

FLUIDOS SUPERCRÍTICOS EM QUÍMICA ANALÍTICA. III. CROMATOGRAFIA COM FLUIDO SUPERCRÍTICO: APLICAÇÕES

Emanuel Carrilho, Maria Cecília H. Tavares e Fernando M. Lanças*

Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 780, 13560-970 São Carlos - SP, Brasil

Recebido em 13/4/05; aceito em 19/7/05; publicado na web em 16/2/06

SUPERCRITICAL FLUIDS IN ANALYTICAL CHEMISTRY III. SUPERCRITICAL FLUID CHROMATOGRAPHY: APPLICATIONS. The first two papers in this series described the basic theory involved in supercritical fluid chromatography (SFC), how the technique evolved from gas and liquid chromatography and how the instrumentation was developed. Over the last two years, a commercial, dedicated packed-column SFC/MS instrument appeared on the market. The SFC continues to grow in use, with fundamental developments, coupled with a steady rise in the number of industrial users and applications.

Keywords: supercritical fluids; review; applications.

INTRODUÇÃO

A cromatografia com fluido supercrítico (SFC) e as técnicas cromatográficas relativas (utilizando fluidos compressíveis ou solvatados) continuam com demanda crescente, principalmente em aplicações industriais.

O desenvolvimento da instrumentação teve um papel importante no progresso da utilização da SFC. Nos últimos dois anos, um instrumento comercial SFC/MS com coluna empacotada apareceu no mercado, além de um outro instrumento SFC semipreparativo com capacidade de vazão de até 50 mL/min¹. O uso da SFC vem crescendo principalmente na determinação de produtos farmacêuticos e produtos naturais, por utilizar baixas temperaturas de análise.

O desenvolvimento teórico², os aspectos experimentais e a instrumentação³ existente em cromatografia com fluido supercrítico foram discutidos anteriormente, e algumas aplicações industriais e acadêmicas relevantes podem ser comentadas.

ALIMENTOS

A aplicação da SFC na determinação de componentes de alimentos vem crescendo em anos recentes. Chester⁴ discutiu a evolução da instrumentação utilizada neste tipo de análise. Flament *et al.*⁵ apresentaram fortes argumentos para utilização da SFC semipreparativa na separação e isolamento de componentes não-polares de aromas e alimentos. Lafosse *et al.*⁶ revisaram o uso da SFC em colunas capilares e empacotadas na caracterização de carboidratos, discutindo a necessidade ou não de derivação dos analitos. Salvador *et al.*⁷ usaram uma vazão de 5 mL/min e uma temperatura da coluna de 60 °C para separar 8 monossacarídeos e polióis em menos de 10 min, empregando colunas de sílica, típicas de cromatografia em fase líquida de alta eficiência (HPLC, "high performance liquid chromatography").

Huber *et al.*⁸ compararam a eficiência entre SFC e cromatografia em fase gasosa (GC, "gas chromatography") para determinação de colesterol em gordura de leite, usando amostras certificadas. Demonstraram que a SFC produziu resultados mais precisos que aqueles obtidos por GC, além do cromatograma da Figura 1 apresentar

picos simétricos para colesterol e colestano, em um tempo de análise inferior a 25 min e sem a necessidade de derivação da amostra.

Buskov *et al.*⁹ analisaram uma mistura complexa de produtos de degradação da clorofila durante o processamento de óleos vegetais e materiais como brócolis e espinafre. O método permitiu a separação de 15 derivados de clorofila em 20 min, utilizando-se uma coluna empacotada com octadecilsilano (C-18) em SFC.

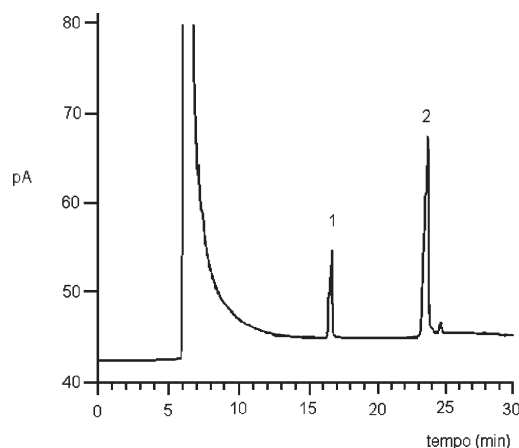


Figura 1. SFC-FID da gordura do leite anidro, coluna capilar SB fenil (20 m x 50 µm x 0,25 µm), T = 130 °C. Picos: 1) colestane, 2) colesterol. Reproduzido da ref. 8, com permissão da Elsevier Science

Recentemente, De la Fuente e Juarez¹⁰ compararam várias técnicas cromatográficas (GC, HPLC e SFC) para determinação de triglicerídeos e ésteres da gordura do leite, enquanto que Andrikopoulos¹¹ revisou a separação cromatográfica e identificação espectroscópica de isômeros de triacilglicerídeos em óleos e gorduras vegetais, destacando a potencialidade da SFC para esse tipo de amostra. Sandra *et al.*¹² apresentaram uma comparação entre pSFC e SFC-MS para caracterização de triglicerídeos em óleos vegetais. Hirata *et al.*¹³ desenvolveram um sistema para SFC com 2 colunas empacotadas para determinação de triglicerídeos em óleos e gorduras. Jochum *et al.*¹⁴ realizaram uma interessante comparação entre GC e SFC na determinação de ácidos graxos poli-insaturados.

