inércia e conectores adequados.

Em 1983 Lipsky e McMurray¹³ publicaram um artigo sobre o uso de polimetilsilicones com OH terminal, como fases estacionárias em tubos capilares de sílica fundida com proteção externa de alumínio. Este trabalho é o precursor da Cromatografia Gasosa de Alta Resolução e Alta Temperatura (CGAR-AT), um termo também proposto para caracterizar a CGAR com temperaturas finais superiores a 350°C. Pela primeira vez, eles superaram parcialmente as duas desvantagens da CGAR, isto é a estabilidade térmica limitada das fases estacionárias e a da polimídia que recobria externamente os tubos capilares de sílica fundida.

Posteriormente as colunas de sílica fundida recobertas externamente com alumínio demonstraram algumas desvantagens e foram parcialmente substituídas através do uso de colunas de sílica fundida recoberta com poliimida estável a alta temperatura, e mais recentemente por uma segunda geração de colunas capilares de metal: colunas de sílica fundida recobertas externamente com aço, ou mais apropriadamente, tubos de aço recobertos internamente com uma camada de sílica¹⁶⁻¹⁷.

A grande inovação das colunas capilares de alta temperatura, o que permitiu sua utilização eficiente acima de 300°C, foi a utilização de polissiloxanas com OH, terminal, nas quais a imobilização ocorre pela formação de uma ligação química entre os silanóis residuais da superfície interna do capilar (de sílica fundida ou de vidro), e a fase estacionária. Essa ligação resulta em aumento da inércia e da termo-estabilidade¹⁸.

A investigação das fases estacionárias de polissiloxanas com OH terminal, incorporando os desenvolvimentos da família Grob¹⁹,

e-mail: ladetec@iq.ufrrj.br

Tabela 1. Histórico da cromatografia gasosa de alta resolução.

- 1951 – Desenvolvimento da cromatografia gás-sólido (E. Cremer²).
1952 – Desenvolvimento da cromatografia gás-líquido (A. T. James e A. J. P. Martin³).
1956 – 1º Simpósio de cromatografia gasosa da American Chemical Society.
1957 – Desenvolvimento das colunas capilares de metal (M. Golay⁴).
1959 – Coluna capilar de vidro (D. H. Desty et al.⁵), o desenvolvimento tinha o objetivo de reduzir o custo de obtenção do capilar; mas Desty abandonou os esforços após dois anos de tentativas de recobrir o vidro com a fase estacionária.
1961 – K. Grob reinicia na Suíça os esforços de Desty.
1978 – É dominada a confecção de colunas capilares (inertes), além das técnicas de introdução de amostras, principalmente devido aos esforços da família Grob⁶⁻¹¹.
1979 – Surgimento das colunas capilares de sílica fundida (R. D. Dandenau e E. M. Zerenner¹²).
1983/84 – Imobilização de fases estacionárias com OH terminal¹³⁻¹⁴.
1985 – Sistematização da confecção de colunas capilares de alta resolução e alta temperatura (W. Blum¹⁵).

e o conhecimento da preparação de colunas capilares de alta temperatura foram sistematizadas através de Blum et al.^{15, 20-25}.

A estabilidade de fases de polisiloxanas de alta temperatura depende de características estruturais, tais como a reatividade dos grupos funcionais terminais, substituição simétrica de grupos funcionais diferentes na estrutura do polímero e o grau de polimerização, particularmente quando a polisiloxana é fenil-substituída. Em 1988, a SGE Ltd. Internacional, introduziu a copoli-(dimetil-dihidroxi-silano/carborano) (95/5) HT-5 como fase estacionária para CGAR-AT. A fase HT-5 em colunas capilares de sílica fundida recobertas com alumínio permite trabalhar à temperatura máxima contínua (isoterma final) de até 460°C. A alta estabilidade térmica da fase HT5 possibilitou ter êxito em diversas aplicações até 480°C²⁶. Mathews²⁷ descreveu a preparação de colunas capilares com o éter poli-(aril)-sulfônico como fase estacionária, o qual é termo-estável até 380°C, apresentando, no entanto, temperatura mínima de trabalho de 60°C. Hoje, colunas capilares apolares e de média polaridade podem ser operadas convenientemente a temperaturas até 420°C. A um primeiro olhar, a extensão da faixa de temperatura de operação, de 370°C para 420°C parece possuir pequeno significado. Porém, na prática é altamente significativo: expressado em unidades de massa dos compostos que podem ser analisados, o alcance das análises pode ser estendido em mais de 400 daltons. Assim, várias amostras tipicamente analisadas por CLAE também podem ser analisadas por CGAR-AT.

O desenvolvimento e consolidação da CGAR-AT tem como um dos seus principais marcos a publicação do livro "Hochtemperatur Gas Chromatographie" em 1991, por Blum e Aichholtz²⁸.

A aplicabilidade da CGAR-AT inclui a análise de lipídeos²⁸, n-alcanos até C₁₀₀²⁹, triglicerídeos³⁰⁻³¹, oligosacarídeos³²⁻³³, oligômeros de resinas³⁴, porfirinas³⁵⁻³⁸, produtos naturais³⁹⁻⁴⁰, ciclodextrinas⁴¹ e outros tipos de amostras⁴².

Outros tipos de cromatografia gasosa a altas temperaturas, como a cromatografia "on-line" de elementos químicos como tálio utilizando colunas de quartzo ou platina a temperaturas de até 1000°C⁴³, não são consideradas como sendo CGAR-AT.

À parte de alguns grupos especializados em CGAR, a maioria dos usuários potenciais das aplicações da CGAR-AT ainda não percebeu que ela já pode ser utilizada como técnica rotineira. Há várias razões para isto: a ainda baixa estabilidade térmica da camada externa do capilar, a aparente sofisticação das técnicas de injeção e velhos preconceitos cromatográficos.

Há limitações de uso das colunas capilares de sílica fundida recobertas com poliimida, para a análise rotineira com temperaturas finais até 400°C. Até mesmo as colunas recobertas com o polímero de poliimida estável a alta temperatura, quando mantidas a 370°C ou temperaturas mais altas, sofrem processo de degradação térmica. Quando a sílica fundida é exposta, o contato com superfícies metálicas forma microfissuras, que se expandem em rachaduras que conduzem à quebra espontânea da coluna capilar flexível¹⁸.

Uma nova geração de poliimidas, ainda mais resistente às temperaturas elevadas (370°C ou mais), aumentou a vida útil das colunas capilares²⁹.

Hoje em dia, tubos capilares de vidro (Duran-50; Schott-Ruhrglan, Alemanha) ainda são o melhor material para preparação de colunas capilares de alta temperatura, porque eles podem ser utilizados até 450°C. Mas as propriedades mecânicas do capilar de vidro e a falta de fornecedores comerciais são as principais desvantagens. Recentemente, uma segunda geração de colunas capilares de metal vem sendo comercializada. Essas colunas capilares possuem os méritos das colunas capilares de vidro assim como as de sílica fundida, sendo flexíveis, inertes e termo-estáveis até 390°C. Takayama e Takeichi utilizaram essas colunas até 450°C e predisseram, para um futuro próximo, uma competição comercial dessa segunda geração de colunas capilares de metal com as colunas capilares de sílica fundida tradicionais, especialmente em relação à utilização em alta temperatura⁴⁴.

Hoje em dia, a CGAR-AT é uma ferramenta poderosa, com aplicações multidisciplinares, para muitos tipos de análises em diferentes campos da Ciência. As principais aplicações atuais da CGAR-AT encontram-se resumidas na Tabela 2.

TÉCNICAS DE INJEÇÃO

Além das características peculiares das colunas de alta temperatura, uma exigência mais crítica é a técnica de injeção. É obrigatória a utilização de injetor que introduz amostras com pequena ou nenhuma perda devido à alta massa molecular e ou termolabilidade. Assim, a introdução da amostra requer injetores na coluna a frio ("cold on-column") ou por temperatura programável (PTV)⁴⁵.

