

## CROMATOGRAFIA POR INTERAÇÕES HIDROFILICAS (HILIC): ESTADO DA ARTE E APLICAÇÕES

Carla Grazieli Azevedo da Silva,\* Carla Beatriz Grespan Bottoli e Carol H. Collins

Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970 Campinas – SP, Brasil

Recebido em 09/06/2015; aceito em 22/09/2015; publicado na web em 14/01/2016

HYDROPHILIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY (HILIC): STATE OF THE ART AND APPLICATIONS. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) has been gaining increased attention for its effective separation of highly polar compounds, which include carbohydrates, amino acids, pharmaceutical compounds, proteins, glycoproteins, nucleosides, etc. Polar compounds are usually poorly retained on reverse-phase liquid chromatography (RP-HPLC) columns or have poor solubility in the apolar mobile phase of normal-phase high performance liquid chromatography (NP-HPLC). Since HILIC uses organic solvents such as ACN or MeOH (> 70%), also used in RP-HPLC and polar stationary phases similar to NP-HPLC (bare silica, diol, amino, amide, saccharide, zwitterionic stationary phases, etc.), it represents a hybrid of the two separation modes. The high organic content in the MP leads to good compatibility with mass spectrometry (MS), increasing the detectivity. This review describes the fundamentals of HILIC and highlights some interesting applications.

Keywords: hydrophilic interaction chromatography; separation of polar compounds; HILIC separations; high performance liquid chromatography; polar stationary phases.

## INTRODUÇÃO

A cromatografia líquida no modo fase reversa (RP-HPLC, do inglês *reversed phase high performance liquid chromatography*), onde se emprega uma fase estacionária (SP, do inglês *stationary phase*) mais apolar que a fase móvel (MP, do inglês *mobile phase*) é a técnica analítica de separação mais utilizada.<sup>1</sup> Porém, uma das limitações do uso da fase reversa é a baixa retenção de moléculas polares ou iônicas. O uso da cromatografia líquida no modo de fase normal (NP-HPLC, do inglês *normal phase high performance liquid chromatography*), na qual se emprega SP mais polares que as fases móveis, pode solucionar essa limitação. No entanto, a solubilidade de moléculas polares em MP apolares não aquosas é limitada, restringindo a aplicabilidade desta. E em alguns casos, a cromatografia de íons não pode ser aplicada devido a ausência de cargas dos solutos. Para minimizar esses problemas, na década de 90, Alpert<sup>2</sup> introduziu a cromatografia por interações hidrofílicas (HILIC, do inglês *hydrophilic interaction chromatography*). A HILIC é uma modalidade de separação na qual é empregada uma SP mais polar do que em RP-HPLC e MP com pouca concentração de água ou tampão, sendo normalmente > 70% em solvente orgânico, tipicamente acetonitrila.<sup>3</sup>

Dessa forma, HILIC apresenta modo de separação ortogonal ao modo em RP-HPLC, pois os mecanismos de separação do modo HILIC e do modo RP são independentes entre si. Com isso há a possibilidade de se explorar diferentes perfis de seletividade, o que permite a sua aplicação em cromatografia líquida bidimensional abrangente (LC × LC), com a vantagem de apresentar menor incompatibilidade do eluente da primeira dimensão (1D) com o eluente da segunda dimensão (2D), quando comparado a um sistema ortogonal com NP-HPLC, podendo ser utilizada no modo de duas dimensões para separação de amostras complexas na qual a amostra é submetida a dois mecanismos de separação diferentes e complementares com a finalidade de fornecer um maior poder de separação e distribuição dos analitos nas duas dimensões, aumentando o poder de resolução.<sup>4</sup>

Além disso, seu uso com detectores de espectrometria de massas, devido à alta proporção de solvente orgânico na MP,<sup>5-9</sup> vem

possibilitando um incremento anual de trabalhos utilizando essa modalidade de cromatografia (Figura 1), principalmente devido à necessidade crescente de separação de compostos altamente polares (com valores negativos de  $\log P$ : coeficiente de partição octanol-água) em análises clínicas e de compostos farmacêuticos, nas áreas da metabolômica, proteômica, glicômica, etc. (Figura 2).

As SP utilizadas em HILIC<sup>10</sup> são fases polares tradicionalmente conhecidas como a sílica pura,<sup>11,12</sup> sílica modificada<sup>13</sup> com grupos triazóis, cianos, aminos,<sup>14,15</sup> amidas, ácidos sulfônicos, carboxilatos, diols,<sup>16</sup> poliidroxiethylaspartamida,<sup>2</sup> e SP à base de ciclodextrinas,<sup>16,17</sup> ou polímeros,<sup>3</sup> além de novos materiais como compostos zwitteriônicos, os quais apresentam cargas positivas e negativas em sua estrutura.<sup>18-20</sup> Mais recentemente SPs à base de líquidos iônicos<sup>21,22</sup> vêm sendo utilizadas, além de SP com diversas funcionalidades preparadas por reações do tipo *click chemistry*.<sup>23,24</sup>

A utilização do modo de separação HILIC, também denominada na época de seu surgimento de cromatografia líquida de “fase reversa-reversa” ou cromatografia “aquosa de fase normal”, propicia algumas vantagens quando comparada a outros modos de separação como a fase normal ou fase reversa.<sup>25-28</sup>

I) Alta concentração de solvente orgânico na MP, o que diminui a pressão do sistema visto que a viscosidade da MP também diminui. A alta concentração de solvente também aumenta a detectabilidade quando se utiliza o detector de espectrometria de massas, uma vez que o processo de ionização dos analitos é favorecido;

II) Maiores retenções e eficiências de separação de analitos polares com baixa retenção no modo em fase reversa, como peptídeos e ácidos nucleicos, sem a necessidade de utilização de aditivos tipo par-iônico;

III) Maior preservação da SP pelo uso de menores quantidades de água na MP, evitando o colapso de sua superfície, principalmente em fases estacionárias com caráter mais hidrofóbico;

IV) Compatibilidade com técnicas de extração que utilizam altas concentrações de solvente orgânico, como a extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) ou extração líquido-líquido, o que facilita e simplifica a etapa de preparação de amostra.

HILIC também pode ser conhecida por “cromatografia de fase normal aquosa” uma vez que essa modalidade de separação envolve

\*e-mail: carlag@live.com

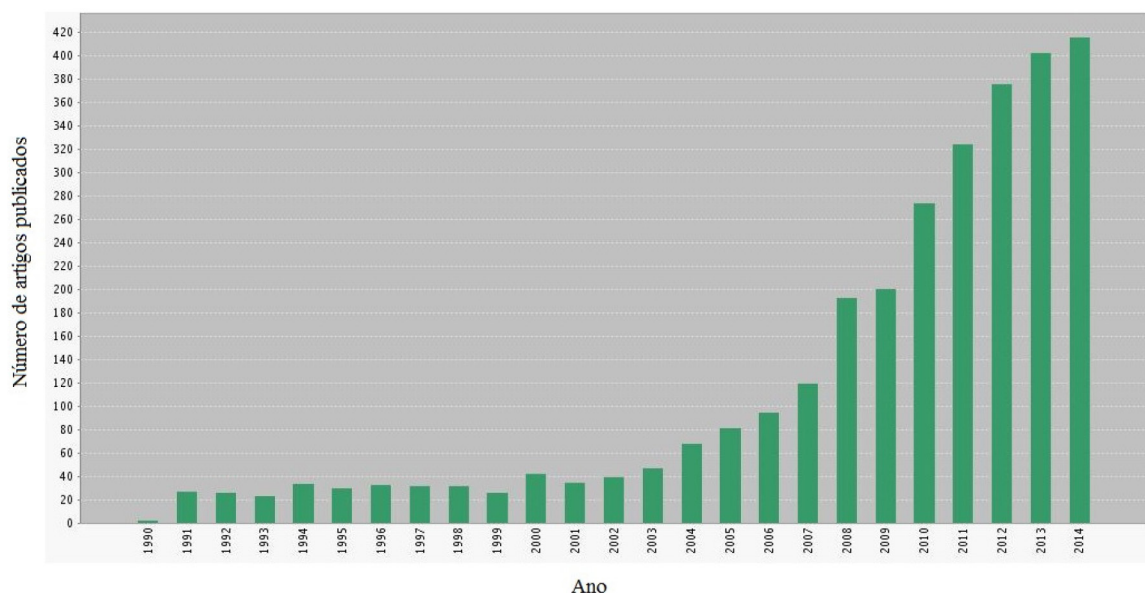


Figura 1. Número de publicações científicas obtidas através da busca do termo "hydrophilic interaction chromatography" no portal ISI/Web of Science de 1990 até 2014