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

Vitaminas lipo-solúveis são perfeitas para serem analisadas por SFC. Turner *et al.*¹⁵ descreveram as vantagens da SFE e SFC para esta classe de compostos. O acoplamento “on-line” da extração com fluido supercrítico com SFC (SFE/SFC) é uma técnica especialmente atrativa para determinação de vitaminas, que são produtos sensíveis à luz, ao oxigênio, calor e pH. Ibanez *et al.*¹⁶ também usaram SFE/SFC “on-line” para determinação de tocoferóis (vitamina E).

O progresso na Bioquímica nutricional está sempre dependente do progresso da análise dos nutrientes. Mais recentemente, Furr¹⁷ apresentou a separação de carotenóides e vitamina A. As análises por SFC e eletroforese capilar apresentaram melhores resultados que por métodos convencionais e as descobertas nas análises de carotenóides incluem a resolução de estereoisômeros e quantificação destes compostos em nível de traços em amostras biológicas.

PRODUTOS NATURAIS

A SFC é uma técnica extremamente versátil para caracterização de produtos naturais e outros compostos termicamente instáveis, principalmente por utilizar temperaturas baixas durante a análise (~40 °C) evitando, assim, a degradação dos analitos¹⁸.

A SFC mostrou-se bastante eficiente na separação de misturas complexas de produtos naturais de substâncias apolares e lipofílicas, usadas na indústria de cosméticos, sendo estes compostos de difícil análise por outras técnicas cromatográficas¹⁹. Dentre as várias classes de produtos naturais investigadas por SFC incluem-se resinas ácidas²⁰, compostos triterpênicos de importância em indústria de perfume²¹, flavonóides de óleos cítricos²² e sesquiterpenos²³.

As SFE/SFC “on-line” e “off-line” são favoráveis para caracterização de produtos naturais. Bichi *et al.*²⁴ compararam SFC/UV e HPLC/UV para determinação de ácido valérico e valepotriato em *Valeriana officinalis*. Os resultados qualitativos e quantitativos obtidos foram parecidos, mas a SFC apresentou menor tempo de análise.

Tavares *et al.*²⁵ estudaram os ácidos triterpênicos, butílico, oleanólico e ursólico. A determinação por SFC com coluna tubular aberta apresentou vantagens se comparada à GC, por apresentar a não necessidade de derivatização e menor tempo de análise (Figura 2). Javis e Morgan²⁶ estudaram triterpenos limonóides por SFC com coluna empacotada.

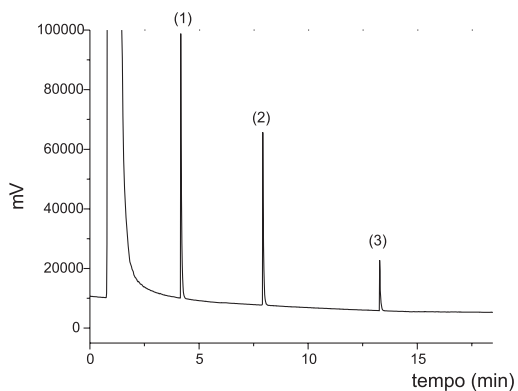


Figura 2. c-SFC de uma mistura de ácidos triterpênicos: (1) ácido oleanólico, (2) ácido ursólico, (3) ácido polipulnonico. Coluna: 20 m x 100 μ m x 0,20 μ m (5% fenil, 95% metil polisiloxano entrecruzada); T = 80 °C; P = 120 atm. Reproduzido da ref. 25, com permissão da Wiley-VCH

Qi e Zhao²⁷ determinaram licopeno extraído da casca do tomate. O tempo de retenção do licopeno por SFC ficou em torno de 3 minutos.

Lesellier *et al.*²⁸ separaram cis/trans de beta-carotenos por SFC.

A grande vantagem encontrada pelos autores foi o menor tempo de análise necessário em comparação com estudos anteriores realizado com outras técnicas, mesmo utilizando uma combinação complexa de fases estacionárias e diferentes tipos de colunas, como exemplificado na Figura 3.

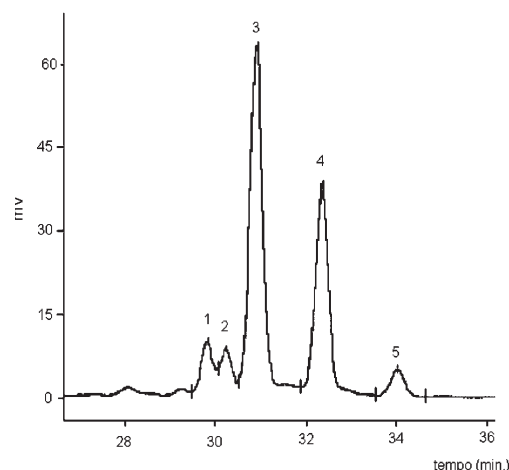


Figura 3. SubFC de uma mistura de isômeros de β -caroteno usando 6 colunas acopladas (uma coluna YMC Pack Pro C₁₈ de 250 x 4,6 mm, seguida de 5 colunas Chromolith monolítica de 100 x 2,6 mm cada) totalizando 75 cm de comprimento, T = 25 °C, P = 15 Mpa; 1) 9 mono-cis (29,82 min), 2) unknown isomer (30,24 min), 3) all trans (30,91 min), 4) 13 mono-cis (32,37 min), 5) 15 mono-cis (34,03 min) Reproduzido da ref. 28, com permissão da Elsevier Science