A injeção de amostra diretamente na coluna a frio é vantajosa, particularmente para amostras de alta massa molecular. Tendo em vista que a amostra é depositada diretamente na coluna, aumentando assim a reprodutibilidade, devido à baixa ou nenhuma discriminação e decomposição da amostra⁴⁶⁻⁴⁷. As misturas complexas freqüentemente obtidas de fontes naturais (por exemplo petróleo, extratos de produtos naturais) incluem, geralmente, frações de alta complexidade, compostos de alta massa molecular ou polares. Portanto, é preciso lidar com dois problemas que levam a soluções opostas: reduzir a retenção para substâncias polares e de alta massa molecular e aumentar a resolução para misturas complexas. As temperaturas de eluição podem ser reduzidas usando colunas de comprimento reduzido e filmes delgados de fase estacionária; se a primeira solução é adotada, porém, o número de pratos também é reduzido. Uma solução é o uso de colunas capilares de tamanho e diâmetro interno reduzidos, aumentando o poder de resolução da análise sem o prolongamento do tempo de análise⁴⁷. Porém, a introdução de amostras em colunas capilares de diâmetro reduzido, através de injetores tipo na coluna a frio, é extremamente problemática⁴⁸. Por outro lado, em várias aplicações,

Tabela 2. Resumo das principais aplicações da CGAR-AT.

Campo da Ciência	Aplicações Típicas
Química de polímeros	Controle de qualidade e pesquisa de oligômeros ^{23,34} .
Geoquímica Orgânica	Análises petroquímicas (ex.: caracterização de geoporfirinas, análises de biomarcadores, etc.) e destilação simulada ^{29,54,55} .
Química de alimentos	Análises de triglicerídeos em óleos e gorduras, análises de oligossacarídeos ^{32,33} .
Química de produtos naturais	Análises de compostos com atividade biológica (ex.: flavonóides e rotenóides) e caracterização de novos compostos de alta massa molecular ^{39,40} .
Arqueologia	Identificação de pigmentos, gomas e outros compostos utilizados no passado em trabalhos de arte ⁹⁰ .
Produtos industriais	Controle de qualidade e pesquisa de agentes tensoativos não iônicos ^{105,109} .
Química ambiental	Análises de compostos de alta massa molecular (ex.: HPAs) em diferentes matrizes ambientais ^{114,115} .

quando a resolução não é um fator crítico, podem ser utilizadas colunas de alta temperatura com diâmetro interno elevado ("megabore", 0,53 mm d.i.)⁴⁹.

O injetor com temperatura programável (PTV) é uma combinação do injetor clássico, com e sem divisão de fluxo ("split/splitless"), com o injetor na coluna a frio, onde a amostra é introduzida no sistema cromatográfico a baixas temperaturas, mas em um injetor especialmente projetado e não diretamente na coluna⁵⁰. A utilização de injetores com temperatura programável é uma técnica de injeção fria, na qual não haverá nenhuma discriminação na agulha. Sua utilização pode produzir resultado semelhante à injeção na coluna a frio, para n-alcenos de ponto de ebulição alto, assim como para mistura de compostos termolábeis^{47,49-52}. Mas, pelo menos em aplicações em geoquímica orgânica, observou-se pequena discriminação para amostras de hidrocarbonetos acima de C₃₀²⁹. Como a amostra é depositada na câmara para ser volatilizada e transferida para a coluna, pode-se prever que ocorra discriminação de substâncias termolábeis e de massa molecular muito alta.

O injetor com temperatura programável requer aquecimento e resfriamento programável da câmara de vaporização inteira e é tecnicamente mais sofisticado que outros injetores. Esses injetores necessitam de controladores eletrônicos, o que aumenta seu custo e reduz sua confiabilidade significativamente em relação aos injetores clássicos. Porém, esses injetores, quando utilizados em toda a sua capacidade, produzem grandes benefícios em relação aos injetores clássicos ("split/splitless").

GEQUÍMICA ORGÂNICA

A ocorrência de hidrocarbonetos de alta massa molecular (> C₄₀) em materiais geológicos recebeu pouca atenção até recentemente, devido às dificuldades analíticas⁵⁴. Depois do trabalho exploratório de Lipsky & Duffy¹³ com petróleos brutos, Del Rio et al.⁵⁵⁻⁵⁶, utilizando a CGAR-AT observaram a ocorrência de hidrocarbonetos até C₇₅ em betumes e petróleos brutos.

A CGAR-AT na indústria de petróleo possui várias e importantes aplicações, por exemplo destilação simulada⁵⁷⁻⁶⁴, análise de biomarcadores de alta massa molecular auxiliando a exploração de petróleo⁶⁵ e mais recentemente na classificação de petróleos²⁹. A baixa volatilidade inerente de misturas acima de C₄₀ impediu a aplicação de CGAR para a análise dos componentes pesados dessas amostras. A alta massa molecular das amostras contendo compostos acima de C₄₀ impediu que estas fossem estudadas na mesma extensão que as amostras com distribuição abaixo de C₄₀.

A "destilação simulada" por CGAR é um método extensamente utilizado na indústria de petróleo, para obter a distribuição do ponto de ebulição de vários óleos brutos, destilados e resíduos. Foram desenvolvidos métodos em CGAR-AT

para determinação da volatilidade de óleos lubrificantes. Os procedimentos por CGAR-AT são métodos que promoveram maior reprodutibilidade do que os métodos tradicionais, como por exemplo os termogravimétricos. Os métodos por CGAR-AT podem ser automatizados e ser executados com colunas capilares de vidro de tamanho reduzido; amostras com pontos de ebulição acima de 650°C podem ser analisadas (equivalente ao ponto de ebulição de n-C₇₀), já que eluem a temperatura menor que 390°C⁵⁷⁻⁵⁸. Novas fases de poli(metilsiloxano) com alta estabilidade térmica, permitiram a análise de frações de petróleo com ponto de ebulição de até 700°C à pressão atmosférica, com pequena ou nenhuma perda ("sangria") da fase⁵⁹.

A geoquímica orgânica preocupa-se quase exclusivamente com a caracterização de compostos orgânicos de C₁ a C₄₀. Os biomarcadores são extensivamente usados para obter informação sobre a fonte, ambientes de deposição, biodegradação, migração e outra informação que concerne a geoquímica orgânica de petróleos brutos⁶¹⁻⁶⁷.

A principal razão para o aumento rápido no número de biomarcadores identificados nos últimos anos é devido à melhoria das técnicas analíticas, em particular a CGAR acoplada a espectrometria de massas (CGAR-EM)⁶⁸. A CGAR-AT acoplada a espectrometria de massas por ionização em campo ("FIMS"), também foi aplicada largamente à análise de porfirinas e hidrocarbonetos aromáticos e saturados de alta massa molecular⁶⁹⁻⁷⁰. Mas além do aumento rápido no número de biomarcadores identificados, os novos biomarcadores têm maior massa molecular^{61,68}. Por exemplo, a utilização das porfirinas metaladas como marcadores geoquímicos esteve um pouco limitado pela falta de técnicas analíticas satisfatórias. As geoporfirinas podem ser utilizadas na exploração de petróleo, para determinar correlações óleo-rocha geradora e óleo-óleo, e como indicadores de maturação de óleo⁶⁰. O desenvolvimento de novas técnicas como a CGAR-AT acoplada a espectrometria de massas por plasma induzido ("ICP-MS") e a CGAR-AT acoplada ao detector por emissão atômica (CGAR-AT-DEA) podem ser utilizados para a análise rápida e quantificação de porfirinas metaladas, como as de níquel, ferro e vanádio⁷¹⁻⁷³.

Os hidrocarbonetos de alta massa molecular presentes em petróleos são mais resistentes a reações químicas ou degradação biológica, sendo bem conhecido que os processos de biodegradação afetam inicialmente os compostos de menor massa molecular. Hoje em dia, a química do petróleo se preocupa cada vez mais com os compostos de maior massa molecular, utilizando para vários fins as frações pesadas e depósitos, que anteriormente eram desprezados ou utilizados para fins menos nobres. Nesse aspecto, o conhecimento molecular é essencial para um melhor entendimento químico dos fenômenos macroscópicos comuns à exploração e exploração de petróleos²⁹.

