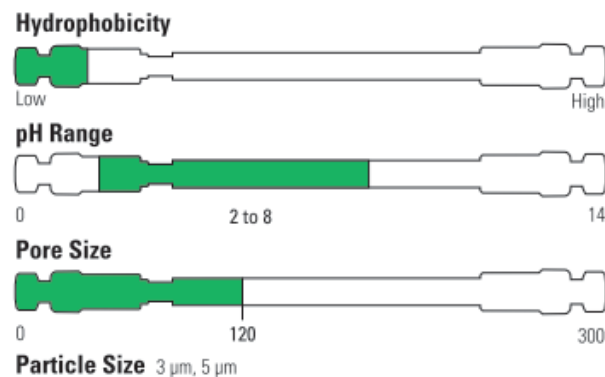
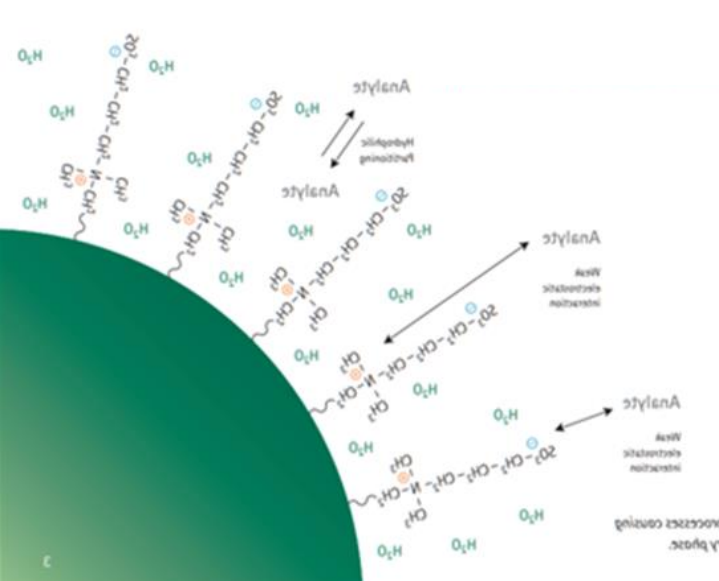
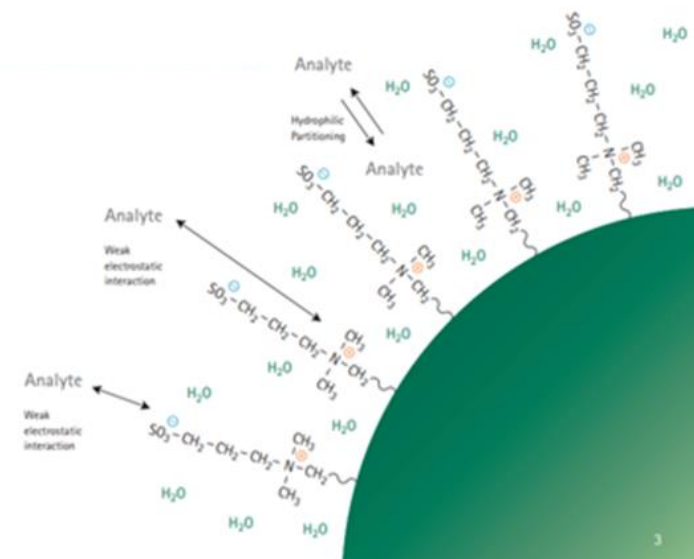


CROMATOGRAFIA LÍQUIDA POR INTERAÇÕES HIDROFÍLICAS (HILIC): HISTÓRICO, AVANÇOS RECENTES E POTENCIAL



Aluno: Paulo Emílio Barci
São Carlos, 29 de setembro de 2022



- Ferramenta alternativa
- Separação de compostos polares ($\text{LogK}_{\text{OW}} < 0$) e íons
- **HILIC** vs RPLC
- Maior eficiência de separação
- Perdas no t_0



Composição MP RPLC

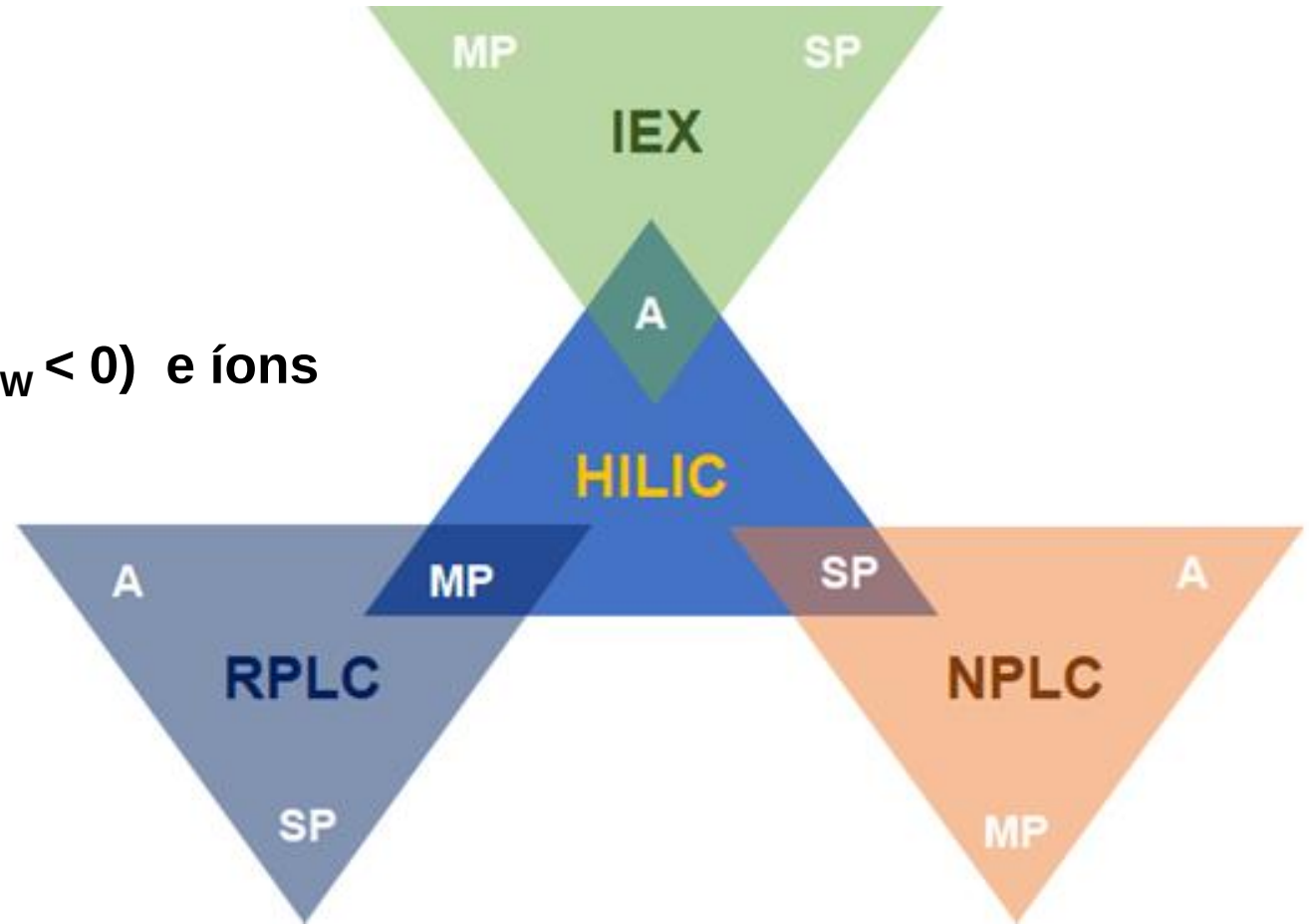


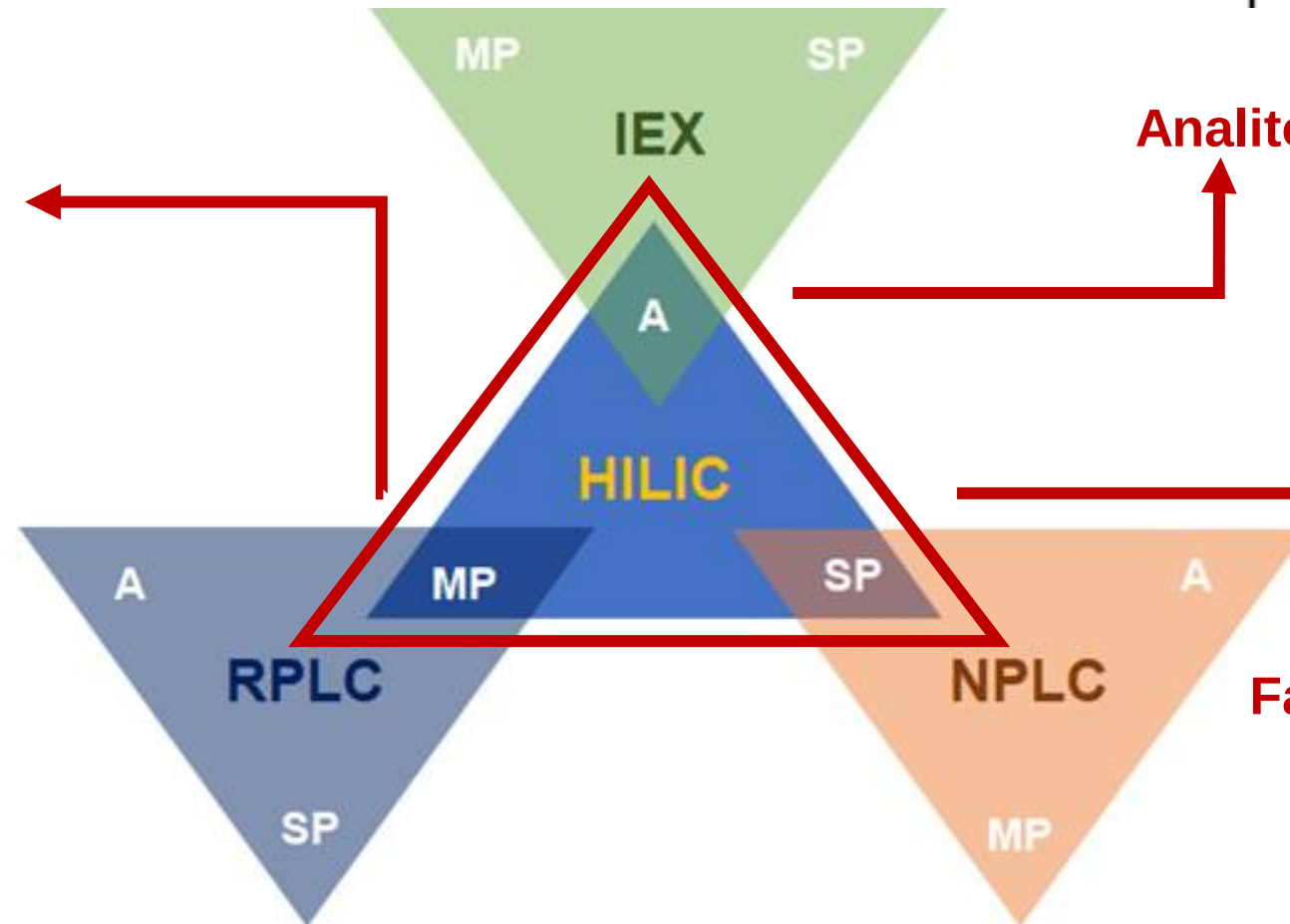
Figura 1. Diagrama de correlação entre os mecanismos de separação cromatográfica dos analitos (A) por migração diferencial entre a MP e SP na HILIC, NPLC, RPLC e IEX. Adaptado da referência [1].



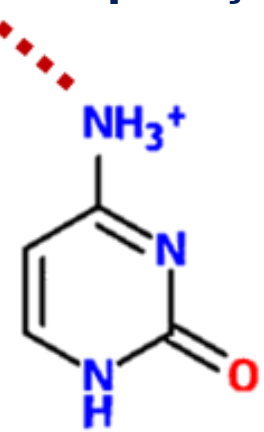
H_2O / ACN / MeOH

Aditivos

Fase móvel



Analito



Citosina

Fase estacionária

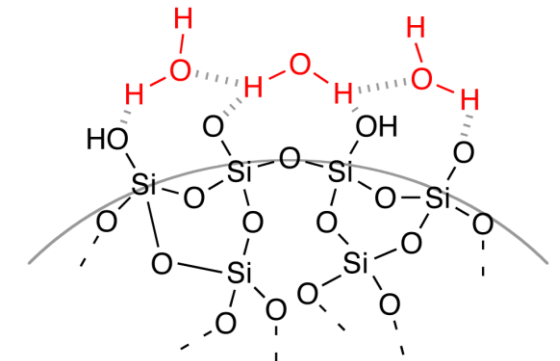
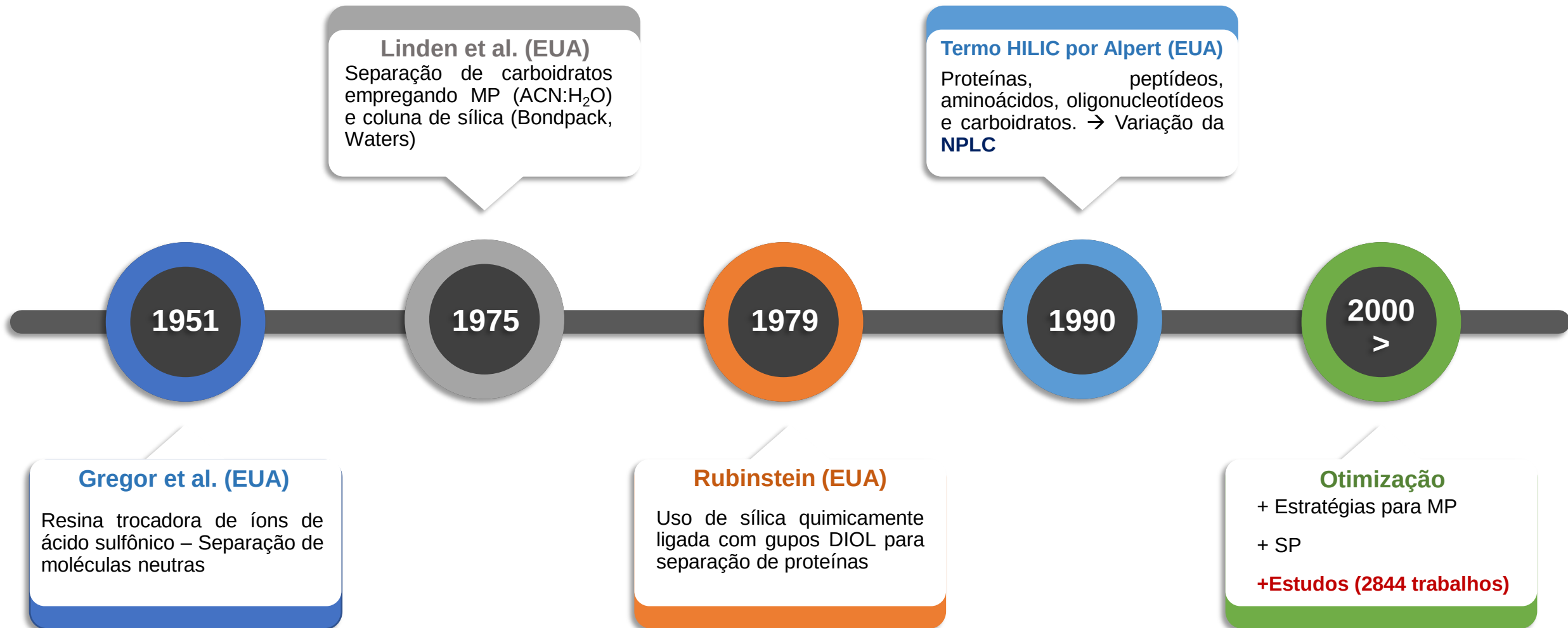


Figura 1. Diagrama de correlação entre os mecanismos de separação cromatográfica dos analitos (A) por migração diferencial entre a MP e SP na HILIC, NPLC, RPLC e IEX. Adaptado da referência [1].