PESTICIDAS E MEIO AMBIENTE

A análise de pesticidas tem recebido grande atenção recentemente, devido ao impacto ambiental e à necessidade de monitorar traços de seus metabólitos em amostras complexas de alimentos. Geralmente a cromatografia gasosa é escolhida como o método analítico, devido a sua alta sensibilidade e disponibilidade de detectores seletivos (fotométrico de chama, nitrogênio-fósforo e, principalmente, o detector por captura de elétrons). Entretanto, uma fração significativa dos pesticidas é termicamente instável, dificultando a determinação por GC. A HPLC não pode ser utilizada em outras situações, pois alguns compostos não podem ser detectados em níveis de traços por um detector de UV ou em outros tipos de detectores. Neste caso, a SFC é uma ótima alternativa, pois pode operar em temperaturas baixas evitando a degradação térmica do soluto e, ao mesmo tempo, é compatível com os detectores mais sensíveis existentes para GC, além das colunas capilares oferecerem uma boa eficiência na separação.

Um bom exemplo deste problema é a determinação de glifosato (N-(fosfonometil)glicina; RoundupTM) que necessita derivatização prévia para determinação tanto por GC²⁹ quanto por LC³⁰, ou condições bastante exigentes por LC sem derivatização³¹. Curiosamente, em busca bibliográfica recente³² não foi encontrada nenhuma publicação descrevendo a determinação de glifosato por SFC.

Berger³³ publicou um trabalho descrevendo a determinação de aproximadamente 100 pesticidas termo-lábeis por SFC. Bichi *et al.*³⁴ usaram extração em fase sólida (SPE, “solid phase extraction”) “off-line” com SFC para determinação de diflubenzuron, teflubenzuron e triflumuron em frutas verdes, conseguindo uma recuperação de 60%. A análise por SFC-UV foi realizada com CO₂ a 30 MPa como fase móvel e acetonitrila a 10% como modificador. Bernal *et al.*³⁵

avaliaram 10 colunas empacotadas com sílica e acopladas em série para separação de 184 pesticidas em amostras de água. Dost *et al.*³⁶ determinaram pesticidas em amostras de solo em concentrações de 0,1 a 50,0 µg/mL usando SFC acoplada com espectrometria de massas com ionização química à pressão atmosférica (SFC-APCI-MS). Os resultados mostrados na Figura 4 demonstram que a técnica apresentou altas seletividade e sensibilidade e identificação inequívoca dos analitos.

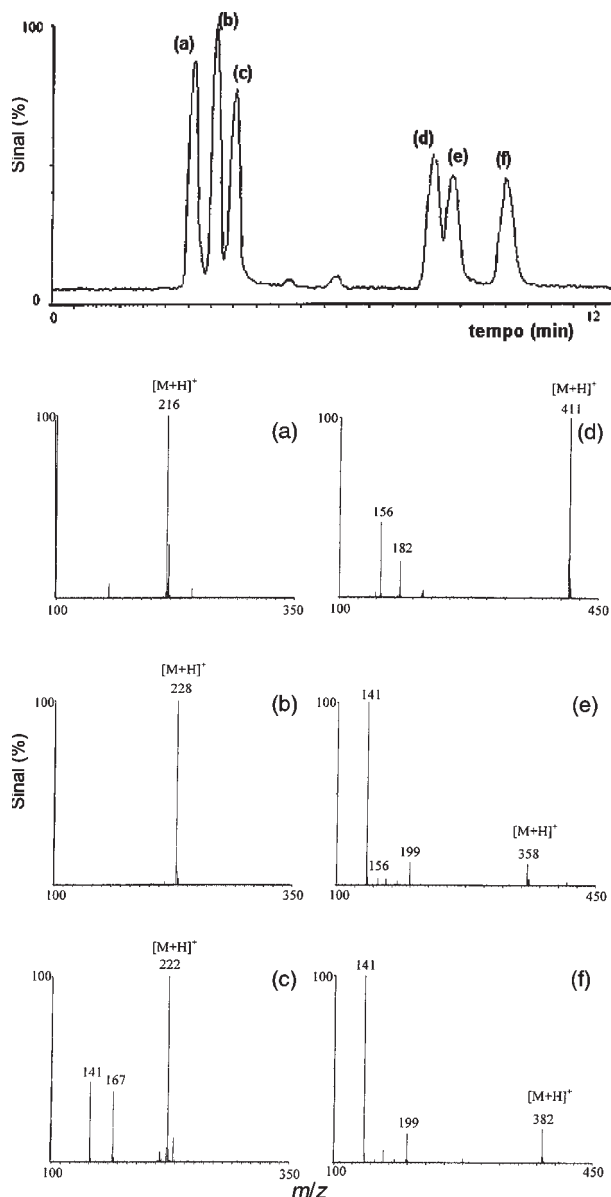


Figura 4. TIC de 6 pesticidas por *p*-SFC-APCI-MS a 20 V, (a) atrazina, (b) ametrina, (c) carbofuran, (d) metil benzosulfuran, (e) clorosulfuran, (f) metil metsulfuran. Coluna empacotada Spherisorb (25 cm x 4,6 mm), $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 200\text{ bar}$, 10% de metanol como modificador. Reproduzido da ref. 36, com permissão da The Royal Society of Chemistry

COMBUSTÍVEIS FÓSSEIS

As principais análises de combustíveis fósseis são as destilações simuladas e o fracionamento por classes químicas. Algumas revisões apontam estes como sendo um dos principais nichos de excelência para SFC^{37,38}. Devido à grande complexidade, ampla faixa de polaridade, massa molecular e temperaturas de ebulição

das amostras, a GC tem um desempenho limitado neste campo. A SFC combina a alta resolução das colunas capilares e o elevado poder de solvatação do CO_2 supercrítico³⁹.