A crescente exploração de petróleo na plataforma continental em vários países, em especial no Brasil, líder mundial em exploração de petróleo em águas profundas, resulta no surgimento de

novos desafios. Esses tem que ser vencidos rapidamente pelo Brasil, uma vez que o petróleo tem um papel fundamental na economia do país, e que mais de 70% do petróleo produzido no país é oriundo de poços na plataforma continental. Devido ao gradiente geotérmico entre o petróleo contido nos reservatórios na plataforma continental (que está aquecido a temperatura superior a 40°C devido a grande profundidade com que é achado em relação a superfície terrestre) e os oleodutos de produção submarina (no fundo do mar a temperatura aproximada é de 4°C), quando o petróleo entra em contato com as paredes internas dos oleodutos, há precipitação de compostos pesados.

Esse processo pode levar a obstrução total da tubulação. As técnicas de recuperação disponíveis são demasiadamente caras. Dependendo da profundidade do oleoduto na água, os custos de substituição da tubulação podem chegar a US\$500.000,00/quilômetro de oleoduto. Nesse contexto CGAR-AT é uma ferramenta essencial para monitorar, antecipar os problemas e testar a efetividade de soluções experimentais^{29,74}.

Heath e colaboradores relataram a quantificação de n-alcenos de alta massa molecular por CGAR-AT com boa reprodutibilidade e uma curva de calibração para o n-C₆₀ com coeficientes de correlação de 0,995 e limite de detecção de 2,8 ng⁷⁵.

A análise por CGAR e CGAR-AT de polywax 655 (série homóloga de alta massa molecular de n-alcenos, com predominância de n-alcenos pares, entre C₃₀ e C₈₀) mostra as vantagens da CGAR-AT em comparação a CGAR, isto é, a extensão do alcance analítico de C₄₈ para C₁₀₀ (dados apresentados previamente em Pereira et al.¹⁸).

Outra aplicação da CGAR-AT na geoquímica orgânica é a diferenciação de paleoambientes (lacustre marinho, de água doce e hipersalino) de petróleos brutos e suas rochas geradoras, baseada na distribuição de picos de biomarcadores na faixa entre C₄₀ e C₅₀⁶⁵⁻⁶⁶.

TRIGLICERÍDEOS

Em 1979 K. Grob Jr. declarava que os triglicerídeos eram os compostos de maior ponto de ebulição que poderiam ser analisados habitualmente por CGAR⁴⁵. Colunas capilares de vidro podiam ser usadas para algumas centenas de análises (até 355°C), sem mudança significativa de seu desempenho e lidando com compostos com massas moleculares até 1030 Daltons, mas com baixa ou nenhuma resolução dos isômeros dos triglicerídeos.

Com o desenvolvimento das colunas capilares, várias publicações demonstraram a aplicabilidade da CGAR e CGAR-AT, para a caracterização de óleos e gorduras, com resolução suficiente para diferenciar os diferentes triglicerídeos insaturados⁷⁶⁻⁷⁹. Esta técnica analítica foi desenvolvida principalmente para caracterização de adulterações de óleos utilizados na indústria alimentícia devido a fatores econômicos, como por exemplo, a adulteração intencional de azeite de oliva por adição de óleo de soja (que possui um menor valor agregado)⁸⁰. Existem vários métodos físico-químicos para determinar as propriedades dos óleos, mas a complexidade das amostras dificulta o reconhecimento e quantificação de possíveis adulterações⁸⁰⁻⁸². A CGAR-AT propicia a injeção do óleo diretamente na coluna capilar, evitando processos de hidrólise ou derivatização. A CGAR-AT fornece o perfil característico da distribuição de triglicerídeos de cada óleo vegetal, possibilitando a identificação de adulterações, pela simples comparação dos perfis cromatográficos.

Aicholtz e colaboradores utilizaram a CGAR-AT acoplada a espectrometria de massas por ionização química, para a identificação de triglicerídeos menos comuns (ex: hidroxitriglicerídeos e triacilgliceróis de epóxidos)⁸²⁻⁸³.

Há várias outras aplicações relacionadas às análises de triglicerídeos por CGAR-AT, como a descoberta de adulteração de gordura do leite usado na indústria de queijo⁸⁴; estudo de

óleos de sementes utilizados para propósitos terapêuticos em medicamentos populares⁸⁵; monitoramento de meios reacionais, como a clivagem de acilgliceróis catalisada por lipases⁸⁶; e controle de qualidade de produtos alimentícios⁸⁷. A eficiência desta técnica permite empregar misturas de triacilglicerídeos, como mistura teste para colunas capilares de alta temperatura. Sua análise fornece informações importantes sobre o poder de separação, atividade catalítica e a sangria de colunas capilares, a temperaturas entre 300°C e 420°C⁸⁸ (Figura 1).

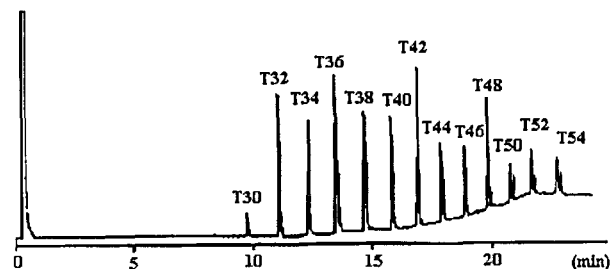


Figura 1. Cromatograma da análise de triglicerídeos de manteiga em iso-octano (10% massa/massa). Coluna capilar capilar de borossilicato (Duran-50) (10 m x 0,30 mm x 0,1 µm), com fase estacionária PS-090, copoli(dimetil-dihidroxi-silano/difenil-dihidroxi-silano) (80/20). Condições de análise: Temperatura inicial 40°C, taxa de aquecimento de 20°C/min até 390°C/10 min; temperatura do injetor 40°C, temperatura do detector 400°C (DIC), fase móvel 0,8 ml/min (H₂). Tipo de injeção: na coluna a frio, com volume de injeção de 0,5 µl. (Mistura teste utilizada pela Quadrex Corporation, para testar colunas capilares de alta temperatura de média polaridade).

OLIGOSSACARÍDEOS

Legumes, vários óleos de sementes, ervilhas e feijões, são de interesse nutricional por serem fontes de proteína e energia. É sabido que eles causam flatulência no homem e animais por causa da concentração relativamente elevada de oligossacarídeos, inclusive rafinose, estaquiose e verbascose³²⁻³³. Fruto-oligossacarídeos que existem em frutas, legumes e grãos são utilizados seletivamente por bactérias do cólon no intestino delgado, causando diversos problemas digestivos³²⁻³³.

O uso da CGAR-AT como um método rápido e simples para a determinação qualitativa e quantitativa de oligossacarídeos, inclusive sacarídeos com massa molecular de até 1400 daltons, em amostras de comida e conteúdo intestinal, tem contribuído para o estudo dos efeitos fisiológicos de oligossacarídeos em dietas no homem e animais³²⁻³³. A vantagem principal da CGAR-AT é a alta resolução obtida para os derivados trimetilsililados de polissacarídeos, permitindo a identificação desses compostos em misturas complexas. A CGAR-AT aumentou consideravelmente o âmbito dessas análises, suplantando a cromatografia por fluido supercrítico (SFC), até mesmo para a análise de oligossacarídeos considerados termolábeis⁸⁹.

Outra aplicação de CGAR-AT em análise de oligossacarídeos é a identificação de gomas formadas por polissacarídeos em obras de arte⁹⁰. Uma tinta pode ser considerada como uma mistura de um pigmento e uma goma. A goma é uma substância que forma um filme que une partículas de pigmento e os adere ao substrato. Entre outras substâncias, resinas de plantas e ceras foram utilizadas como gomas e pigmentos desde tempos pré-históricos⁹¹. A identificação molecular de pigmentos e gomas provê informações úteis sobre os materiais e técnicas utilizadas no passado. Um conhecimento melhor dos materiais utilizados em obras de arte, propicia o desenvolvimento de métodos de conservação mais satisfatórios. Outras misturas de compostos orgânicos de alta massa molecular são marcadores importantes em materiais de origem arqueológica⁹¹.