- RPLC Vs **HILIC** →

- Interações hidrofílicas**

- Moléculas neutras e iônicas

- Partição hidrofílica

- Interações intermoleculares

- Dipolo-dipolo

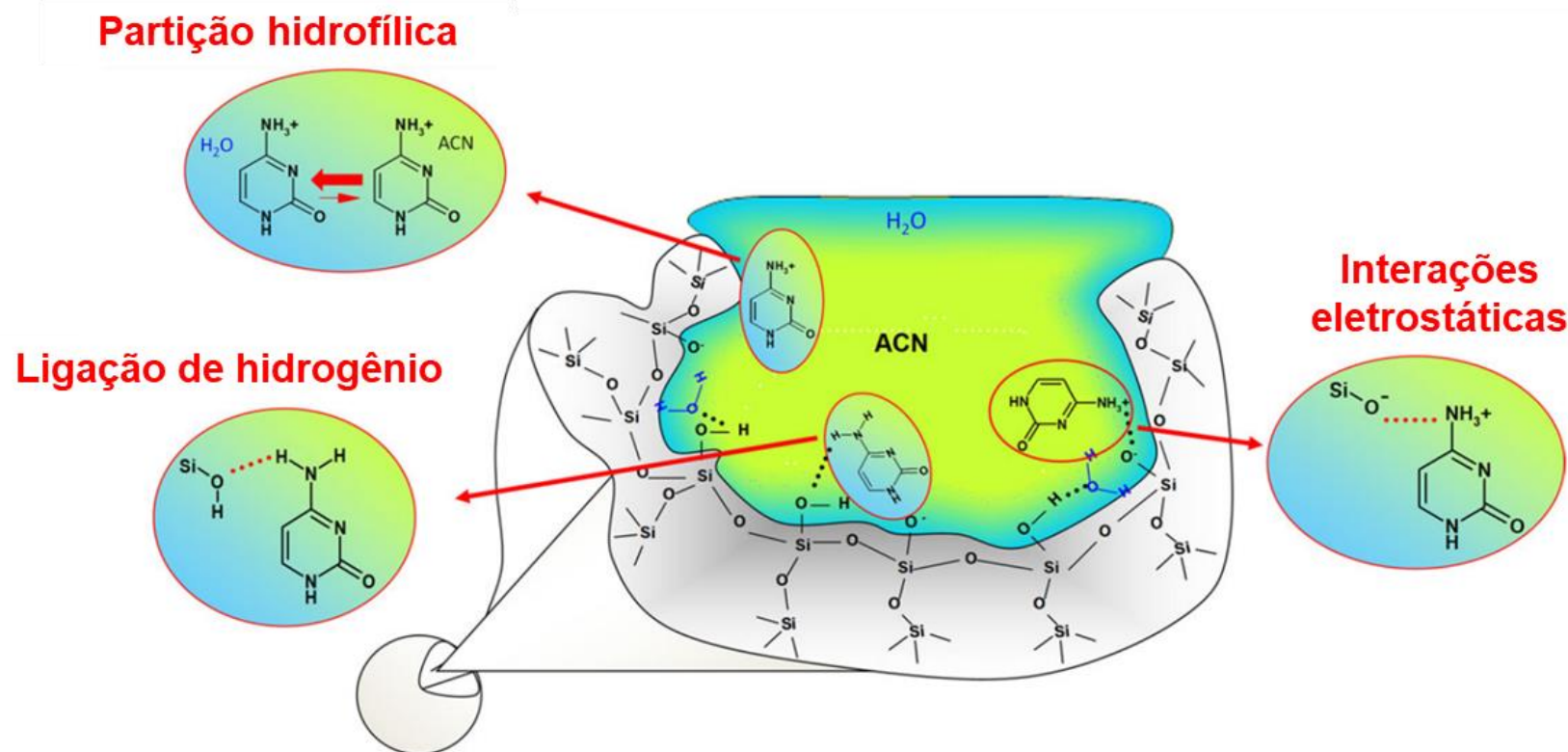


Figura 4. Representação dos mecanismos envolvidos na separação cromatográfica em HILIC. Adaptado da referência [8].

- Vantagem frente RPLC
- Equilíbrio de partição
- Menor viscosidade da MP



Menor pressão da coluna cromatográfica

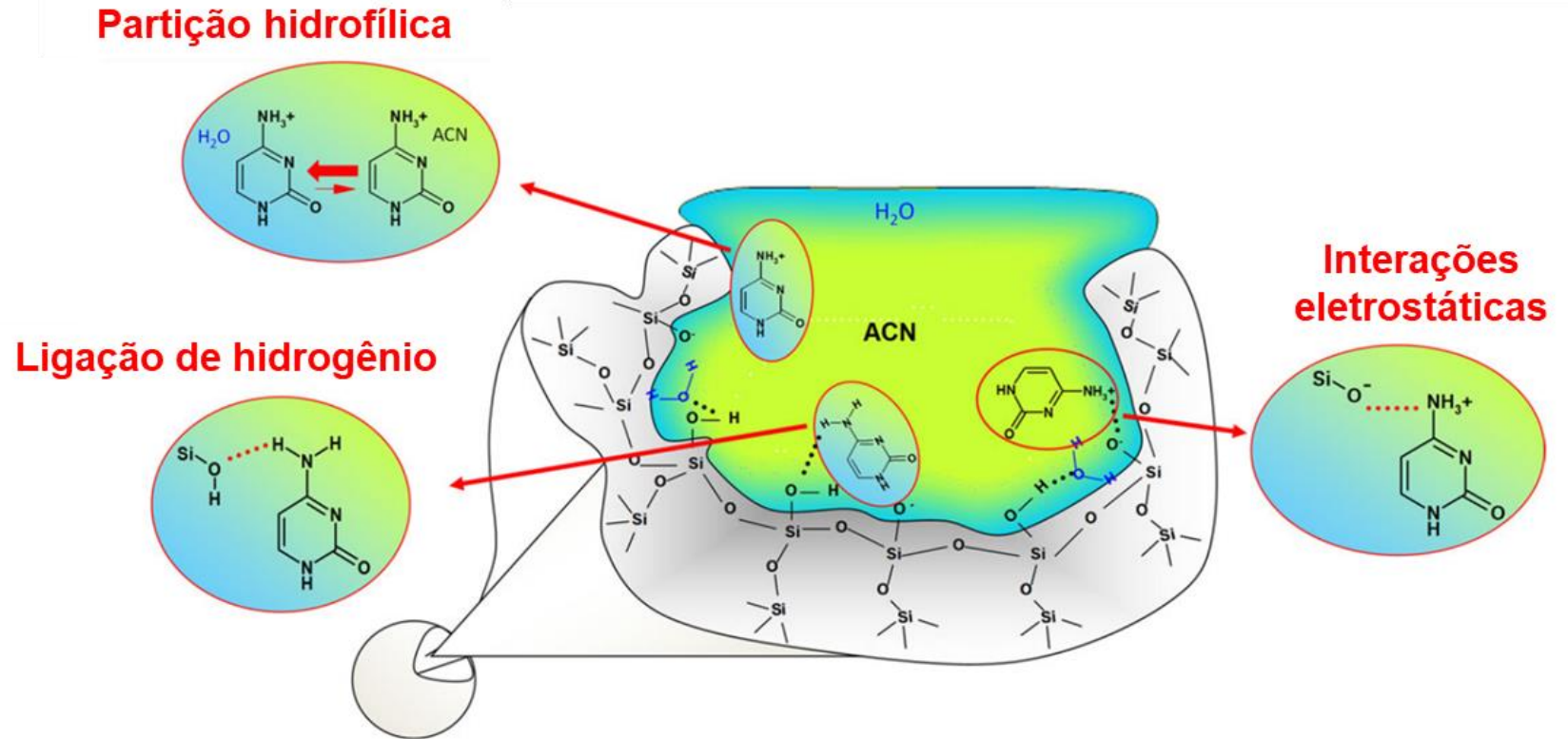


Figura 4. Representação dos mecanismos envolvidos na separação cromatográfica em HILIC. Adaptado da referência [8].

- Ionização eficiente em sistemas LC-ESI-MS

FASE MÓVEL

- MP hidro-orgânica
- Filme aquoso 3 e 40% da MP
- **ACN vs MeOH:** Performance e competição
- Ligação de hidrogênio
- Sítios ativos da SP

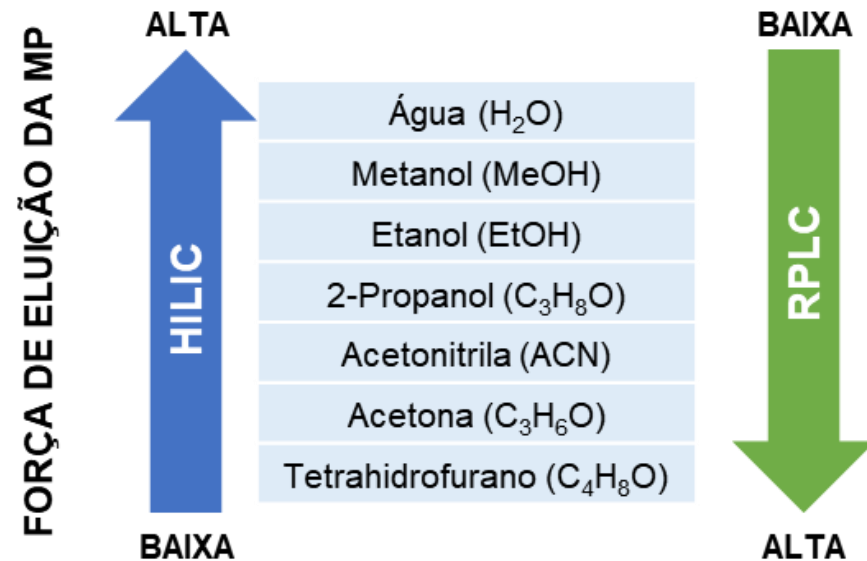


Figura 6. Efeito do solvente da amostra no formato do pico cromatográfico no modo HILIC. Adaptado da referência [2].

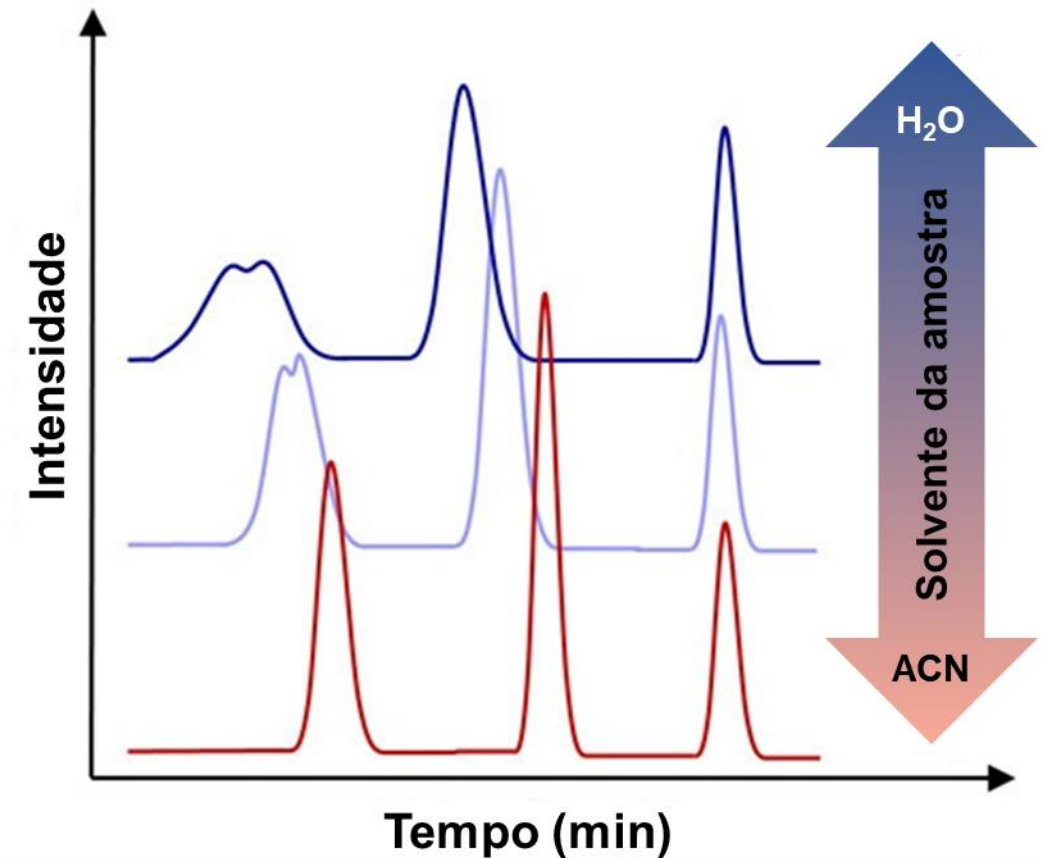
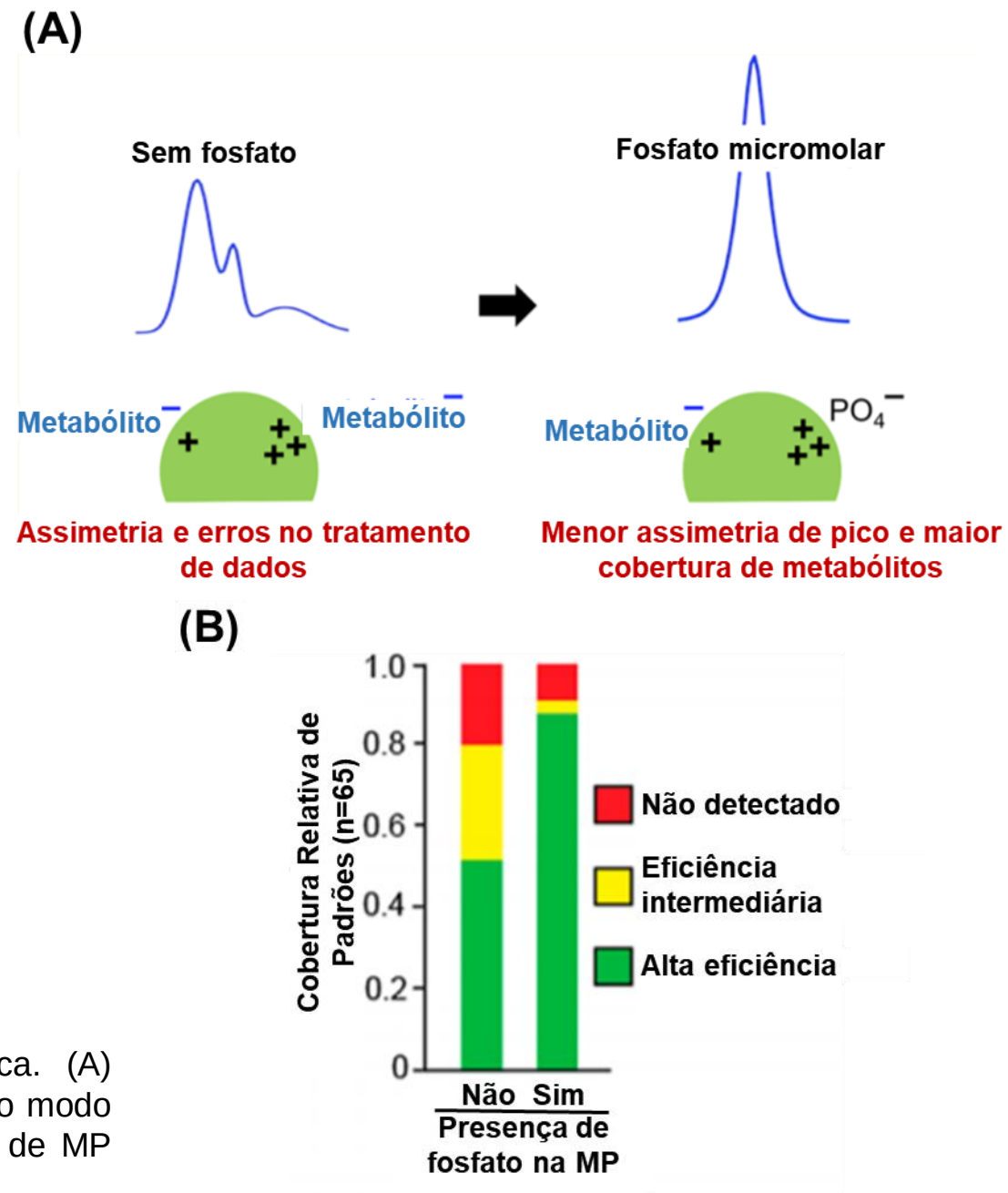


Figura 5. Diagrama de correlação entre a força de eluição da MP nos modos HILIC e RPLC. Adaptado da referência [1].