Nomura *et al.*⁴⁰ usaram, simultaneamente, detectores de fluorescência, UV e ionização por chama (FID, “flame ionization detector”) para a caracterização de frações de vários óleos combustíveis separados por SFC. Xu *et al.*⁴¹ usaram pentano no estado supercrítico como fase móvel para fracionamento de piches betuminosos. Venter *et al.*⁴² empregaram a SFC preparativa com colunas de sílica gel para fracionamento de classes químicas de petróleo antes de uma análise por GC-MS. Determinações de hidrocarbonetos polinucleares aromáticos (PAHs) apresentam boa seletividade quando efetuadas através de SFC. Os 16 PAHs considerados poluentes prioritários pela US-EPA (método EPA 610 da Agência de Proteção Ambiental Americana) foram amplamente estudados por SFC⁴³, sendo necessárias duas colunas acopladas para completa separação dos poluentes ambientais. O mecanismo de retenção dos mesmos PAHs foi estudado e obtido em colunas com fase especiais⁴⁴.

Tavares e Lanças⁴⁵ usaram SFC com coluna tubular aberta para a caracterização de derivados de combustíveis alternativos obtidos por SFE de carvão brasileiro. A coluna tubular aberta permitiu a eluição de asfaltóis polares e de alto peso molecular. Os autores concluíram que a SFC apresentou melhores resultados para hidrocarbonetos não-voláteis, os quais não podiam ser analisados por GC convencional. A Figura 5 mostra um exemplo da alta complexidade deste tipo de amostras com excelente resolução e tempo de análise.

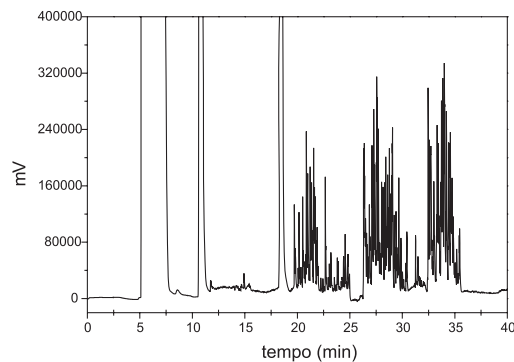


Figura 5. *ot*-SFC da fração F8 (asfaltóis) obtidos a partir de SFE de carvão seguida de LC preparativa. Coluna não-polar LM-5 (20 m x 100 µm x 0,20 µm), $T = 70\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 80\text{ a }150\text{ atm}$, volume de injeção = 60 nL. Reproduzido da ref. 45, com permissão da Wiley - VCH

Outros trabalhos podem ser destacados na aplicação de SFC na análise de derivados pesados de combustíveis fósseis. Satou *et al.*⁴⁶ usaram GC e SFC para simular uma curva de distribuição de hidrocarbonetos poliaromáticos de óleos pesados, encontrando uma faixa de distribuição mais ampla no segundo. Albuquerque⁴⁷ apresentou um método analítico validado para determinação total de dienos conjugados em produtos de petróleo, usando SFC como um bom exemplo de sua aplicação em análises de interesse na indústria petrolífera.

Saito *et al.*⁴⁸ apresentaram uma revisão sobre novas fases estacionárias utilizadas em SFC para determinação de PAHs e, assim como é encontrado para HPLC, a natureza da fase estacionária é determinante na separação desta classe de compostos.

POLÍMEROS

Os poliglicóis são amplamente usados na indústria química, in-

cluindo aplicações como tensoativos, fluidos de transferência de calor, fluidos de freios e matéria bruta na produção de poliuretanas e outros polímeros. Muitos poliglicóis não possuem grupos cromóforos, o que impossibilita sua detecção por absorção no UV; a maioria possui elevada massa molecular impedindo sua análise por GC convencional. Neste caso, a cromatografia de permeação em gel (GPC, “gel permeation chromatography”) é utilizada, mas não é tão precisa. Por esta razão, a cromatografia com fluido supercrítico é a única alternativa nestes casos, separando os oligômeros individuais e permitindo, inclusive, sua quantificação⁴⁹⁻⁵¹.

Desbene *et al.*⁵² analisaram alguns polisiloxanos, tanto por SFC quanto por GPC, e encontraram que a SFC propicia melhores resultados, tanto de repetibilidade quanto de identificação e quantificação dos polímeros. Jordan *et al.*⁵³ descreveram o uso “on-line” de extração e cromatografia com fluido supercrítico acoplado com espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (SFE-SFC-FT/IR) para extração, separação e identificação de extratos em Nylon e poliestirenos, usando condições de extração relativamente brandas. Chmelik *et al.*⁵⁴ determinaram a distribuição da massa molar de óleo de silicone por SFC e compararam os resultados com espectrometria de massas por tempo de voo com desorção à laser e ionização assistida por matriz (MALDI-TOF MS, “matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry”) e verificaram que as duas abordagens apresentaram uma boa correlação dos resultados com grande vantagem para SFC na detecção de oligômeros menores, os quais são subestimados na análise por espectrometria de massas. MALDI-TOF MS foi relativamente melhor na detecção de oligômeros de massa molar mais elevadas, conseguindo detectar oligômeros com 70 unidades, enquanto que SFC foi até 60 unidades, como pode ser visto na Figura 6.