Oligossacarídeos cíclicos, como os derivados de ciclodextrinas^{41,92-94}, podem ser facilmente analisados. Derivados de β -ciclodextrinas (β -CD) são utilizados como fases estacionárias quirais em CGAR. O uso dessas fases resultou na resolução enantiomérica de precursores quirais e intermediários sintéticos de compostos com atividade biológica, enantioselectividade simultânea de componentes quirais de aromas com diferentes grupos funcionais, etc⁹⁵⁻⁹⁸. Vários derivados de ciclodextrinas, descritos na literatura e usados como fases estacionárias quirais, são misturas complexas. Eles são sintetizados pela substituição de grupos hidroxila e resultam em número considerável de isômeros de posição. Como a qualidade das colunas quirais depende da fase estacionária⁴¹, são necessários métodos para analisá-las e caracterizá-las. A CGAR-AT também pode ser usada na análise de derivados de β -CD, com algumas vantagens em relação a outros métodos como por exemplo, Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCD-AE) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A CGAR-AT pode ser utilizada para análises de rotina de substâncias isoladas e misturas em meios reacionais de derivados de β -ciclodextrinas^{41,93} (Figura 2).

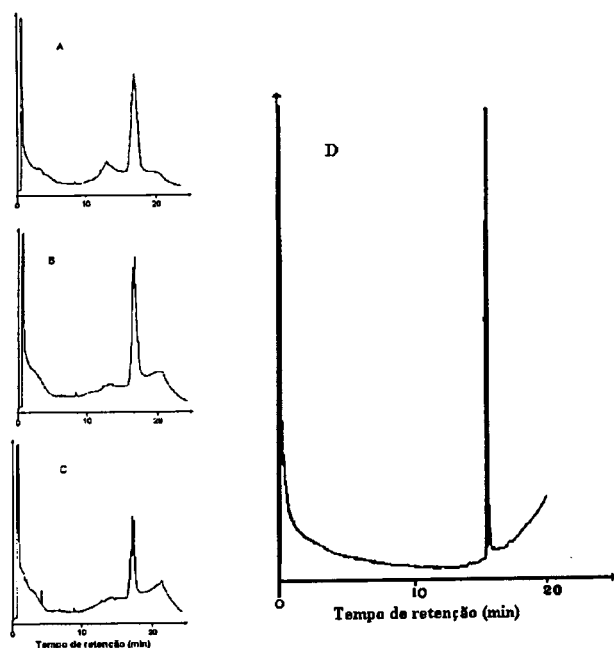


Figura 2. Cromatogramas da análise do meio reacional da 2,6-di-O-metil-3-O-acetil- β -ciclodextrina: a) após 12 horas de reação; b) após 36 horas de reação; c) após 72 horas de reação e d) após purificação em cromatografia de coluna. Para maiores detalhes, referências 41 e 94. Cromatógrafo HP-5890 (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, EUA), Coluna capilar de sílica fundida recoberta com poliimida de alta temperatura, com a fase estacionária copoli (dimetil-dihidroxi-silano/difenil-dihidroxi-silano/silil-difenileno-éter) (40/30/30) (3 m x 0,25 mm x 0,1 μ m), Silaren, BGB, Suíça. Condições de análise: Temperatura inicial de 80°C/0,5 min, taxa de aquecimento de 20°C/min até 320°C, 2ª taxa de aquecimento 10°C/min até 400°C/10 min. Detector (DIC) 400°C. Tipo de injeção: na coluna a frio, com volume de injeção de 0,5 μ l.

Os derivados de β -ciclodextrinas são os compostos de maior massa molecular até o momento analisados por CGAR-AT. É interessante notar que, apesar da elevada massa molecular dos derivados de CD (1400-2500 daltons), eles possuem tempo de retenção na faixa dos n-alcenos de C_{60} a C_{70} (844-984 daltons). Esse fato é devido as estruturas cíclicas (toroidais) das CD diminuírem a interação dessas substâncias com a fase estacionária⁴¹.

PRODUTOS NATURAIS

A caracterização de importantes classes de produtos naturais (por exemplo rotenóides, flavonóides e várias outras classes de compostos aromáticos) é normalmente realizada através de técnicas da fitoquímica clássica e inclui primeiramente uma etapa de isolamento, através de cromatografia em coluna aberta (CC), cromatografia em camada delgada (CCD) ou CLAE, antes da identificação pelos métodos espectroscópicos habituais de UV, IR e NMR. Assim, a identificação de múltiplos componentes através de fitoquímica clássica é extremamente lenta.

Desde 1985 o LADETEC-IQ-UFRJ vem enfatizando que a CGAR pode e deve ser utilizada para analisar compostos tradicionalmente rotulados como não analisáveis por cromatografia gasosa, por serem polares ou "termolábeis", em especial os produtos naturais⁹⁹. Tem-se, também, procurado disseminar essa atitude para a química ambiental, medicinal e clínica. Pesquisadores desses campos continuam a preferir a CLAE como técnica ideal, provavelmente devido às velhas limitações da CG terem sido estendidas para a CGAR, sem uma análise adequada. A CGAR tem muitas vantagens quando comparada a CLAE: a não utilização de solventes como fase móvel, maior resolução, separação mais rápida, facilidade de acoplamento a um grande número de detectores seletivos, etc.¹⁰⁰. Hoje, a CGAR-EM é um método importante e consolidado para a análise sistemática de produtos naturais^{99,101}. No estudo de plantas medicinais, porém, a CGAR-EM tem-se restringido, geralmente, à análise de misturas de componentes de baixa polaridade e de baixa massa molecular.

A CGAR-AT abriu novas perspectivas para a determinação rápida de produtos naturais, algum deles com atividade biológica, como flavonóides e rotenóides³⁹⁻⁴⁰. A Figura 3 mostra a análise de extratos acetônicos brutos de propólis por CGAR-AT com três flavonóides caracterizados por CGAR-AT-EM.

Os extratos brutos polares de produtos naturais são amostras complexas, como, por exemplo, o extrato acetônico bruto de propólis. Este extrato possui vários ácidos e compostos fenólicos, misturas que são difíceis de analisar, devido, entre outros fatores, à forte tendência desses compostos sobreacregarem as fases estacionárias apolares (ou de média polaridade) necessárias para o trabalho em temperaturas elevadas¹⁰⁵. A utilização de colunas de comprimento reduzido (≤ 10 m) e filmes delgados de fase estacionária ($\leq 0,1$ mm) favorecem a eluição mais rápida (e a temperaturas mais baixas) de misturas de compostos de alta massa molecular, ou de alto ponto de ebulição. Por outro lado, a utilização de filmes delgados de fases estacionárias compromete o poder de resolução, assim como a capacidade da coluna capilar. Apesar destes fatos o extrato acetônico bruto de propólis pode ser analisado por CGAR-AT, sem a necessidade de "clean-up", propiciando um cromatograma informativo.

A utilização da CGAR-AT e da CGAR-AT-EM na análise de extratos brutos e frações de produtos naturais permitiu a caracterização direta de vários compostos, sem a necessidade de derivatização e, em vários casos, sem a necessidade de procedimentos de "clean up". Estes compostos incluem flavonóides, rotenóides e ésteres graxos de terpenóides e de álcoois de cadeia longa^{39,40,102,103}. A possibilidade de analisar extratos brutos pode ser extremamente útil para o estudo sistemático de plantas medicinais e outras fontes de amostras biologicamente ativas, como um método de análise rápida, que pode guiar o trabalho fitoquímico subsequente. Como resultado, depois de uma etapa de triagem ("screening"), só alguns picos cromatográficos desconhecidos permanecerão dependentes de metodologia analítica clássica (por exemplo, isolamento) para identificação inequívoca. Em certos casos essa abordagem pode ser simplificada pelo isolamento de uma substância chave apenas. Após sua identificação é possível buscar, via espectrometria de massas, a presença