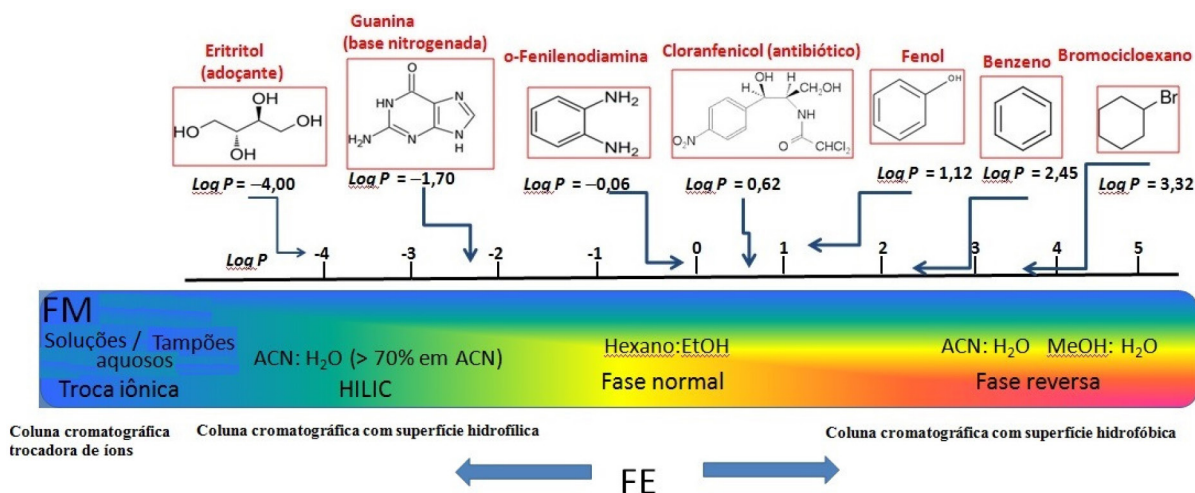


Figura 2. Exemplo de seleção do tipo de modalidade cromatográfica em função da polaridade dos analitos medida pelo log P

uma fase estacionária polar similar a algumas das SP utilizado em cromatografia com fase normal, e a porção aquosa na fase móvel atua como o solvente forte, de forma oposta ao que ocorre na cromatografia líquida em fase reversa.<sup>29</sup> Por outro lado, HILIC pode ser relacionada ao modo de separação em fase normal de compostos altamente polares ou iônicos, mas sob condições típicas da fase reversa. Dessa forma, muitos autores descrevem essa modalidade como um eixo de conexão entre a fase normal (NP) e a fase reversa (RP) (Figura 3).

## BREVE HISTÓRICO

Em 1951 Gregor *et al.*<sup>30</sup> descreveram as interações envolvendo a camada de água presente em uma SP a base de resina trocadora de íons. Os trabalhos de Samuelson e Sjöström<sup>31</sup> e Rückert e Samuelson<sup>32</sup> também relacionaram interações entre os analitos e a camada de água presente na SP trocadora de íons. Um pouco depois, Linden e Lawhead,<sup>33</sup> em 1975, utilizaram colunas polares com SP trocadora de ânions na separação de sacarídeos com uma MP com elevada concentração de solvente orgânico e Palmer,<sup>34</sup> no mesmo ano, utilizou uma coluna à base de carboidrato para separar açúcares com uma MP com alta concentração de acetonitrila (ACN).

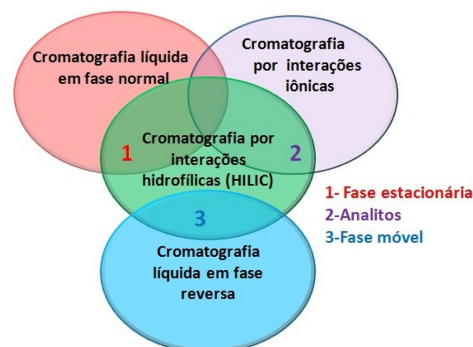


Figura 3. Relação entre HILIC e as demais modalidades principais de cromatografia líquida. Adaptado da ref. 6

Sequencialmente, em 1982 e 1985, Verhaar e Kuster<sup>35</sup> e Nikolov e Reilly,<sup>36</sup> respectivamente, separaram misturas de açúcares utilizando colunas polares com grupos amino baseadas em suporte de sílica, utilizando uma mistura de água/acetonitrila como MP.

No entanto, a utilização do termo e do acrônimo HILIC é atribuída a Alpert<sup>2</sup> no seu trabalho clássico de 1990 sobre essa modalidade de

separação em cromatografia líquida, no qual foram separados peptídeos, ácidos nucleicos e outros compostos polares. Este autor propôs o termo como uma variação da cromatografia em fase normal quando utilizou MP com alta concentração de solvente orgânico e mecanismo de retenção baseado na interação hidrofílica entre os analitos polares e a camada de água superficialmente imobilizada na SP também polar.

## MECANISMOS DE SEPARAÇÃO

Em HILIC a MP utilizada é similar à utilizada no modo em RP, descrita como uma mistura de água/solvente orgânico, tipicamente ACN, porém, diferentemente da RP, com alta concentração de solvente orgânico e pouca concentração de água (ou tampão aquoso) (5-40%).<sup>3,6,26,29</sup> Assim como o modo em NP, HILIC utiliza SP mais polares que facilmente apresentam uma camada de água superficialmente imobilizada ou adsorvida e que retém solutos igualmente polares por meio de interações hidrofílicas por meio de um equilíbrio de partição. Da mesma forma, acredita-se que podem ocorrer também interações do tipo ligação de hidrogênio entre os grupos funcionais polares dos analitos e da SP<sup>29,37-40</sup> e interações eletrostáticas entre a SP e grupos funcionais ionizados dos analitos (Figura 4). Adicionalmente, podem também ocorrer interações do tipo forças de van der Waals entre a porção hidrofóbica da SP e grupos não polares dos analitos,<sup>3</sup> e adsorção dos analitos na superfície do adsorvente.

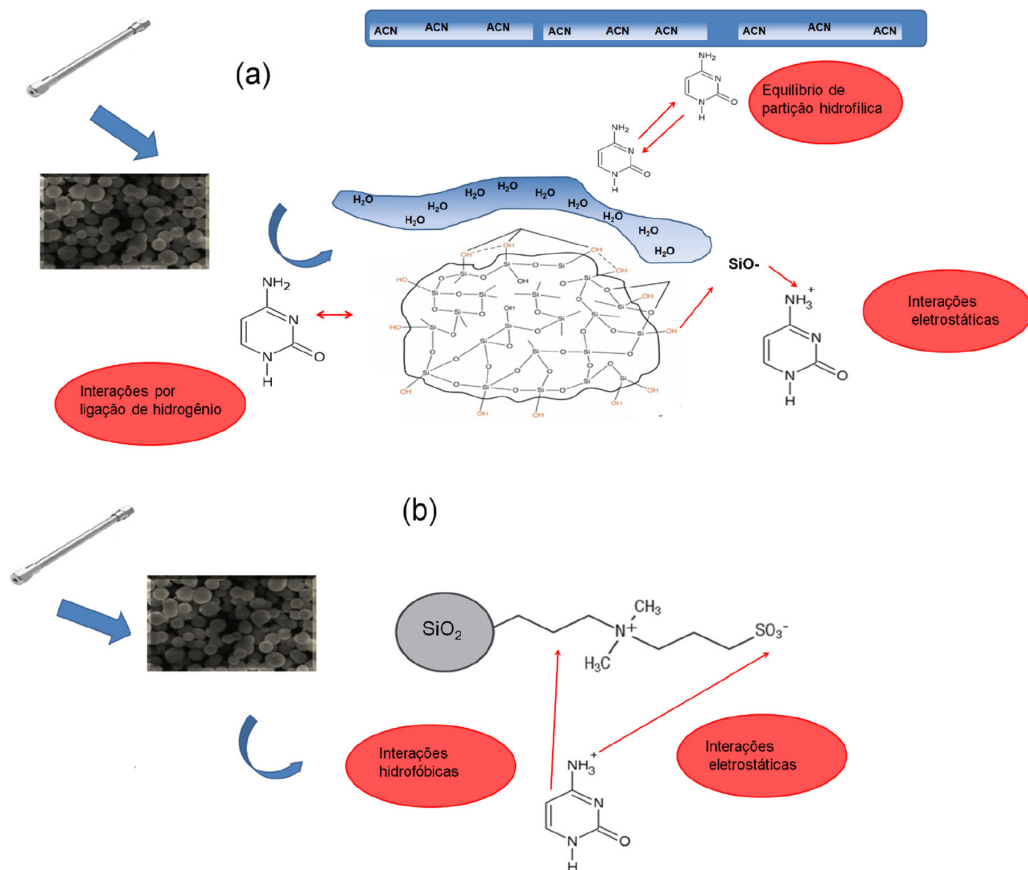
Como resultado desse mecanismo triplo de interação, na HILIC há a inversão na ordem de retenção dos compostos, em que os compostos mais polares são os mais retidos em comparação com a RP, na qual os compostos polares são os menos retidos (Figura 5).

