

CROMATOGRAFIA GASOSA BIDIMENSIONAL ABRANGENTE (GC × GC)

Marcio Pozzobon Pedroso, Luiz Antonio Fonseca de Godoy, Carlos Henrique de Vasconcellos Fidélis, Ernesto Correa Ferreira, Ronei Jesus Poppi e Fabio Augusto*

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

Recebido em 23/11/07; aceito em 30/7/08; publicado na web em 18/12/08

COMPREHENSIVE TWO-DIMENSIONAL GAS CHROMATOGRAPHY (GC × GC). This paper presents the fundamental principles, instrumentation and selected applications of comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC × GC). In this technique, introduced in 1991, two capillary columns are coupled and proper modulating interfaces continuously collect the eluate from the first column, transferring it to the second column. The result is a geometric increment in the chromatographic resolution, ensuring separation of extremely complex mixtures in time periods shorter or comparable to those of analysis using conventional gas chromatography and with better detectabilities and sensitivities.

Keywords: comprehensive two-dimensional gas chromatography; instrumentation; multidimensional chromatographic techniques.

INTRODUÇÃO

O objetivo geral de novas tecnologias para cromatografia gasosa (GC, *Gas Chromatography*) é viabilizar a separação, identificação e quantificação rápidas do maior número de constituintes em misturas complexas, usando equipamentos simples e robustos. Essas metas têm sido atingidas através de aperfeiçoamentos nos diversos módulos dos sistemas cromatográficos. Por exemplo, colunas cromatográficas capilares de diâmetros muito pequenos – e, portanto, de alta eficiência – permitem um grande aumento na capacidade de resolução.¹ O uso dessas colunas combinadas com vazões elevadas de gás de arraste, rampas de aquecimento de forno de coluna de dezenas a centenas de graus por minuto e sistemas digitais de controle e aquisição de dados viabilizou a chamada cromatografia gasosa rápida (*Fast GC*, *Fast Gas Chromatography*), onde tempos de corrida da ordem de dezenas de milissegundos já foram reportados.² Outra alternativa para o aumento da capacidade aparente de separação é o uso de detectores espectroscópicos, que podem proporcionar grande seletividade e detectabilidade, como a detecção por emissão atômica, espectrometria de massas (MS, *Mass Spectrometry*) ou espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier.³

Entretanto, muitos desses recursos já atingiram seus limites máximos de desempenho e aperfeiçoamento; p.ex., colunas com diâmetros muito inferiores aos menores atualmente disponíveis (50 a 100 µm) seriam inviáveis para aplicações rotineiras.⁴ Assim, a princípio, a existência de sistemas cromatográficos com eficiência e sensibilidade muito superiores às atuais demandaria, necessariamente, novos paradigmas nas pesquisas em GC. Porém, uma das vertentes mais promissoras para esses desenvolvimentos se baseia em um conceito já há muito conhecido: o de separação multidimensional, no qual a amostra é submetida seqüencialmente a diferentes processos de eluição. Separações bidimensionais são muito usadas em cromatografia planar:⁵ a amostra é aplicada no canto de uma cromatoplaça quadrada e eluída; em seguida, a cromatoplaça é seca, girada em um ângulo de 90° e eluída novamente com uma segunda fase móvel diferente da usada na primeira eluição. Também são disponíveis diversos modos de separação bidimensional para cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, *High Performance*

Liquid Chromatography), sendo a segunda eluição feita em outra coluna de HPLC⁶ ou mesmo com outras técnicas, como eletroforese capilar⁷ ou GC.⁸ Em qualquer caso, espécies coeluídas na primeira etapa podem ser separadas na segunda eluição, especialmente se os mecanismos de separação das etapas forem diferentes – i.e., se eles forem ortogonais.⁹

A operacionalização de separações bidimensionais em GC é muito mais complexa, já que coleta de frações do eluato de uma coluna capilar e transferência para segunda coluna sem perdas, contaminação ou alargamento excessivo da banda cromatográfica não são triviais. A primeira tentativa de implementação foi o “cromatógrafo a gás de dois estágios” de Simmons e Snyder:¹⁰ frações selecionadas do eluato de uma coluna, contendo analitos não separados, eram desviadas para uma segunda coluna instalada no mesmo forno através de um sistema complexo de válvulas. Em 1968, quando surgiu um dispositivo pneumático mais conveniente para a transferência de frações – o “Inversor de Deans” (*Deans Switching*)¹¹ – a chamada cromatografia gasosa bidimensional de frações parciais (GC – GC, *Heartcut Two-dimensional Gas Chromatography*) começou a ser aplicada mais intensivamente, sendo ainda hoje eventualmente usada para amostras complexas.¹²

Em 1991, Liu e Phillips¹³ descreveram um novo sistema bidimensional consistindo de duas colunas capilares conectadas em série: a primeira coluna (ou a primeira dimensão, ¹D) de polietilenoglicol com dimensões de 21 m com 0,25 mm de diâmetro interno e a segunda coluna (ou segunda dimensão, ²D) curta e fina (1 m × 0,1 mm) de metilsilicone. Um pedaço de 15 cm do início da segunda coluna, recoberto com um filme de ouro, era mantido fora do forno do cromatógrafo (Figura 1). O setor metalizado da ²D – denominado modulador – era conectado a uma fonte de 40 V CC. A conexão da fonte ao modulador era feita por três terminais, formando dois circuitos separados (S1 e S2 na Figura 1) acionáveis individualmente através de chaves eletrônicas microprocessadas. A função do modulador era coletar continuamente frações do eluato da ¹D, reconcentrá-las e transferí-las para a ²D. Inicialmente, com o circuito S1 não energizado e o circuito S2 energizado, a seção inicial do modulador (Figura 2) fica a temperatura ambiente e assim retém eluato vindo da ¹D (a). Durante certo intervalo de tempo, todo material eluído da ¹D é sorvido pelo filme de fase estacionária na seção inicial (b). Em seguida, o circuito S1 é acionado e o circuito S2 desligado,

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

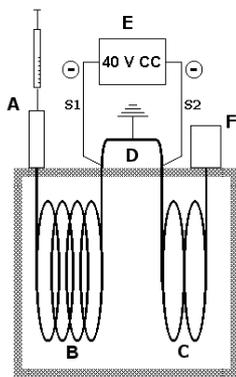


Figura 1. Diagrama do sistema de cromatografia gasosa bidimensional abrangente de Liu e Phillips: A – injetor; B – coluna da 1ª dimensão (21 m × 0,25 mm); C – coluna da 2ª dimensão (1 m × 0,1 mm); D – modulador; E – fonte de corrente contínua e F – detector por ionização em chama

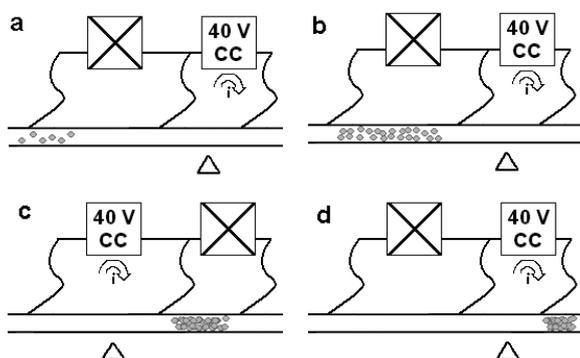


Figura 2. Ciclo de funcionamento do modulador térmico de Liu e Phillips

aquecendo rapidamente a seção inicial do modulador pela passagem de corrente elétrica através do filme metálico. Assim, os analitos que estavam retidos são dessorvidos termicamente e eluem para a seção final do modulador (agora à temperatura ambiente), sendo recoletados na forma de uma banda estreita (c). Dada a baixa capacidade térmica das paredes da coluna cromatográfica, assim que cessada a corrente elétrica cada seção do modulador retorna rapidamente à temperatura ambiente. Após outro intervalo de tempo, o circuito S2 é ligado e o circuito S1 desligado (d), e o sistema retorna ao estado inicial (a). A fração reconcentrada na seção final elui pela 2ªD, onde é separada, enquanto uma nova fração do eluato da 1ªD começa a ser sorvida na seção inicial do modulador. O conjunto dessas operações de coleta, reconcentração e transferência de frações é denominado modulação; ela é repetida continuamente a partir da injeção da amostra, sendo o eluato da 1ªD completamente fracionado e transferido para a 2ªD. Esta técnica foi chamada de cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC × GC, *Comprehensive Two-dimensional Gas Chromatography*). Na GC × GC é fundamental o uso de uma 2ªD curta e eficiente: misturas simples (como as frações coletadas e transferidas) podem ser separadas em alguns segundos, possibilitando ciclos de modulação rápidos e fracionamento completo da amostra eluída, sem aumento significativo do tempo total de análise em relação a uma separação por 1D GC.

A grande vantagem da GC × GC frente à GC – GC ou a 1D GC é a grande capacidade de pico da técnica,¹⁴ ou seja, o número máximo de compostos que podem ser separados em uma mesma análise. Considerando que a capacidade de pico de uma coluna é o número máximo de picos separáveis por ela, pode-se assumir que a capacidade de pico da 1ªD é n_1 picos, enquanto que a da 2ªD é n_2 picos. Assim, pode-se dizer

que a capacidade de picos da GC × GC será $n_1 \times n_2$ picos, visto que toda a amostra é submetida à separação em ambas as colunas. Comparativamente, a capacidade de pico da GC – GC será $n_1 + n_2$, uma vez que apenas uma fração da amostra é submetida à separação na 2ªD. Outra diferença da GC × GC frente à 1D GC é a forma de representação gráfica dos cromatogramas. O registro do sinal do detector em função do tempo em um sistema GC × GC é uma seqüência contínua e encadeada dos cromatogramas curtos para cada fração eluída na 2ªD. A partir desse registro digitalizado, e conhecido o período de modulação (intervalo de tempo para cada ciclo de modulação) pode-se construir gráficos tridimensionais sinal do detector × tempo de retenção na 1ª coluna (t_{R1}) × tempo de retenção na 2ª coluna (t_{R2}). Na Figura 3 uma banda cromatográfica larga, consistindo de três analitos não separados na 1ªD, (A) é fracionada e eluída na 2ªD, gerando um cromatograma bruto (B). Cada um dos cromatogramas individuais das frações pode ser destacado do cromatograma bruto (C) e a partir deles pode-se gerar gráficos sinal × $t_{R1} \times t_{R2}$ como diagrama tridimensional (3D Plot, D), como uma série de curvas de nível monocromáticas chamadas de diagrama de contorno (Contour Plot, E) ou usando escalas cromáticas de intensidade de sinal, o diagrama de cores (Colour Plot, F). Outro aspecto fundamental de GC × GC também pode ser destacado nessa figura. A compressão das bandas cromatográficas decorrente da modulação ocasiona um aumento significativo da detectabilidade: ao invés de eluir como um pico largo e pouco intenso, cada analito elui como uma série de picos estreitos e intensos (altas relações sinal/ruído), sendo facilmente detectados.