Recentemente, Hatara *et al.*⁵⁵ revisaram a preparação de polímeros e seu uso. Um método típico de preparação é a combinação da polimerização e separação por SFC, uma vez que o polímero sintético apresenta problemas de distribuição de peso molecular, os quais são de importância significativa para estudos de suas propriedades estruturais.

Jenke⁵⁶ apresentou métodos para identificação e quantificação de polímeros orgânicos aditivos utilizando diferentes técnicas, como SFC, HPLC, SEC, TLC e GC. Johnston *et al.*⁵⁷ extraíram, identificaram e quantificaram N-N dimetil p-toluidina, hidroquinona e metil éter de hidroquinona em co-polímeros de etil e metil metacrilato. Os autores concluíram que o trabalho realizado com fluido supercrítico apresentou vantagens se comparado com outras técnicas analíticas.

FÁRMACOS

Sem dúvida nenhuma, a área de maior crescimento em aplicações da SFC durante os últimos anos foi a indústria farmacêutica. Os químicos analíticos farmacêuticos frequentemente encontram alguns problemas quando analisam antibióticos. Sua massa molar é sempre elevada, são termicamente sensíveis e geralmente não possuem cromóforos adequados para detecção por UV em HPLC. Neste caso e como em muitos outros fármacos, a SFC é a alternativa analítica mais adequada. CO₂ a baixas temperaturas é utilizado como o fluido supercrítico de preferência⁵⁸. Este é um exemplo típico de porque a SFC é amplamente usada na análise de drogas, pois os fármacos têm se constituído como um verdadeiro nicho de aplicação para SFC⁵⁹. Por ex., agentes antifúngicos⁶⁰⁻⁶², sulfato de salbutamol⁶³, benzodiazepinas⁶⁴, sulfonamidas⁶⁵, tocoferóis⁶⁶ e esteróides^{67,68} foram determinados com sucesso em uma variedade ampla de matrizes.

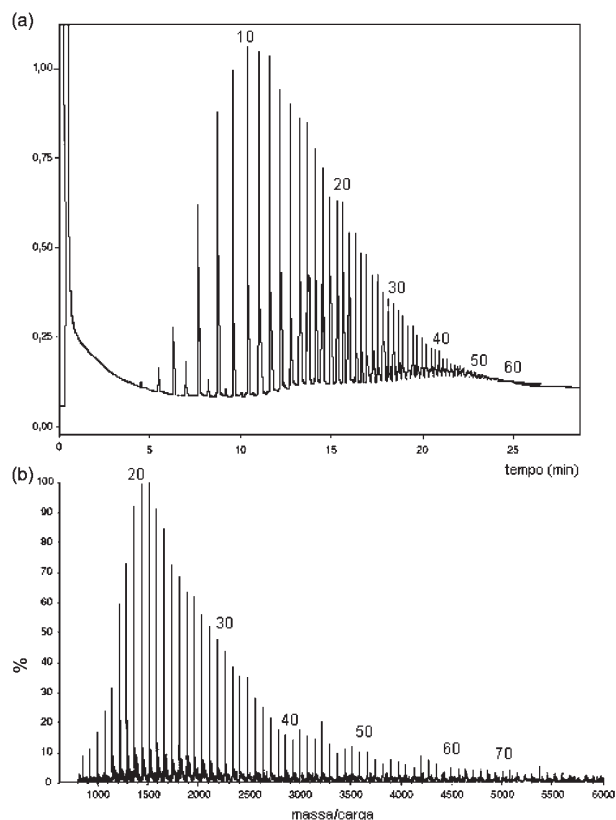


Figura 6. Análise da amostra A: solução 1% (v/v) de óleo de silicone em acetona. (a) SFC (coluna capilar microempacotada de 150 mm x 320 μ m d.i. x 450 μ m d.o. empacotada com partículas ODS de 5 μ m, P = 8-36 MPa e volume de injeção de 60 nL), (b) MALDI-TOF-MS do intervalo F. Reproduzido da ref. 54, com permissão da Wiley - VCH

Anton e Siffrin⁶⁹ aplicaram sua vasta experiência na área farmacêutica e publicaram um sumário dos aspectos dos métodos desenvolvidos relacionados a Boas Práticas de Manipulação (GMP). Foram descritos procedimentos padrões de operação para medidas e calibração de vários parâmetros instrumentais, como gradiente, pressão da fase-móvel, detector, etc. Alguns exemplos ilustrativos de determinação de esteróides podem ser vistos no artigo de Yaku e Morishita⁷⁰.

Koh *et al.*⁷¹ revisaram a combinação de várias técnicas, incluindo SFC-MS, para análise de compostos farmacêuticos. Discutiram ainda que os avanços na instrumentação analítica estão propiciando a descoberta de novas drogas para a prevenção e o tratamento de doenças.

Srinivas⁷² discutiu a existência da estereosseletividade no metabolismo e na disposição de drogas, acoplada à existência do polimorfismo genético e a modulação cinética do enantiômero, e o quanto a SFC auxilia na determinação da bioequivalência utilizando-se da estereosseletividade.

Borman *et al.*⁷³ compararam a eficiência dos sistemas HPLC, SFC e CE na determinação de mais de 100 amostras farmacêuticas racêmicas. Estas amostras requerem um sistema de análise capaz de identificar os diferentes pares de enantiômeros. Os resultados obtidos sugerem que as três técnicas são equivalentes no seu potencial de uso. Jiang *et al.*⁷⁴ desenvolveram um processo para separação do alfa-tocoferol do gama e delta-tocoferóis por SFC. Os efeitos da pressão, da temperatura, do fator de retenção e resolução foram estudados. Jiang *et al.*⁷⁵ separaram tocoferóis por SFC utilizando uma coluna ODS.