## FASES ESTACIONÁRIAS

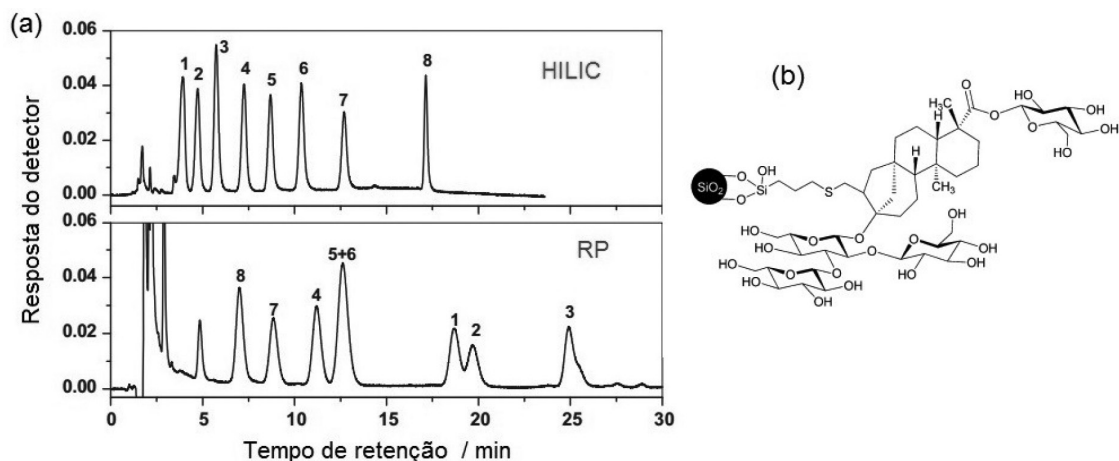
Atualmente, o número de SP disponíveis para HILIC é significativo e vêm crescendo a cada dia. Há no mercado de colunas cromatográficas SP especialmente preparadas para essa modalidade cromatográfica, com diversos grupos funcionais que propiciam a retenção e seletividade adequadas para analitos polares de acordo com o tipo de aplicação a ser desenvolvida. *A priori*, uma SP tipo HILIC deve conter grupos polares para interação de analitos com polaridade semelhante.<sup>41</sup> Ainda hoje, as SP mais utilizadas são as baseadas em sílica, incluindo sílica híbrida, partículas superficialmente porosas sub-2  $\mu\text{m}$  e sílica monolítica<sup>42-44</sup> ou suportes de sílica modificados quimicamente com grupamentos neutros, tais como ciano, diol, amida, alquilamida, etc., ou carregados (amina, grupos sulfônicos) ou, até, com grupos zwitteriônicos (ZIC), que tem demonstrado bom desempenho para retenção de compostos polares iônicos ou não-iônicos.<sup>6,45</sup>

### Fases estacionárias produzidas por “click chemistry”

As tendências dos últimos anos na síntese e preparação de SP para HILIC incluem as reações por *click chemistry*,<sup>46,47</sup> o que representa preparar SP por meio de reações entre grupos funcionais que reagem de forma rápida, seletiva (daí o termo do inglês *click*) e que estaria relacionado ao “encaixe” entre as moléculas de reagentes em reações que incluem duas etapas, com altos rendimentos, utilizando condições reacionais brandas. A *click chemistry* também é utilizada para síntese e preparo de compostos ou materiais nas áreas de biociências,<sup>48,49</sup> farmacêutica<sup>50,51</sup> e de materiais.<sup>52</sup>



**Figura 4.** Tipos de interações presentes na cromatografia por interações hidrofílicas (HILIC): partição hidrofílica dos solutos da amostra entre a fase móvel (orgânica) e a camada aquosa sobre a superfície da fase estacionária; interação entre os átomos polares presentes nos solutos e a superfície polar da fase estacionária (interações por ligações de hidrogênio), interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Na ilustração o soluto está representado pela molécula da citossina; a SP é a sílica pura em (a) e, em (b) do tipo zwitteriônica a base de sílica funcionalizada com grupos sulfobetaina. A MP utilizada foi ACN/H<sub>2</sub>O



**Figura 5.** Separação de uma mistura de saponinas derivadas de triterpenos em HILIC e em RP. Detecção UV a 210 nm. Fase móvel:  $H_2O$  (A) e ACN (B). Gradiente HILIC: 0-10 min, A:B (15:85, v/v)→A:B (20:80, v/v), 10-20 min, A:B (20:80, v/v)→A:B (35:65, v/v). Gradiente RP: 0-20 min, A:B (80:20, v/v)→A:B (70:30, v/v), 20-35 min, A:B (70:30, v/v)→A:B (50/50, v/v). Coluna cromatográfica Click TE-RA (a base de mercapto-sílica modificada com rebaudioside A (150 mm × 4.6 mm i.d., 5 $\mu$ m), labmade). Analitos: (1) ginsenoside Mc, (2) gypenoside XIII, (3) gin-senoside Rg3, (4) notoginsenoside Fe, (5) notoginsenoside Fd, (6) ginsenoside Rd, (7) ginsenoside Rc, (8) notoginsenoside Fa. Adaptado da Ref. 40

Como exemplo de SP preparada por reações do tipo *click chemistry* pode-se destacar o trabalho de Guo *et al.*,<sup>53</sup> que modificaram a superfície da sílica com grupos polares de polietilenoglicol (PEG), seguidos pela modificação do mesmo suporte com glicopeptídeos,<sup>54</sup>  $\beta$ -ciclodextrinas<sup>55</sup> ou fosfolipídios.<sup>56</sup>

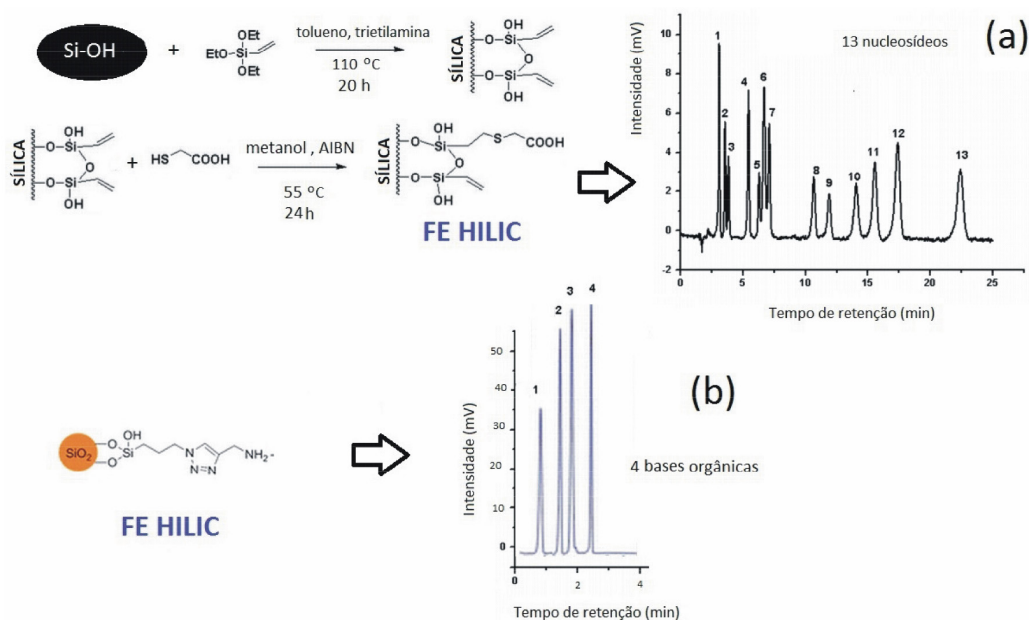
Outro exemplo interessante de preparação de SP por meio de reações do tipo *click chemistry* foi reportado por Peng *et al.*,<sup>57</sup> os quais sintetizaram uma nova SP a base de sílica modificada com grupos tiol e carboxila (Figura 6a), que apresentou perfil de separação satisfatório para a caracterização cromatográfica de 13 nucleosídeos e suas bases, além de quatro vitaminas hidrossolúveis.

Liu *et al.*<sup>58</sup> prepararam uma SP a base de grupos amino imobilizados sobre sílica via reações do tipo *click chemistry* com bom desempenho para separação de compostos polares, incluindo nucleosídeos,

compostos orgânicos com características ácidas e básicas. A SP ainda separou ânions de natureza inorgânica no modo cromatografia de íons (Figura 6b).

#### Fases estacionárias monolíticas convencionais e capilares

Colunas monolíticas são um meio contínuo de separação, formadas por um corpo único, poroso, em formato de haste, utilizados em cromatografia líquida (cromatografia líquida em escala convencional, electrocromatografia capilar e cromatografia líquida capilar) como alternativa às colunas com SP particuladas. Essas colunas possuem uma estrutura bi-porosa com macroporos (com diâmetros superiores a 50 nm) e mesoporos (2 a 50 nm) que permite a utilização de vazões mais altas, devido à alta permeabilidade do material, o que proporciona



**Figura 6.** Reações do tipo *click chemistry* envolvidas na preparação da SP HILIC baseada em sílica modificada com grupos tiol e carboxila e o seu desempenho na separação de 13 nucleosídeos em (a) e o desempenho de uma SP preparada por *click chemistry* modificada com grupos amino na separação de quatro compostos orgânicos com características básicas em (b). Dimensões das colunas cromatográficas: 150 mm × 4.6 mm em (a) e 100 mm × 2.1 mm em (b). Analitos: (1) timina, (2) uracila, (3) timidina, (4) desoxiadenosina, (5) uridina, (6) adenina, (7) adenosina, (8) citosina, (9) deoxicitidina, (10) guanina, (11) desoxiguanosina, (12) citidina e (13) guanosina em (a). Em (b), (1) difenilamina, (2) cafeína, (3) teofilina, (4) diprofilina. Adaptadas das refs. 57 e 58

análises mais rápidas, sem o comprometimento da eficiência de separação e sem aumento significativo da pressão no sistema cromatográfico. Além disso, apresentam fácil preparação e modificação química de sua superfície e não necessitam do uso de *frits* para isolamento da SP.<sup>59-68</sup>