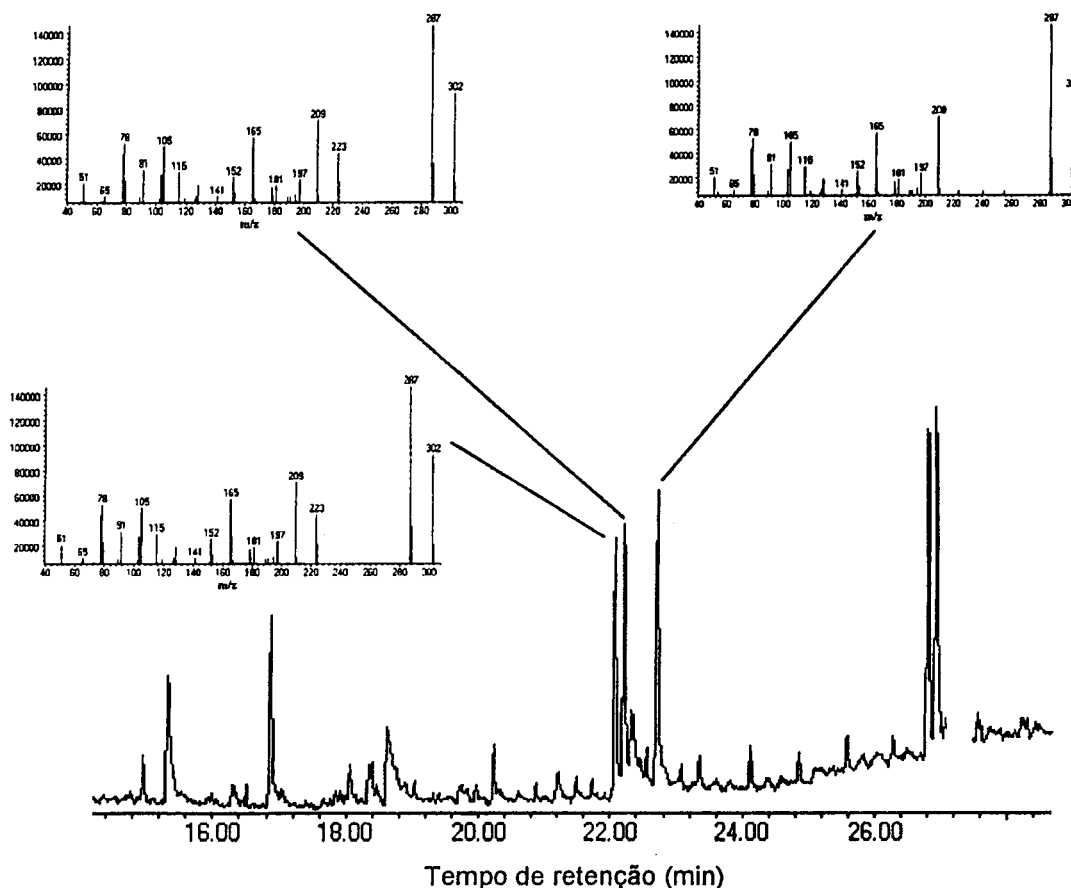


Figura 3. Cromatograma de íons totais de um extrato acetônico bruto de propólis, apresentando três espectros de massas, correspondentes a três isômeros de trihidroxi-metoxi-flavonóides. Condições de análise: coluna capilar de borosilicato (Duran-50) (18 m x 0,30 mm x 0,1 μ m), com fase estacionária OV-1701-OH copoli(dimetil-dihidroxi-silano/dicianopropil-dihidroxi-silano/difenil-dihidroxi-silano) (88/7/5); Ohio Valley Specialty Chemical, Co., USA). Espectrômetro de massas HP5972 MSD acoplado a um cromatógrafo HP-5890 (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, EUA), volume de injeção 0,2 μ l, com o injetor na coluna a frio (temperatura ambiente), interface a 390°C, Temperatura inicial de 40°C, taxa de aquecimento de 10°C/min até 370°C/10 min. Faixa de varredura de 50-700 Daltons (70 eV).

de outros membros de sua família estrutural presentes na amostra. A caracterização dessas substâncias correlatas pode ser feita por transformações químicas efetuadas naquela que foi isolada, possibilitando a rápida caracterização dos demais compostos desconhecidos. Essa abordagem é especialmente vantajosa, quando a quantidade dos compostos desconhecidos é insuficiente para permitir o seu isolamento. Essa sistemática foi bem descrita por Godoy et al. em 1987⁹⁹. Novas fases estacionárias para CGAR-AT de média polaridade (ex.: fluoroalquil/fenil-substituídas, termicamente estável até 400°C) propiciam a resolução de amostras de elevada complexidade, como por exemplo a separação dos componentes da cera de abelha¹⁰⁴.

AGENTES TENSOATIVOS

A baixa volatilidade inerente de vários contaminantes, como os agentes tensoativos não iônicos, impediu a análise desses compostos por CGAR. Esse fato foi superado pelo uso de colunas capilares de alta temperatura e injetores tipo "cold on-column" (na coluna a frio). Esta técnica de introdução de amostra, como já foi dito, é útil para todos os tipos de amostras, mas essencial para a análise de misturas termolábeis e amostras com alto ponto de ebulição¹⁰⁶.

Álcoois graxos polietoxilados são amplamente empregados em cosméticos. São agentes tensoativos não iônicos e atuam como detergentes e emulsificantes. Como a maioria dos fabricantes não fornece um perfil analítico específico desses materiais, frequentemente acontece que o químico de cosméticos

não tem conhecimento exato sobre o número de componentes presentes, assim como suas estruturas¹⁰⁷. O principal grupo de agentes tensoativos não iônicos consiste em misturas de álcoois polietoxilados ou de alquilfenóis polietoxilados. A biodegradação ambiental, inclusive no tratamento de água de esgoto, que contém alquilfenóis polietoxilados, resulta em alquilfenóis e alquilfenóis etoxilados (tipicamente com 1 a 3 unidades de etoxila), que são mais resistentes que os seus precursores e podem acumular em ciclos alimentares. Foi relatado em laboratório¹⁰⁸⁻¹⁰⁹, assim como em estudos de campo¹¹⁰, que esses compostos induzem atividades estrogênicas.

Além das questões ambientais pertinentes, a análise e conhecimento da composição química de misturas de agentes tensoativos não iônicos apresenta outros aspectos tecnológicos e econômicos importantes, como: i) diferenças na distribuição de oligômeros podem afetar profundamente as propriedades físico-químicas dessas misturas e ii) avaliação de matérias primas comerciais, devido à grande variação de preços entre diferentes fornecedores^{23,109}.

Foram propostas várias metodologias para a separação e determinação quantitativa de agentes tensoativos não iônicos, como CCD, CLAE, CGAR e Cromatografia com fluido supercrítico¹¹¹. Embora a sensibilidade e capacidade de separação dos métodos de CCD tradicionais sejam muito baixos quando comparadas à CGAR e à CLAE, a CCD foi utilizada também para a separação e determinação quantitativa de agentes tensoativos. A baixa reprodutibilidade inerente da CCD resultou na diminuição de sua aplicação na análise de agentes tensoativos não iônicos. A CLAE

também foi utilizada para a separação de agentes tensoativos não iônicos, tais como os oligômeros de álcoois etoxilados. Mas, como estes compostos não possuem nenhuma absorção significativa no ultravioleta (UV), eles devem ser derivatizados previamente para análise em CLAE. Somente os agentes tensoativos com um número limitado de grupos etoxila por molécula, podem ser analisados por CGAR sem a necessidade de derivatização. Vários processos de derivatização foram utilizados para aumentar a volatilidade dos agentes tensoativos não iônicos, porém, além dos métodos de derivatização serem demorados, vários agentes tensoativos continuam possuindo baixa volatilidade, limitando a aplicação desses métodos, por exemplo, a álcoois com um máximo de vinte grupos etoxila. A cromatografia com fluido supercrítico foi proposta como um procedimento analítico alternativo para a análise de misturas que são termolábeis ou têm baixa volatilidade, mas apresentou pouca ou nenhuma resolução, para os isômeros de álcoois etoxilados¹¹².

Uma metodologia alternativa para a caracterização de agentes tensoativos não iônicos é o uso da CGAR-AT e CGAR-AT-EM para resolução, caracterização e quantificação de isômeros^{106,111,112}. A Figura 4 ilustra a análise por CGAR-AT-EM de uma mistura de etoxinonilfenóis, contendo entre 1 e 7 unidades de etoxila, sem a necessidade de derivatização, propiciando um cromatograma informativo, com a resolução de vários isômeros.