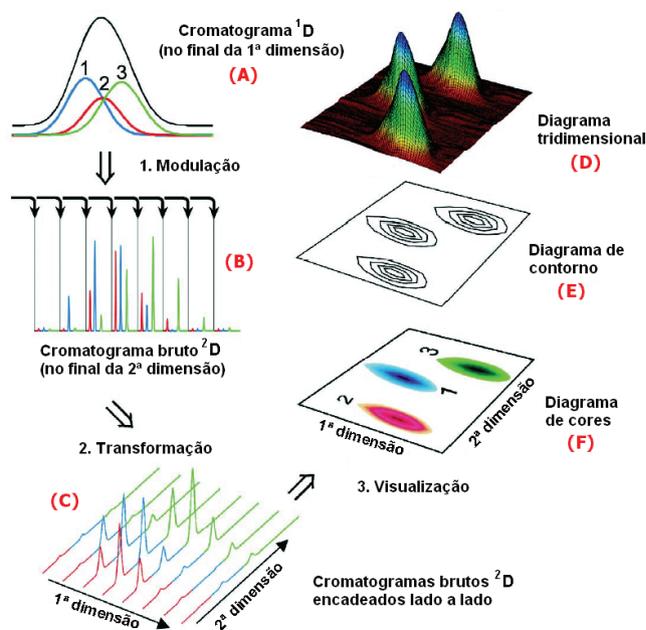


Figura 3. Construção de diagramas tridimensionais sinal × t_{R1} × t_{R2} em GC × GC. Adaptado da ref. 18

Na Figura 4a é mostrada uma parte de um cromatograma de amostra de gasolina obtido por um sistema 1D GC com detecção por ionização em chama (FID, *Flame Ionization Detection*), enquanto que na Figura 4b é mostrado, na mesma escala de tempo, a representação em diagrama de cores (escala de cinza) da mesma amostra obtido em um sistema GC × GC-FID. Essa comparação é especialmente ilustrativa da potencialidade e poder de separação da GC × GC. Nessa região do cromatograma de 1D GC alguns picos com sinal intenso se sobrepõem em relação a diversos picos com baixa relação sinal/ruído que coeluem, sendo que é difícil definir o que é ruído e o que é sinal. Em contrapartida, no sistema GC × GC, na mesma faixa de tempo de corrida, diversas manchas de analitos aparecem resolvidas ou grupos

de eluatos quimicamente correlacionados são visíveis na forma de diagonais. obtém-se um quadro muito mais claro da composição e diversidade da amostra, embora ainda existam coeluições devido à grande complexidade da amostra.

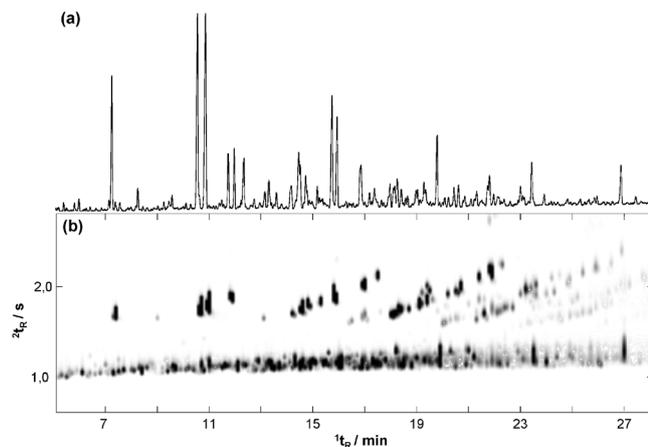


Figura 4. Seções de cromatogramas de gasolina: (a) GC-FID e (b) GC × GC-FID com modulador criogênico. Colunas: GC-FID: metilsilicone (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm); GC × GC-FID: metilsilicone (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) + polietilenoglicol (1,0 m × 0,1 mm × 0,1 μm)

Os resultados das primeiras aplicações de GC × GC reportadas foram bastante impressionantes. Liu *et al.*¹⁵ separaram completamente, usando o sistema descrito acima, 17 pesticidas, dois padrões internos e impurezas co-extraídas de soro humano por extração com fluido supercrítico com apenas 4,5 min de corrida. Entretanto, até o final da década de 90 o uso desta técnica foi restrito. O modulador em questão apresentou inconvenientes, como baixa durabilidade e dificuldade de confecção.¹⁶ Só no final daquela década, quando moduladores mais convenientes e confiáveis, assim como detectores rápidos e microcomputadores com maiores capacidades de memória e velocidades de processamento se tornaram disponíveis, é que a GC × GC começou realmente a se popularizar. Um levantamento na base de dados do ISI (*Web of Science*) mostrou que entre 1991 e 2000 apareceram menos de 10 artigos anuais sobre GC × GC; a partir desse ano o número de publicações aumentou bastante, chegando a cerca de 60 publicações anuais entre 2003-2007. No Brasil, a técnica vem recebendo a atenção dos pesquisadores e já existe nomenclatura em português para os termos específicos da GC × GC,¹⁷ os quais serão adotados nessa revisão.

INSTRUMENTAÇÃO PARA GC × GC

Os sistemas GC × GC consistem em cromatógrafos a gás comerciais convencionais modificados, com uso de duas colunas capilares conectadas em série, com adaptação de um modulador e, em alguns casos, de um forno secundário (situados dentro do forno do cromatógrafo, porém com controle independente de temperatura). Reservatórios e/ou dutos para abastecimento do fluido criogênico tornam-se necessários (para o caso de sistemas criogênicos). O controle de válvulas que liberam o fluido criogênico ou de outros sistemas mecânicos, a transformação do sinal adquirido em diagramas tridimensionais e obtenção de valores como tempo de retenção, área ou volume de pico e outros parâmetros cromatográficos normalmente não é feita com softwares convencionais. A complexidade final do sistema GC × GC e do software empregado depende do tipo de detector empregado, sendo que detecção por MS torna o sistema mais complexo que com outros detectores.

O conjunto de colunas típico para GC × GC é constituído de uma coluna capilar convencional – com até 30 m de comprimento e diâmetro internos de 0,25 a 0,32 mm – conectada por conectores de baixo volume a um pedaço curto (≤ 2 m) de uma coluna fina, do tipo empregado para Fast GC ($d_c \leq 0,1$ mm). A segunda coluna deve ser curta o suficiente para que o material coletado e posteriormente reinjetado seja completamente eluído antes que a próxima fração seja nela introduzida. Quanto às fases estacionárias das colunas, é altamente desejável (mas não imprescindível) que os mecanismos de separação sejam ortogonais, ou seja, que o mecanismo de separação da ¹D seja independente e diferente do mecanismo da ²D. Uma combinação comum consiste em uma ¹D apolar ou pouco polar (polidimetilsiloxano ou 5% fenil-polidimetilsiloxano), e uma ²D mais seletiva (polar), como polietilenoglicol ou 50% fenil-polidimetilsiloxano.¹⁸ Sendo não-seletiva, a separação na ¹D será governada pelas pressões de vapor dos analitos, e cada fração coletada pelo modulador conterá espécies com pontos de ebulição próximos. Se a fase estacionária da ²D for seletiva, esses analitos de volatilidade próxima, contidos em cada fração, serão diferentemente retidos, dependendo do tipo e magnitude das interações específicas entre eles e a fase estacionária seletiva. A escolha do conjunto de colunas é dependente dos compostos presentes na amostra analisada e, por isso, o conjunto de colunas ideal deve ser investigado previamente.

O modulador é o componente fundamental em GC × GC: ele deve coletar continuamente pequenas frações do eluato da ¹D, reconcentrá-las em uma banda estreita e reinjetá-las na ²D. Embora existam moduladores comercialmente disponíveis, alguns usuários de GC × GC ainda confeccionam seus próprios moduladores e programas computacionais para controlá-los.¹⁹⁻²¹

Os moduladores podem ser classificados em três tipos, de acordo com seu princípio operacional. O primeiro engloba dispositivos baseados em válvulas diversoras de comando eletrônico ou pneumático instaladas entre as colunas, que coletam frações do efuente da ¹D e as transferem para a ²D.¹⁹ Esses moduladores apresentam como grande inconveniente o fato de não haver reconcentração das frações. A segunda forma de realizar a modulação consiste na captura do eluato da ¹D em uma armadilha contendo um sorvente adequado, seguida de dessorção térmica para a ²D. O modulador original de Liu e Phillips, descrito anteriormente, enquadra-se nesse grupo: a armadilha é a seção metalizada da ²D e o sorvente é o filme de fase estacionária desta seção da coluna. O modulador térmico de varredura (*thermal sweeper modulator*) - um aperfeiçoamento desse conceito - foi o primeiro modulador para GC × GC disponível comercialmente. Ele consiste em um capilar de sílica com um filme interno espesso de fase estacionária, conectado entre as duas colunas. O movimento rotatório de um aquecedor dessorve e arrasta continuamente os analitos ao longo do capilar, até a introdução dos mesmos na ²D. Esse modulador respondeu por aplicações reportadas em GC × GC até o final da última década,¹⁶ sendo progressivamente substituído por outros tipos de moduladores. Uma de suas desvantagens é a limitação quanto ao uso de temperaturas altas.