Colunas monolíticas polares a base de sílica, introduzidas por Tanaka *et al.*,<sup>69</sup> vem sendo utilizadas no modo HILIC devido a suas propriedades físico-químicas como estabilidade em solventes orgânicos utilizados em cromatografia, reduzido diâmetro de poros e elevada área superficial. Esses monolitos são preparados pelo processo sol-gel (PSG), que envolve reações de hidrólise de um alcóxido (geralmente tetraetoxisilano, TEOS, ou tetrametoxisilano, TMOS), chamado de precursor, seguida por reações de condensação e policondensação. O tamanho dos poros do material é controlado por polímeros orgânicos, chamados de agentes porogênicos, sendo que o mais utilizado é o polietilenoglicol (PEG), que é dissolvido em água contendo um catalisador apropriado, que pode ser um ácido ou base (normalmente ácido acético ou uréia). A reação se dá primeiramente pela formação de um sol, suspensão coloidal de espécies sólidas em um líquido. Em seguida, há a formação do gel a partir da policondensação do sol, levando a uma estrutura úmida. Após, a estrutura porosa bimodal é obtida por meio de tratamento térmico, no qual sucessivas evaporações e secagens são realizadas para decompor os constituintes orgânicos e estabilizar a superfície do gel hidrofílico de sílica.<sup>61,70-72</sup> Alternativamente, pode-se substituir o alcóxido de silício por alcóxidos metálicos de zircônio ou titânio, resultando em materiais com maior estabilidade química do que os de sílica, que resistem apenas na faixa  $2 < \text{pH} < 8$ , inclusive podendo ser utilizados em separações no modo HILIC utilizando a cromatografia líquida em escala convencional ou capilar.<sup>67,73-78</sup>

Um exemplo interessante foi descrito por Zhou e Lucy,<sup>78</sup> que separaram, utilizando o modo HILIC, uma mistura de ácidos carboxílicos altamente polares, incluindo ácidos com mais de uma carboxila na estrutura, utilizando uma coluna à base de titânia ( $\text{TiO}_2$ ) e MP ACN:tampão acetato em pH 6 ou 11, como pode ser observado nas Figuras 7a e 7b.

### Fases estacionárias à base de líquidos iônicos

Líquidos iônicos (IL, do inglês *ionic liquids*) são compostos geralmente formados por um cátion orgânico e um ânion inorgânico ou orgânico. Estes compostos também são chamados de sais fundidos à temperatura ambiente, que apresentam baixíssima pressão de vapor e propriedades de solvatação elevada.<sup>79-81</sup>

A baixa volatilidade dos IL não é uma propriedade crítica em cromatografia líquida e a sua natureza não molecular resulta em seletividades únicas tanto como aditivos de MP, para suprimir interações

indesejáveis com os grupos silanóis ácidos ou como seletores químicos de SP, devido à possibilidade de imobilização sobre materiais considerados suportes cromatográficos, combinando, assim, suas características e propriedades com as desses materiais aplicados tanto no modo em fase normal, como em fase reversa.<sup>82-90</sup>

Em HILIC, a modificação de suportes cromatográficos com IL já foi realizada com grupos imidazol,<sup>91</sup> glucaminium<sup>92</sup> e tricatiônicos.<sup>93</sup> Quiao *et al.*<sup>93</sup> prepararam e caracterizaram físico-química e cromatograficamente uma SP baseada no IL tri-imidazol quimicamente ligado na superfície de sílica porosa. A eficiência de separação e seletividade foi investigada por meio da separação de solutos nucleosídeos, bases orgânicas e flavonoides, e foi demonstrado que colunas cromatográficas baseadas em IL apresentam excelente potencial para serem utilizadas em HILIC. Da mesma forma, foi demonstrada a versatilidade das SP a base de IL, que foram utilizadas em fase reversa com seletividade superior a uma SP do tipo alquila com grupos C8.

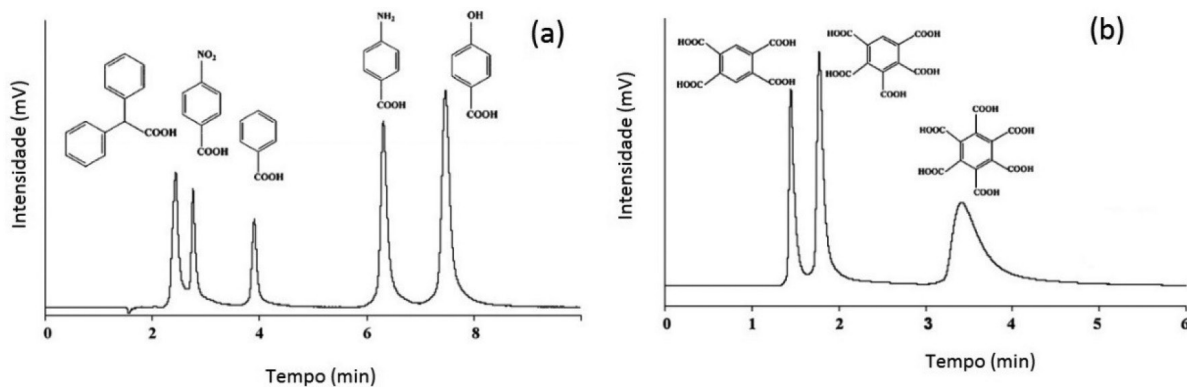
### Seleção de colunas em HILIC

Com o grande número de SP e colunas cromatográficas disponíveis comercialmente, somada àquelas produzidas em laboratório, tipo *labmade*, surge a necessidade de se prever o comportamento de uma determinada SP frente à separação de analitos com características específicas, através do estudo de suas interações moleculares com a SP e MP.

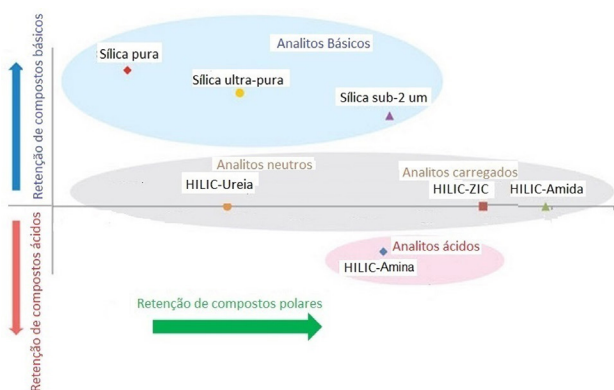
Em HILIC, para se otimizar a retenção dos analitos polares, sugere-se a observação dos valores de  $\log P$  e compará-lo com o grau de polaridade da SP. Por outro lado, alguns diagramas, como apresentados na Figura 8, desenvolvido pelos fabricantes de colunas, podem ser uma ferramenta interessante para seleção de SP para uma aplicação específica.

Assim, de acordo com a Figura 8, SP com elevada hidrofiliicidade, com grupos amida e zwitteriônicas (localizadas mais a direita no diagrama), deveriam ser escolhidas para separar compostos mais polares e hidrofílicos. Para a separação de analitos básicos, as fases recomendadas seriam as mais acima do eixo y, a saber, SP com alta capacidade de interação com cátions, à base de sílica. No entanto, para retenção de compostos ácidos, SP com elevada capacidade de interação com ânions são as mais apropriadas, como as que apresentam grupos amina. E por fim, SP que não apresentam propriedades de troca iônica, como as modificadas com grupos ureia, são as mais recomendadas para a separação de misturas com analitos neutros, ácidos, básicos.<sup>94,95</sup>

Por outro lado, assim como em cromatografia líquida no modo fase reversa, ou em cromatografia com fluido supercrítico, pode-se utilizar metodologias e modelos matemáticos para caracterizar SP



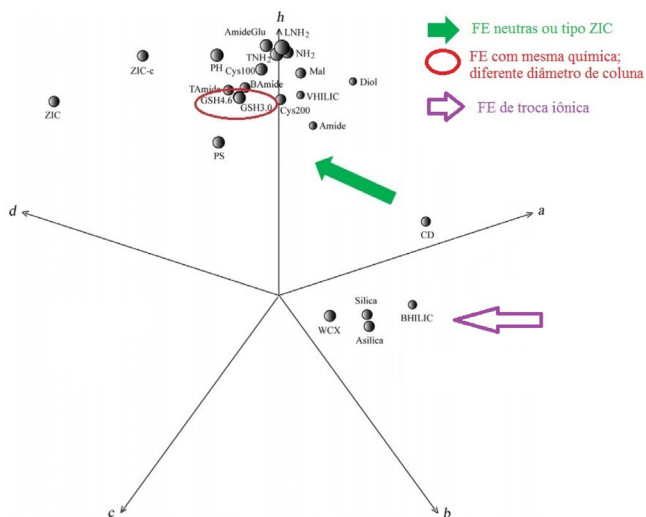
**Figura 7.** Separações de ácidos monocarboxílicos polares em (a) e separação de ácidos multi-carboxílicos em (b). Condições cromatográficas em (a): vazão:  $1 \text{ mL min}^{-1}$ ; MP: ACN: tampão acetato de sódio  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  (95:5 v/v), pH 6; detecção 254 nm. Condições cromatográficas em (b): vazão:  $1 \text{ mL min}^{-1}$ ; MP: ACN: tampão acetato de sódio  $3 \text{ mmol L}^{-1}$  (50:50 v/v), pH 11; detecção 254 nm. Em (a) e (b) foi utilizada coluna à base de titânia ( $\text{TiO}_2$ ) ( $150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ). Adaptada da ref. 78



**Figura 8.** Diagrama para seleção de uma SP tipo HILIC de acordo com as propriedades químicas dos analitos a serem separados. Adaptada das refs. 94 e 95

por meio do estudo das interações moleculares que ocorrem durante o processo de separação cromatográfica.<sup>96-101</sup>

Schuster e Lindner<sup>102,103</sup> foram os pioneiros na utilização do modelo dos parâmetros de solvatação, LSER (do inglês *linear solvation energy relationship*), para classificar e avaliar o comportamento de 23 colunas cromatográficas tipo HILIC em duas faixas de pH, 3 e 5. Nesse trabalho, o coeficiente de ajuste do modelo ( $r^2$ ) apresentou valores entre 0,487 e 0,854, devido à utilização de descritores de espécies iônicas na sua forma neutra. Para sanar essa limitação, Wang *et al.*<sup>104</sup> propuseram uma adaptação ao modelo de Schuster e Lindner, baseado na retenção de 41 solutos representando 5 propriedades relacionadas aos mecanismos de retenção em HILIC: h, habilidade de realizar partição hidrofílica; a, acidez; b, basicidade; c, capacidade de realizar troca catiônica e d, capacidade de realizar troca aniônica, o que proporcionou um modelo matemático mais adequado, com coeficiente de ajuste do modelo ( $r^2$ )  $\geq 0,990$  e com baixo desvio padrão (SD),  $\leq 0,041$ . Além disso, com base nos coeficientes de regressão do modelo relacionados a estas interações, a seletividade de SP HILIC foi plotada num diagrama do “tipo aranha” (do inglês, *spider diagram*).<sup>105</sup> Esse diagrama serve para guiar usuários e pesquisadores na seleção de colunas mais adequadas para a separação de um analito com propriedade específica e baseado nas propriedades estudadas em HILIC (Figura 9).