ANÁLISE AMBIENTAL

Aplicações recentes da CGAR-AT em química ambiental incluem a análise e caracterização de compostos de alta massa molecular, em amostras de fumaça da queima de biomassa. Ésteres de ácidos graxos, ésteres triterpenílicos de ácidos graxos [(ex: uma série de ésteres de α - e β -amirina, (Figura 5)] e triglicerídeos, foram identificados pela primeira vez em emissões da queima de biomassa, indicando a emissão desses compostos diretamente volatilizados das plantas para a fumaça^{102,113,114}. Esses compostos não foram caracterizados previamente em análises por CGAR e CGAR-EM de outras amostras

de plantas, devido às análises em CGAR possuírem um limite de volatilidade dos compostos que podem ser analisados, muito inferior às da CGAR-AT. Isso levava a um limite máximo para a análise a cerca de 500 daltons de massa molecular, para compostos não derivatizados.

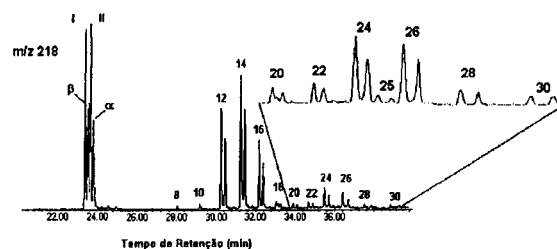


Figura 5. Fragmentograma do íon m/z 218 de um extrato bruto de *Croton hemiargyreus*, apresentando uma série de derivados de ésteres de α e β amirina se estendendo até aos triacontanoatos de α e β amirina. Condições de análise: coluna capilar de sílica fundida recoberta com polimida de alta temperatura (30 m x 0,25 mm x 0,1 μ m), com fase estacionária DB-5-HT copoli (dimetil-dihidroxi-silano/difenil-dihidroxi-silano) (95/5); J&W, Rancho Cordova, CA, EUA). Espectrômetro de massas HP5972 MSD acoplado a um cromatógrafo HP-5890 (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, EUA), volume de injeção 0,2 μ l, com o injetor na coluna a frio (temperatura ambiente), interface a 390°C, Temperatura inicial de 40°C, taxa de aquecimento de 10°C/min até 390°C/10 min. Faixa de varredura de 50-700 Daltons (70 eV).

Outra aplicação importante da CGAR-AT em química ambiental, é a análise de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). A importância desse grupo de contaminantes ambientais baseia-se no fato de que vários compostos possuem atividade mutagênica ou carcinogênica¹¹⁵⁻¹¹⁶. Os HPAs podem ser formados pela combustão incompleta de combustíveis fósseis, sendo, conseqüentemente, amplamente difundidos no ambiente. Esse grupo é grande e possui muitos isômeros, o que requer métodos de separação eficientes como a

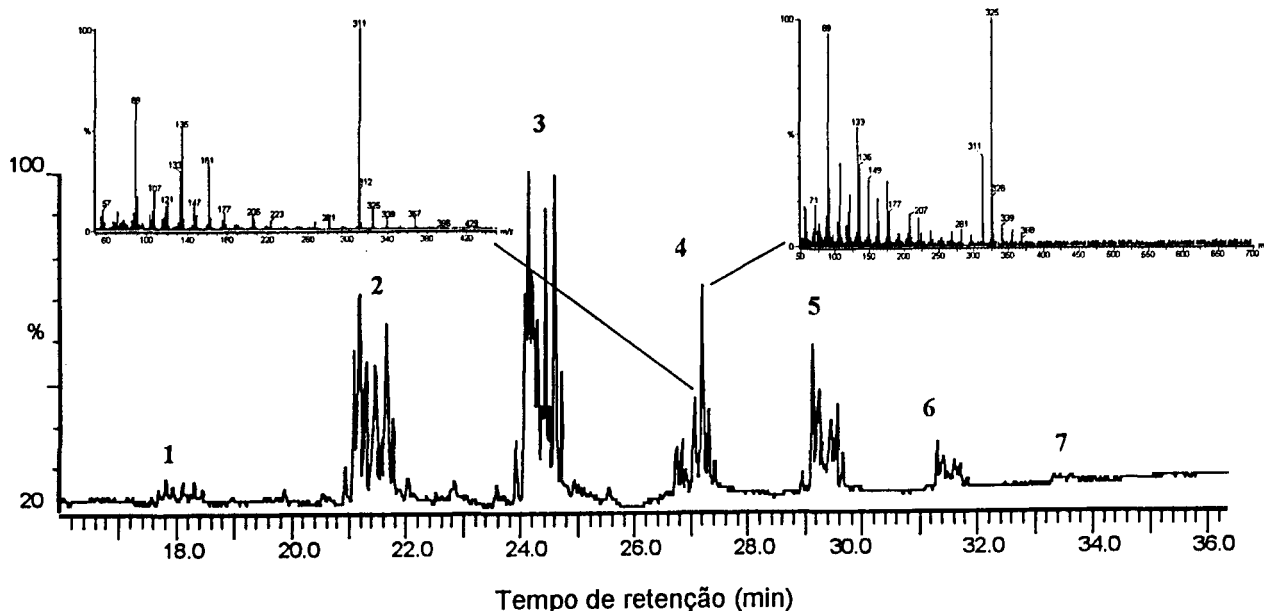


Figura 4. Cromatograma de íons totais de uma mistura de nonilfenóis polietoxilados (mistura de padrões cedida pelo Dr. D. Barceló, CID-CSIC, Espanha). Condições de análise: coluna capilar de sílica fundida recoberta com polimida de alta temperatura (30 m x 0,25 mm x 0,1 μ m), com fase estacionária DB-17-HT copoli (difenil-dihidroxi-silano/dimetil-dihidroxi-silano) (50/50); J&W, Rancho Cordova, CA, EUA). Espectrômetro de massas Fisons MD 800 acoplado a um cromatógrafo Fisons Serie 8000 (Fisons, Manchester, Reino Unido), volume de injeção 0,2 μ l, com o injetor na coluna a frio (temperatura ambiente), interface a 370°C, Temperatura inicial de 40°C, taxa de aquecimento de 8°C/min até 350°C/10 min. Faixa de varredura de 50-700 Daltons (70 eV).

CGAR. Porém, a cromatografia de HPAs de alta massa molecular pode exceder o limite de temperatura máxima de utilização das colunas capilares tradicionais¹¹⁵⁻¹¹⁸. Neste contexto, a CGAR-AT oferece a possibilidade de analisar uma variedade de HPAs com massas moleculares até pelo menos 400 daltons¹¹⁵⁻¹¹⁸.

OUTRAS APLICAÇÕES

Há várias outras possibilidades de aplicação da CGAR-AT em controle de qualidade, e pesquisa e desenvolvimento de oligômeros. Por exemplo, resinas fenólicas como a Novolac³⁴, além de outros tipos de aditivos e resinas, podem ser analisados por CGAR-AT²³.

O controle de qualidade destes materiais não só requer informação sobre a massa molecular (até 1400 daltons) ou distribuição do número de anéis aromáticos, mas também caracterização detalhada de isômeros de posição³⁴, o que pode ser realizado pela CGAR-AT.

A CGAR-AT veio para ocupar um nicho de faixa de massa molecular, entre 700 e 3000 Daltons, que não é coberto pelas técnicas analíticas convencionais. Muito se sabe da distribuição de moléculas menores que 700 Daltons e de peptídeos, proteínas e polisacarídeos, na natureza. Mas apenas agora, com o uso da CGAR-AT, vislumbra-se um universo de moléculas desconhecidas, que aguarda sua descoberta.

CONCLUSÕES

Como a CGAR já é um das técnicas mais populares e poderosas para separação de misturas, o futuro da CGAR-AT e da CGAR-AT-EM é certamente promissor.

A CGAR-AT é um conceito relativamente novo para análises de rotina, porque as colunas capilares comerciais de alta temperatura só agora estão ficando facilmente disponíveis. Mas os velhos preconceitos contra a análise de substâncias termolábeis ou de alta massa molecular por CG são um obstáculo para sua aceitação por usuários potenciais. A CGAR-AT oferece a possibilidade de analisar uma grande variedade de amostras de alta massa molecular.