TAMPÕES E ADITIVOS

- Boa solubilidade
- Separação cromatográfica
- Diminuição da retenção → IE
- Acetato e formiato de amônio
- Favorecimento da ligação de hidrogênio
- Aumentando a retenção do analito
- Aplicação em metabolômicas
- Aumento na cobertura do metaboloma

Figura 7. Efeito do emprego de fosfato em MP para análise metabolômica. (A) Representação do efeito da adição de fosfato MP na separação cromatográfica no modo HILIC. (B) Eficiência cromatográfica para 65 padrões analíticos com o emprego de MP com e sem fosfato (5 µM de fosfato de amônio). Adaptado da referência [5].



- Traços de íon Ba^{2+}
- Aumento da seletividade
- NH_4OAc e NH_4ClO_4
- LC-UV-Vis
- Alteração do comportamento de eluição

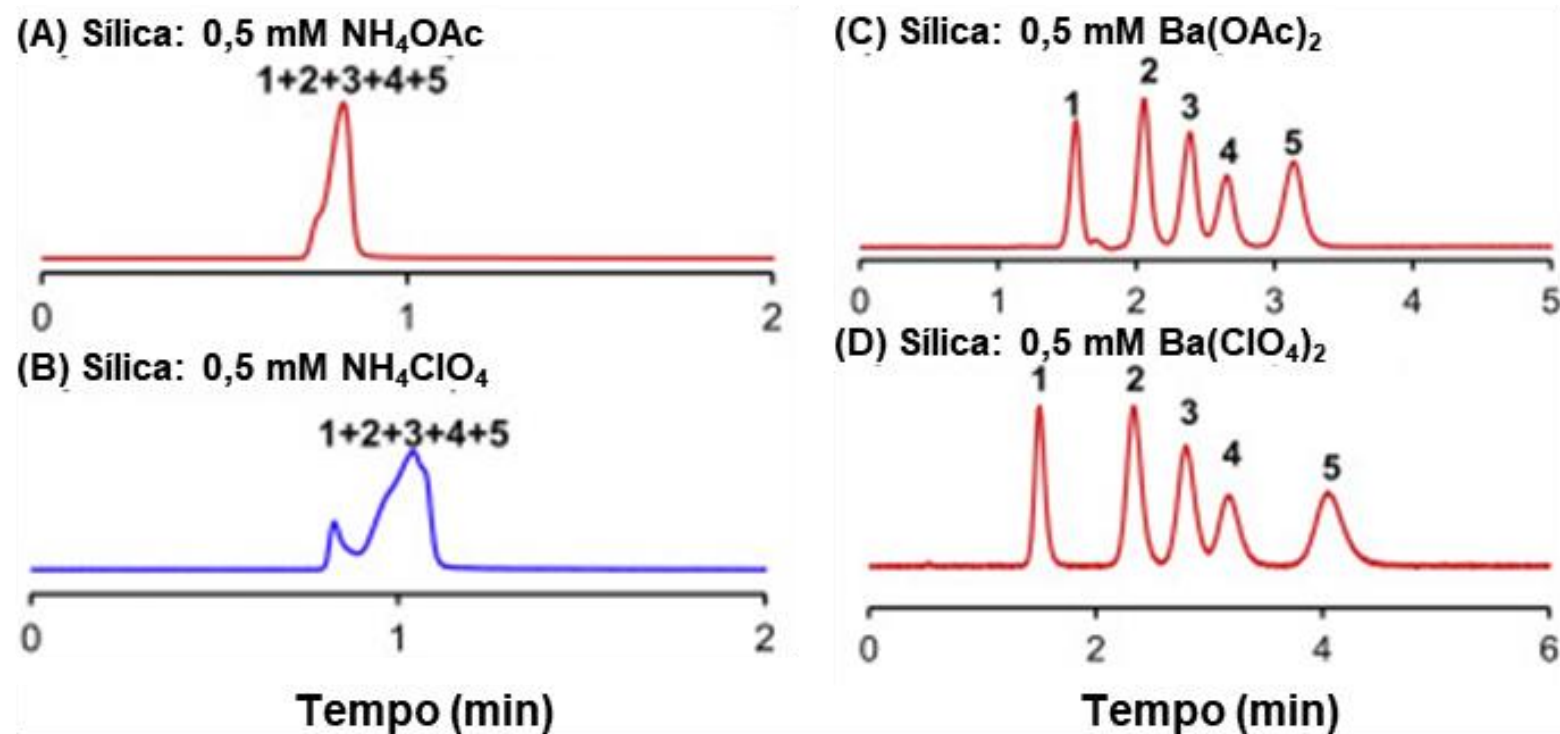
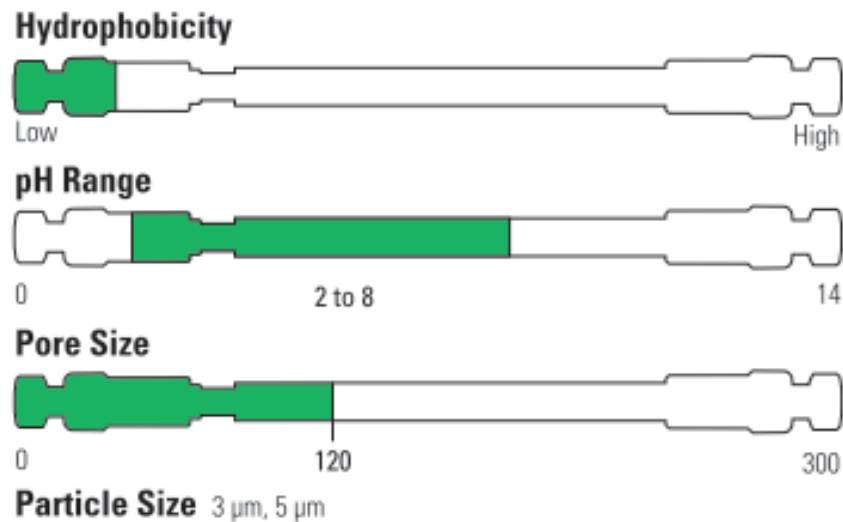


Figura 8. Avaliação da seletividade do modo HILIC para **5 ácidos sulfônicos** empregando 4 tampões diferentes em MP (ACN:H₂O; 90:10 v/v). (A) Sílica com 0,5 mM de NH_4OAc , vazão: 0,425 mL min⁻¹, (B) sílica com 0,5 mM de NH_4ClO_4 , vazão: 0,425 mL min⁻¹, (C) sílica com 0,5 mM $\text{Ba}(\text{OAc})_2$, vazão: 1 mL min⁻¹, (D) sílica com 0,5 mM $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$, vazão: mL min⁻¹. Analitos: (1) ácido antraquinona 2-sulfônico, (2) ácido p-xileno 2-sulfônico, (3) ácido benzeno sulfônico, (4) ácido anilina 2-sulfônico, (5) ácido 4-hidroxibenzenossulfônico. Adaptado da referência [6].

- Crescimento do mercado
- Atendimento de diferentes aplicações
- Obtenção de alta seletividade
- Eficiência de separação
- Classificações



Grupos

- ✓ Sílica
- ✓ Sílica quimicamente ligada
- ✓ Fases zwitteriônicas
- ✓ Líquidos iônicos
- ✓ Suportes híbridos
- ✓ Colunas monolíticas
- ✓ Carbono grafítico poroso (PGC)
- ✓ SP revestidas ou ligadas em polímero

FASES ESTACIONÁRIAS

▪ Aplicações:

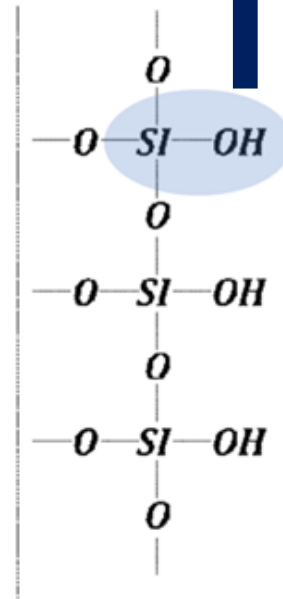
- ✓ Fármacos
- ✓ compostos polifenólicos

- Vantagem frente a SP quimicamente ligada
- Compostos fortemente ácidos e básicos → Limitação!
- Menor quantidade de água na MP

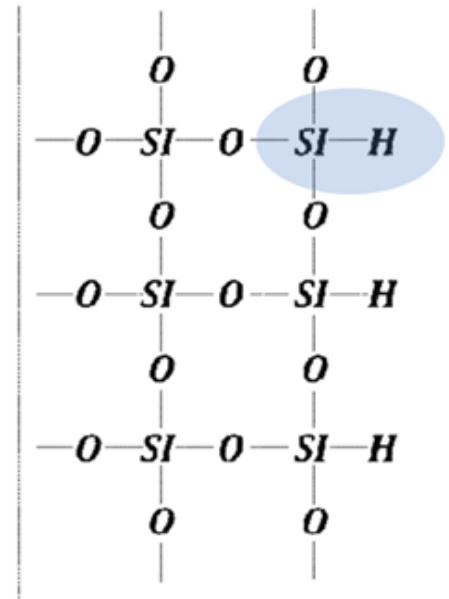
▪ Classificações:

- ✓ **Tipo A:** precipitação de uma solução contendo silicatos acidificada. **Cuidado!** → impurezas → Deformações
- ✓ **Tipo B:** agregação de sílica sol no ar → Estabilidade química (pH 9). **Cuidado!** → TFA (supressão da ionização dos grupos silanol)
- ✓ **Tipo C:** hidrólise da superfície da sílica → Menor polaridade.

Repulsão
eletrostática



(a) Sílica do tipo
A e B



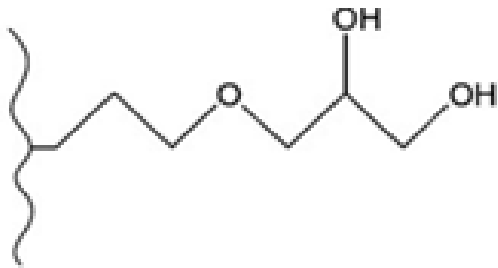
(b) Sílica do tipo
C

Figura 9. Representação da superfície da sílica gel nos tipos A e B (a) e do tipo C (b). Adaptado da referência [1,9].

FASES ESTACIONÁRIAS

▪ Diol-Sílica

- ✓ Inicialmente para separação de proteínas
- ✓ Problemas de adsorção da sílica pura
- ✓ Elevada polaridade + Formação de ligações de hidrogênio
- ✓ Decaimento das IE
- ✓ Maior interação Analito-SP
- ✓ Interação hidrofílica
- ✓ Separação de mistura de isômeros



Sílica quimicamente ligada

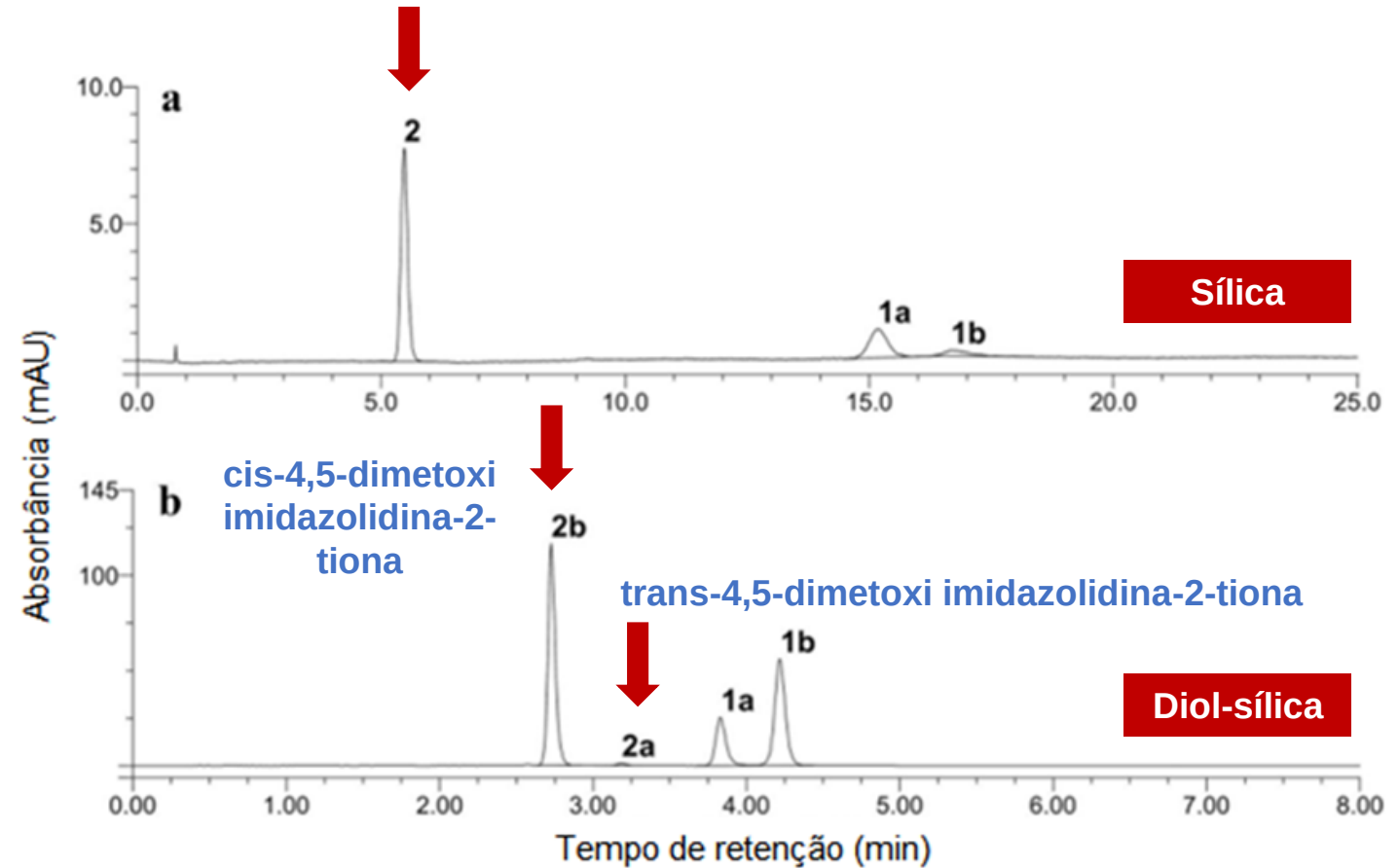


Figura 10. Cromatogramas de cromatografia líquida para a separação dos isômeros dos isômeros cis-4,5-dihidroxi imidazolidina-2-tiona (1a), trans-4,5-dihidroxi imidazolidina-2-tiona (1b), cis-4,5-dimetoxi imidazolidina-2-tiona (2a) e trans-4,5-dimetoxi imidazolidina-2-tiona (2b) com emprego (a) de coluna analítica com SP de sílica (coluna Zorbax RX-SIL 4.6×150 mm, diâmetro de partícula 5 µm), MP isopropanol/1,2-propanodiol (94:5:1, v/v/v) e (b) coluna analítica com diol quimicamente ligada a sílica (coluna Luna HILIC 200 Å, 4.6×150 mm, diâmetro de partícula 5 µm), MP acetonitrila/água (95:5, v/v). Adaptado da referência [10].