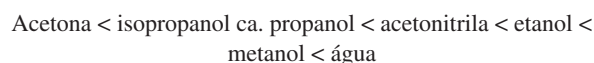
**Figura 9.** Diagrama tipo aranha das 23 colunas cromatográficas caracterizadas por Wang *et al.*,<sup>104</sup> utilizando a HILIC para os cinco tipos de interações avaliadas pelo modelo dos parâmetros de solvatação: h, habilidade de realizar partição hidrofílica; a, acidez; b, basicidade; c, capacidade de realizar troca catiônica; d, capacidade de realizar troca aniônica. Adaptada da ref. 104

De acordo com a Figura 9, SP neutras e zwitteriônicas (ZIC) estão na mesma região do diagrama e, por isso, apresentam comportamento de retenção semelhante, ao passo que FE trocadoras de cátions estariam mais distantes no diagrama por apresentarem interações diferenciadas das colunas neutras e tipo ZIC. Por outro lado, a proximidade das SP do tipo Click TE-GSH (4.6 mm) e Click TE-GSH (3.0 mm) indicam que as dimensões da coluna cromatográfica (no caso diâmetro de coluna) têm papel insignificante no perfil de seletividade cromatográfica em HILIC. Assim, poderia-se selecionar uma coluna específica de acordo com o tipo de interação desejada para uma dada separação, em função das propriedades químicas dos analitos.

## FASES MÓVEIS

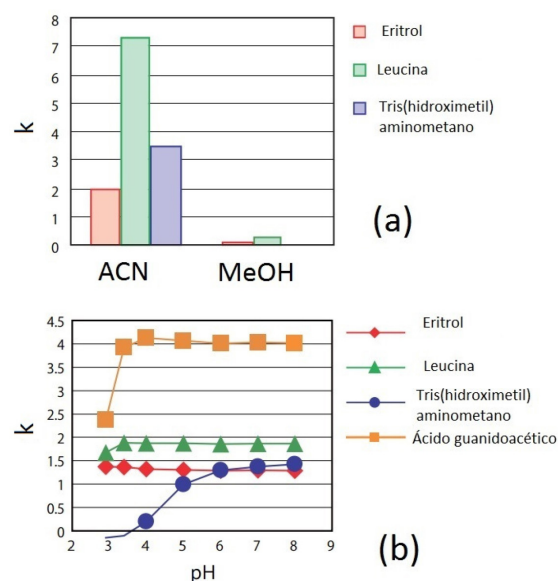
### Solventes em HILIC

A fase móvel clássica para separações em HILIC consiste em uma solução contendo um solvente aprótico como a ACN e água (com proporção de ACN > 70%, geralmente entre 70-95%). A ordem de força cromatográfica dos solventes em HILIC é dada por:<sup>6,13,29,106,107</sup>



Metanol é o solvente orgânico clássico para ser utilizado em RP-HPLC, no entanto, em HILIC sua força cromatográfica é maior e, por isso, a retenção dos analitos é bastante diminuída (Figura 10a). Nesse sentido, acetonitrila, por ser um solvente mais fraco, foi selecionada como “solvente clássico” de HILIC, uma vez que, em contraste à utilização de metanol ou outros alcoóis, sua estrutura não favorece interações por ligações de hidrogênio e não proporciona competição com a água pelos sítios ativos da fase estacionária, o que diminui a estabilidade da camada de água utilizada para separação dos compostos em HILIC.

Além disso, independente do solvente orgânico, um gradiente típico de HILIC se inicia com elevada proporção de solvente orgânico



**Figura 10.** Perfil de retenção de compostos polares utilizando como MP MeOH:10 mmol L<sup>-1</sup> CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> (90:10 v/v) em (a) e utilizando ACN:10 mmol L<sup>-1</sup> CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> (90:10 v/v) em (b). Coluna cromatográfica: Cosmosil HILIC (sílica modificada com grupos triazóis). Analitos: eritrol, leucina, tris(hidroxi metil)aminometano, e ácido guanidoacético. Adaptada da referência 106

e, por isso, compostos mais retidos são eluídos com o aumento na proporção de água na MP, uma vez que a retenção aumenta quando o conteúdo de água na MP diminui.

### Uso de fases móveis tamponadas

Quando se analisa compostos ionizáveis, faz-se necessário o uso de tampões, na concentração comumente utilizada na fase reversa (5-100 mmol L<sup>-1</sup>), como acetato, fosfato, formiato, etc., mantendo-se a elevada proporção de solvente orgânico. O pH do tampão geralmente fica entre 2-7,5 unidades e o uso de tampões com pH mais elevado aumenta a retenção (Figura 10b).

Como se pode observar na Figura 10b, SP com suportes de sílica podem ser utilizadas na faixa de 2 < pH < 8, visto que em pH acima de 8 ocorre a dissolução da sílica e o colapso da SP e em pH menores que 2 ocorre a hidrólise da ligação siloxano (Si-O-Si-C), com a quebra da ligação entre a fase ligada e o suporte cromatográfico, resultando em uma perda contínua de fase, com subsequente perda de retenção do analito. Por isso, não se recomenda em HILIC uso de SP com suportes de sílica ou com sílica pura quando se utiliza tampões acima ou abaixo dessa faixa de pH.<sup>108-110</sup> Para separação de solutos ácidos, deve-se evitar o uso de tampões a base de formiato de amônio por apresentarem baixa retenção neste tipo de MP. Nesse caso, recomenda-se o uso de tampões à base de ácido trifluoroacético, pois diminuem a repulsão entre os solutos carregados negativamente e os silanóis residuais da SP base de sílica.<sup>6</sup>

### Uso de aditivos

O uso de ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA, do inglês, *ethylenediamine tetraacetic acid*) na concentração de 5 mmol L<sup>-1</sup> ou de tampão citrato pH 7 (10 mmol L<sup>-1</sup>) tem sido reportada<sup>106</sup> como uma alternativa interessante para suprimir interações indesejáveis entre os silanóis ácidos presentes no suporte e os analitos básicos, o que leva ao alargamento dos picos cromatográficos e perda da simetria.

Para analitos ácidos, quando se utiliza o detector espectrômetro de massas e ionização por *electrospray* (ESI-MS), ácido ftálico na concentração de 0,08 mmol L<sup>-1</sup> aumenta a detectabilidade devido ao desfavorecimento da formação de adutos de sódio com os analitos. Também foi reportado o aumento da simetria dos picos cromatográficos.<sup>111</sup>

## HILIC ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

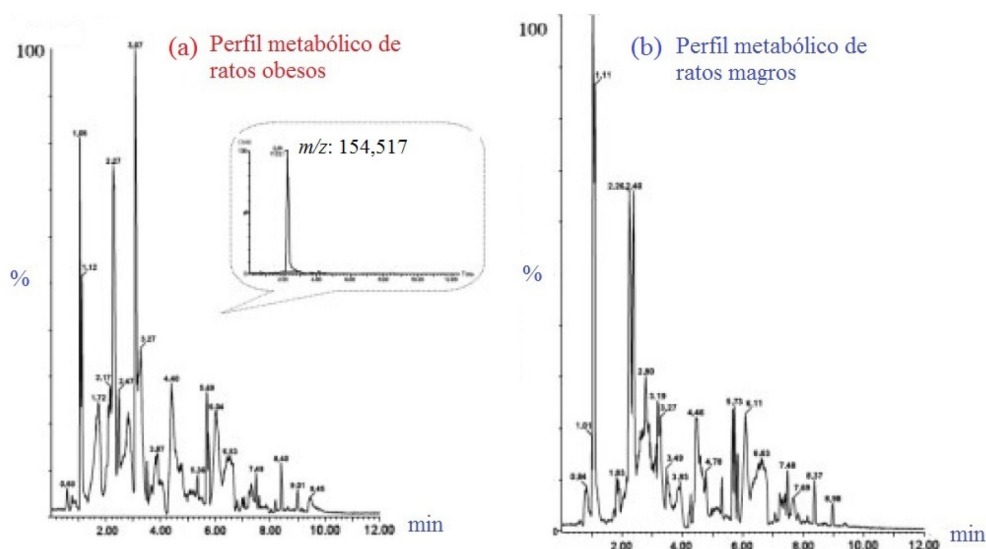
A alta compatibilidade da HILIC com a espectrometria de massas, devido à elevada porcentagem de solvente orgânico na MP, tem elevado o número de aplicações da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, o que pode ser evidenciado por suas aplicações em diversas áreas da ciência como em química ambiental,<sup>112-114</sup> de alimentos,<sup>115-118</sup> na área farmacêutica,<sup>119-122</sup> na área clínica,<sup>111,123-125</sup> e, mais recentemente, na área ômica (proteômica, glicômica, lipidômica, peptômica, etc.)<sup>126-132</sup>

Assim como na modalidade em fase reversa, o método mais utilizado para ionizar os analitos é a ionização por *electrospray*, devido ao estado físico líquido da MP.