Os dispositivos baseados em válvulas ou interfaces sorventes têm sido preteridos em favor de uma terceira forma de modulação, que é realizada através de moduladores criogênicos, que são mais simples e robustos. Nestes moduladores, a coleta e reconcentração de frações do eluato da ¹D são feitas por armadilhas criogênicas. A Figura 5 mostra os diagramas alguns moduladores criogênicos já comercializados. Um dos primeiros moduladores criogênicos foi o sistema criogênico longitudinalmente modulado (LMCS, *Longitudinally Modulating Cryogenic System*) (Figura 5A),²² na qual o resfriamento é feito de forma indireta. Ele consiste em uma camisa de refrigeração em aço, resfriada internamente pela passagem de CO₂ líquido, que se move sobre um trilho instalado no forno do cromatógrafo. Essa camisa de

refrigeração envolve o início da 2D e atua como armadilha criogênica. Inicialmente, a camisa é posicionada na extremidade inferior do trilho, resfriando um setor inicial da 2D . Em seguida, a camisa é movida rapidamente para cima; o setor da coluna antes resfriado é aquecido pelo ar quente no forno do cromatógrafo e o material coletado elui, sendo reconcentrado na seção posterior da 2D , agora resfriada pela camisa móvel reposicionada. À medida que a camisa retorna à posição inicial na parte inferior do trilho, o material reconcentrado começa a eluir e uma nova fração, proveniente da 1D , será coletada, completando o ciclo de modulação. O LMCS consiste em um avanço relativamente às alternativas antes disponíveis, entretanto ainda apresenta alguns inconvenientes, principalmente para analitos extremamente voláteis, uma vez que o resfriamento (indireto) por CO_2 líquido não é suficiente para que estas sejam retidas.

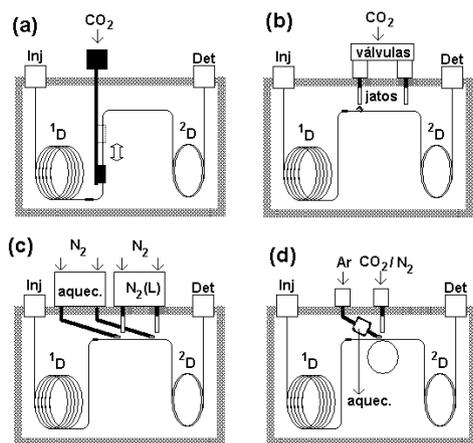


Figura 5. Diagramas de moduladores criogênicos. Adaptado da ref. 21: (a) LMCS, (b) modulador criogênico de duplo jato, (c) modulador com dois jatos quentes e dois jatos frios, (d) modulador com um jato quente e um jato frio. Inj.=Injetor, Det.=Detector, aquec.=aquecimento

Moduladores criogênicos baseados em jatos frios estão sendo cada vez mais empregados. Nestes moduladores, o resfriamento é feito através de jatos de CO_2 ou de N_2 líquidos diretamente lançados sobre a coluna. Válvulas instaladas fora do forno são abertas e fechadas sincronizadamente, criando ciclos de modulação através do resfriamento alternado de seções da 2D . As principais vantagens destes moduladores em comparação com o LMCS são sua robustez (eles não têm partes móveis) e a alta eficiência de resfriamento. Dentre os moduladores criogênicos de jatos destacam-se o de duplo jato frio (*dual jet*, Figura 5B),²³ que utiliza CO_2 como fluido criogênico, o de duplo jato frio e duplo jato quente (*quad jet*, Figura 5C)²⁴ e o com um jato frio e um quente (*loop modulator*, Figura 5D).²⁵ O fluido criogênico desses dois últimos moduladores é o nitrogênio líquido, resultando na coleta efetiva até mesmo para analitos altamente voláteis.¹⁸

O processo de modulação faz com que as bandas cromatográficas em sistemas GC x GC sejam 10 a 50 vezes mais estreitas que em 1D GC, resultando em picos modulados com largura de base (w_b) entre 50 a 500 ms, exigindo detectores com resposta rápida e com pequenos volumes internos.²⁶ Além de compatibilidade com bandas cromatográficas estreitas, os sistemas eletrônicos e de processamento de dados associados à detecção também devem possibilitar taxas de coleta (número de leituras do sinal digitalizado do detector por segundo) compatíveis: 100 Hz ou mais, o que implica em arquivos de dados extremamente extensos.

Entre os detectores cromatográficos mais populares, o FID é o que melhor se ajusta aos requisitos acima: os FID modernos têm volumes internos desprezíveis e possibilitam taxas de coleta de até 200 Hz;²⁶

assim, seu uso tem sido muito difundido em GC x GC. O uso de detectores por captura de elétrons (ECD, *Electron Capture Detector*) exige otimização mais cuidadosa de parâmetros operacionais, já que os volumes internos comparativamente grandes dos ECD (150 μL ou mais) tendem a resultar em respostas mais lentas e maior dispersão das bandas cromatográficas.²⁷ Já a detecção por MS, que está plenamente sedimentada para 1D GC, tem sido bastante discutida visto que seu uso para GC x GC não é trivial.²⁸ Em primeiro lugar, deve-se considerar que os diagramas gerados são na verdade estruturas de dados em quatro dimensões – $Sinal \times (m/z) \times t_R \times t_R$ (m/z = relação massa/carga do fragmento iônico). Espectrômetros de massas com analisadores quadrupolares (qMS) apresentam taxa de aquisição de pouco mais que dois espectros de massas por segundo, sendo lentos para as bandas cromatográficas estreitas de GC x GC.²⁹ Contudo, é possível diminuir a faixa de massas investigada ou monitorar apenas alguns íons durante a corrida, resultando assim em uma maior taxa de aquisição. Adachhour *et al.*³⁰ relataram a interdependência entre taxa de coleta do sinal, faixa de massas investigada e 2w_b , de forma que taxa de aquisição de até 50 Hz pode ser obtida desde que a faixa de massas seja reduzida para 95 u.m.a. e que 2w_b seja maior que 140 ms, o que determina, pelo menos, sete pontos por pico. Com o intervalo de m/z entre 40-240 a taxa de aquisição cai para 20 Hz, a qual permite a coleta de, no mínimo, quatro espectros de massas por pico, o que pode ser considerado suficiente para a identificação de diversos compostos.³¹ Cabe ressaltar que os espectros de massas obtidos por GC x GC-qMS são mais “limpos” que aqueles obtidos por GC-qMS, porque a separação na 2D permite resolver o analito de outros interferentes e, também, devido à diminuição do ruído. Por outro lado, a espectrometria de massas por tempo de voo (TOFMS, *Time of Flight Mass Spectrometry*) permite a coleta de até 500 espectros de massas por segundo¹⁸ e, portanto, mostra-se superior aos qMS em análises qualitativas e quantitativas.³⁰ Além disso, dado o elevado número de espectros de massas por pico, torna-se possível a deconvolução espectral de picos que coeluem na 1D e na 2D , o que aumenta a capacidade de separação. Para isso, algoritmos para reconhecimento de picos, deconvolução espectral e comparação com a biblioteca de espectros de massas necessitam ser empregados no processamento e interpretação dos diagramas tridimensionais obtidos, o que torna a análise complexa e demorada.³² Devido às características de cada detector, a TOFMS parece ser a detecção ideal para GC x GC e, embora o seu custo seja proibitivo para muitos usuários, diversos trabalhos empregando TOFMS têm sido relatados.

PROCESSAMENTO DE DADOS DE GC x GC

Da mesma forma que em 1D GC, os diagramas tridimensionais obtidos em GC x GC contêm informações qualitativas e quantitativas sobre a composição da amostra cromatografada. Entretanto, a forma de obtenção dos resultados a partir desses diagramas é bastante diferente daquela empregada convencionalmente. Para realizar a identificação de um analito através de 1D GC ou de GC x GC é desejável, mas não imprescindível, que este esteja resolvido dos demais compostos presentes na amostra. O cálculo de resolução para 1D GC é feito, conforme a Equação 1, levando em consideração os picos “vizinhos” ao analito, sendo possível apenas um pico antes e outro após a eluição do analito. Entretanto, em GC x GC mais de um pico pode ser considerado vizinho do analito e, portanto, o conceito de resolução deve ser redefinido. Duas formas de calcular a resolução para GC x GC foram encontradas em artigos recentemente, embora não se possa afirmar qual delas é a mais adequada. Adam *et al.*³³ calcularam a resolução para GC x GC através da média euclidiana da resolução em cada uma das dimensões ($R_{s,x}$ e $R_{s,y}$), mostrada nas Equações 2 e 3.

$$R_s(A,B) = \left(\frac{2\delta_{rr}}{\omega_A + \omega_B} \right) \quad (1)$$

$$R_{s,x}(A,B) = \left(\frac{2\delta_{r,x}}{\omega_{A,x} + \omega_{B,x}} \right) \quad (2)$$

$$R_{s,y}(A,B) = \left(\frac{2\delta_{r,y}}{\omega_{A,y} + \omega_{B,y}} \right) \quad (3)$$

sendo que $\delta_{r,x}$ e $\delta_{r,y}$ são as diferenças entre os tempos de retenção dos compostos A e B nos eixos x e y, respectivamente; $\omega_{A,x}$ e $\omega_{B,x}$ são as larguras de pico para A e B na 1D, assumindo que elas são iguais ao produto entre o número de modulações para um mesmo pico e período de modulação; $\omega_{A,y}$ e $\omega_{B,y}$ são as larguras para o pico modulado mais intenso dos compostos A e B. A outra forma de calcular R_s é baseada no conceito razão “vale-pico”.³⁴ Na teoria da razão “vale-pico” uma reta é traçada entre os máximos dos picos dos dois compostos, sendo identificado o ponto de menor intensidade sobre a reta. Para o cálculo da resolução emprega-se a distância entre os máximos dos dois picos e o ponto de menor intensidade e, também, os valores de intensidade nesses três pontos. Os valores de resolução obtidos dessa forma podem ser aplicados tanto a separações em uma ou em duas dimensões. Peters *et al.*³⁵ mostraram que a resolução calculada através da razão “vale-pico” é válida apenas para picos (ou manchas no caso de GC x GC) gaussianos, porém, com pequenas modificações na forma de calcular a razão “vale-pico”, pode-se calcular a resolução para picos não gaussianos. Além disso, os autores definiram um novo conceito de “vizinhança” para GC x GC, visto que um composto pode ter mais que apenas dois “vizinhos”.