Zhao *et al.*⁷⁶ desenvolveram um método rápido para separação quiral de drogas usando SFC-MS e concluíram que as amostras enantioméricas podem ser determinadas por SFC-MS com limite de detecção menor que por UV e com tempo de análise menor, se comparado com LC de fase reversa.

Bernal *et al.*⁶² fizeram um estudo comparativo da separação de drogas, e respectivos precursores, com atividade antifúngica por SFC e HPLC e os resultados mostraram que a separação obtida por SFC, como na Figura 7, era melhor em termos da alta resolução

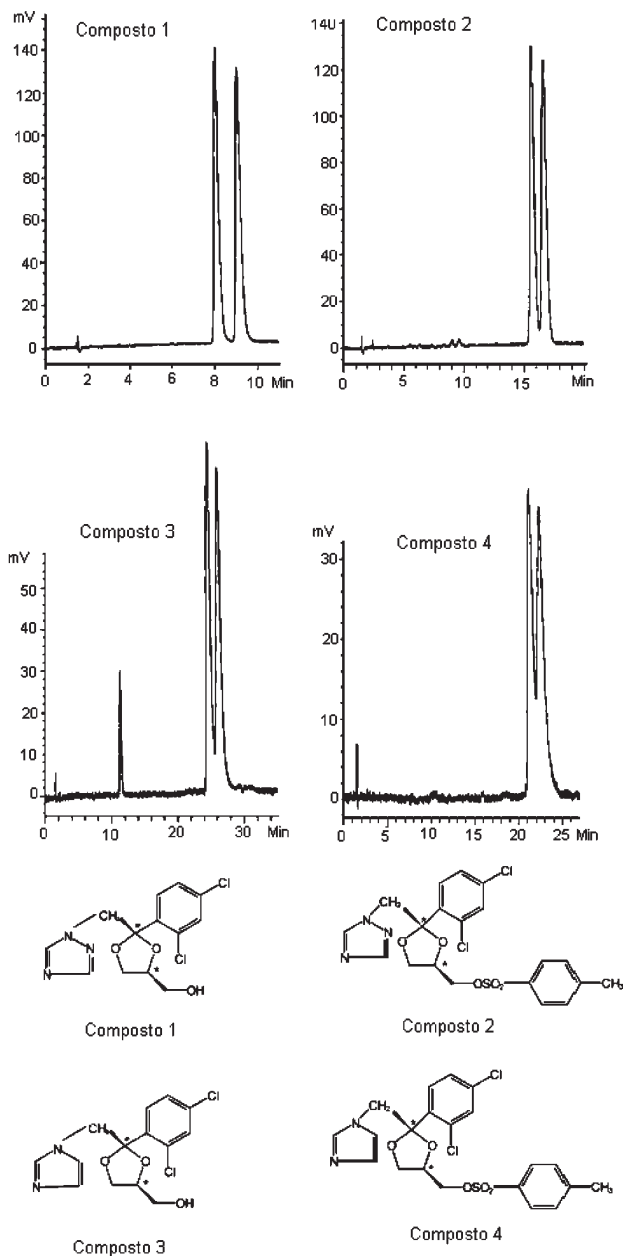


Figura 7. Separação por SFC dos compostos 1,2,3 e 4 usando uma coluna Chiralcel OD (250 x 4,6 mm) e 10% de etanol como modificador para os compostos 1,2 e 4 e 5% de metanol como modificador para o composto 3. Volume de injeção = 5 μ L; **Composto 1** cis [2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmetil)-1,3-dioxolan-4-yl]metanol; **Composto 2** cis [2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmetil)-1,3-dioxolan-4-yl]metil p-toluensulfonato; **Composto 3** cis [2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-imidazol-1-ylmetil)-1,3-dioxolan-4-yl]metanol; **Composto 4** cis [2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-imidazol-1-ylmetil)-1,3-dioxolan-4-yl]metil p-toluensulfonato. Reproduzido da ref. 62, com permissão da Elsevier Science

obtida com menor tempo de análise, que os obtidos por HPLC.

Barnhart *et al.*⁷⁷ desenvolveram um método utilizando duas colunas quirais para separar uma mistura de compostos farmacêuticos estereoisômeros via SFC com uma fase móvel composta de 90% de CO₂ líquido e 10% de solvente orgânico. Um estudo sobre o efeito do modificador orgânico na ordem de eluição permitiu a determinação de uma purificação mais eficiente de uma mistura com dois ou mais estereoisômeros.

Majewski *et al.*⁷⁸ descreveram os princípios e as aplicações da SFC como uma técnica rápida e eficiente, durante o desenvolvimento e a purificação de novos compostos farmacêuticos.

CONCLUSÕES

O uso rotineiro da técnica de análise por SFC produz uma separação em aproximadamente um terço do tempo necessário por HPLC de fase reversa, o que torna a SFC mais atrativa. Além disso, a SFC apresenta algumas características interessantes: a temperatura e pressão da fase móvel favorecem o ajuste da seletividade; o controle da viscosidade da fase móvel com a manipulação da pressão; a regulagem da razão de difusão permitindo análises mais rápidas, mas sem dúvida, o alto poder de solvatação a baixas temperaturas favorece a análise de analitos termolábeis.