Em metabolômica, HILIC acoplada à MS tem se apresentado como uma ferramenta importante e complementar a cromatografia líquida em fase reversa, para compostos polares que não são retidos ou têm baixa retenção. O acoplamento com o espectrômetro de massas permite a elucidação estrutural dos metabólitos uma vez que o objetivo principal é fornecer o mais abrangente conjunto de perfis de metabólitos o quanto possível para os diferentes tipos de matrizes (fluidos biológicos, tecidos, células, etc.).<sup>8</sup>

A MS e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR, do inglês *nuclear magnetic resonance*) são atualmente as principais tecnologias analíticas para a geração de dados para estudos na área de metabolômica, sendo que a MS ainda fornece uma importante vantagem: a possibilidade do fácil e direto acoplamento com a cromatografia. Nesse sentido, HILIC-MS proporciona não só a retenção de compostos polares, mas a possibilidade do estudo de novas interações relativas à química complementar das SP. Da mesma forma, a alta porcentagem de solvente orgânico na MP permite a detecção de diversos analitos em ambos os modos de ionização, positiva ou negativa, maximizando o número de compostos a serem estudados.

Os estudos de Godejohann,<sup>133</sup> por exemplo, ilustram a complementaridade da HILIC em relação a RP-HPLC na separação e identificação de metabólitos polares endógenos em urina de ratos tipo "Zucker", criados em laboratório para serem utilizados como modelos genéticos para o estudos de obesidade, utilizando o detector MS (Figura 11). Nesse trabalho, os compostos creatinina, creatina, uracil, trigoneline e ácido hipúrico foram separados no modo HILIC utilizando uma coluna polar de sílica e o perfil de separação comparado com aquele que utilizou uma coluna tipo C18 em modo fase reversa, ambos



**Figura 11.** Perfil de separação dos metabólitos de ratos obesos em (a) e magros em (b) separados por HILIC e identificados por MS. A extração do íon  $m/z$  154,517 revelou melhor detectabilidade desse analito em HILIC quando comparado com o modo em RP. Adaptada da ref. 133

**Tabela 1.** Aplicações recentes da separação de compostos por HILIC

Analito	Matriz	Fase estacionária	Fase móvel	Tipo de detecção	Referência
Solutos polares neutros (dimetilformamida, tolueno, formamida e tiuréia)	padrões	tipo zwitteriônica (em suporte de sílica monolítica); coluna com 475 mm × 75 µm (capilar)	ACN/H <sub>2</sub> O (90:10, v/v), com vazão de 100 µL min <sup>-1</sup> (modo isocrático)	UV	5
Fármacos (albuterol, bametano, nicotina e cotinina)	padrões	sílica pura, coluna com 50 mm × 2,0 mm, 5 µm diâmetro de partícula	ACN/H <sub>2</sub> O acidificada com 0,2% de ácido fluoroacético (70:30, v/v); com vazão de 0,5 mL min <sup>-1</sup> (modo isocrático)	ESI-MS	11
Antioxidantes (flavonas e ácidos fenólicos)	cerveja	sílica modificada com grupos diol ou polietilenoglicol (PEG); coluna com 150 mm × 2,1 mm, 5 µm diâmetro de partícula (PEG) e 125 mm × 4,0 mm, 5 µm de diâmetro de partícula (diol)	ACN/tampão acetato 10 mmol L <sup>-1</sup> , pH 3,0, 96:4 (v/v), com vazão de 0,5 mL min <sup>-1</sup> ; (modo isocrático) (coluna PEG) e ACN/tampão acetato 10 mmol L <sup>-1</sup> (pH 3,0) com vazão de 0,8 mL min <sup>-1</sup> (modo gradiente) (coluna diol)	UV	16
Bases nitrogenadas	padrões	tipo zwitterionica (em suporte de sílica), coluna com 100 mm × 2,1 mm, 3 µm diâmetro de partícula	ACN/tampão acetato 10 mmol L <sup>-1</sup> , (95:5, v/v), com vazão de 0,2 mL min <sup>-1</sup> ; (modo isocrático)	UV	20
Nucleosídeos	padrões	sílica modificada com líquido iônico, coluna com 100 mm × 2,1 mm, 3 µm diâmetro de partícula	ACN/tampão formato 10 mmol L <sup>-1</sup> , (95:5, v/v), com vazão de 0,2 mL min <sup>-1</sup> , (modo isocrático)	UV	22
Nucleosídeos	padrões	sílica modificada com grupos diol, coluna com 100 mm × 2,1 mm, 2,7 µm diâmetro de partícula	ACN/tampão acetato 10 mmol L <sup>-1</sup> , pH 5,0 (95:5, v/v), com vazão de 0,3 mL min <sup>-1</sup> (modo gradiente)	UV	39
Saponinas	padrões	mercapto-sílica modificada com rebaudioside A, coluna com 150 mm × 4,6 mm, 5 µm diâmetro de partícula	ACN/H <sub>2</sub> O (85:15, v/v), com vazão de 0,3 mL min <sup>-1</sup> (modo gradiente)	UV	40
Nucleosídeos	padrões	sílica modificada com glicosídeo de esteviol, coluna com 150 mm × 4,6 mm, 5 µm diâmetro de partícula	ACN/tampão formato 100 mmol L <sup>-1</sup> , pH 3,0 (90:10, v/v), com vazão de 0,3 mL min <sup>-1</sup> (modo gradiente)	UV	40
Açúcares	Folhas de <i>L. lucidus</i>	sílica modificada com glicosídeo de esteviol, coluna com 150 mm × 4,6 mm, 5 µm diâmetro de partícula	ACN/H <sub>2</sub> O (85:15, v/v), com vazão de 0,3 mL min <sup>-1</sup> (modo isocrático)	ELSD	40
Oligossacarídeos	pele de sapo (medicamento da medicina chinesa tradicional)	sílica modificada com ciclodextrinas, coluna com 150 mm × 4,6 mm, 5 µm diâmetro de partícula	ACN/tampão acetato 100 mmol L <sup>-1</sup> (90:10, v/v), vazão de 1 mL min <sup>-1</sup> (modo gradiente)	ELSD	55
Nucleosídeos	padrões	sílica modificada com grupos tiol e carboxila, coluna com 150 mm × 4,6 mm, 5 µm diâmetro de partícula	ACN/tampão acetato 20 mmol L <sup>-1</sup> , pH 6,5, 89:11(v/v), vazão de 1 mL min <sup>-1</sup> (modo isocrático)	UV	57
Ácidos carboxílicos	padrões	titânia, coluna com 150 mm × 4,6 mm, 5 µm diâmetro de partícula.	ACN/tampão acetato 10 mmol L <sup>-1</sup> , (95:5, v/v), com vazão de 1 mL min <sup>-1</sup> , (modo isocrático)	UV	78
Metabólitos	urina de ratos	Sílica pura, coluna com 250 mm × 4 mm, 4 µm diâmetro de partícula	ACN (0,2% de ácido fórmico)/H <sub>2</sub> O (com 100 mmol L <sup>-1</sup> NH <sub>3</sub> ), (90:10, v/v), com vazão de 0,5 mL min <sup>-1</sup> (modo gradiente)	ESI-MS	133
Mononucleotídeos	leite	sílica modificada com grupos amina, amida e diol; coluna com 150 mm × 4,6 mm, 5 µm diâmetro de partícula	ACN/H <sub>2</sub> O acidificada, pH 2,5, (70:30, v/v), com vazão de 0,8 mL min <sup>-1</sup> ; (modo isocrático)	DAD	134
Biomarcadores	suco de laranja, leite	sílica modificada com grupos amina; coluna com 250 mm × 4,6 mm, 5 µm diâmetro de partícula	ACN/tampão fosfato 10 mmol L <sup>-1</sup> , pH 4,75, com vazão de 1,2 mL min <sup>-1</sup> ; (modo isocrático)	UV	135
Metabólitos urinários	urina	tipo zwitterionica (em suporte de sílica), coluna com 150 mm × 2,1 mm, 5 µm diâmetro de partícula	ACN/tampão acetato 50 mmol L <sup>-1</sup> , com vazão de 0,2 mL min <sup>-1</sup> ; (modo gradiente)	ESI-MS	136
Cocaína e seus metabólitos	folhas de coca, cabelo humano	sílica pura, coluna com 100 mm × 2,1 mm, 2,7 µm diâmetro de partícula	ACN/tampão formiato 10 mmol L <sup>-1</sup> , pH 4,2, com vazão de 0,3-0,5 mL min <sup>-1</sup> ; (modo gradiente)	ESI-MS	137
Fármacos	plasma humano	sílica pura, coluna com 250 mm × 4,6 mm, 5 µm diâmetro de partícula	ACN/tampão formiato 10 mmol L <sup>-1</sup> , pH 5,5, 90:10, (v/v), com vazão de 1,0 mL min <sup>-1</sup> (modo isocrático)	UV	138



utilizando como detector espectrômetro de massas com analisador por tempo de voo (do inglês, *time-of-flight*). A utilização dos dois modos de separação permitiu a obtenção de resultados complementares em relação à retenção dos compostos analisados e os analitos, que eluíram praticamente junto com o volume morto em fase reversa, porém, foram efetivamente separados em HILIC, o que permitiu se determinar o perfil metabólico de ratos magros e ratos obesos em amostras de urina.