Outra modificação necessária para GC x GC refere-se ao uso de índices de retenção de Kováts³⁶ ou suas variantes (*e.g.*, índices de Kratz – van den Dool³⁷ em separações usando programação linear de temperatura) para identificação de analitos. Em 1D GC esses índices são bem estabelecidos, porém, em GC x GC a retenção é caracterizada por dois valores independentes – 1t_R e 2t_R – e, em decorrência disso, ainda encontra-se em estudo um sistema similar de índices de retenção que seja universalmente aceito.¹⁸ Western e Marriott³⁸ propuseram um novo conceito exclusivo para GC x GC, os chamados mapas de retenção, que possibilitam os cálculos dos índices de retenção na 2D. Bieri e Marriott³⁹ desenvolveram mapas de retenção múltiplos, empregando um sistema GC x GC no qual o eluato da 1D foi transferido para duas diferentes 2D, através de um divisor em forma de “y”. Desta forma, foi possível obter índices de retenção para a 1D e dois diferentes índices de retenção para a 2D. Posteriormente, os mesmos autores⁴⁰ utilizaram dois injetores, dois detectores e outras pequenas modificações no sistema para obter de forma mais correta os valores de índices de retenção para 1D e 2D, eliminando erros de até 20 unidades nos índices de retenção de 1D observados por outros autores.³¹

A Figura 6 mostra um diagrama de contorno para séries homólogas de alcanos, resultando no mapa de retenção para ambas as dimensões. A linha mais escura representa a injeção líquida de alcanos entre C_{10} - C_{23} , para calcular os índices de retenção na 1D. Para calcular os índices de retenção na 2D é necessário construir curvas de isovolatilidade para alguns alcanos. Para construção de tais curvas, séries de alcanos são injetadas em intervalos de tempo definidos, preferencialmente por microextração em fase sólida. A união entre os pontos referentes a cada alcano resulta na curva de isovolatilidade, como representado pelas linhas mais finas na Figura 6, definindo o 2t_R do alcano para cada ciclo de modulação. Como diversas curvas são geradas no espaço de separação, é possível calcular, por interpolação entre duas curvas, o índice de retenção na 2D de um composto

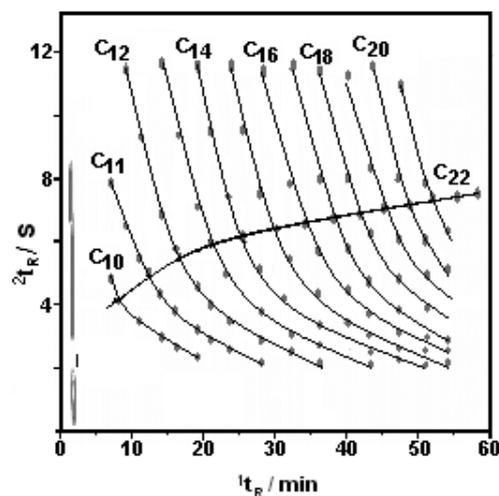


Figura 6. Mapa de retenção para 1D e 2D. Adaptado da ref. 39. Linha espessa mostra mapa para 1D obtido com injeção de série homóloga de alcanos (C_{10} - C_{23}) em $t = 0$ min. Linhas finas obtidas com múltiplas injeções por SPME de série homóloga de alcanos (diferente composição em cada injeção), formando as curvas de isovolatilidade para cada alcano, permitem calcular os índices de retenção na 2D

desconhecido. Mesmo que bem fundamentada sob o aspecto teórico e com algumas limitações práticas, esta sistemática ainda não foi suficientemente testada para que sejam averiguadas suas potencialidades e limitações. Para obtenção de valores corretos dos índices de retenção em ambas as dimensões, deve-se verificar se o pico não está fora de ciclo. Isso é facilmente observado quando a mesma amostra é analisada com o período de modulação diferente do anterior. Ao comparar os dois diagramas tridimensionais, picos que tiveram o 2t_R alterado são considerados fora de ciclo, sendo que o 2t_R correto pode ser obtido através de cálculos simples ou uso de algoritmos.⁴¹

Em adição aos dados de retenção, os diagramas de GC x GC têm uma característica única e poderosa sob o aspecto qualitativo, ausente na 1D GC: a estrutura cromatográfica. Picos de substâncias relacionadas estruturalmente – séries homólogas, isômeros de cadeia ou de posição – aparecem agrupados em regiões claramente definidas do diagrama GC x GC. No diagrama de cores da Figura 4 os picos dos hidrocarbonetos com mesmo número de átomos de carbono agrupam-se sobre a superfície $^1t_R \times ^2t_R$, correspondentes a eluatos com estruturas similares. Os hidrocarbonetos com mais e menos átomos de carbono agrupam-se da mesma forma no diagrama de cores, resultando no “efeito telhado”.¹⁷ Dada a enorme capacidade de resolução de GC x GC, o número de picos detectáveis tende a ser muito maior que em 1D GC e a presença de estruturação pode ser de grande valia na identificação dos analitos separados. A estrutura gerada por GC x GC já havia sido prevista teoricamente,⁹ sendo perceptível apenas em amostras ricas em isômeros ou espécies de outra forma relacionadas entre si. Para que essa estruturação apareça em regiões bem definidas dos diagramas é necessária ortogonalidade entre as colunas usadas.

Da mesma forma que em 1D GC, a identificação confiável de picos em GC x GC demandaria combinação de dados de retenção (como os discutidos acima) e de MS. Entretanto, como discutido anteriormente, a quantidade de informação nos diagramas gerados por esses sistemas requer estratégias diferenciadas para sua avaliação, sendo absolutamente imprescindível a adoção de rotinas computacionais com alto grau de automação. O uso de algumas ferramentas quimiométricas, que é a abordagem ideal para o volume de dados gerados, será discutido posteriormente. Dallüge *et al.*⁴² detalharam algumas abordagens possíveis. Se as espécies de interesse para o problema em questão – *i.e.*, os

analitos-alvo – já são conhecidos (por exemplo, detecção e identificação de um fármaco, seus metabólitos e contaminantes na urina de pacientes sendo tratados com medicamentos conhecidos), o processamento é relativamente simples e rápido. Neste caso, os tempos de retenção aproximados nas duas dimensões e espectros de massas de referência dos analitos-alvo seriam determinados preliminarmente, com uso de padrões. Para as amostras, seriam inspecionados e comparados com espectros de referência apenas os espectros correspondentes a picos pré-detectados com retenção próxima à de analitos-alvo. Outro caso seria a varredura (*screening*) de amostras pouco conhecidas ou onde não existir possibilidade de definição prévia de analitos-alvo. Para essas análises, deve-se objetivar a identificação do maior número de picos possível dentre todos aqueles pré-detectados. Pela complexidade e pelo grande número de picos nos diagramas tridimensionais, essa tarefa demanda muitas horas de processamento, mesmo em microcomputadores poderosos. De forma semelhante ao que ocorre em GC/MS, é conveniente que os resultados de algoritmos de identificação sejam, tanto quanto possível, confirmados e, eventualmente, refinados por inspeção manual. Vale lembrar que a estrutura cromatográfica facilita a análise qualitativa: a identificação de um ou mais picos de um grupo pode fornecer informações sobre a estrutura das demais espécies do grupo.

A quantificação em GC × GC depende da medida da área dos picos detectados ou, mais corretamente, do seu volume, já que aqui eles são definidos em três dimensões (sinal × t_{R1} × t_{R2}). A forma mais fácil de integração de picos de GC × GC é pela soma das áreas dos picos modulados usados para construir o diagrama tridimensional: algoritmos apropriados detectam os pontos de início e fim dos picos e somam os sinais entre os dois pontos, descontando a área sob a linha de base. Embora essa tarefa possa ser feita pelos algoritmos usuais de processamento de dados adaptados, existem softwares específicos para integração de picos de GC × GC⁴³ e algumas ferramentas quimiométricas também podem substituir a integração convencional. Qualquer que seja a forma de medida dos volumes dos picos, a exatidão e precisão de GC × GC é equivalente à de 1D GC. Beens *et al.*²⁶ compararam a quantificação de misturas de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos por GC × GC-FID e por GC-FID. As concentrações obtidas por ambas técnicas foram equivalentes e a repetibilidade dos resultados (expressa como estimativa dos desvios-padrão relativos) variou de 0,24 a 2,33% - mesma ordem de grandeza de 1D GC. Quanto à detectabilidade, ela é incrementada em GC × GC: a compressão das bandas cromatográficas na modulação gera picos mais altos, melhorando as razões sinal/ruído. Isso foi demonstrado por de Geus *et al.*,⁴⁴ que mediram um aumento de 50 vezes na altura de um pico de n-dodecano em GC × GC sem alterações em sua área, quando comparada à eluição em 1D GC. Lee *et al.*⁴⁵ demonstraram que com períodos de modulação curtos o incremento na altura é maior; porém, a melhoria nas razões sinal/ruído nunca é numericamente igual ao aumento na altura dos picos. Para registrar picos estreitos, o sinal do detector deve ser coletado com maior frequência, o que aumenta o nível de ruído registrado. Ainda assim, a detectabilidade típica em GC × GC-FID foi 4 a 5 vezes melhor que a de GC-FID.