- Alquilamida ligadas a sílica
- ✓ separação cromatográfica de hormônios sexuais femininos
- ✓ Síntese em conjunto com a SP do tipo amino-ligada de forma mista com cloretos de acetil + hexanoil ou estearoil
- ✓ Mix contendo diferentes tipos de ligantes (-CN, -Ph, -C8 e -C18)



Múltiplas interações do analito com a SP →
separação de nucleosídeos

Sílica quimicamente ligada

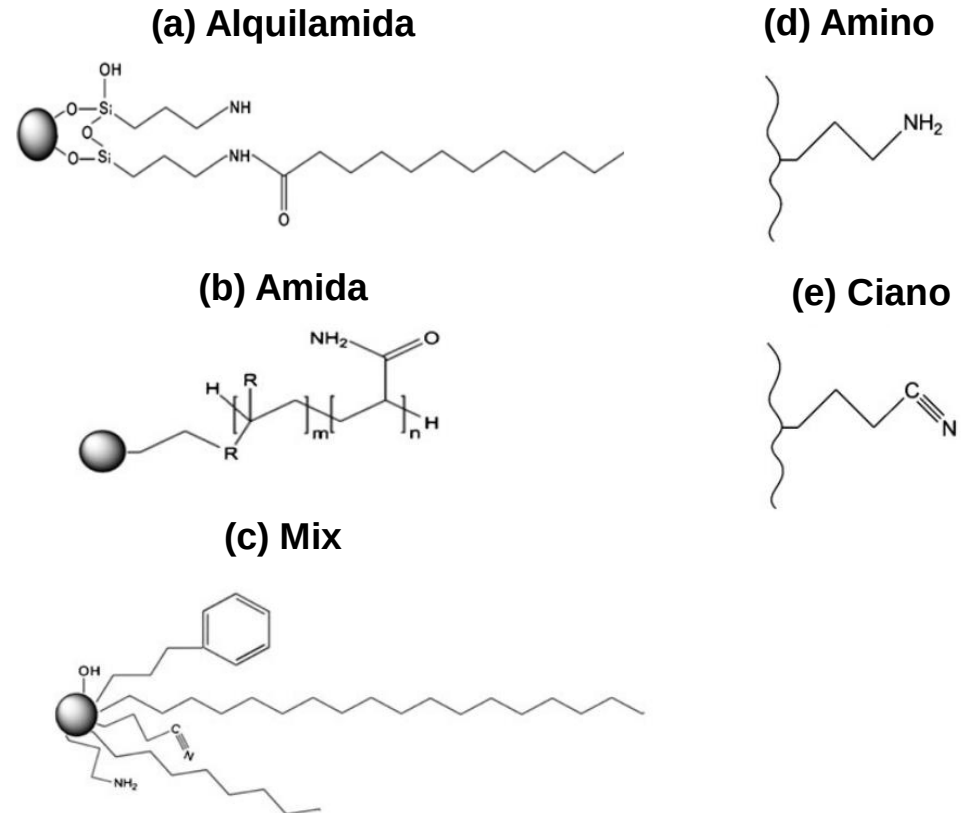


Figura 12. Representação da superfície da sílica gel quimicamente ligada com grupos (a) alquilamida, (b) amida, (c) mix de ligantes, (d) amino e (e) ciano. Adaptado das referências [12,13].

FASES ESTACIONÁRIAS

- Aminoácido e peptídica

- Aplicações

- ✓ Aminoácidos
- ✓ Peptídeos

- Mecanismo complexo

- “Quadrupolo”

- Multipontos de interações analito-SP



- ✓ Aniônicos (silanol residual, grupos carboxílicos)
- ✓ Catiônicos (grupos aminos protonados)

- Ligações de hidrogênio dependente do tipo de aminoácidos

Sílica quimicamente ligada

- Diferenças de pH → Ativação de mecanismos de separação diferentes
- Distribuição de cargas

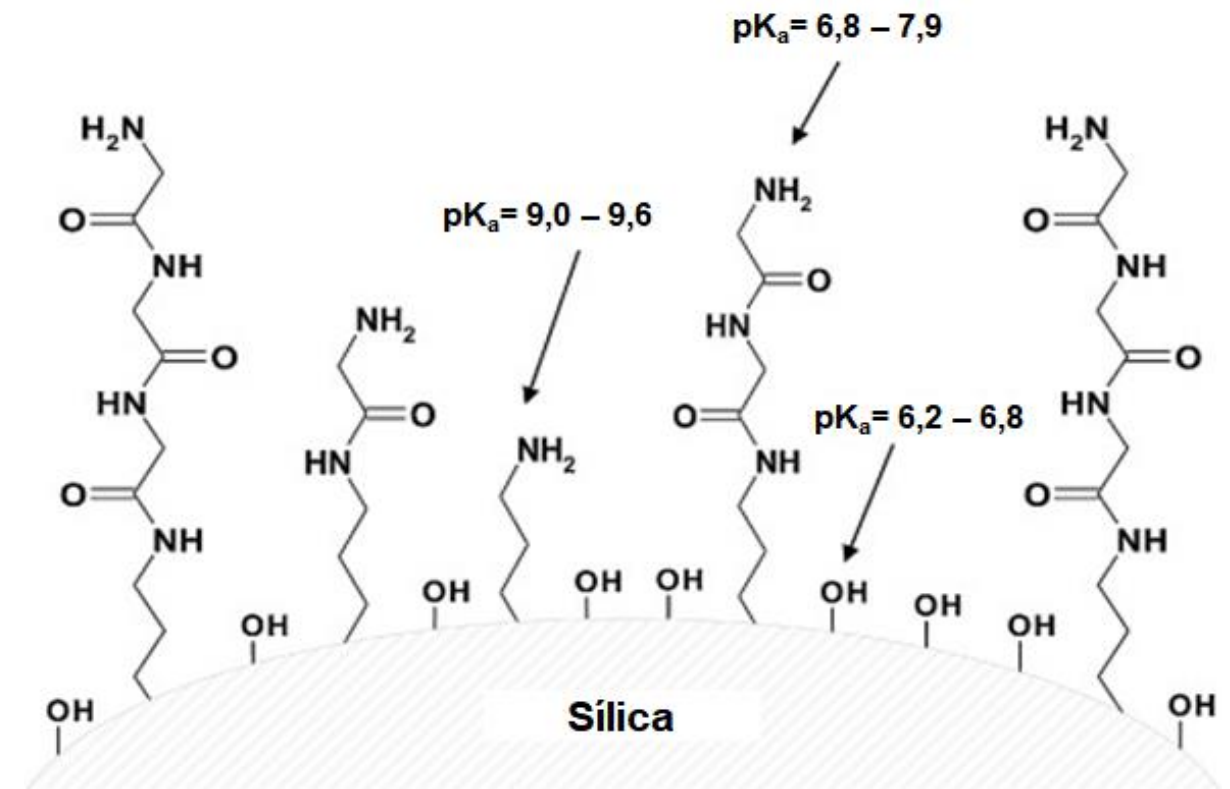


Figura 13. Estrutura de aminoácido e peptídica quimicamente ligadas em sílica em estado não ionizado. Adaptado da referência [14].

▪ Mecanismos de separação

- ✓ Partição hidrofílica dos analitos SP-MP
- ✓ Combinação de sítios iônicos com adsorção de analitos polares sobre a SP
→ **íon-íon** e **íon-dipolo**
- ✓ Fracas interações eletrostáticas

▪ Cargas (+) e (-) em proporção 1:1

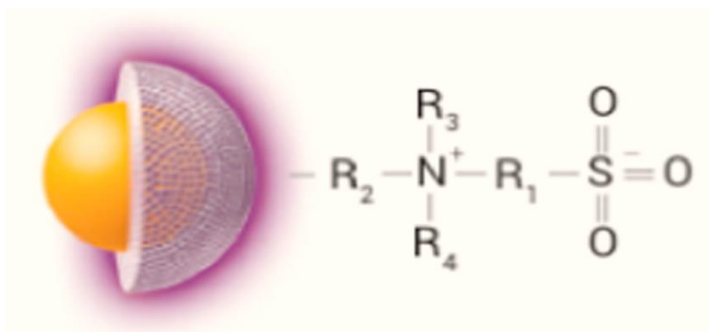


Figura 14. Representação da estrutura da SP zwitteriônica com conteúdo N, N, N-trimetil taurina ligada a um silano. Adaptado da referência [15].

▪ Aplicações

- ✓ Nucleotídeos de piridina
- ✓ Metabolitos
- ✓ Peptídeos
- ✓ Polissacarídeos
- ✓ Aminoácidos em bebidas

▪ Tipos de SP

- ✓ Sulfalquilbetaína
- ✓ Peptídica
- ✓ Amino-fosfato
- ✓ Glutathiona (GSH)

- Síntese amino-fosfato zwitteriônica
- **Aplicações:** vitaminas hidrossolúveis, ácidos orgânicos e nucleosídeos
- **Fatores cruciais para os mecanismos:** MP, tampão e temperatura do forno da coluna

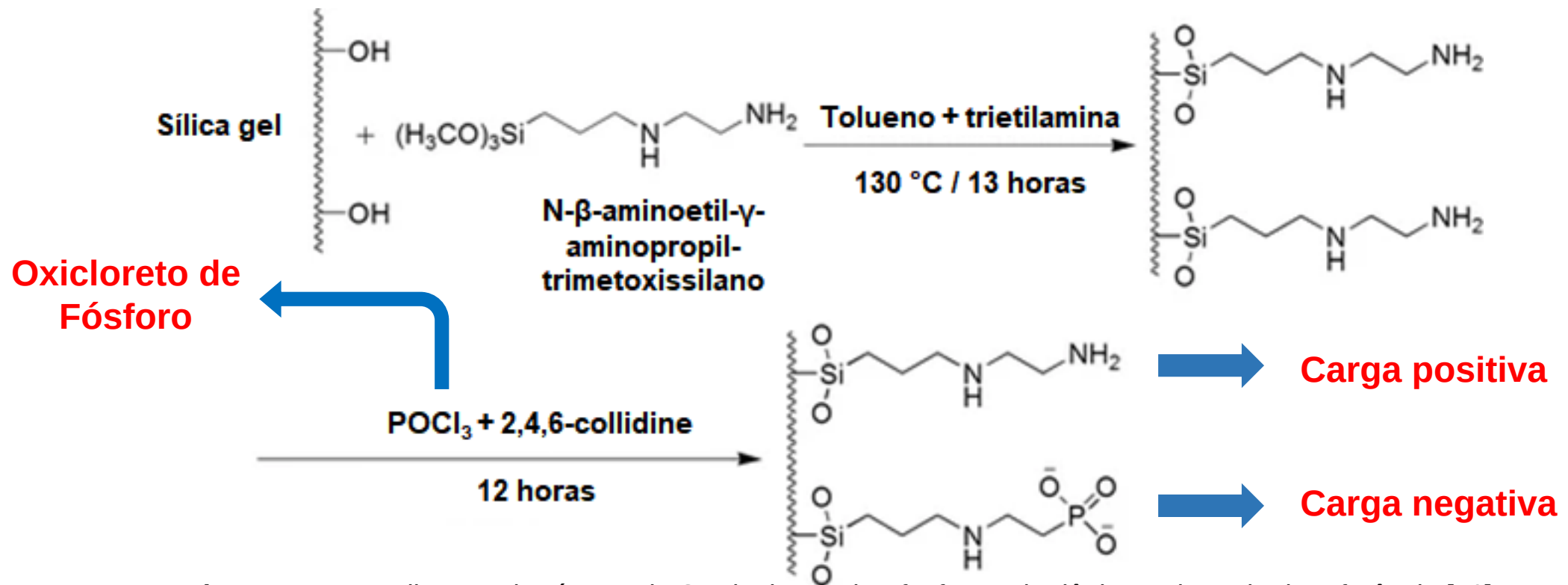


Figura 15. Procedimento de síntese da SP do tipo amino-fosfato zwitteriônica. Adaptado da referência [16].