## APLICAÇÕES RECENTES

Algumas aplicações recentes da HILIC estão sumarizadas na Tabela 1, na qual se pode observar que as possibilidades de análise com HILIC são amplas e variadas, desde a separação de metabólitos ou biomarcadores, fármacos, drogas de abuso ou seus metabólitos em matrizes complexas como alimentos, plasma, amostras ambientais, ou cabelos, separados em colunas cromatográficas de sílica pura ou modificada com grupos polares, ciclodextrinas, líquidos iônicos e zwitteriônicos, e utilizando detectores mais simples, como ultravioleta (UV), por arranjos de diodos (DAD, do inglês, *diode array detector*), de espalhamento de luz (ELSD, do inglês, *evaporative light scattering detector*) ou ainda detectores mais sofisticados como o MS.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

HILIC representa uma nova e recente modalidade de separação da cromatografia líquida e tem como principal vantagem a ortogonalidade em relação à cromatografia líquida em fase reversa. HILIC tem sido utilizada na separação de compostos polares em diversas áreas da ciência como a área farmacêutica, de alimentos, da química ambiental, em toxicologia, metabólica, entre outras.

Uma das áreas de pesquisa dentro de separações que mais tem contribuído para o aumento das publicações no meio acadêmico e a aplicação da HILIC na indústria se deve à pesquisa e o desenvolvimento de novas fases estacionárias com características químicas e de retenção baseadas em interações polares, como, por exemplo, ligações de hidrogênio. Nesse sentido, há muito que se pesquisar para se produzir fases estacionárias cada vez mais seletivas e com características ainda mais apropriadas. O estudo das interações moleculares que ocorrem entre analitos, MP e SP, baseados principalmente na utilização de modelos matemáticos – como o modelo dos parâmetros de solvatação que descreve essas interações a fim de elucidar com mais detalhes os mecanismos que regem a retenção no modo HILIC, bem como permite a previsão do perfil de separação baseado nas características físico-químicas dos analitos a fim de se selecionar uma SP mais adequada para a separação de um grupo específico ou classes de analitos, também merece destaque.

## AGRADECIMENTOS

À FAPESP pela bolsa de pós-doutorado (processo 2012/23518-2) e auxílio financeiro (processo 2013/25933-0). Esta é uma contribuição do Instituto Nacional de Química Bioanalítica (INCTBio).

## REFERÊNCIAS

- Maldaner, L.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; *Quim. Nova* **2010**, *33*, 1559.
- Alpert, A. J.; *J. Chromatogr.* **1990**, *499*, 177.
- Gama, M. R.; Silva, R. G. C.; Collins, C. H. C.; Bottoli, C. B. G.; *Trends Anal. Chem.* **2012**, *37*, 48.
- Mogollón, G. S. N.; Lima, P. F.; Gama, M. R.; Furlan, M. F.; Braga, S. C. G. N.; Prata, P. S.; Jardim, I. C. S. F.; Augusto, F.; *Quim. Nova* **2014**, *37*, 1680.
- Lin, H.; Ou, J.; Zhang, Z.; Dong, J.; Wu, M.; Zou, H.; *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 2721.
- Buszewski, B.; Noga, S.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402*, 231.
- Cubbon, S.; Antonio, C.; Wilson, J.; Thomas-Oates, J.; *Mass Spectrom. Rev.* **2010**, *29*, 671.
- Spagou, K.; Tsoukali, H.; Raikos, N.; Gika, H.; Wilson, I. D.; Theodoridis, G.; *J. Sep. Sci.* **2010**, *33*, 716.
- Xu, R. N.; Rieser, M. J.; El-Shourbagy, T. A.; *Bioanalysis* **2009**, *1*, 239.
- Zhang, F.; Shen, G.; Ji, S.; Yang, B.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2015**, *38*, 349.
- Naidong, W.; Shou, W.; Chen, L. Y.; Jiang, X. L.; *J. Chromatogr. B* **2001**, *754*, 387.
- Dejaegher, B.; Heyden, Y. V.; *J. Sep. Sci.* **2010**, *33*, 698.
- Jandera, P.; *Anal. Chim. Acta* **2011**, *692*, 1.
- Oyler, A. R.; Armstrong, B. L.; Cha, J. Y.; Zhou, M. X.; Yang, Q.; Robinson, R. I.; Dunphy, R.; Burinsky, D. J.; *J. Chromatogr. A* **1996**, *724*, 378.
- Tolstikov, V. V.; Fiehn, O.; *Anal. Biochem.* **2002**, *301*, 298.
- Jandera, P.; Hajek, T.; *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 3603.
- Armstrong, D. W.; Jin, H. L.; *J. Chromatogr.* **1989**, *462*, 219.
- Kawachi, Y.; Ikegami, T.; Takubo, H.; Ikegami, Y.; Miyamoto, M.; Tanaka, N.; *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 5903.
- Wang, C.; Jiang, C.; Armstrong, D. W.; *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 1980.
- Qiao, L.; Dou, A.; Shi, X.; Li, H.; Shan, Y.; Lu, X.; Xu, G.; *J. Chromatogr. A* **2013**, *1286*, 137.
- Pino, V.; Afonso, M. A.; *Anal. Chim. Acta* **2012**, *714*, 20.
- Qiao, L.; Li, H.; Shan, Y.; Wang, S.; Shi, X.; Lu, X.; Xu, G.; *J. Chromatogr. A* **2014**, *1330*, 40.
- Guo, Z. M.; Lei, A. W.; Zhang, Y. P.; Xu, Q.; Xue, X. Y.; Zhang, F. F.; Liang, X. M.; *Chem. Commun.* **2007**, 2491.
- Fu, Q.; Guo, Z.; Liang, T.; Zhang, X.; Xu, Q.; Liang, X.; *Anal. Methods* **2010**, *2*, 217.
- Ikegami, T.; Tomomatsu, K.; Takubo, K.; Horie, K.; Tanaka, N.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *474*, 1184.
- Pesek, J. J.; Matyska, M. T.; In *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) and Advanced Applications*; Wang, P. G.; He, W., eds.; CRC Press: Boca Raton, 2011, ch. 2.
- Weng, N.; *J. Chromatogr. B* **2003**, *796*, 209.
- Weng, N.; Shou, W.; Chen, Y.; Jiang, X.; *J. Chromatogr. B* **2001**, *754*, 387.
- Hemstrom, P.; Irgum, K.; *J. Sep. Sci.* **2006**, *29*, 1784.
- Gregor, H. P.; Collins, F. C.; Pope, M.; *J. Colloid Sci.* **1951**, *6*, 304.
- Samuelson, O.; Sjöström, E.; *Sven. Kem. Tidskr.* **1952**, *64*, 305.
- Rückert, H.; Samuelson, O.; *Sven. Kem. Tidskr.* **1954**, *66*, 337.
- Linden, J. C.; Lawhead, C. L.; *J. Chromatogr.* **1975**, *105*, 125.
- Palmer, J. K.; *Anal. Lett.* **1975**, *8*, 215.
- Verhaar, L. A. T.; Kuster, B. F. N.; *J. Chromatogr.* **1982**, *234*, 57.
- Nikolov, Z. L.; Reilly, P. J.; *J. Chromatogr.* **1985**, *325*, 287.
- Yoshida, T.; *J. Biochem. Biophys. Methods* **2004**, *60*, 265.
- Yoshida, T.; *J. Chromatogr. A* **1998**, *811*, 61.
- Bell, D. S.; *LCGC North Am.* **2015**, *33*, 90.
- Liang, T.; Fu, Q.; Shen, A.; Wang, J.; Xin, H.; Guo, K. Y.; Liang, X.; *J. Chromatogr. A* **2015**, *1388*, 110.
- Garcia-Gomez, D.; Rodriguez-Gonzalo, E.; Carabias-Martinez, R.; *Trends Anal. Chem.* **2013**, *47*, 111.
- McCalley, D. V.; *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 3408.
- Chen, Y.; Wang, K.; Liu, Y.; Yang, H.; Yao, S.; Chen, B.; Nie, L.; Xu, G. M.; *Electrophoresis* **2013**, *34*, 1877.
- Li, R.; Yuan, Q.; Huang, Y.; *Chin. J. Chromatogr.* **2014**, *32*, 675.
- Zhang, F.; Shen, G.; Ji, S.; Yang, B.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2015**, *38*, 349.
- Chu, C. H.; Liu, R. H.; *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2177.
- Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, B.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004.