A quantificação por GC × GC-qMS tem sido investigada devido ao limitado número de pontos necessários para definir um pico. Cordero *et al.*⁴⁶ compararam o número de pontos por pico obtidos através da varredura entre os valores de m/z 40-240 e pelo modo de monitoramento de íons selecionados (SIM - *Selected Ion Monitoring*). Em média, 14 pontos por pico foram obtidos para os dois modos de aquisição e, mesmo que exista divergência quanto ao número mínimo de pontos por pico para quantificação, esse valor foi considerado pequeno. Assim, para a quantificação dos compostos o detector qMS foi preterido em relação ao FID, devido ao maior número de pontos por pico, maior robustez e faixa linear. Debonneville e Chaintreau⁴⁷ empregaram o modo SIM com taxa de aquisição de 30,7 Hz, o que

resultou na aquisição de 28 pontos para um pico de limoneno, sendo observados três picos modulados. O desvio padrão relativo para os valores de área de cada um dos picos modulados (cinco replicatas) variou entre 16 e 169%, enquanto que o desvio padrão relativo da soma das áreas dos três picos modulados foi de cerca de 4%, valor aceitável para fins quantitativos. Contudo, os valores obtidos na quantificação de alergênicos adicionados à matriz apresentaram diferença de até 50% em relação ao valor esperado, enquanto que para o detector FID a diferença foi menor que 8%.

Quimiometria e GC × GC

Os diagramas obtidos a partir de GC × GC contêm um volume de informação muito maior que os cromatogramas de 1D GC. Por exemplo, em uma seção de menos de 45 min de um diagrama GC × GC de fumaça de cigarro²⁹ foram visíveis mais de 30.000 picos. A interpretação humana dos cromatogramas sem o uso de ferramentas quimiométricas é extremamente difícil, devido à sua alta complexidade. Além disso, o aumento de informações obtidas com a GC × GC, em relação à 1D GC, somente é benéfica se os resultados puderem ser rapidamente compilados e interpretados pelo usuário em um tempo razoável.⁴⁸

Cada amostra analisada através da GC × GC fornece uma matriz de dados. Na análise quimiométrica, as matrizes obtidas para as amostras analisadas são sobrepostas formando um cubo de dados, sendo classificadas como dados do tipo multi-modos (*multi-way*). Para a maior parte das ferramentas quimiométricas é desejável que os cromatogramas obtidos a partir de GC × GC apresentem uma estrutura bilinear. A bilinearidade é alcançada quando o pico observado experimentalmente pode ser descrito como o produto de seu perfil cromatográfico na 1D e na 2D . Ou seja, quando o tempo de retenção, a forma do pico e a largura de base de um componente são reprodutíveis, principalmente na 2D .⁴⁹

Uma técnica multivariada utilizada no processamento de dados de GC × GC é o método generalizado de aniquilação de posto (GRAM, *Generalised Rank Annihilation Method*), que utiliza a estrutura bilinear dos dados de uma amostra e de um padrão de calibração para resolver e quantificar o sinal de interesse, mesmo quando este não se apresenta resolvido. Além disso, permite filtrar ruídos e apresenta a vantagem de segunda ordem, ou seja, a amostra de previsão pode apresentar interferentes não calibrados.⁵⁰ Um estudo comparativo entre o algoritmo GRAM e o método de integração convencional para dados de GC × GC mostrou que GRAM foi mais exato, preciso e rápido. Xie *et al.*⁵¹ realizaram a análise dos dados obtidos por GC × GC para amostras contendo os ésteres metílicos dos ácidos graxos oléico e linoleico, que apresentaram sinais cromatográficos parcialmente sobrepostos. Utilizando GRAM os autores fizeram a quantificação dos dois compostos em amostras preparadas em laboratório com erros de previsão médios de 7 a 11% para o éster metílico do ácido oléico e de 3 a 7% para o éster metílico do ácido linoleico. Como o algoritmo GRAM utiliza a bilinearidade do conjunto de dados multidimensionais, ele foi utilizado para verificar a reprodutibilidade de dados obtidos em equipamentos de GC × GC construídos em laboratórios de pesquisa.^{49,52,53}

A análise de fatores paralelos (PARAFAC, *Parallel Factor Analysis*) é o algoritmo mais utilizado no tratamento de dados gerados a partir de GC × GC, principalmente, por apresentar vantagem de segunda ordem e também devido à facilidade de uso e interpretação dos resultados. No algoritmo PARAFAC, a decomposição dos dados é feita em tríades, onde cada componente consiste de um vetor score e dois vetores pesos e, idealmente, o número de componentes é igual ao número de espécies químicas. Não existe um método padrão para a escolha do número de componentes, que é a etapa crucial na

análise, sendo que esta pode ser feita baseada na variância explicada pelo modelo, no conhecimento químico do sistema, em métodos de reamostragem e validação cruzada (*split-half*) ou no teste de consistência trilinear (CORCONDIA, *Core Consistency Diagnostic*).⁵⁴ Como esta escolha é realizada pelo analista, PARAFAC é considerado uma ferramenta semi-automatizada. Recentemente, Hoggard e Synovec⁵⁵ propuseram um método para a escolha automática do número de fatores em separações obtidas em GC × GC–TOFMS, tornando assim o PARAFAC totalmente automatizado.

Assim como GRAM, o PARAFAC é utilizado para a resolução de sinais cromatográficos sobrepostos,^{56,57} com a vantagem de que não é necessária a análise de cada composto puro. Nesse sentido, PARAFAC foi utilizado para resolver, identificar e quantificar compostos químicos parcialmente sobrepostos em separação de amostras ambientais por GC × GC–TOFMS.⁵⁸ Outra característica do PARAFAC é que o algoritmo requer uma estrutura bilinear para os dados, mas em GC × GC isto nem sempre é possível devido às variações que podem ocorrer de análise para análise. Nesses casos pode-se empregar o algoritmo PARAFAC2, uma versão do PARAFAC que permite pequenos desvios em uma das dimensões.⁵⁹

A regressão por mínimos quadrados parciais (PLS, *Partial Least Square*) é um método para a construção de modelos de regressão entre variáveis independentes (dados instrumentais) e dependente (geralmente concentração). Uma extensão do PLS para dados de ordem superior é a regressão por mínimos quadrados parciais multilinear (NPLS, *Multilinear Partial Least Squares*),⁶⁰ que decompõe o conjunto de dados, no caso de GC × GC, em um conjunto de tríades. Cada tríade consiste de um vetor escore e dois vetores pesos, os quais são calculados de modo a apresentar a máxima covariância com a variável dependente. O sistema é modelado de modo a obter a minimização nos erros de previsão. Uma vantagem do NPLS é que ele não necessita de uma estrutura bilinear dos dados, enquanto que a principal desvantagem é o fato de não apresentar a vantagem de segunda ordem. Em comparação ao PARAFAC, que utiliza apenas as informações cromatográficas para a construção dos modelos de calibração, o NPLS utiliza as informações cromatográficas (variável independente) relacionadas às concentrações das amostras. Já em análises quantitativas utilizando o PARAFAC, a regressão linear é realizada pelo analista, enquanto que com o NPLS a regressão é feita pelo algoritmo. Johnson *et al.*⁶¹ realizaram a quantificação de naftalenos em 14 amostras combustíveis de jatos utilizando NPLS para construir o modelo de calibração dos dados obtidos a partir de GC × GC–FID. O método foi validado utilizando-se um conjunto de amostras de previsão, com erro médio quadrático de previsão (RMSEP) de 0,03% e os resultados foram compatíveis ao método oficial.

Como existem diferentes métodos quimiométricos multi-modos, cabe ao analista decidir qual deles é mais adequado para tratamento dos dados. Na maioria das análises mais de um algoritmo pode se adequar aos dados; nestes casos, podem-se utilizar esses algoritmos e comparar os resultados obtidos. Van Mispelaar *et al.*⁶² avaliaram a aplicação dos algoritmos PARAFAC, PARAFAC2 e NPLS em dados de GC × GC–FID e compararam os resultados obtidos com os de integração convencional para picos cromatograficamente separados. As figuras de mérito relevantes para quantificação – exatidão, precisão, detectabilidade, etc. – foram melhores para o método de integração convencional em relação às ferramentas quimiométricas avaliadas. Entretanto, foram necessárias 16 h para processar os resultados de 32 cromatogramas através da integração convencional, enquanto que usando PARAFAC, PARAFAC2 ou NPLS, o tempo total para processamento foi reduzido a 2 h.

De Godoy *et al.*⁶³ analisaram gasolina por GC × GC–FID, para verificar adulteração por querosene. O uso de ferramentas quimiométricas como PARAFAC, PARAFAC2 e NPLS foi necessário devido

à dificuldade de quantificar uma mistura de diversos compostos, como é o caso do querosene, em outra mistura, caso da gasolina, e também porque muitos compostos fazem parte, ao mesmo tempo, do querosene e da gasolina. O método para quantificação de querosene em gasolina foi validado por validação cruzada e os erros quadráticos médios de validação cruzada (RMSECV) foram 3, 4 e 2% para PARAFAC, PARAFAC2 e N-PLS, respectivamente. O estudo de adulteração de gasolina foi, posteriormente, ampliado para três adulterantes (querosene, thinner e aguarrás) utilizando-se GC × GC–FID e NPLS no processamento dos dados.⁶⁴ O modelo foi validado por validação cruzada e por análise de amostras de gasolina adulteradas preparadas em laboratório. Utilizando-se este modelo foi, inicialmente, verificada a adulteração de outras amostras de gasolina fornecida e certificada pela Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) e, posteriormente, foi feita a quantificação dos adulterantes nas amostras consideradas adulteradas.

Qiu *et al.*⁶⁵ realizaram a análise de Qianghuo, importante planta utilizada na medicina tradicional chinesa, obtida de diferentes regiões. As amostras foram analisadas por GC × GC–FID e GC × GC–TOFMS, sendo que através de análise de componentes principais (PCA, *Principal Component Analysis*) pôde-se identificar a origem das amostras e os compostos marcadores das diferentes regiões. Sinha *et al.*⁶⁶ desenvolveram um algoritmo chamado DotMap, com o objetivo de rapidamente localizar analitos de interesse através dos espectros de massas obtidos por GC × GC–TOFMS. A estrutura de funcionamento do DotMap está baseada na comparação entre todos os espectros de massas obtidos experimentalmente e o espectro de massas do analito. O resultado do algoritmo é um diagrama de contorno indicando a localização dos sinais que estão acima de um valor de similaridade fornecido pelo analista. Este algoritmo foi utilizado na identificação de derivados de ácidos orgânicos em urina humana e de *O,O,O*-trietilfosfotato (TEPT) em combustível de jato,⁶⁶ sendo que cada análise demorou menos de 1 min.