O uso crescente da SFC em escala analítica destaca-se principalmente em aplicações farmacêuticas, onde um rápido avanço vem ocorrendo, porque as análises e o estudo de novas drogas representa um mercado multimilionário. Todavia, a SFC e a HPLC de fase reversa são complementares e têm apresentado um papel importante nas aplicações farmacêuticas. Ambas as técnicas são responsáveis por três quartos da resolução de problemas analíticos.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e à FAPESP pelo suporte financeiro ao laboratório CROMA/IQSC/USP.

REFERÊNCIAS

- Chester, T. L.; Pinkston, J. D.; *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2801.
- Carrilho, E.; Tavares, M. C. H.; Lanças, F. M.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 509.
- Carrilho, E.; Tavares, M. C. H.; Lanças, F. M.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 687.
- Chester, T. L. Em *Supercritical fluid chromatography for the analysis of oleochemicals*; King, J. W.; List, G. R., eds.; AOCS Press: Champaign, IL, 1996.
- Flament, I.; Keller, U.; Wunsche, L. Em *Use of semi-preparative supercritical fluid chromatography for the separation and isolation of flavor and food constituents*; Rizvi, S. S. H., ed.; Blackie: Glasgow, U.K., 1994.
- Lafosse, M.; Herbreteau, B.; Morin-Allory, L.; *J. Chromatogr.* **1996**, *720*, 61.
- Salvador, A.; Herbreteau, B.; Lafosse, M.; Dreux, M.; *J. Chromatogr.* **1997**, *785*, 195.
- Huber, W.; Molerro, A.; Pereyra, C.; Martinez de la Ossa, E.; *J. Chromatogr.* **1995**, *715*, 333.
- Buskov, S.; Sorensen, H.; Sorensen, S.; *J. High Resol. Chromatogr.* **1999**, *22*, 339.
- De la Fuente, M. A.; Juárez, M.; *Food Sci. Technol. Int.* **1999**, *5*, 103.
- Andrikopoulos, N. K.; *Crit. Rev. Food Sci.* **2002**, *42*, 473.
- Sandra, P.; Medvedovici, A.; David, F.; *LC GC Europe* **2003**, *16*, 32.
- Hirata, Y.; Hashiguchi, T.; Kawata, E.; *J. Sep. Sci.* **2003**, *26*, 531.
- Jochum, M.; Pieper, A.; Engelhardt, H.; *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* **2001**, *97*, 285.
- Turner, C.; King, J. W.; Mathiasson, L.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *936*, 215.
- Ibanez, E.; Palácios, J.; Senorans, F. J.; Santa-Maria, G.; Tabera, J.; Reglero, G.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2000**, *77*, 187.
- Furr, H.C.; *J. Nut.* **2004**, *134*, 281S.
- Desmet, K.; Sandra, P.; Vizvardi, K.; Hoornaert, G.J.; Van der Eycken, E.; *J. Microcol. Sep.* **2001**, *13*, 163.
- King, J. W.; *J. Microcol. Sep.* **1998**, *10*, 33.
- Yamada, A.; Ezaki, Y.; Matsuo, K.; Yaritha, T.; Nomura, A.; *J. Chromatogr.* **1995**, *709*, 345.