▪ Características

- ✓ Alta condutividade
- ✓ Média estabilidade térmica
- ✓ Interações de solvatação variada
- ✓ Ampla faixa de miscibilidade e viscosidade
- ✓ Reutilização

▪ Mecanismos de separação

- ✓ Partição hidrofílica
- ✓ Processos de interação por solvatação
- ✓ Troca iônica
- ✓ Ligação de hidrogênio
- ✓ π - π *stacking*
- ✓ Interações dipolares

▪ Modos de separação

- ✓ HILIC
- ✓ NPLC
- ✓ IEX

**Dependência da
estrutura do IL
+
Proporções de
cátions e ânions**



- Síntese amida funcionalizada em imidazólio ligada em sílica
- Separação de nucleosídeos em amostras complexas como urina e mistura de flavonóides em soja
- Seletividade é otimizada → **maior quantidade de sítios ativos para diferentes mecanismos de interação do analito-SP**

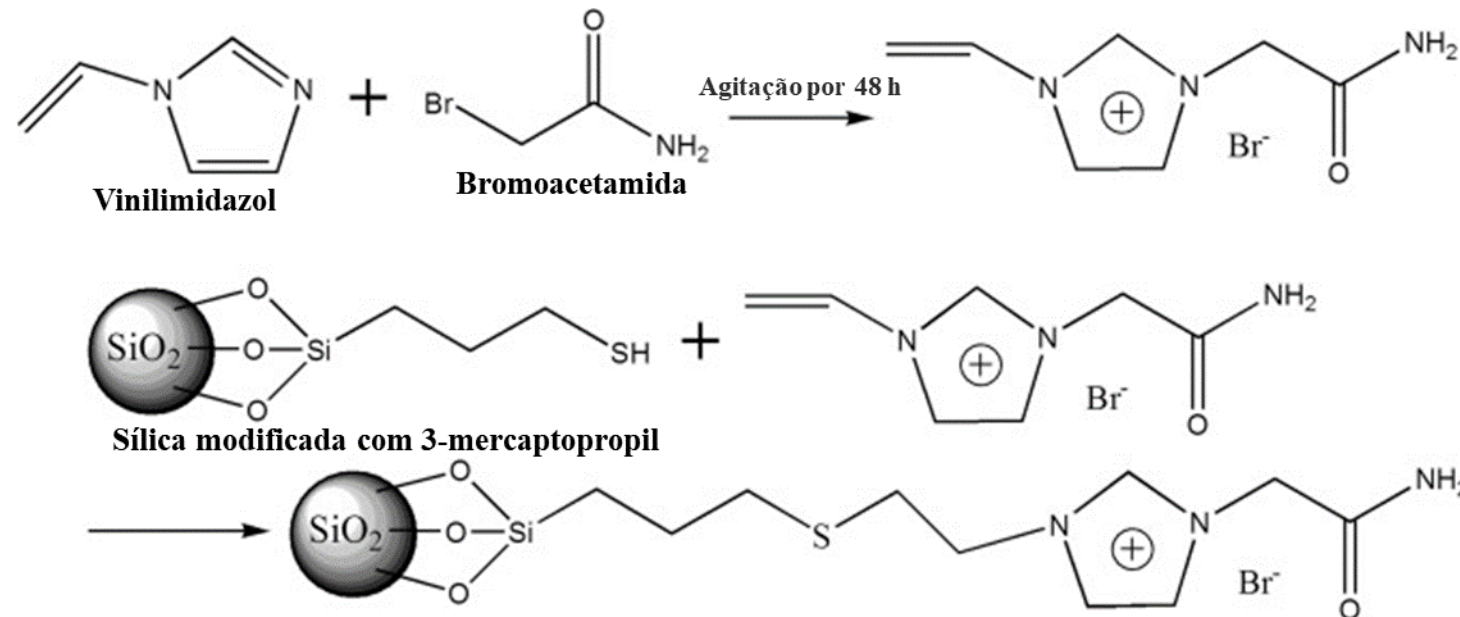


Figura 16. Síntese de amida funcionalizada em imidazólio ligada em sílica. Adaptado da referência [18].

▪ Nanomateriais de carbono (CNMs)

▪ Vantagens:

- ✓ Alta área superficial
- ✓ Estabilidade térmica
- ✓ Capacidade de adsorção
- ✓ Estabilidade mecânica
- ✓ Durabilidade
- ✓ Resistência à corrosão

▪ Materiais:

- ✓ Nanodiamantes oxidados
- ✓ Fulereno
- ✓ Pontos de carbono (CDs)

Líquidos Iônicos

▪ CDs: Tamanho entre 1 a 10 nm

- ✓ **Características:** Alta dispersão em água, alta biocompatibilidade e baixa toxicidade

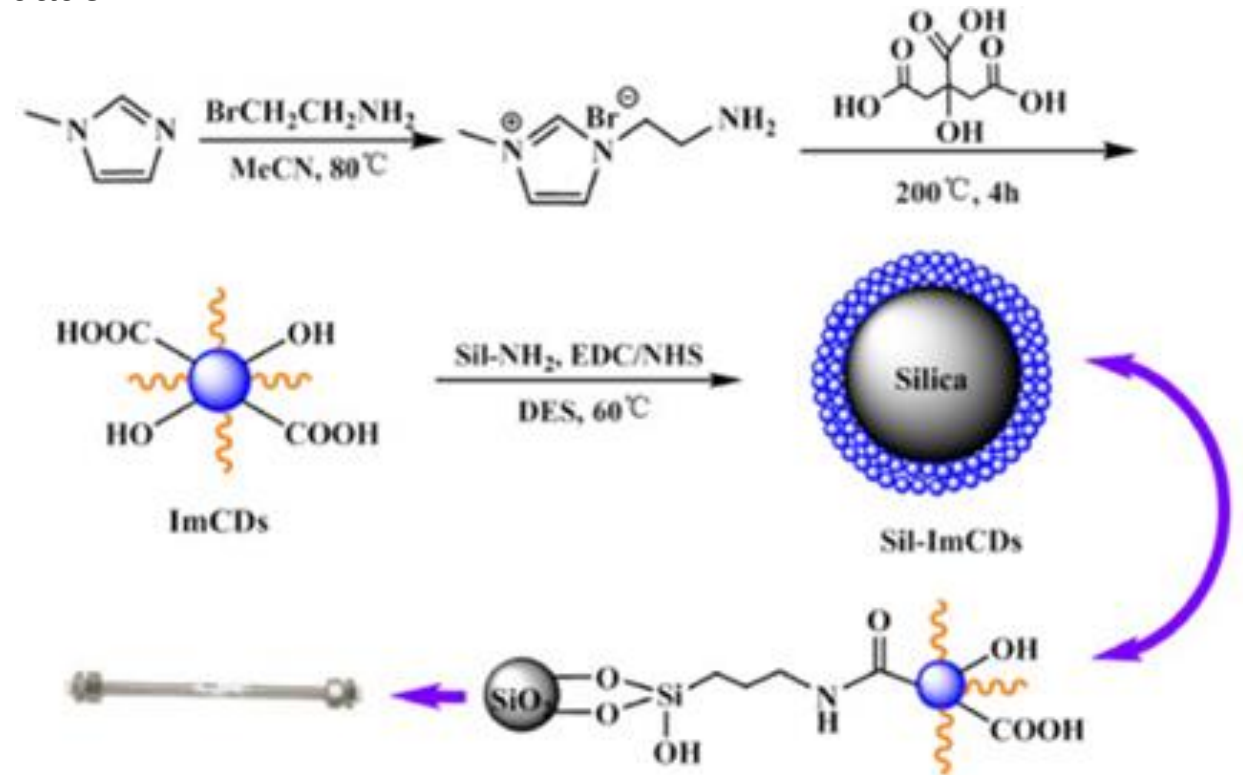


Figura 17. Síntese de imidazólio IL derivados de pontos de carbono funcionalizados em sílica (Sil-ImCDs). Adaptado da referência [19].

FASES ESTACIONÁRIAS

- Maior eficiência cromatográfica e seletividade
- Sulfametoxina com **75000 pratos teóricos/m (Sil-ImCDs)** Vs **43200 pratos teóricos/m (Sil-Im)**

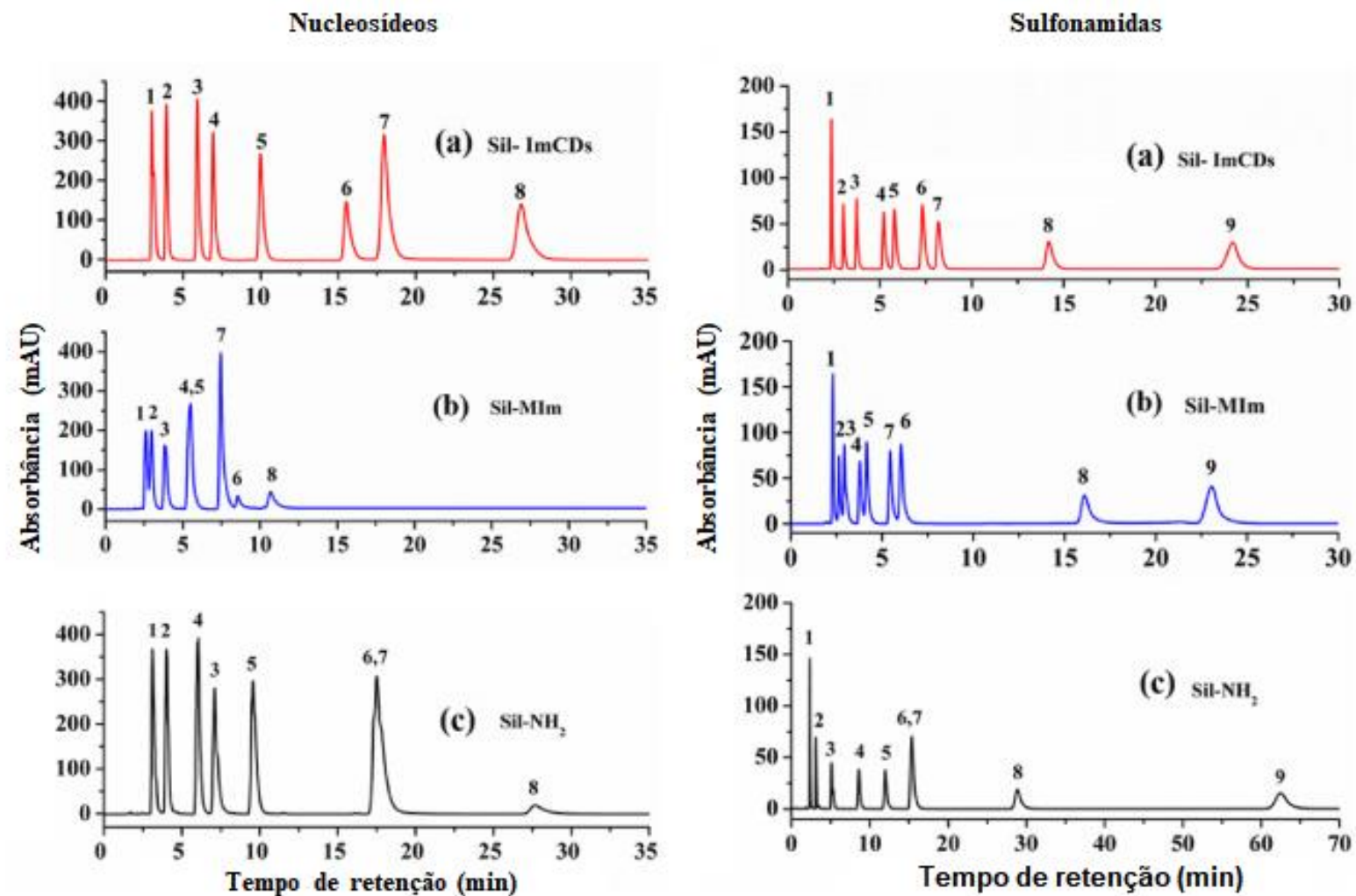


Figura 18. Separação cromatográfica de **8 nucleosídeos** (1.timina, 2.timidina, 3.uridina, 4.adenina, 5.citosina, 6.guanina, 7.citidina e 8.guanosina) e **9 sulfonamidas** (1.sulfonamida, 2.sulfapiridina, 3.sulfametazina, 4.sulfamerazina, 5.sulfametoxina, 6.sulfametoxina, 7.sulfadiazina, 8.sulfatiazol e 9.sulfaisoxazolas) empregando SPs imidazólio IL funcionalizado em fase estacionária de sílica (Sil-MIm), aminopropil suportado em sílica (Sil-NH₂) e imidazólio IL derivados de pontos de carbono funcionalizados em sílica (Sil-ImCDs). Adaptado da referência [19].

- Materiais orgânico-inorgânico híbridos
- Aumento de 10x da estabilidade química
- Remoção de 1/3 dos grupos silanol
- pH mais alcalinos (11)
- Temperaturas elevadas
- Características:
 - ✓ Menor acidez dos grupos silanol
 - ✓ Maior tempo de vida útil da SP
 - ✓ Boa resistência mecânica
 - ✓ Regulação pH → IE

Suportes híbridos

SP híbrida com ponte
de etileno - BEH

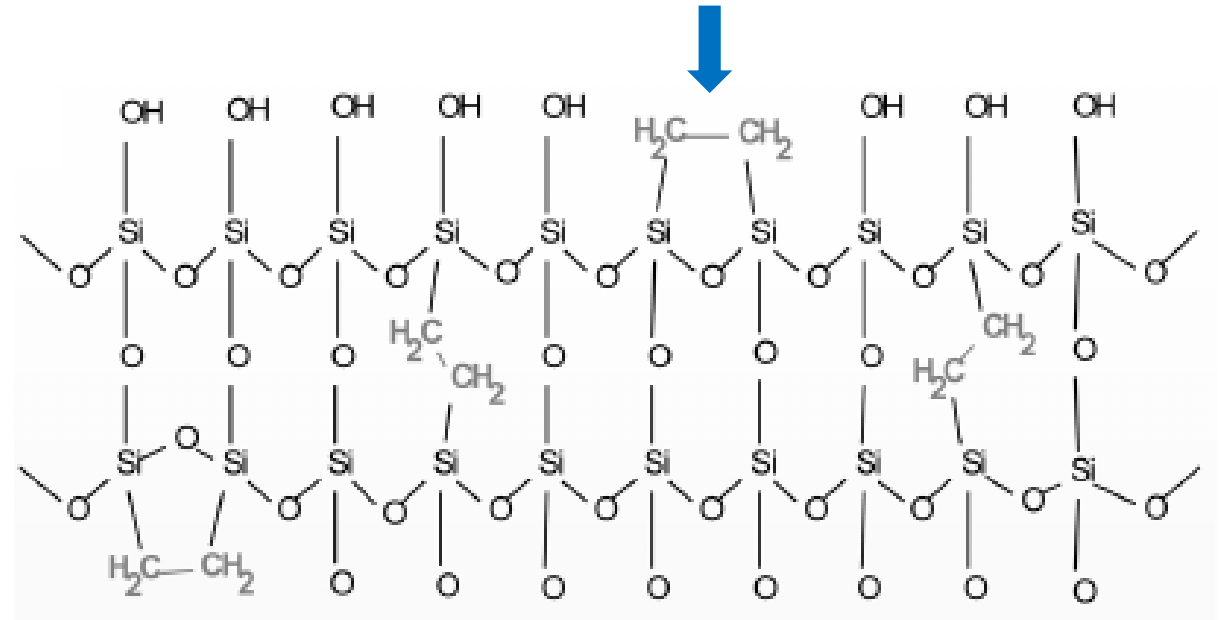


Figura 19. Estrutura da SP do tipo BEH. Adaptado da referência [20].