Dados obtidos a partir de GC × GC–TOFMS foram analisados utilizando-se a razão de Fisher por Pierce *et al.*⁶⁷ A razão de Fisher é a variação da resposta obtida interclasses dividida pela soma das variações intraclasse. O conjunto de dados de 4 dimensões, obtido do GC × GC –TOFMS, foi dividido em subconjuntos, os quais são compostos por cromatogramas, em replicata, para cada valor de *m/z*. Em seguida, calcularam-se as razões de Fisher para estes dados que, em seguida, foram rearranjados de modo a gerar um gráfico bidimensional das razões de Fisher para cada *m/z*. Ou seja, se 361 *m/z* forem monitorados, 361 gráficos das razões de Fisher serão automaticamente gerados. Por último, foram somados todos os gráficos das razões de Fisher, obtendo-se assim as regiões do cromatograma que apresentaram maiores variações. Este método foi empregado na análise de 6 amostras de urina de mulheres grávidas e 4 não grávidas, nas quais foram detectados de 600 compostos. Após análise dos dados, utilizando-se as razões de Fisher, foram identificados 11 compostos que apresentaram variação significativa entre os dois tipos de amostra.

APLICAÇÕES DE GC × GC

O poder de separação de GC × GC tem sido demonstrado em diferentes áreas. Porém, suas aplicações para amostras petroquímicas e para caracterização de aromas naturais e óleos essenciais são especialmente ilustrativas do seu potencial, dada a complexidade desses materiais e a relevância dos problemas analíticos a eles associados. Como uma ótima revisão versando sobre a caracterização de amostras petroquímicas por GC × GC foi publicada recentemente,⁶⁸ este tipo de amostra não será abordada nessa revisão.

Amostras como aromas naturais e óleos essenciais também são

misturas extremamente complexas, sendo que a detecção, identificação e quantificação dos constituintes são feitas, majoritariamente, por 1D GC.⁶⁹ Dada a presença de componentes-chave em concentrações extremamente baixas, que não são detectados ou então coeluem com compostos majoritários, o incremento de separação e de detectabilidade proporcionado pela GC x GC é especialmente desejável.⁷⁰ O primeiro relato de uso de GC x GC-FID para análises de óleos essenciais foi feito por Dimandja *et al.*,⁷¹ que estudaram óleos de duas espécies de hortelã (*Mentha piperita* e *M. spicata*). Em comparação com GC/MS convencional, o número de compostos detectáveis foi aumentado consideravelmente (para *M. piperita*, de 30 para 89). Em virtude desse resultado, a GC x GC foi aplicada na separação de compostos de outros óleos essenciais ou aromas naturais.⁷²⁻⁷⁸ Na separação de voláteis de cachaça⁷⁹ foi relatada a possibilidade distinguir o tipo de madeira empregada no processo de envelhecimento; já para voláteis de uva⁸⁰ o perfil dos terpenos e seus derivados oxigenados pode ser empregado para traçar a origem da uva. Ainda, a separação e quantificação de alergênicos^{46,47,81-83} presentes em perfumes e cosméticos, bem como em óleos essenciais, também tem sido bastante investigada por GC x GC.

Da mesma forma que para amostras petroquímicas, é possível obter a estruturação dos diagramas tridimensionais para compostos de óleos essenciais ou aromas naturais. Quando é utilizado o conjunto de colunas apolar-polar, monoterpenos eluem em t_R menores que monoterpenos oxigenados e sesquiterpenos, enquanto que compostos oxigenados apresentam maior t_R . Visto que esse tipo de amostra não apresenta tantos isômeros quanto amostras petroquímicas, a estruturação dos diagramas não apresenta "telhas", mas apenas uma separação entre classes de compostos no espaço de separação. Foram observados grupos isolados de sesquiterpenos e também de álcoois, ésteres e aldeídos derivados de monoterpenos em óleo essencial de limão.⁸² Estruturação semelhante foi verificada para monoterpenos presentes em voláteis de uva, na qual foi visualizado agrupamento de terpenos oxigenados de acordo com a função química, como álcool, diol, aldeídos, éster, óxido ou cetona.⁸⁰

Uma das maneiras de diminuir o tempo de análise em 1D GC sem perder poder de separação é a Fast GC, na qual o diâmetro da coluna e a espessura do filme de fase estacionária são reduzidos, enquanto a vazão do gás de arraste (preferencialmente H₂) e a programação da temperatura do forno do cromatógrafo são aumentadas, entre outras modificações.² Baseados nessa teoria, Junge *et al.*⁸¹ realizaram a separação de compostos alergênicos por Fast GC x GC. Ao comparar a separação de 25 alergênicos por 1D GC e por GC x GC nas mesmas condições experimentais, algumas coeluições observadas em 1D GC foram resolvidas por GC x GC devido à separação na 2D. Já quando GC x GC foi comparada com Fast GC x GC, na qual os autores utilizaram um conjunto de colunas composto por uma BP20 10 m x 0,1 mm x 0,1 µm e uma BGB1701 0,3 m x 0,05 mm x 0,05 µm, a separação entre os compostos foi mantida e o tempo de análise diminuiu de 60 para 5 min. A largura dos picos (medida a meia altura) na 2D foi de cerca de 30 ms, sendo necessário aumentar a taxa de aquisição do detector para 200 Hz para obter pelo menos 10 pontos por pico. Como o período de modulação foi ajustado para 1 s e a largura de base dos picos na 1D foi de cerca de 1 s, o eluato da 1D foi modulado, em média, apenas uma vez. Se o período de modulação fosse menor que 1 s, muitos picos ficariam fora de ciclo e, por outro lado, se o valor for muito maior que 1 s, compostos já separados na 1D seriam novamente agrupados durante a modulação. Ainda, os autores investigaram a reprodutibilidade dos tempos de retenção e das áreas somadas dos picos modulados. Foram reportados coeficientes de variação de, no máximo, 0,2% para t_R , 9,0% para t_R e 7,1% para a soma das áreas dos picos modulados.

A GC x GC com uso de colunas com fase estacionária quiral tem sido uma alternativa às análises quirais por 1D GC. Em teoria, a coluna quiral pode ser empregada tanto como 1D (enantio GC x GC) ou 2D (GC x enantio GC).⁷⁸ Quando a coluna quiral é disposta como segunda dimensão, a separação entre os enantiômeros de um mesmo composto pode ser facilmente observada através de manchas com mesmo tempo de retenção na primeira dimensão, sendo que o excesso enantiomérico pode ser facilmente observado e quantificado. Contudo, o seu uso como 2D apresenta algumas limitações como a baixa eficiência dessas colunas, que resulta na coeluição dos enantiômeros ou em tempos de retenção excessivos (até 124 s). Por isso, na maioria dos trabalhos a separação enantiomérica ocorre na 1D, enquanto a 2D possibilita a separação dos analitos com outros compostos presentes na matriz, o que é a grande vantagem frente à 1D GC.

Análises envolvendo colunas de fase estacionária quiral para a separação de alergênicos⁸¹, óleo essencial e extrato de ervas,⁸⁴ de bifenilas policloradas⁸⁵ e de aminoácidos⁸⁶ são alguns exemplos de enantio GC x GC. Wang *et al.*⁸⁴ observaram que na separação de efedrina e derivados presentes em ervas medicinais, por 1D GC com fases estacionárias quirais β e γ-ciclodextrina, ocorreu a sobreposição total entre a (+)-pseudofedrina e a (+)-N-metilefedrina e, também, a coeluição parcial destes dois compostos com a (-)-N-metilefedrina. Os autores escolheram a GC x GC para que houvesse separação desses compostos na 2D. Para tal, investigaram diferentes fases estacionárias de 2D, sendo que a BP20 resultou na separação completa entre os analitos mencionados e entre analitos e interferentes da matriz. Com isso, foi possível identificar e quantificar efedrina e três derivados em diferentes tipos de ervas.

Junge *et al.*⁸⁶ analisaram enantiômeros de aminoácidos em cerveja por enantio GC x GC com uma coluna quiral de L-valina-terc-butilamida-PDMS. Devido à volatilidade dos analitos foi feita a derivatização com metil-cloroformiato e com trifluoroacetato de metila previamente à análise cromatográfica. Os derivados foram analisados empregando conjuntos de coluna quiral/polar e quiral/pouco polar. A 2D polar resultou em elevada retenção e alargamento excessivo para alguns picos e, por isso, o conjunto quiral/pouco polar foi selecionado. A derivatização com trifluoroacetato de metila resultou em maior separação entre os enantiômeros, principalmente na 2D. Bordaíandi *et al.*⁸⁵ avaliaram diversos conjuntos de colunas, envolvendo três colunas quirais de 1D e outras três aquirais como 2D, para separação de bifenilas policloradas quirais e congêneres em alimentos. Uma única coluna quiral não permitiu a separação de todos os enantiômeros e, portanto, para avaliação completa dos isômeros presentes em amostras de peixe e extratos de leite e de queijo, dois conjuntos de colunas foram utilizados.

Junge *et al.*⁸¹ empregaram a Fast GC x GC para separação de enantiômeros de alergênicos, utilizando um conjunto de colunas composto por uma MEGA (30% -ciclodextrina) 10 m x 0,1 mm x 0,1 µm e uma BP20 0,3 m x 0,05 mm x 0,05 µm. A separação levou cerca de 22 min, sendo observada apenas a coeluição entre os enantiômeros do hidroxycitronelal. Mesmo com programação da temperatura de 2 °C min⁻¹, o que favorece as separações quirais, a resolução entre os enantiômeros não foi alcançada, o que confirma uma limitação das fases estacionárias quirais disponíveis: elas não são adequadas para separação de diversos tipos de enantiômeros.