Foram apresentados vários exemplos de análises do LADETEC – IQ/UFRJ, destacando o uso da CGAR-AT e CGAR-AT-EM como excelentes técnicas de apoio à pesquisa, podendo transformar-se facilmente em técnicas de rotina. A CGAR-AT possui um grande potencial para a análise de inúmeras classes de compostos orgânicos, como, por exemplo: ésteres triterpenílicos de ácidos graxos; álcoois graxos polietoxilados, triglicerídeos, ésteres de álcoois graxos e carboidratos. Alia-se a isso a possibilidade de identificação de ácidos graxos livres, de novos produtos naturais, de aplicação em destilação simulada de frações pesadas de petróleo; caracterização de polímeros, etc.. A grande versatilidade da técnica é baseada intrinsecamente no grande poder de resolução e extrema inércia química das colunas capilares, além da facilidade de utilização de vários sistemas de detecção e de contar com sistemas de transferência de amostra (injeção na coluna a frio) não discriminatórios.

Deve ser acentuado que o uso de condições de CGAR-AT para análises típicas de CGAR pode melhorar à análise devido a menor sangria das colunas, assim como o menor tempo de análise, além de um prolongamento da vida útil das colunas capilares.

A disponibilidade da CGAR-AT e CGAR-AT-EM deveria incentivar pesquisadores de todas as áreas, a buscar moléculas de massa molecular na faixa de 700 a 3000 Daltons.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Finep, CNPq, FUJB, FAPERJ e UFRJ/SR-2, pelo apoio financeiro e pelas bolsas concedidas.

REFERÊNCIAS

- Grob, K.; *Rev. Quím. Industr.* **1986**, *55*, 23
- Cremer, E.; Muller, R.; *Ibid.* **1951**, *55*, 217.
- James, A. T.; Martin, A. J. P.; *Biochem. J.* **1952**, *50*, 679.
- Golay, M. J. E.; *Anal. Chem.* **1957**, *29*, 928.
- Desty, D. H.; Goldurp, A.; Wyman, B. E.; *J. Inst. Petrol.* **1959**, *45*, 287.
- Grob, K.; Grob, G.; *J. Chromatogr. Sci.* **1969**, *7*, 584.
- Grob, K.; Grob, G.; *J. Chromatogr. Sci.* **1970**, *8*, 635.
- Grob, K.; Grob, G.; *J. Chromatogr.* **1971**, *62*, 1.
- Grob, K.; Grob Jr., K.; *J. Chromatogr.* **1978**, *151*, 311.
- Grob Jr., K.; Grob, G.; Grob, K.; *J. Chromatogr.* **1978**, *156*, 1.
- Grob, K.; Grob Jr., K.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1978**, *1*, 57.
- Dandenau, R. D.; Zerenner, E. M.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1979**, *2*, 351.
- Lipsky, S. R.; McMurray, W. J.; *J. Chromatogr.* **1983**, *279*, 59.
- Gereraert, E.; Sandra, P.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1984**, *7*, 431.
- Blum, W.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1985**, *8*, 718.
- Lipsky, S. R.; Duffy, M. L.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1986**, *9*, 376.
- Lipsky, S. R.; Duffy, M. L.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1986**, *9*, 725.
- Pereira, A. S.; Silva, E. F.; Aquino Neto, F. R.; *Quím. Nova* **1996**, *19*, 600.
- Grob, K.; *Making and manipulating capillary columns for gas chromatography*, Hüthig Heidelberg, 1986, p. 232.
- Blum, W.; Grob, K.; *J. Chromatogr.* **1985**, *346*, 341.
- Blum, W.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1985**, *8*, 718.
- Blum, W.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1986**, *9*, 350.
- Blum, W.; Damasceno, L. M. P.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1987**, *10*, 472.
- Blum, W.; Englinton, G.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1989**, *12*, 290.
- Blum, W.; Aichholz, R.; *J. Microcol. Sep.* **1993**, *5*, 297.
- Dawes, P.; Cumbers, M.; *Am. Lab.* **1989**, *21*, 102.
- Mathews, R.G.; *J. Chromatogr. Sci.* **1989**, *27*, 47.
- Blum, W.; Aichholz, R.; *Hochtemperatur Gas-Chromatographie*, Hüthig Verlag, Heidelberg, 1991, p. 166.
- Aquino Neto, F. R.; Cardoso, J. N.; Pereira, A. S.; Fernandes, M. C. Z.; Caetano, C. A.; Machado, A. L. C.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1994**, *17*, 259.
- Geeraert, E.; Sandra, P.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1985**, *8*, 415.
- Hinshaw Jr., J. V.; Seferovic, W.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1986**, *9*, 69.
- Karlsson, H.; Carlstedt, I.; Hansson, G. C.; *Anal. Biochem.* **1989**, *182*, 438.
- Carlsson, N. G.; Karlsson, H.; Sandberg, A. S.; *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 2404.
- Tóth, T.; Garay, F.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1994**, *17*, 177.
- Blum, W.; Richter, W. J.; Englinton, G.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1988**, *11*, 148.
- Machado, S. P.; Cardoso, J. N.; 10th Int. Symp. Capillary Chromatogr., livro de resumos, Riva del Gardia, Itália, 1989, p. 812.
- Blum, W.; Englinton, G.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1989**, *12*, 621.
- Blum, W.; Ramstein, P.; Englinton, G.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1990**, *13*, 85.
- Pereira, A. S.; Pinto, A. C.; Cardoso, J. N.; Aquino Neto, F. R.; Ramos, M. F. S.; Dellamora-Ortiz, G. M.; Santos, E. P.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1998**, *21*, 396.