21. Bicchi, C.; Rubiolo, P.; Fresia, M.; David, F.; Sandra, P.; *Phytochem. Anal.* **1996**, *7*, 37.
22. Dugo, P.; Mondello, L.; Dugo, G.; Heaton, D. M.; Bartle, K. D.; Clifford, A. A.; Myers, P.; *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 3900.
23. Bicchi, C.; Balbo, C.; Rubiolo, P.; *J. Chromatogr.* **1997**, *779*, 315.
24. Bicchi, C.; Binello, A.; Rubiolo, P.; *Phytochem. Anal.* **2000**, *11*, 179.
25. Tavares, M. C. H.; Vilegas, J. H. Y.; Lanças, F. M.; *Phytochem. Anal.* **2001**, *12*, 134.
26. Jarvis, A. P.; Morgan, E. D.; *Phytochem. Anal.* **2000**, *11*, 184.
27. Qi, G. P.; Zhao, S. Q.; *Chin. J. Anal. Chem.* **2002**, *30*, 1477.
28. Lesellier, E.; West, C.; Tchaplá, A.; *J. Chromatogr., A* **2003**, *1018*, 225.
29. Kataoka, H.; Ryu, S.; Sakiyama, N.; Makita, M.; *J. Chromatogr., A* **1996**, *726*, 253.
30. Le Bot, B.; Colliaux, K.; Pelle, D.; Briens, C.; Seux, R.; Clement, M.; *Chromatographia* **2002**, *56*, 161.
31. Morlier, L. W.; Tomkins, D. F.; *J. AOAC Int.* **1997**, *80*, 464.
32. <http://isi3.isiknowledge.com/>, acessada em Março 2004.
33. Berger, T. A.; *Chromatographia* **1995**, *41*, 471.
34. Bicchi, C.; Balbo, C.; D'Amato, A.; Panero, O.; *Chromatographia* **1996**, *43*, 439.
35. Bernal, J. L.; Jimenez, J. J.; Rivera, J. M.; Toribio, L.; del Nozal, M. J.; *J. Chromatogr.* **1996**, *754*, 145.
36. Dost, K.; Jones, D. C.; Auerbach, R.; Davidson, G.; *Analyst* **2000**, *125*, 1751.
37. Thiebaut, D. R. P.; Robert, E. C.; *Analisis* **1999**, *27*, 681.
38. Levy, J. M.; *J. High Resol. Chromatogr.* **1994**, *17*, 212.
39. Richter, B. E.; Jones, B. A.; Porter, N. L.; *J. Chromatogr. Sci.* **1998**, *36*, 444.
40. Nomura, A.; Yamada, J.; Yarita, T.; Maeda, T.; *J. Supercrit. Fluids* **1995**, *8*, 329.
41. Xu, C.; Keng, C.; Hu, Y.; Wang, R.; Lin, S.; *Chin. J. Chem. Eng.* **1996**, *4*, 359.
42. Venter, A.; Rohwer, E. R.; Laubscher, A. E.; *J. Chromatogr., A* **1999**, *847*, 309.
43. Lesellier, E.; *Analisis* **1999**, *27*, 241.
44. Gritti, F.; Felix, G.; Achard, M. F.; Hardouin, F.; *Chromatographia* **2001**, *53*, 201.
45. Tavares, M. C. H.; Lanças, F. M.; *J. High Resol. Chromatogr.* **2000**, *23*, 515.
46. Satou, M.; Itoh, D.; Hattori, H.; Yoshida, T.; *Fuel* **2000**, *79*, 339.
47. Albuquerque, F. C.; *J. Sep. Sci.* **2003**, *26*, 1403.
48. Saito, Y.; Ohta, H.; Jinno, K.; *J. Sep. Sci.* **2003**, *26*, 225.
49. Auerbach, R. H.; Dost, K.; Jones, D. C.; Davidson, G.; *Analyst* **1999**, *124*, 1501.
50. Wu, N.; Yee, R.; Lee, M. L.; *Chromatographia* **2001**, *53*, 197.
51. Pinkston, J. D.; Marapane, S. B.; Jordan, G. T.; Clair, B.D.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**, *13*, 1195.
52. Desbene, P. L.; Yver, B.; Desmazieres, B.; *J. Chromatogr., A* **1998**, *813*, 121.
53. Jordan, S. L.; Taylor, L. T.; Seemuth, P. D.; Miller, R. J.; *Text. Chem. Color.* **1997**, *29*, 25.
54. Chmelik, J.; Planeta, J.; Rehulka, P.; *J. Mass Spectrom.* **2001**, *36*, 760.
55. Hatara, K.; Kitayama, T.; Ute, K.; Nishiura, T.; *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2004**, *42*, 416.
56. Jenke, D.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2003**, *26*, 2417.
57. Johnston, D.; Ashraf-Khorassani, M.; Taylor, L. T.; *Chromatographia* **2003**, *57*, 533.
58. Richter, B. E.; *Chromatogr. Forum* **1986**, *6*, 52.
59. Harris, C. M.; *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 87A.
60. Dean, J. R.; Fowles, I. A.; Hitchen, S. M.; Khundker, S.; Ludkin, E.; Normand, F.; *J. AOAC Int.* **1997**, *80*, 7.
61. Patil, S. T.; Bhoir, I. C.; Bhagwat, A. M.; Sundaresan, M.; *Frenesius J. Anal. Chem.* **2000**, *367*, 91.
62. Bernal, J. T.; Toribio, L.; del Nozal, M. J.; Nieto, E. M.; Montequi, M. I.; *J. Biochem. Biophys. Methods* **2002**, *54*, 245.
63. Bernal, J. L.; del Nozal, M. J.; Rivera, J. M.; Serna, M. L.; Toribio, L.; *Chromatographia* **1996**, *42*, 89.
64. Salvador, A.; Jaime, M. A.; De La Guardia, M.; *Anal. Proc.* **1995**, *32*, 463.
65. Combs, M. T.; Ashraf-Khorassani, M.; Taylor, L. T.; *J. Chromatogr. Sci.* **1997**, *35*, 176.
66. Ruperez, F. J.; Martin, D.; Herrera, E.; Barbas, C.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *935*, 45.
67. Baiocchi, C.; Giacosa, D.; Roggero, M. A.; Marengo, E.; *J. Chromatogr. Sci.* **1996**, *34*, 399.
68. Yaku, K.; Morishita, F.; *J. Biochem. Biophys. Methods* **2000**, *43*, 59.
69. Anton, K.; Siffrin, C.; *Analisis* **1999**, *27*, 691.
70. Yaku, K.; Morishita, F.; *J. Biochem. Biophys. Methods* **2000**, *43*, 59.
71. Koh, H. L.; Yau, W. P.; Ong, P. S.; Hegde, A.; *Drug Discov. Today* **2003**, *8*, 889.
72. Srivinas, N. R.; *J. Clin. Pharmacol.* **2004**, *44*, 115.
73. Borman, P.; Boughtflower, B.; Cattanach, K.; Crane, K.; Freebairn, K.; Jonas, G.; Mutton, I.; *Chirality* **2003**, *15*, S1.
74. Jiang, C. W.; Ren, Q. L.; Wu, P. D.; Patel, A.; Sanders, M.; Thompson, D.; *J. Chromatogr., A* **2003**, *1005*, 155.
75. Jiang, C. W.; Yang, Y. W.; Ren, Q. L.; Wu, P. D.; *Chin. J. Anal. Chem.* **2003**, *31*, 1337.
76. Zhao, Y. N.; Woo, G.; Thomas, S.; Semin, D.; Sandra, P.; *J. Chromatogr., A* **2003**, *1003*, 157.
77. Barnhart, W. W.; Gahm, K. H.; Thomas, S.; Natari, S.; Semin, D.; Cheetham, J.; *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 619.
78. Majewski, W.; Valery, E.; Ludemann-Houbourger, O.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2005**, *28*, 1233.