Um outro tipo de aplicação que tem recebido destaque nas publicações recentes é a análise de metabólitos combinada com dados gerados por GC x GC-TOFMS e, em grande parte dos casos, uso de ferramentas quimiométricas. A metabolômica é a área da ciência que estuda a caracterização de fenótipos metabólicos (metaboloma) em diferentes condições, sendo um dos objetivos a descoberta de biomarcadores ou a compreensão das reações envolvendo tais metabólitos. Para isso, devem-se encontrar compostos que estão presentes

em apenas uma das condições avaliadas ou compostos que têm sua quantidade variada significativamente de uma condição para outra. Devido à sua importância, possivelmente a metabolômica seja uma área de bastante aplicação da GC × GC, ao lado de petroquímica e aromas naturais. Os trabalhos descritos a seguir foram feitos empregando GC × GC – TOFMS devido à necessidade de identificação dos compostos e, também, por possibilitar a deconvolução de picos através dos espectros de massas.

Um dos trabalhos empregando GC × GC em estudos de metabolomas foi realizado por Welthagen *et al.*,⁸⁷ no qual foram analisadas amostras de baço de ratos magros e de ratos obesos, após derivatização dos metabólitos com *N*-metil-*N*-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA). Os autores identificaram açúcares alcoólicos como principais biomarcadores para obesidade e evidenciaram as vantagens da GC × GC-TOFMS sobre a GC-TOFMS em relação ao maior poder de separação e identificação e maior número de picos detectados. Hope *et al.*⁸⁸ analisaram amostras de grama antes e após a colheita. Tanto as amostras como uma mistura de padrões de 45 aminoácidos e ácidos orgânicos foram submetidas à derivatização com *N*,*O*-bis(trimetilsilil)acetamida (BSA), clorotrimetilsilano (TMSC) e *N*-trimetilsililimidazol (TMSI). Foram observadas algumas diferenças entre os diagramas tridimensionais das amostras, sendo a principal delas a presença de ácido málico na amostra pós-colheita, provavelmente devido a alterações no ciclo do ácido cítrico. Mohler *et al.*⁸⁹ analisaram metabólitos celulares sob duas condições diferentes de crescimento: fermentação e respiração. As regiões dos cromatogramas que apresentaram variação entre os dois tipos de crescimento foram selecionadas empregando o procedimento de razões de Fisher. Em seguida, PARAFAC foi utilizado na deconvolução de sinais sobrepostos nestas regiões permitindo, assim, a identificação destes, através do espectro de massas. O PARAFAC também foi utilizado para determinar a concentração dos compostos que apresentaram variação significativa entre os meios de crescimento.

A análise dos metabólitos de uma bactéria com capacidade para converter compostos com um átomo de carbono em compostos com dois ou mais átomos foi realizada a fim de ser utilizar a bactéria em processos industriais. Para isso, Guo e Lindstrom⁹⁰ analisaram o perfil metabólico da bactéria em dois meios de cultura diferentes, um contendo metanol e o outro contendo succinato. PARAFAC foi empregado na deconvolução de sinais sobrepostos e, também, na quantificação de aminoácidos e ácidos orgânicos alvos. Utilizando a razão de Fisher, os autores identificaram os compostos que apresentaram variação significativa entre os meios de cultura e, a partir desse resultado, foi possível compreender diferenças no ciclo metabólico da bactéria para os dois meios de cultura. Huang e Regnier⁹¹ analisaram derivados isotopicamente marcados de 16 aminoácidos, 19 ácidos graxos e 20 ácidos orgânicos em amostras sintéticas e também em soro humano. Os erros de exatidão e precisão na análise das amostras sintéticas foram, respectivamente, 9,5 e 4,77% para os aminoácidos, 9,7 e 2,83% para os ácidos graxos e 14 e 4,53% para os ácidos orgânicos. Nas amostras de soro humano foram identificados 639 compostos, sendo 11 aminoácidos, 7 ácidos graxos e 8 ácidos orgânicos, mostrando assim a aplicabilidade do método proposto na análise de amostras complexas. Pierce *et al.*⁹² realizaram a comparação do perfil metabólico de três plantas diferentes. Após extração e derivatização dos metabólitos, uma análise quimiométrica foi feita de modo a selecionar um valor de m/z referente ao derivatizante e obter uma matriz de dados para cada amostra. A essa matriz de dados foi realizada PCA, na qual se observou claramente a separação dos três diferentes tipos de plantas. Utilizando-se PARAFAC, os autores realizaram a separação e quantificação de alguns analitos que evidenciam a diferença entre as espécies.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O primeiro sistema para GC × GC foi descrito no princípio da década de 90; porém, passados mais de 15 anos ela ainda pode ser considerada uma inovação, não tendo atingido ainda sua maturidade. Dentre as implementações necessárias para estabelecê-la como técnica de rotina estão a necessidade de melhores algoritmos e estratégias para o processamento dos cromatogramas e um sistema consistente e prático de índices de retenção. Além disso, o custo elevado de detectores TOFMS e a baixa velocidade de aquisição de espectros em detectores de qMS ainda são limitantes para a identificação em GC × GC. Entretanto, o instrumental básico de GC × GC é essencialmente o mesmo da 1D GC: a adaptação de um modulador a um cromatógrafo a gás comum, juntamente com pequenos periféricos e um software específico, é o suficiente para convertê-lo em um sistema para GC × GC. Talvez esse seja o grande atrativo da GC × GC: ela faculta um ganho significativo em resolução e detectabilidade apenas por uma pequena modificação em um instrumento comercial já existente.

Além das aplicações envolvendo amostras petroquímicas e aromas naturais, trabalhos recentes envolvendo separações quirais, Fast GC × GC ou aplicações com metaboloma aumentaram o campo de aplicação da técnica. Em linhas gerais, o impacto dos novos desenvolvimentos em GC × GC pode ser considerado similar ao resultante da disponibilização comercial de colunas capilares, iniciada há cerca de 30 anos. Ainda que só o tempo possa confirmar se a GC × GC atingirá esse estágio de popularidade como técnica analítica, a possibilidade de que isso ocorra é bastante significativa, devido às suas vantagens intrínsecas em comparação à 1D GC.

REFERÊNCIAS

1. Desty, D. H.; *Adv. Chromatogr.* **1965**, *1*, 852.
2. Matisova, E.; Domotorova, M.; *J. Chromatogr., A* **2003**, *1000*, 199.
3. Rangunathan, N.; Krock, K. A.; Klawun, C.; Sasaki, T. A.; Wilkins, C. L.; *J. Chromatogr., A* **1999**, *856*, 349.
4. Marriot, P. J.; Ong, R.; Shellie, R.; *Am. Lab.* **2001**, *33*, 44.
5. Poole, C. F.; *J. Chromatogr., A* **2003**, *1000*, 963.
6. Hogendoorn, E. A.; Vanzoonen, P.; *J. Chromatogr., A* **1995**, *703*, 149.
7. Issaq, H. J.; Chan, K. C.; Liu, C. S.; Li, Q. B.; *Electrophoresis* **2001**, *22*, 1133.
8. Hyotylainen, T.; Riekkola, M. L.; *J. Chromatogr., A* **2003**, *1000*, 357.
9. Giddings, J. C.; *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 1258A.
10. Simmons, M. C.; Snyder, L. R.; *Anal. Chem.* **1958**, *30*, 32.
11. Deans, D. R.; *Chromatographia* **1968**, *1*, 18.
12. Bertsch, W.; *J. High Resol. Chromatogr.* **1999**, *22*, 647.
13. Lui, Z.; Phillips, J. B.; *J. Chromatogr. Sci.* **1991**, *29*, 227.
14. Phillips, J. B.; Beens, J.; *J. Chromatogr., A* **1999**, *856*, 331.
15. Liu, Z.; Sirimanne, S. R.; Patterson, D. G.; Needham, L. L.; Phillips, J. B.; Xu, J.; *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3086.
16. Phillips, J. B.; Gaines, R. B.; Blomberg, J.; van der Wielen, F. W. M.; Dimandja, J. M.; Green, V.; Granger, J.; Patterson, D.; Racoalis, L.; de Geus, H. J.; de Boer, J.; Haglund, P.; Lipsky, J.; Sinha, V.; Ledford, E. B. A.; *J. High Resol. Chromatogr.* **1999**, *22*, 3.
17. von Mühlen, C.; Zini, C. A.; Caramão, E. B.; Marriot, P. J.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 682.
18. Dallüge, J.; Beens, J.; Brinkman, U. A. T.; *J. Chromatogr., A* **2003**, *1000*, 69.
19. Bruckner, C. A.; Prazen, B. J.; Synovec, R. E.; *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2796.
20. Harynyuk, J.; Gorecki, T.; *J. Chromatogr., A* **2003**, *1019*, 53.
21. Adahchour, M.; Beens, J.; Brinkman, U. A. T.; *Analyst* **2003**, *128*, 213.
22. Kinghorn, R. M.; Marriot, P. J.; *J. High Resol. Chromatogr.* **1999**, *22*, 235.