- Materiais orgânico-inorgânico híbridos
- Aumento de 10x da estabilidade química
- Remoção de 1/3 dos grupos silanol
- pH mais alcalinos (11)
- Temperaturas elevadas
- Características:

- ✓ Menor acidez dos grupos silanol
- ✓ **Maior tempo de vida útil da SP**
- ✓ Boa resistência mecânica
- ✓ Regulação pH → IE

Suportes híbridos

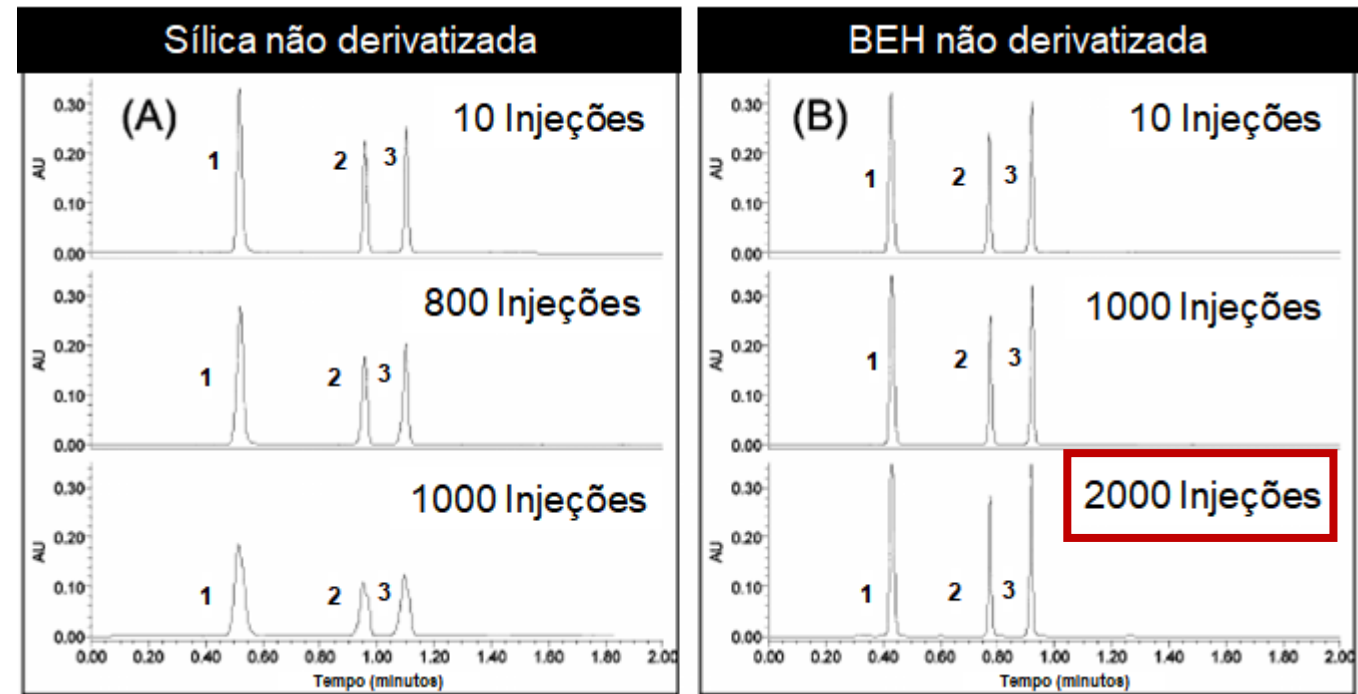


Figura 20. Teste de estabilidade química das colunas de sílica (A) e BEH (B) em **pH 5**. Gradiente de 1-99% de MP B durante 2 minutos. Vazão a 0,5 mL min⁻¹. Compostos avaliados Picos: (1) uracil, (2) 5-fluorocitosina e (3) citosina. Adaptado da referência [20].

FASES ESTACIONÁRIAS

- Fator de retenção dependente do pH

- Aplicações

- ✓ Carboidratos
- ✓ Anti-histamínicos
- ✓ Fosfolípidios em alimentos
- ✓ Genômica
- ✓ Pteridinas
- ✓ Aminoácidos
- ✓ Glicerol
- ✓ Drogas de abuso

Suportes híbridos

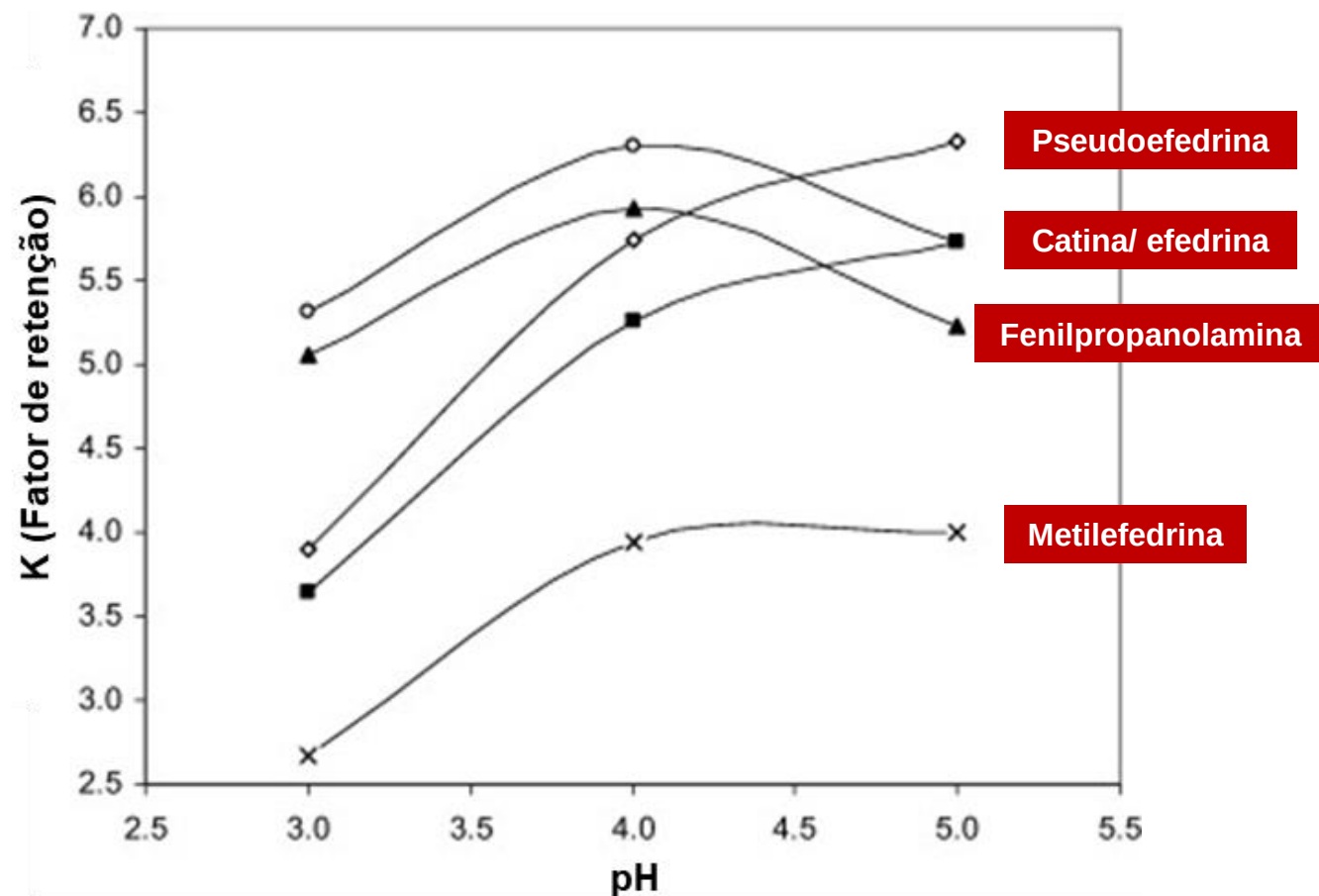


Figura 21. Fator de retenção (k) de efedrinas em coluna BEH HILIC em função do pH. Temperatura do forno da coluna: 50 °C. MP: CH₃CN:200 mM tampão acetato de amônio (95:5, v/v). Analitos: efedrina (■), fenilpropanolamina (▲), catina (○), metilefedrina (x) e pseudoefedrina (◇). Adaptado da referência [21].

- **Combinação de micro ou mesoporos**
- **Rede de poros**
- **Retenção e separação**
- **Seletividade dependente dos GF**

- ✓ Amino
- ✓ Diol
- ✓ Ciclodextrina
- ✓ Sulfoalquilbetaína
- ✓ Poli (succinimida)
- ✓ Polietilenoglicol
- ✓ Pentafluorofenilpropil
- ✓ Álcool polivinílico
- ✓ Polipeptídeo

Colunas monolíticas

▪ **Classificação:**

- ✓ Orgânicos (polimerização térmica ou fotoiniciada)
- ✓ Inorgânicos (transição sol-gel de alcoxissilanos)
- ✓ Materiais orgânico-inorgânico (híbridos)

▪ **Vantagens:**

- ✓ Elevada permeabilidade
- ✓ Baixa compressão da MP
- ✓ Análises + rápidas
- ✓ Eficiência em altas vazões

▪ **Aplicações:**

- ✓ Fármacos
- ✓ Metabolômica
- ✓ Bioanálises

- Alternativa a sílica gel
- Folhas de grafite de alta pureza
- Estrutura esférica porosa
- Retenção de compostos polares por Transferência de e^-
- Nuvem eletrônica do PGC
- Maior efeito PREG (*polar retention effect on grafite*) quando os analitos polares estão ligados a anéis aromáticos ou par de e^-
- Sobreposição dos orbitais e condutividade
- Alta estabilidade térmica e química ($T > 200\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pH 0-14)
- Variada modificações da superfície do carbono

Carbono grafítico poroso (PGC)

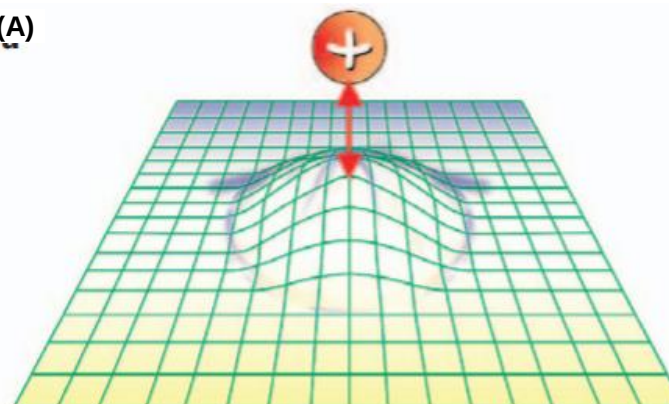
▪ Aplicações

- ✓ Carboidratos
- ✓ Hidroxila
- ✓ Carboxila
- ✓ Amino



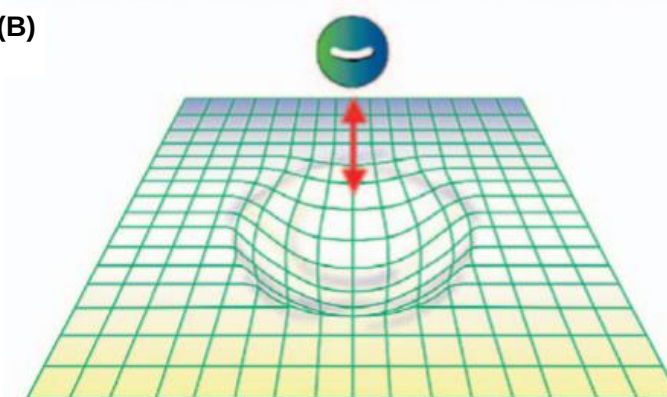
↓ **retenção em SP
convencionais**

(A)



Forças atrativas

(B)



Forças repulsivas

Figura 22. Representação do efeito da retenção de analitos polares em que (A) cargas positivas e (B) cargas negativas, ao se aproximarem da superfície do PGC resultam em dipolo induzido por carga na superfície do grafite. Adaptado da referência [25].

FASES ESTACIONÁRIAS

- **Polímeros**
- **Acetato de polivinila (PVA) funcionalizado em PGC**

- **Características:**

- ✓ Maior permeabilidade (pressão 50%↓)
- ✓ pH 1-12,7 unidades
- ✓ Formação de hidrogéis porosos
- ✓ Entre 70000-118000 pratos/m (citosina e resorcinol)
- ✓ Excelente eficiência cromatográfica
- ✓ Maior simetria vs PGC
- ✓ PVA predominantemente neutro
- ✓ Adição de grupos funcionais carregados
- ✓ Dopagem (como amônio quaternário ou cloreto de dialildimetilamônio)

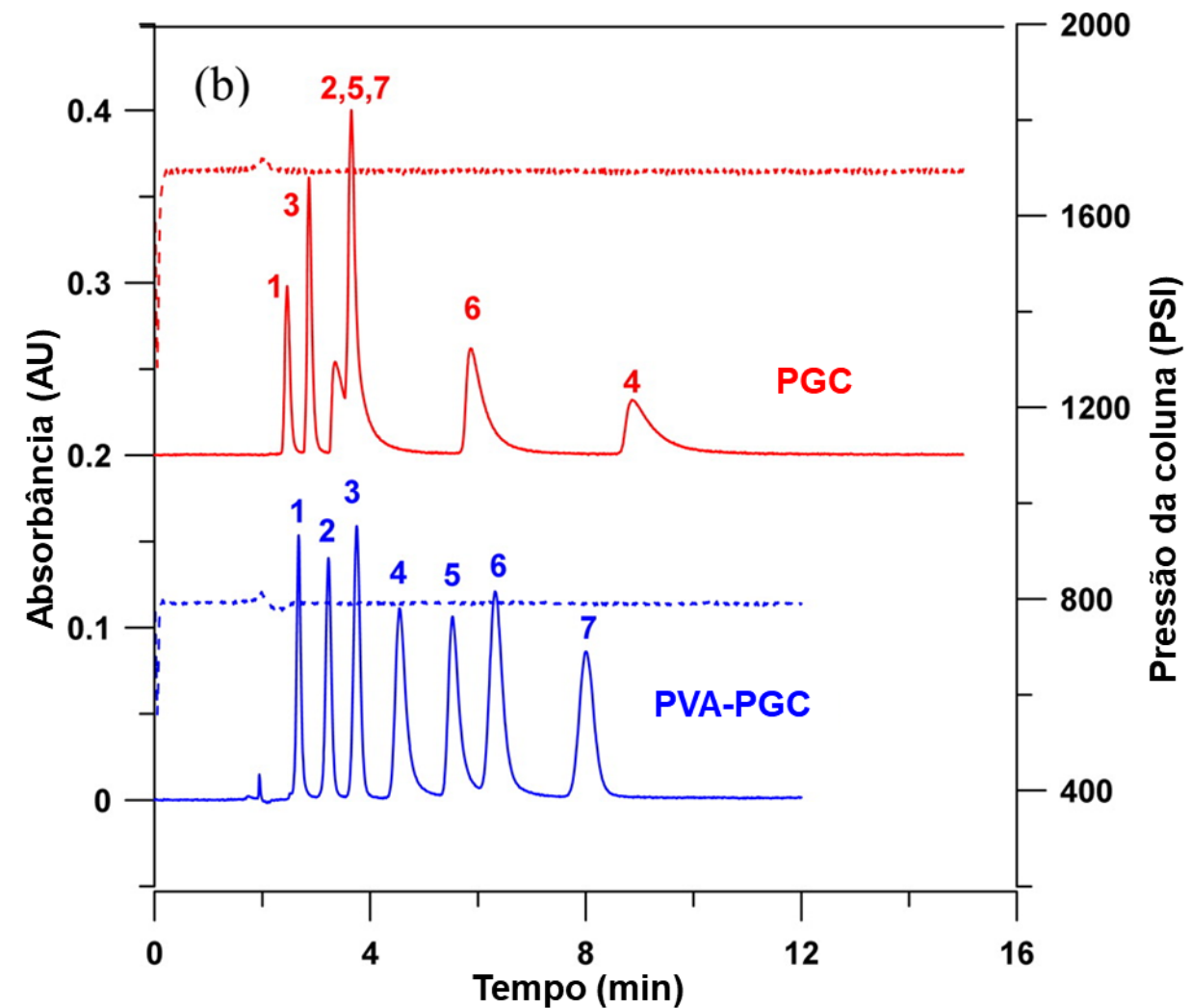


Figura 24. Cromatograma da separação dos nucleosídeos (1) uracilo, (2) 5-metiluridina, (3) uridina, (4) adenosina, (5) citosina, (6) inosina e (7) citidina empregando as SP PGC e PVA-PGC. MP: 88% ACN/ 6% H₂O/ 6% formato de amônio (250 mM, pH 8,2, (v/v/v). Temperatura do forno da coluna: 35 °C. Detecção por UV-Vis em comprimento de onda de 254 nm. Adaptado da referência [27].