40. Pereira, A. S.; Pinto, A. C.; Cardoso, J. N.; Aquino Neto, F. R.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Silva, M. F. G. F.; Andrei, C. C.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1998**, *21*, 513.
41. Pereira, A. S.; Silva, E. F.; Aquino Neto, F. R.; *J. Chromatogr. Sci.* **1998**, *36*, 91.
42. Mayer, B. X.; Lorbeer, E.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1995**, *18*, 504.
43. Hoffman, D. C.; *Chem. Eng. News* **1994**, *72*, 24.
44. Takayama, Y.; Takeichi, T.; *J. Chromatogr.* **1994**, *685*, 61.
45. Grob Jr., K.; *J. Chromatogr.* **1979**, *178*, 387.
46. Wang, F. S.; Shanfield, H.; Zlatkis, A.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1983**, *6*, 471.
47. Grob, K.; *On-column injection in capillary gas chromatography*, Hüthig, Verlag, Heidelberg, 1993, p. 486.
48. Damasceno, L. M. P.; Cardoso, J. N.; Coelho, R. B.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1992**, *15*, 256.
49. Thomsom, J. S.; Rynaski, A. F.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1992**, *15*, 227.
50. Tipler, A.; Johnson, G.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1990**, *13*, 365.
51. Schomburg, G.; Husmann, H.; Schultz, F.; Teller, G.; Bender, M.; *J. Chromatogr.* **1983**, *279*, 259.
52. Schomburg, G.; Husmann, H.; Belau, H.; Schultz, F.; *J. Chromatogr.* **1983**, *279*, 251.
53. Stan, H. J.; Müller, H. M.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1988**, *11*, 140.
54. Grob, K.; Läubli, T. H.; Brechbühler, B.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1988**, *11*, 462.
55. del Rio, J. C.; Phip, R. P.; *Org. Geochem.* **1992**, *18*, 869.
56. del Rio, J. C.; Phip, R. P.; Allen, J.; *Org. Geochem.* **1992**, *18*, 541.
57. McCormack, A. J.; McCann, J. M.; *LC-GC* **1991**, *9*, 28.
58. Neer, L. A.; Deo, D.; *J. Chromatogr. Sci.* **1995**, *33*, 133.
59. DiFeo, D.; Sharp, G.; 7th Latin-American Congress on Chromatography and Related Techniques, livro de resumos, Águas de São Pedro, SP, Brasil, 1998, p. 91.
60. Faria, F. R. D.; Carmo, R. S.; Almeida, L. F.; Matos, A.; 7th Latin-American Congress on Chromatography and Related Techniques, livro de resumos, Águas de São Pedro, SP, Brazil, 1998, p. 326.
61. del Rio, J.C.; Phip, R.P.; Allen, J.; *Org. Geochem.* **1988**, *14*, 462.
62. del Rio, J. C.; Philp, R. P.; *Trends Anal. Chem.* **1992**, *11*, 187.
63. Philp, R. P.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1994**, *17*, 398.
64. Wavrek, D. A.; Collister, J. W.; 18th International Meeting on Organic Geochemistry, livro de resumos, Maastrich, Holanda, 1997, p. 135.
65. De Grande, S. M. B.; Aquino Neto, F. R.; Mello, M. R.; *Org. Geochem.* **1993**, *20*, 1039.
66. Carlson, R. M. K.; Dias, R. F.; Schoell, M.; 18th International Meeting on Organic Geochemistry, livro de resumos, Maastrich, Holanda, 1997, p. 399.
67. Chouparova, E.; Philp, R. P.; 18th International Meeting on Organic Geochemistry, livro de resumos, Maastrich, Holanda, 1997, p. 591.
68. De Grande, S. M. B.; Aquino Neto, F. R.; Mello, M. R.; Manning, D. (Editor), *Organic Geochemistry Advances and Applications in Energy and the Natural Environment*, Manchester University Press, Manchester, 1991, p. 181.
69. Blum, W.; Golimund, K.; Jordi, P. E.; Ramstein, P.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1988**, *11*, 441.
70. Gallegos, E. J.; Fetzter, J. C.; Carlson R. M.; Pena, M. M.; *Energy Fuels* **1991**, *5*, 376.
71. Ebdon, L.; Evans, E. H.; Pretorius, W. G.; Rowland, S. J.; *J. Anal. At. Spectrom.* **1994**, *9*, 939.
72. Pretorius, W. G.; Ebdopn, L.; Rowland, S. J.; *J. Chromatogr.* **1993**, *646*, 369.
73. Zeng, Y.; Uden, P. C.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1994**, *17*, 223.
74. Aquino Neto, F. R.; Cardoso, J. N.; Pereira, A. S.; Fernandes, M. C. Z.; First International Symposium on Colloid Chemistry in Oil Production: Asphaltenes and Wax Deposition, livro de resumos, Rio de Janeiro, 1995, p. 63.
75. Heath, D.; Moffatt, B.; Lowry, R.; Rowland, S.; *Anal. Proceed.* **1995**, *32*, 485.
76. Termonia, M.; Munari, F.; Sandra, P.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1987**, *10*, 263.
77. Schaller, V. H.; *Fat Sci. Technol.* **1991**, *93*, 510.
78. Khaled, M. Y.; McNair, H. M.; Hanson, D. J.; *J. Chromatogr. Sci.* **1993**, *31*, 375.
79. Ulberth, F.; Gabernig, R.; *J. Chromatogr.* **1997**, *773*, 233.
80. Antoniosi Filho, N. R.; Carrilho E.; Lanças, F. M.; *J. Am. Oil. Chem Soc.* **1993**, *70*, 1051.
81. Havenga W. J.; Rohwer, E. R.; *J. Chromatogr.* **1994**, *669*, 139.
82. Aicholtz, R.; Spitzer V.; Lorbeer, E.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1998**, *21*, 152.
83. Aicholtz, R.; Spitzer V.; Lorbeer, E.; *J. Chromatogr.* **1997**, *787*, 181.
84. Peña, A.; Nevárez, L.; Labastida, C.; Capella, S.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1997**, *20*, 572.
85. Spitzer, V.; Aicholz, R.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1996**, *19*, 497.
86. Bereuter, T. L.; Lorbeer, E.; *J. Chromatogr.* **1995**, *697*, 469.
87. Huang, A. S.; Robinson, L. R.; Gursky, L. G.; Pidel, A.; Delano, G.; Softly, B. J.; Templeman, G. J.; Finley, J. W.; Leveille, G. A.; *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1834.
88. Mayer, B. X.; Lorbeer, E.; *J. Chromatogr.* **1997**, *758*, 235.
89. Karrer, R.; Helberg, H.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1992**, *15*, 585.
90. Peña, A.; Capella, S.; González, C.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1995**, *18*, 713.
91. Regert, M.; Delacotte, J. M.; Arpino, P.; *Analisis* **1996**, *24*, M23.
92. Blum, W.; Aichholz, R.; *J. Microcol. Sep.* **1991**, *3*, 325.
93. Shomburg, G.; Deege, A.; Hinrichs, H.; Hübinger, E.; Husmann, H.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1992**, *15*, 579.
94. Pereira, A. S.; Silva, E. F.; Aquino Neto, F. R.; In: *Chromatography - Celebrating Michael Tswett's 125th Birthay* - Ed. Kaiser; O.; Kaiser, R. E.; Gunz, H.; Günther, W.; InCom, Duesseldorf, Alemanha, 1997, p. 65.
95. König, W. A.; Gehrcke, B.; Runge T.; Wolf, C.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1993**, *16*, 376.
96. König, W. A.; Rieck, A.; Hardt, I.; Gehrcke, B.; Kubecka, K.; Muhle, K.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1994**, *17*, 315.
97. Casabianca, H.; Graff, J. B.; Jane, P.; Perrucchiatt, C.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1995**, *18*, 279.
98. Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J.; Silva, E. F.; Santos, A. R.; Ramos, M. C. K. V.; Aquino Neto, F. R.; *Chirality* **1997**, *9*, 321.
99. Godoy, R. L. O.; Aquino Neto, F. R.; Pinto, A. C.; do 8th Int. Symp. on Capillary Chromatography, livro de resumos, Riva del Garda, Italia, 1987, p. 636.
100. Pereira, A. S.; Aquino Neto, F. R.; Cardoso, J. N.; Violante, F. A.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J.; *Anal. Lett.* **1998**, *31*, 719.
101. Patitucci, M. L.; Pinto, A. C.; Cardoso, J. N.; *Phytochem. Anal.* **1995**, *6*, 38.
102. Elias, V. O.; Simoneit, B. R. T.; Pereira, A. S.; Cardoso, J. N.; *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32*, 1356.
103. Vilegas, J. H. Y.; Lanças, F. M.; Antoniosi Filho, N. R.; *Chromatographia* **1995**, *40*, 341.

104. Aichholz, R.; Lorbeer, R.; *J. Microcol. Sep.* **1996**, *8*, 553.
105. Stuckenbruck, P.; Aquino Neto, F. R.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1990**, *13*, 210.
106. M. Castillo, A. S. Pereira, F. R. Aquino Neto and D. Barceló, *Trends Anal. Chem.* **1999**, *18*, 26.
107. Vettori, U.; Issa, S.; Facino R. M.; Carini, M.; *Biom. Environ. Mass Spectrom.* **1988**, *17*, 193.
108. Jobling, S.; Sumpter, J. P.; *Aquat. Toxicol.* **1993**, *27*, 361.
109. White, R.; Jobling, S.; Hoare, S. A.; Sumpter, J. P.; Parker, M. G.; *Endocrinology* **1994**, *135*, 175.
110. Purdom, C. E.; Ahardiman, P.; Bye, V. J.; Eno, N. C.; Tyler, C. R.; Sumpter, J. P.; *Chem. Ecol.* **1994**, *8*, 275.
111. Cserhádi, T.; Forgács, E.; *J. Chromatogr.* **1997**, *774*, 265.
112. Silver, A. H.; Kalinoski, H. T.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1992**, *69*, 599.
113. Elias, V. O.; Simoneit, B. R. T.; Pereira, A. S.; Cardoso, J. N.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1998**, *21*, 87.
114. Elias, V. O.; Simoneit, B. R. T.; Pereira, A. S.; Cabral, J. A.; Cardoso, J. N.; *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*, 2369.
115. Bengard, A.; Colmsjö, A.; Lundmark, B. O.; *J. Chromatogr.* **1992**, *595*, 247.
116. Bengard, A.; Colmsjö, A.; Lundmark, B. O.; *J. Chromatogr.* **1993**, *630*, 287.
117. Simoneit, B. R. T.; Fetzter, J. C.; 17th International Meeting on Organic Geochemistry, CD Rom de resumos, Donostia-San Sebastian, Espanha 1995.
118. David, F.; Sandra, P.; *LC-GC* **1993**, *11*, 282.