23. <http://www.thermo.com/com/cda/product/detail/1,,10121492,00.html> acessada em Novembro 2007.
24. http://www.leco.com/products/sep_sci/pegasus_4d/pegasus_4d.htm acessada em Novembro 2007.
25. http://www.zoex.com/kt2004_system.html acessada em Abril 2008.
26. Beens, J.; Boelens, H.; Tijssen, R.; Blomberg, J.; *J. High Resol. Chromatogr.* **1998**, *21*, 47.
27. Kristenson, E. M.; Korytár, P.; Danielsson, C.; Kallio, M.; Brandt, M.; Mäkelä, J.; Vreuls, R. J. J.; Beens, J.; Brinkman, U. A. T.; *J. Chromatogr., A* **2003**, *1019*, 65.
28. Modello, L.; Tranchida, P. Q.; Dugo, G.; Dugo, P.; *Mass Spectrom. Rev.* **2008**, *27*, 101.
29. Dallüge, J.; van Stec, L. L. P.; Xu, X.; Williams, J.; Beens, J.; Vreuls, R. J. J.; Brinkman, U. A. T.; *J. Chromatogr., A* **2002**, *974*, 169.
30. Adahchour, M.; Brandt, M.; Baier, H. U.; Vreuls, R. J. J.; Batenburg, A. M.; Brinkman, U. A. T.; *J. Chromatogr., A* **2005**, *1067*, 245.
31. Modello, L.; Casilli, A.; Tranchida, P. Q.; Dugo, G.; Dugo, P.; *J. Chromatogr., A* **2005**, *1067*, 235.
32. van Deursen, M.; Beens, J.; Reijenga, J.; Lipman, P.; Cramers, C.; Blomberg, J.; *J. High Resol. Chromatogr.* **2000**, *23*, 507.
33. Adam, F.; Bertocini, F.; Coupard, V.; Charon, N.; Thiébaud, D.; Espinant, D.; Hennion, M. C.; *J. Chromatogr., A* **2008**, *1186*, 236; Adam, F.; Vendevre, C.; Bertocini, F.; Thiébaud, D.; Espinant, D.; Hennion, M. C.; *J. Chromatogr., A* **2008**, *1178*, 171.
34. Schure, M. R.; *J. Micro. Sep.* **1997**, *9*, 169.
35. Peters, S.; Vivó-Truyols, G.; Marriott, P. J.; Schoenmakers, P. J.; *J. Chromatogr., A* **2007**, *1146*, 232.
36. Kovats, E., *Helv. Chim. Acta* **1958**, *41*, 1915.
37. van Den Dool, H.; Kratz, P. D., *J. Chromatogr.* **1963**, *11*, 463.
38. Western, R. J.; Marriott, P. J.; *J. Sep. Sci.* **2002**, *25*, 832; Western, R. J.; Marriott, P. J.; *J. Chromatogr., A* **2003**, *1019*, 3.
39. Bieri, S.; Marriott, P. J.; *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 8089.
40. Bieri, S.; Marriott, P. J.; *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 760.
41. Micys, N. J.; Seeley, S. K.; Selley, J. V.; *J. Chromatogr., A* **2005**, *1086*, 171.
42. Dallüge, J.; Vreuls, R. J. J.; Beens, J.; Brinkman, U. A. T.; *J. Sep. Sci.* **2002**, *25*, 201.
43. Beens, J.; Adahchour, M.; Vreuls, R. J. J.; Altena, K.; Brinkman, U. A. T.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *919*, 127.
44. de Geus, H. J.; de Boer, J.; Phillips, J. B.; Ledford, E. B.; Brinkman, U. A. T.; *J. High Resol. Chromatogr.* **1998**, *21*, 411.
45. Lee, A. L.; Bartle, K. D.; Lewis, A. C.; *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1330.
46. Cordero, C.; Bicchi, C.; Joulain, D.; Rubiolo, P.; *J. Chromatogr., A* **2007**, *1150*, 37.
47. Debonneville, C.; Chaintreau, A.; *J. Chromatogr., A* **2004**, *1027*, 109.
48. Pierce, K. M.; Hoggard, J. C.; Mohler, R. E.; Synovec, R. E.; *J. Chromatogr., A* **2008**, *1186*, 401.
49. Johnson, K. J.; Prazen, B. J.; Olund, R. K.; Synovec, R. E.; *J. Sep. Sci.* **2002**, *25*, 297.
50. Sanchez, E.; Kowalski, B. R.; *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 496.
51. Xie, L.; Marriott, P. J.; Adams, M.; *Anal. Chim. Acta* **2003**, *500*, 211.
52. Fraga, C. G.; Prazen, B. J.; Synovec, R. E.; *J. High Resol. Chromatogr.* **2000**, *23*, 215.
53. Fraga, C. G.; Prazen, B. J.; Synovec, R. E.; *Anal. Chem.* **2003**, *73*, 5833.
54. Sena, M. M.; Trevisan, M. G.; Poppi, R. J.; *Quim. Nova* **2005**, *28*, 910.
55. Hoggard, J. C.; Synovec, R. E.; *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 1611.
56. Sinha, A. E.; Hope, J. L.; Prazen, B. J.; Nilsson, E. J.; Jack, R. M.; Synovec, R. E.; *J. Chromatogr., A* **2004**, *1058*, 209.
57. Sinha, A. E.; Hope, J. L.; Prazen, B. J.; Fraga, C. G.; Nilsson, E. J.; Jack, R. M.; Synovec, R. E.; *J. Chromatogr., A* **2004**, *1056*, 145.
58. Sinha, A. E.; Fraga, C. G.; Prazen, B. J.; Synovec, R. E.; *J. Chromatogr., A* **2004**, *1027*, 269.
59. Bro, R.; Andersson, C. A.; Kiers, H. A. L.; *J. Chemom.* **1999**, *13*, 295.
60. Bro, R.; *J. Chemom.* **1996**, *10*, 47.
61. Johnson, K. J.; Prazen, B. J.; Young, D. C.; Synovec, R. E.; *J. Sep. Sci.* **2004**, *27*, 410.
62. van Mispelaar, V. G.; Tas, A. C.; Smilde, A. K.; Schoenmakers, P. J.; van Asten, A. C.; *J. Chromatogr., A* **2003**, *1019*, 15.
63. de Godoy, L. A. F.; Ferreira, E. C.; Pedroso, M. P.; Fidélis, C. H. V.; Augusto, F.; Poppi, R. J.; *Anal. Lett.* **2008**, *41*, 1603.
64. Pedroso, M. P.; Ferreira, E. C.; de Godoy, L. A. F.; Poppi, R. J.; Augusto, F.; *J. Chromatogr., A* **2008**, *1201*, 176.
65. Qiu, Y.; Lu, X.; Pang, T.; Zhu, S.; Kong, H.; Xu, G.; *J. Pharm. Biomed.* **2007**, *43*, 1721.
66. Hope, J. L.; Sinha, A. E.; Prazen, B. J.; Synovec, R. E.; *J. Chromatogr., A* **2005**, *1086*, 185.
67. Pierce, K. M.; Hoggard, J. C.; Hope, J. L.; Rainey, P. M.; Hoofnagle, A. N.; Jack, R. M.; Wright, B. W.; Synovec, R. E.; *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 5068.
68. von Mühlen, C.; Zini, C. A.; Caramão, E. B.; Marriot, P. J.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 765.
69. Augusto, F.; Lopes, A. L.; Zini, C. A.; *Trends Anal. Chem.* **2003**, *22*, 160.
70. Xin, D.; Shellie, R. A.; Marriot, P. J.; Huie, C. W.; *J. Sep. Sci.* **2004**, *27*, 451.
71. Dimandja, J. M.; Stanfill, S. B.; Granger, J.; Patterson, D.; *J. High Resol. Chromatogr.* **2000**, *23*, 208.
72. Shellie, R. A.; Marriott, P. J.; Cornwell, C.; *J. Sep. Sci.* **2001**, *24*, 823.
73. Eyres, G.; Marriott, P. J.; Dufour, J. P.; *J. Chromatogr., A* **2007**, *1150*, 70.
74. Shellie, R. A.; Mondello, L.; Marriott, P. J.; Dugo, G.; *J. Chromatogr., A* **2002**, *970*, 225.
75. Ma, C.; Wang, H.; Lu, X.; Li, H.; Liu, B.; Xu, G.; *J. Chromatogr., A* **2007**, *1150*, 50.
76. Pang, T.; Zhu, S.; Lu, X.; Xu, G.; *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 868.
77. Zhu, S.; Xing, J.; Zhang, S.; Kong, H.; Xu, G.; Wu, C.; *Anal. Chim. Acta* **2005**, *545*, 224.
78. Marriot, P. J.; Shellie, R. A.; *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5426.
79. Cardeal, Z. L.; Souza, P. P.; Silva, M. D. R. G.; Marriott, P. J.; *Talanta* **2008**, *74*, 793.
80. Rocha, S. M.; Coelho, E.; Zrostlíková, J.; Delgadillo, I.; Coimbra, M. A.; *J. Chromatogr., A* **2007**, *1161*, 292.
81. Junge, M.; Bieri, S.; Huegel, H.; Marriott, P. J.; *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4448.
82. Modello, L.; Casilli, A.; Tranchida, P. Q.; Dugo, P.; Dugo, G.; *Flavour Fragr. J.* **2005**, *20*, 136.
83. Shellie, R. A.; Marriott, P. J.; Chaintreau, A.; *Flavour Fragr. J.* **2004**, *19*, 91.
84. Wang, M.; Marriott, P. J.; Chan, W. H.; Lee, A. W. M.; Huie, C. W.; *J. Chromatogr., A* **2006**, *1112*, 361.
85. Bordajandi, L. R.; Ramos, L.; González, M. J.; *J. Chromatogr., A* **2005**, *1078*, 128.
86. Junge, M.; Huegel, H.; Marriott, P. J.; *Chirality* **2007**, *19*, 228.
87. Welthagen, W.; Shellie, R. A.; Spranger, J.; Ristow, M.; Zimmermann, R.; Fiehn, O.; *Metabolomics* **2005**, *1*, 57.
88. Hope, J. L.; Prazen, B. J.; Nilsson, E. J.; Lidstrom, M. E.; Synovec, R. E.; *J. Chromatogr., A* **2005**, *65*, 380.
89. Mohler, R. E.; Dombek, K. M.; Hoggard, J. C.; Pierce, K. M.; Young, E. T.; Synovec, R. E.; *Analyst* **2007**, *132*, 756.
90. Guo, X.; Lidstrom, M. E.; *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *99*, 929.
91. Huang, X.; Regnier, F. E.; *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 107.
92. Pierce, K. M.; Hope, J. L.; Hoggard, J. C.; Synovec, R. E.; *Talanta* **2006**, *70*, 797.
93. Adahchour, M.; Beens, J.; Vreuls, R. J. J.; Brinkman, U. A. T.; *Trends Anal. Chem.* **2006**, *25*, 540.