FASES ESTACIONÁRIAS

- Problemas da sílica gel
- Ampla faixa de pH
- Polímero hidrofílico → **revestimento da sílica**
- Aplicações

- ✓ Nucleosídeos
- ✓ Compostos básicos
- ✓ Sulfonamidas
- ✓ Sacarídeos

- Síntese PVA-Bte-Sil



Figura 35. Demonstração da hidrofília de Bte-Sil e PVA-Bte-Sil em água pura. Adaptado da referência [29].

SP revestidas ou ligadas em polímeros

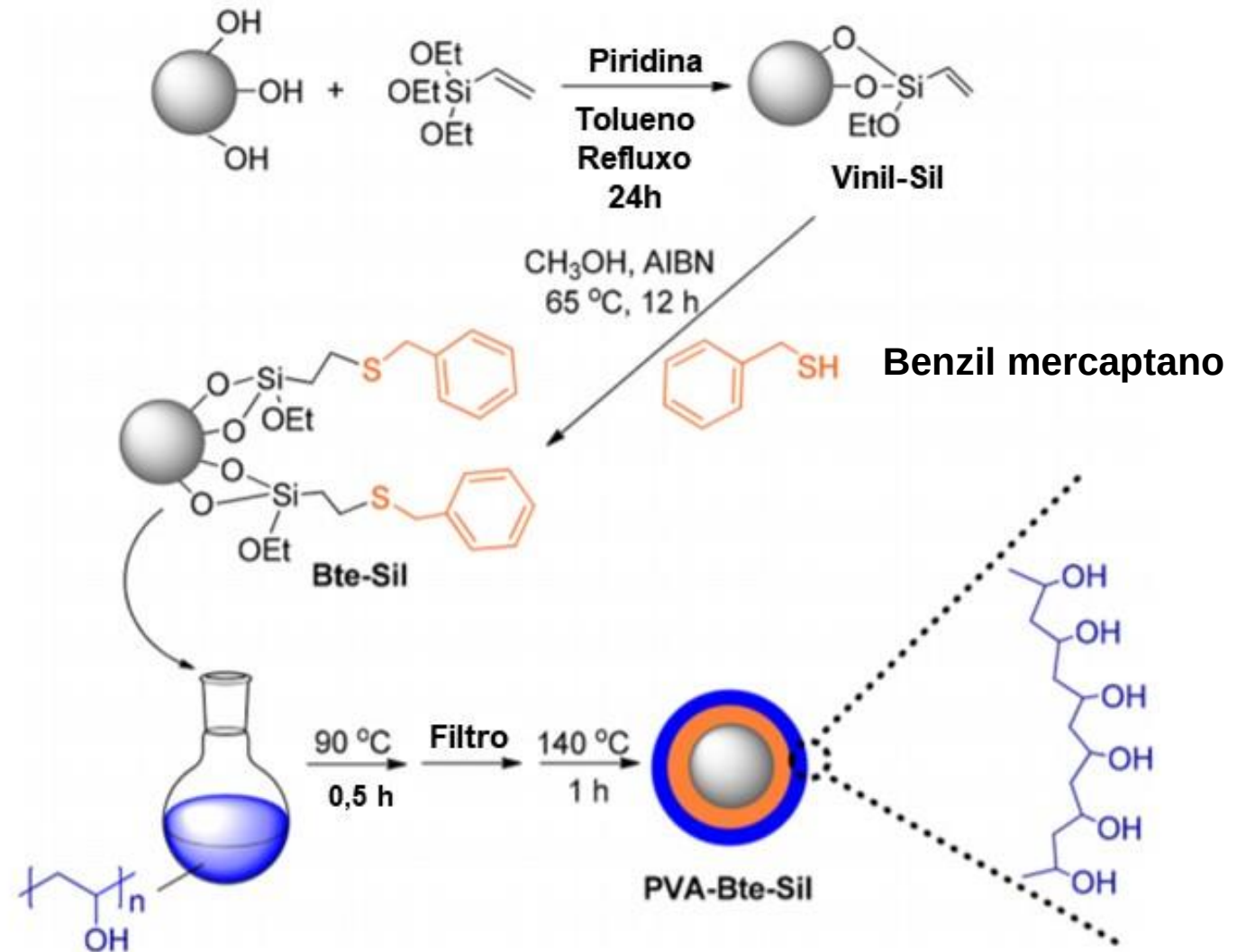
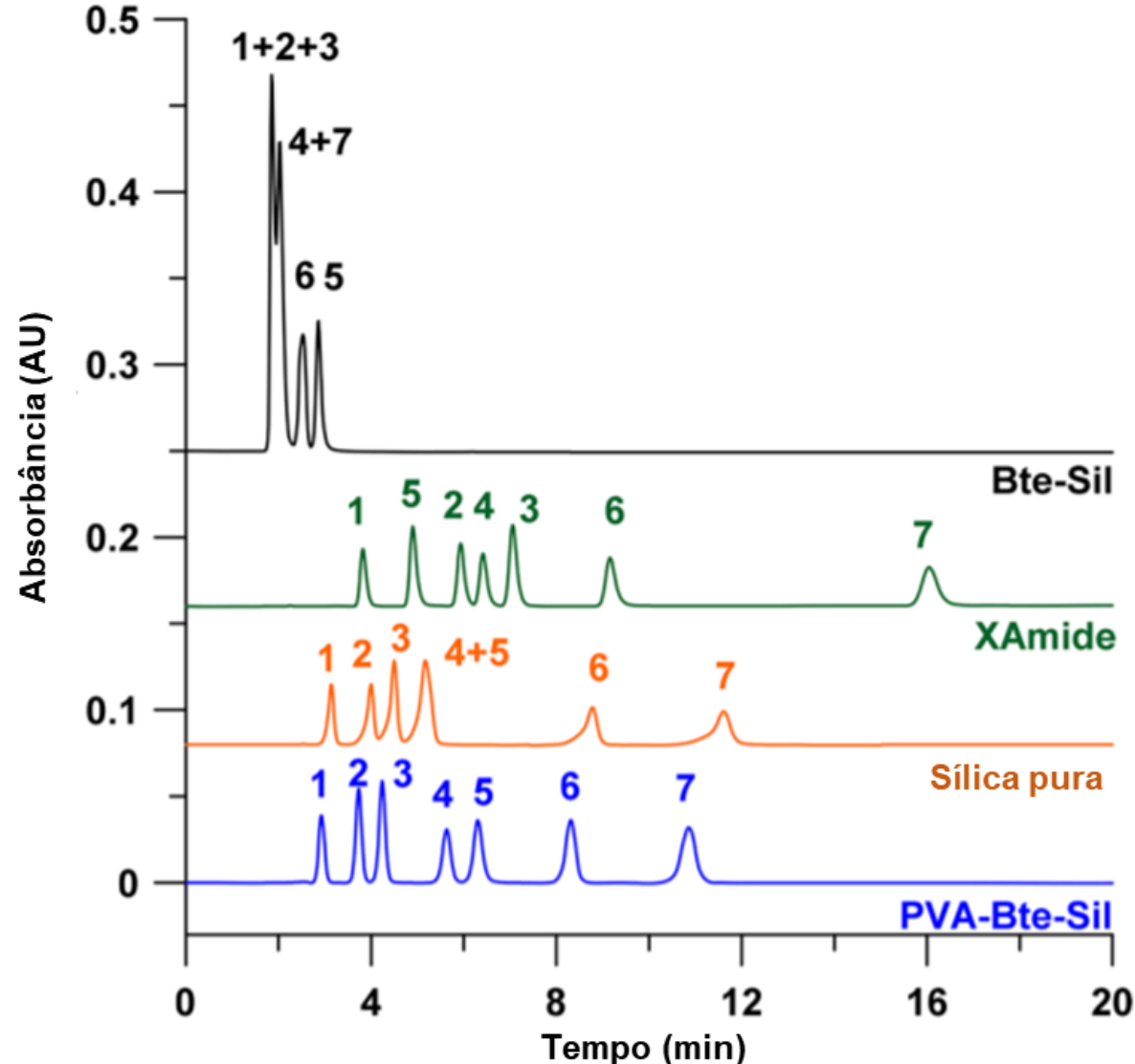


Figura 25. Esquema de síntese da SP PVA-Bte-Sil. Adaptado da referência [29].



▪ PVA-Bte-Sil

- ✓ Melhor performance
- ✓ Menor efeito de cauda
- ✓ DSR *intraday* e *interday* inferiores a 0,22% (n = 9) e 0,45% (n=3)
- ✓ Estabilidade SP

Figura 26. Sobreposição de cromatogramas da separação cromatográfica de (1) uracil, (2) 5-metil uridina, (3) uridina, (4) adenosina, (5) adenina, (6) citosina, (7) citidina empregando colunas analíticas Bte-Sil, XAmide, Sílica pura (Bare sílica) e PVA-Bte-Sil. Adaptado da referência [29].

- Poliacrilamida (PAM)
- Altamente hidrofílico
- Grupos carbomoil
- Revestimento

- ✓ Dissolução dos reagentes
- ✓ Aquecimento
- ✓ Agitação
- ✓ Evaporação

- Baixo custo
- Síntese simples
- Ambientalmente amigável
- Maior tolerância ao pH

SP revestidas ou ligadas em polímeros

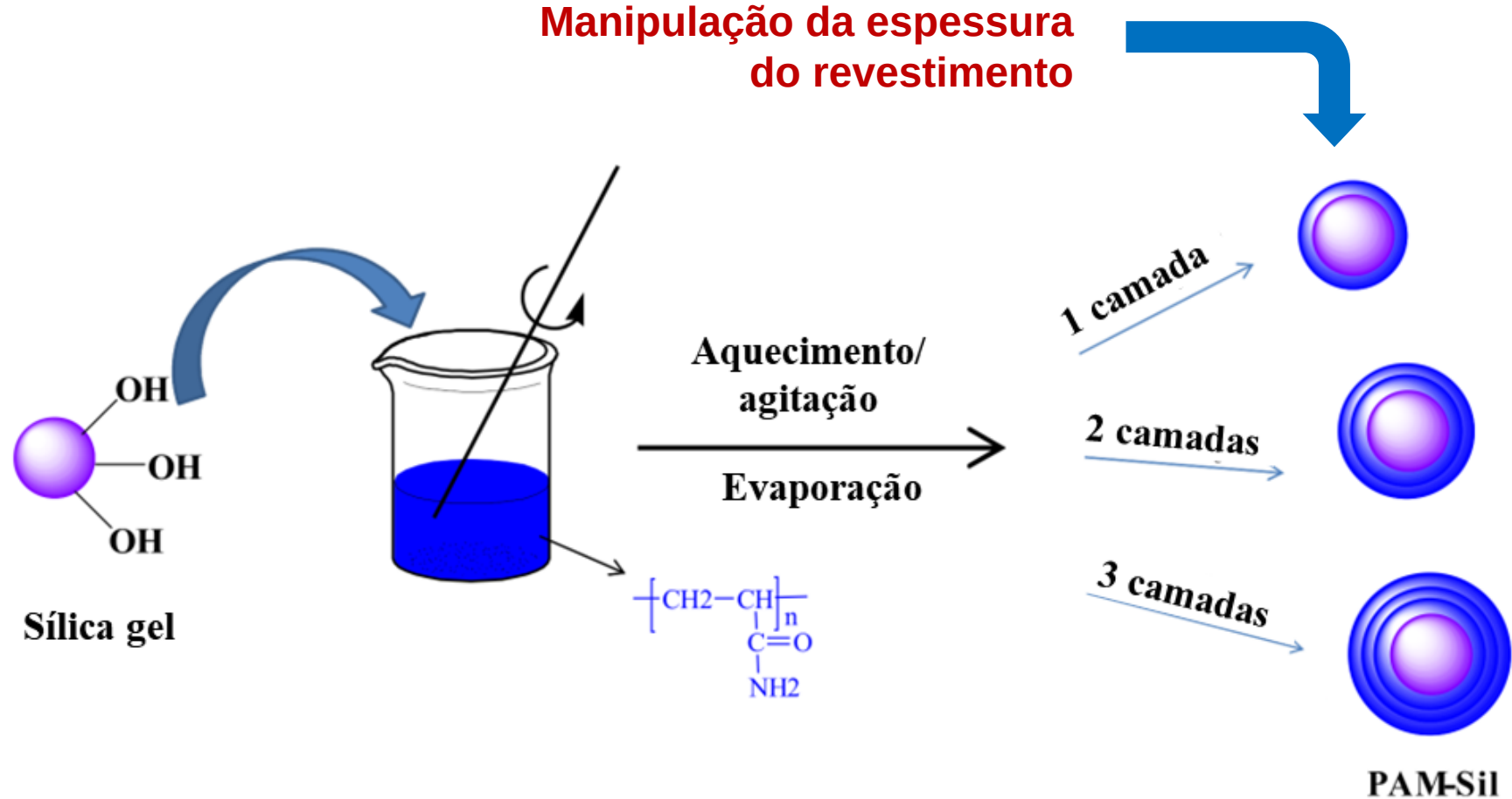


Figura 27. Esquema de síntese da SP PAM-Sil. Adaptado da referência [30].

▪ PAM-SIL 3 camadas

- ✓ **Melhor performance**
- ✓ Lactose → 67000 pratos teóricos/m
- ✓ 10 sacarídeos
- ✓ Aumento de 235% comparado a sílica

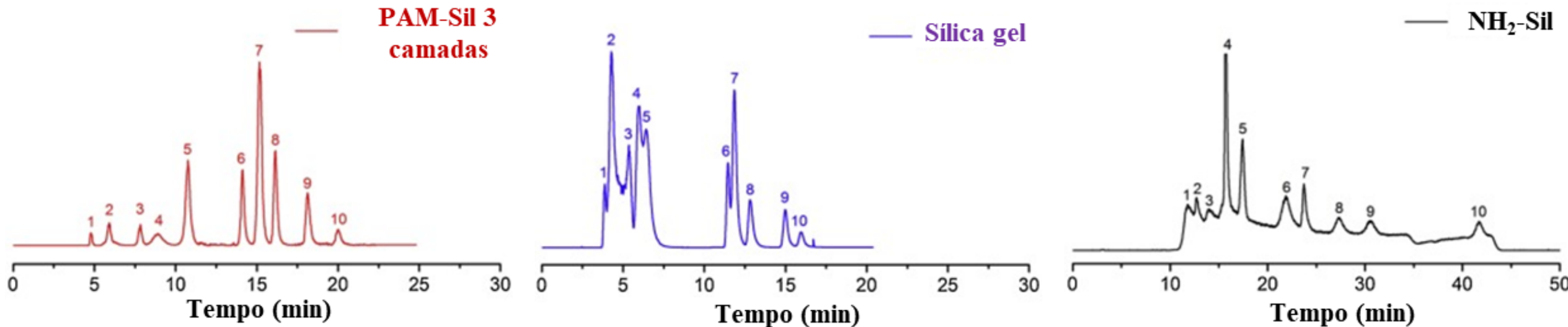
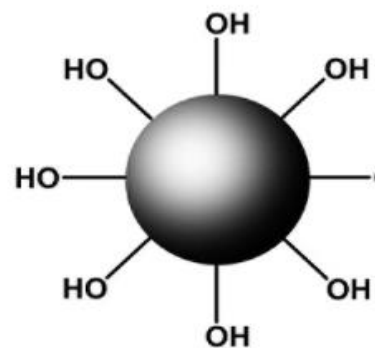


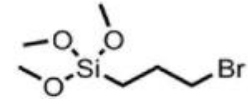
Figura 28. Cromatogramas empregando SPs PAM-Sil 3 camadas, sílica gel e NH₂-Sil, para **separação dos sacarídeos** (1) D-ribose, (2) xilose, (3) arabinose, (4) frutose, (5) glicose, (6) sacarose, (7) maltose, (8) lactose, (9) melezitose, (10) rafinose. Adaptado da referência [30].

FASES ESTACIONÁRIAS

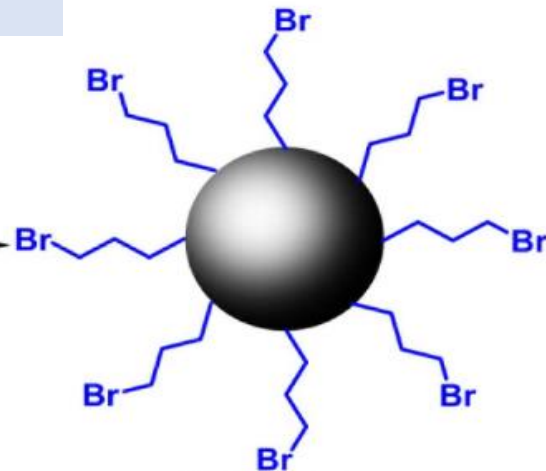
- Subclasse dos polímeros microporosos
- Características:
 - ✓ Grande área superficial
 - ✓ Boa hidrofiliidade
 - ✓ Tamanho de poro regular
 - ✓ Estabilidade térmica e em solventes
 - ✓ Estrutura projetável



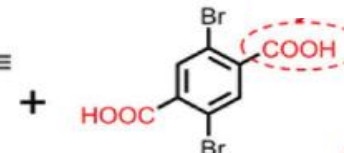
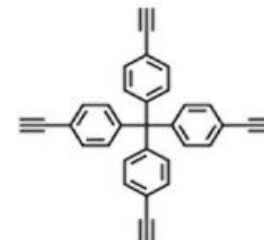
SiO₂



Anhydrous
DMF 90 °C



SiO₂-Br



CuI, Pd(PPh₃)₂Cl₂
90°C, 48 h

Grupo hidrofílico



MON-2COOH@SiO₂

MONs (Microporous organic networks)

- Core-shell MON-2COOH@SiO₂ microspheres
- Modo misto em RPLC/HILIC

- ✓ Hidrofóbico
- ✓ Hidrofílica

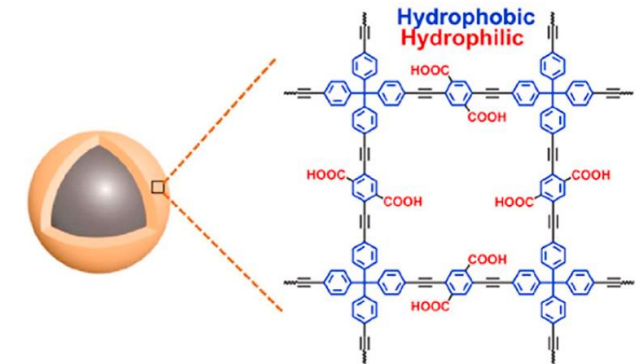


Figura 29. Esquema de síntese de microesferas MON-2COOH@SiO₂. Adaptado da referência [35].

- Aplicações:

- ✓ Nucleosídeos
- ✓ Ácidos nucleicos
- ✓ Flavonóides
- ✓ Herbicidas

- Boa seletividade
- $RSD < 3,1\%$ ($n=3$)

MONs (Microporous organic networks)

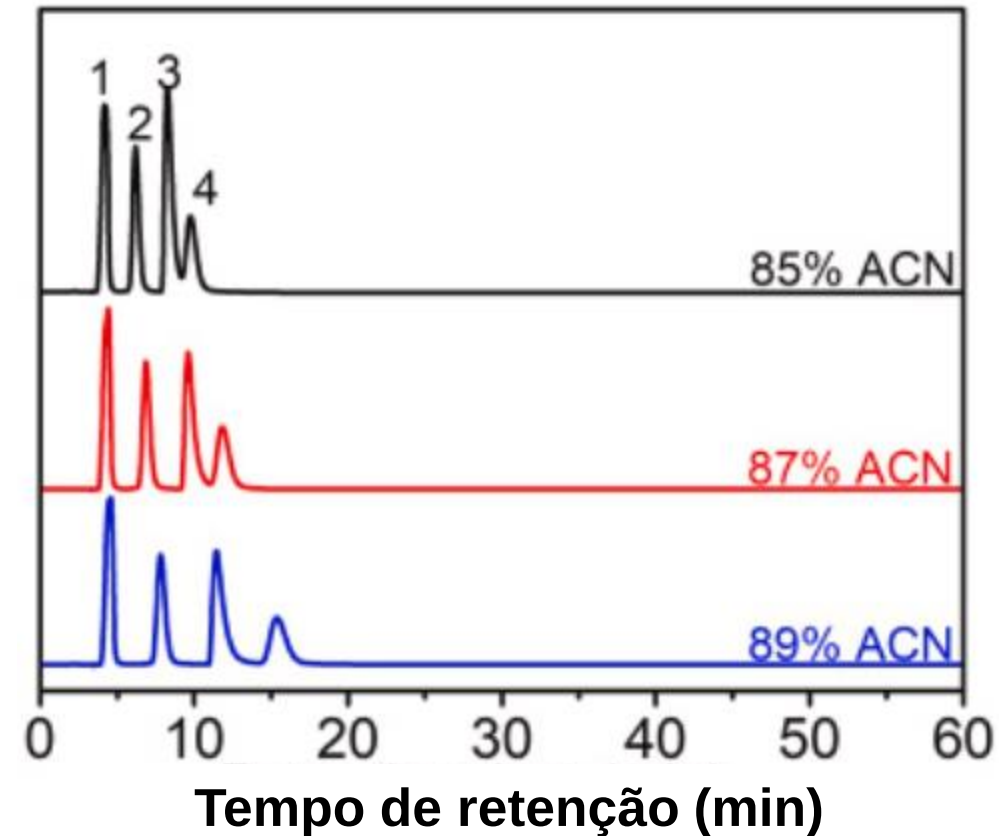


Figura 30. Separação por HPLC de nucleosídeos e bases nucleicas em coluna MON-2COOH@SiO₂ com diferentes proporções de ACN/H₂O como fase móvel. Condições cromatográficas: vazão: 1,0 mL min⁻¹; Comprimento de onda de detecção UV: 254 nm. Picos: 1, uracil (0,25 mg mL⁻¹); 2, adenosina (0,25 mg mL⁻¹); 3, adenina (0,25 mg mL⁻¹); 4, guanosina (0,25 mg mL⁻¹) [35].

- Ferramenta promissora em diferentes aplicações com boa retenção de compostos polares
- Os mecanismos de separação envolvem não somente a partição hidrofílica característica da técnica, mas também interações secundárias como as eletrostáticas, ligações de hidrogênio entre outras interações intermoleculares
- Desenvolvimento de novas tecnologias para síntese de SP, não estando restrita ao desenvolvimento de grupos químicos ligados a sílica, mas também ao emprego de líquidos iônicos, suportes híbridos, polímeros e carbono grafítico poroso

- Expectativa na evolução de materiais para SP que atendam a HILIC e RPLC
- Ampliação do potencial de separação de compostos de ampla faixa de polaridade com eficiência
- Para atender às necessidades de uma separação cromatográfica com maior eficiência e menor efeito de cauda, a MP em HILIC pode ter seu potencial de eluição dos compostos aprimorado com a adição de tampões e aditivos, aumentando a cobertura de moléculas e minimizando os erros de detecção durante o processamento de dados

- [1] S.C. Moldoveanu, V. David, Solvents, Buffers, and Additives Used in the Mobile Phase, in: Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis, Elsevier, 2017: pp. 393–450. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803684-6.00013-5>.
- [2] Sample Solvent in HILIC, (n.d.). <https://blog.sepscience.com/liquidchromatography/hilic-solutions-9-sample-solvent-in-hilic> (acesso Outubro15, 2020).
- [3] P. Jandera, P. Janás, Recent advances in stationary phases and understanding of retention in hydrophilic interaction chromatography. A review, *Analytica Chimica Acta*. 967 (2017) 12–32. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.01.060>.
- [4] J. Soukup, P. Jandera, Adsorption of water from aqueous acetonitrile on silica-based stationary phases in aqueous normal-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*. 1374 (2014) 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.11.028>.
- [5] D.D. Khanal, N. Thakur, M.F. Wahab, D.W. Armstrong, Enhancing the selectivity of polar hydrophilic analytes with a low concentration of barium ions in the mobile phase using geopolymers and silica supports, *Talanta*. 207 (2020) 120339. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120339>.
- [6] R.A. Sonnenberg, S. Naz, L. Cougnaud, D. Vuckovic, Comparison of underivatized silica and zwitterionic sulfobetaine hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases for global metabolomics of human plasma, *Journal of Chromatography A*. 1608 (2019) 460419. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460419>.
- [7] F.M. Lanças, Cromatografia Líquida com Interação Hidrofílica (HILIC), *Scientia Chromatographica*. 2 (2010) 49–
- [8] A.J. Alpert, Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds, *Journal of Chromatography A*. 499 (1990) 177–196. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)96972-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)96972-3).
- [9] Q. Qu, Y. Min, L. Zhang, Q. Xu, Y. Yin, Silica Microspheres with Fibrous Shells: Synthesis and Application in HPLC, *Analytical Chemistry*. 87 (2015) 9631–9638. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02511>.
- [10] H. Aral, T. Aral, B. Ziyadanoğullari, R. Ziyadanoğullari, Development of a novel amide-silica stationary phase for the reversed-phase HPLC separation of different classes of phytohormones, *Talanta*. 116 (2013) 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.05.007>.
- [11] B. Buszewski, M. Jaroniec, R.K. Gilpin, Studies of physicochemical and chromatographic properties of mixed amino-alkylamide bonded phases, *Journal of Chromatography A*. 673 (1994) 11–19. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)87052-7](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)87052-7).
- [12] B. Buszewski, S. Noga, Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 402 (2012) 231–247. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5308-5>.
- [13] S. Kowalska, K. Krupczyńska, B. Buszewski, The influence of the mobile phase pH and the stationary phase type on the selectivity tuning in high performance liquid chromatography nucleosides separation, *Journal of Separation Science*. 28 (2005) 1502–1511. <https://doi.org/10.1002/jssc.200400044>.

REFERÊNCIAS

- [14] M. Skoczylas, S. Bocian, B. Buszewski, Influence of silica functionalization by amino acids and peptides on the stationary phases zeta potential, *Journal of Chromatography A*. 1573 (2018) 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.08.057>.
- [15] L. Song, H. Zhang, J. Chen, Z. Li, M. Guan, H. Qiu, Imidazolium ionic liquids-derived carbon dots-modified silica stationary phase for hydrophilic interaction chromatography, *Talanta*. 209 (2020) 120518. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120518>.
- [16] X.D. Cheng, X.T. Peng, Q.W. Yu, B.F. Yuan, Y.Q. Feng, Preparation of a novel amino-phosphate zwitterionic stationary phase for hydrophilic interaction chromatography, *Chromatographia*. 76 (2013) 1569–1576. <https://doi.org/10.1007/s10337-013-2534-3>.
- [17] A. Shen, X. Li, X. Dong, J. Wei, Z. Guo, X. Liang, Glutathione-based zwitterionic stationary phase for hydrophilic interaction/cation-exchange mixed-mode chromatography, *Journal of Chromatography A*. 1314 (2013) 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.09.002>.
- [18] L. Qiao, W. Lv, M. Chang, X. Shi, G. Xu, Surface-bonded amide-functionalized imidazolium ionic liquid as stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*. 1559 (2018) 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.037>.
- [19] L. Song, H. Zhang, J. Chen, Z. Li, M. Guan, H. Qiu, Imidazolium ionic liquids-derived carbon dots-modified silica stationary phase for hydrophilic interaction chromatography, *Talanta*. 209 (2020) 120518. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120518>.
- [20] J. Heaton, N. Gray, D.A. Cowan, R.S. Plumb, C. Legido-Quigley, N.W. Smith, Comparison of reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography for the separation of ephedrine, *Journal of Chromatography A*. 1228 (2012) 329–337. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.09.026>.
- [21] S. Saha, S. Walia, K. Sharma, K. Banerjee, Suitability of stationary phase for LC analysis of biomolecules, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. (2019). <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1665494>.
- [22] M. Chai, Y. Chen, R. Xuan, J. Ma, T. Wang, D. Qiu, L. Zhang, Y. Zhang, Preparation of attapulgite nanoparticles-based hybrid monolithic column with covalent bond for hydrophilic interaction liquid chromatography, *Talanta*. 189 (2018) 397–403. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.07.039>.
- [23] S. Ma, L. Zhang, S. Wang, H. Zhang, X. You, J. Ou, M. Ye, Y. Wei, Preparation of epoxy-functionalized hierarchically porous hybrid monoliths via free radical polymerization and application in HILIC enrichment of glycopeptides, *Analytica Chimica Acta*. 1058 (2019) 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.01.011>.
- [24] H. Li, C. Liu, Q. Wang, H. Zhou, Z. Jiang, The effect of charged groups on hydrophilic monolithic stationary phases on their chromatographic properties, *Journal of Chromatography A*. 1469 (2016) 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.09.059>.
- [25] Thermo Fisher, Scientific, Method Development Guide for Hypercarb Columns, 2007. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Specification-Sheets/TG-20394-Method-Development-Guide-Hypercarb-Columns-TG20394-EN.pdf> (acesso 10 de outubro de 2020).

- [26] C.D. Iverson, C.A. Lucy, Aniline-modified porous graphitic carbon for hydrophilic interaction and attenuated reverse phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*. 1373 (2014) 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.11.003>.
- [27] Y. Hou, F. Zhang, X. Liu, Y. Ren, B. Yang, A positively charged porous graphitic carbon stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatography, *Talanta*. 164 (2017) 159–163. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.11.033>.
- [28] J.J. Baeza-Baeza, M.C. García-Alvarez-Coque, Extension of the linear solvent strength retention model including a parameter that describes the elution strength changes in liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*. 1615 (2020) 460757. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460757>.
- [29] K. Qian, Z. Yang, F. Zhang, B. Yang, P.K. Dasgupta, Low-Bleed Silica-Based Stationary Phase for Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, *Anal. Chem.* 90 (2018) 50. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01796>.
- [30] Y. Wang, H. Bu, L. Wang, L. Wang, Y. Guo, X. Liang, S. Wang, High efficiency and simple preparation of polyacrylamide coated silica stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*. 1605 (2019) 360357. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.07.011>.
- [31] R.M. Wimalasinghe, C.A. Weatherly, M.F. Wahab, N. Thakur, D.W. Armstrong, Geopolymers as a New Class of High pH Stable Supports with Different Chromatographic Selectivity, *Anal. Chem.* 90 (2018) 8139–8146. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01426>.
- [32] S. Ehrling, C. Kutzscher, P. Freund, P. Müller, I. Senkovska, S. Kaskel, MOF@SiO₂ core-shell composites as stationary phase in high performance liquid chromatography, *Microporous and Mesoporous Materials*. 263 (2018) 268–274. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2018.01.003>.
- [34] Hao-Fei SunYuan-Yuan CuiChang-Qing ZhenCheng-Xiong Yang. Monomer-mediated fabrication of microporous organic network@silicamicrosphere for reversed-phase/hydrophilic interactionmixed-mode chromatography. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123763>

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA POR INTERAÇÕES HIDROFÍLICAS (HILIC): HISTÓRICO, AVANÇOS RECENTES E POTENCIAL

OBRIGADO!