48. Grammel, M.; Hang, H. C.; *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *40*, 2004.
49. Xie, R.; Hong, S.; Chen, X.; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 747.
50. Kolb, H. C.; Sharpless, B.; *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 1128.
51. Thirumurugan, P.; Matosiuk, D.; Jozwiak, K.; *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 4905.
52. Xi, W.; Scott, T. F.; Kloxin, C. J.; Bowman, C. N.; *Adv. Funct. Mater.* **2014**, *24*, 2572.
53. Guo, Z. M.; Liu, Y. F.; Xu, J. Y.; Xu, Q.; Xue, X. Y.; Zhang, F. F.; Ke, Y. X.; Liang, X. M.; Lei, A. W.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1191*, 78.
54. Zhao, Y. Y.; Yu, L.; Guo, Z. M.; Li, X. L.; Liang, X. M.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399*, 3359.
55. Guo, Z.; Jin, Y.; Liang, T.; Liu, Y.; Xu, Q.; Liang, X.; Le, A.; *J. Chromatogr. A* **2011**, *1216*, 257.
56. Zhao, Y. Y.; Li, X. L.; Yan, J. Y.; Guo, Z. M.; Liang, X. M.; *Anal. Methods* **2012**, *4*, 1244.
57. Peng, X. T.; Lui, T.; Ji, S. X.; Feng, Y. Q.; *J. Sep. Sci.* **2013**, *36*, 2571.
58. Liu, Y.; Du, Q.; Yang, B.; Zhang, F.; Chang, C.; Liang, X.; *Analyst* **2012**, *137*, 1624.
59. Legido-Quigley, C.; Marlin, L. D.; Melin, V.; Manz, A.; Smith, N. W.; *Electrophoresis* **2003**, *24*, 917.
60. Moravcová, D.; Jandera, P.; Urban, J.; Planeta, J.; *J. Sep. Sci.* **2004**, *27*, 789.
61. Faria, A. M.; Bottolli, C. B. G.; Jardim, I. C. S. F.; Collins, C. H.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 300.
62. Svec, F.; Geiser, L.; *LCGC North Am.* **2006**, *24*, 22.
63. Carr, C. D.; *LCGC Column Technology Supplement* **2006**, *4*, 44.
64. Ali, I.; Aboul-Enein, H. Y.; Gupta, V. K.; *Nanochromatography and Nanocapillary Electrophoresis: Pharmaceutical and Environmental Analyses*, John Wiley & Sons: Hoboken, 2009, ch. 2.
65. Wu, R.; Zou, H.; M. T. In *Monolithic Chromatography and Its Modern Applications*; Wang, P. G.; He, W., eds.; ILM Publications: Hertfordshire, 2010, ch. 9.
66. Silva, R. G. C.; Collins, C. H.; Bottolli, C. B. G.; *Quim. Nova* **2012**, *34*, 849.
67. Silva, C. G. A.; Collins, C. H.; Bottolli, C. B. G.; *Microchem. J.* **2014**, *116*, 249.
68. Liang, Y.; Zhang, L.; Zhang, Y.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 2095.
69. Tanaka, N.; Kobayashi, H.; Nakanishi, K.; Minakuchi, H.; Ishizuka, N.; *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 420A.
70. Tanaka, N.; Kobayashi, H.; Ishizuka, N.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Hosoya, K.; Ikegami, T.; *J. Chromatogr. A* **2002**, *965*, 35.
71. Brinker, C. J.; Scherer, G. W.; *The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Academic Press: San Diego, 1990, ch. 1.
72. Miyabe, K.; Guiochon, G.; *J. Sep. Sci.* **2004**, *27*, 853.
73. Randon, J.; Huguet, S.; Piram, A.; Puy, G.; Demesmay, C.; Rocca, J. L.; *J. Chromatogr. A* **2006**, *1109*, 19.
74. Randon, J.; Huguet, S.; Demesmay, C.; Berthold, A.; *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 1496.
75. Randon, J.; Guerrin, J. F.; Rocca, J. L.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1214*, 186.
76. Konishi, J.; Fujita, K.; Nakanishi, K.; Hirao, K.; Morisato, K.; Miyazaki, S.; *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 7375.
77. Zhou, T.; Lucy, C. A.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1187*, 87.
78. Zhou, T.; Lucy, C. A.; *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 82.
79. Consorti, C. S.; Souza, R. F.; Dupont, J.; Suarez, P. A. Z.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 830.
80. Anderson, J. L.; Armstrong, D. W.; *Anal. Chem.* **2003**, *1575*, 4851.
81. Bertoti, A. R.; Ferreira, J. C. N.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 1934.
82. Liu, J.; Jonsson, J. A.; Jiang, G.; *Trends Anal. Chem.* **2005**, *24*, 20.
83. Pandey, S.; *Anal. Chim. Acta* **2006**, *556*, 38.
84. Sun, P.; Armstrong, D. W.; *Anal. Chim. Acta* **2010**, *661*, 1.
85. Berthod, A.; Ruiz-Angel, M. J.; Broch-Carda, S.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1184*, 6.
86. van Meter, D. S.; Stuart, O. D.; Carle, A. B.; Stalcup, A. M.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1191*, 67.
87. Pino, V.; Afonso, A. M.; *Anal. Chim. Acta* **2012**, *714*, 20.
88. Xin, B.; Hao, J.; *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 7171.
89. Zhang, M.; Liang, X.; Jiang, S.; Qiu, H.; *Trends Anal. Chem.* **2014**, *53*, 60.
90. Sun, M.; Feng, J.; Luo, C.; Liu, X.; Jiang, S.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 2651.
91. Qui, H.; Mallik, A. K.; Takafuji, M.; Jiang, S.; Ihara, H.; *Analyst* **2012**, *137*, 2553.
92. Qiao, L.; Wang, S.; Li, H.; Shan, Y.; Dou, A.; Shi, X.; Xu, G.; *J. Chromatogr. A* **2014**, *1360*, 240.
93. Qiao, L.; Shi, X.; Lu, X.; Xu, G.; *J. Chromatogr. A* **2015**, *1396*, 62.
94. <https://www.thermoscientific.com/content/tfs/en/about-us/general-landing-page/hilic-overview.html>, acessado em Novembro de 2015.
95. [http://www.biosseparacio.hu/\\_user/browser/File/Thermo/Applik%-C3%A1ci%C3%B3/20957\\_HPLC\\_2014\\_HILIC\\_Methods.pdf](http://www.biosseparacio.hu/_user/browser/File/Thermo/Applik%-C3%A1ci%C3%B3/20957_HPLC_2014_HILIC_Methods.pdf), acessado em Novembro de 2015.
96. Vitha, M.; Carr, P. W.; *J. Chromatogr. A* **2006**, *1126*, 143.
97. West, C.; Lesellier, E.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1191*, 21.
98. West, C.; Fougère, L.; J.; Lesellier, E.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1189*, 227.
99. West, C.; Ogden, J.; Lesellier, E.; *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 5600.
100. West, C.; Lesellier, E.; *J. Chemom.* **2012**, *26*, 52.
101. Galea, C.; Mangelings, D.; Heyden, Y. V.; *Anal. Chim. Acta* **2015**, *886*, 1.
102. Schuster, G.; Lindner, W.; *J. Chromatogr. A* **2013**, *1273*, 73.
103. Schuster, G.; Lindner, W.; *J. Chromatogr. A* **2013**, *1301*, 98.
104. Wang, J.; Guo, Z.; Shen, A.; Yu, L.; Xiao, Y.; Xue, X.; Zhang, X.; Liang, X.; *J. Chromatogr. A* **2015**, *1398*, 29.
105. Lesellier, E.; *J. Chromatogr. A* **2015**, *1389*, 49.
106. [http://www.nacalai.co.jp/global/cosmosil/pdf/cosmosil\\_hilic\\_application\\_notebook.pdf](http://www.nacalai.co.jp/global/cosmosil/pdf/cosmosil_hilic_application_notebook.pdf), acessado em Novembro de 2015.
107. Lanças, F. M.; *Sci. Chromatogr.* **2010**, *2*, 49.
108. Kirkland, J. J.; van Straten, M. A.; *J. Chromatogr. A* **1995**, *691*, 3.
109. Kirkland, J. J.; Henderson, J. W.; DeStefano, J. J.; van Straten, M. A.; Claessens, H. A.; *J. Chromatogr. A* **1997**, *762*, 97.
110. Ma, L.; Carr, P. W.; *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4681.
111. Qi, W. S.; Guan, Q.; Sun, T. Q.; Cao, Y. J.; Zhang, L.; Guo, Y.; *Anal. Chim. Acta* **2015**, *870*, 75.
112. Taujensis, L.; Olsauskaite, V.; Padarauskas, A.; *Acta Chromatogr.* **2015**, *27*, 373.
113. Fan, H.; Qiu, J. B.; Fan, L.; Li, A. F.; *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22*, 5943.
114. Rodin, I.; Baygildiev, T.; Stavrianidi, A.; Braun, A.; Rybalchenko, I.; Shpigun, O.; *Chromatographia* **2015**, *78*, 585.
115. Inoue, K.; Tanada, C.; Sakamoto, T.; Tsutsui, H.; Akiba, T.; Min, J. Z.; Todoroki, K.; Yamano, Y.; Toyo'oka, T.; *Food Chem.* **2015**, *184*, 318.
116. Ghfar, A. A.; Wabaidur, S. M.; Ahmed, A. Y. B. H.; Allothman, Z. A.; Khan, M. R.; Al-Shaalan, N. H.; *Food Chem.* **2015**, *176*, 487.
117. Roullier-Gall, C.; Witting, M.; Tziotis, D.; Ruf, A.; Gougeon, R. D.; Schmitt-Kopplin, P.; *Tetrahedron* **2015**, *71*, 2983.
118. Le Maux, S.; Nongonierma, A.; FitzGerald, B.; Richard, J.; *Food Chem.* **2015**, *173*, 847.
119. Vidmar, J.; Martincic, A.; Milacic, R.; Scancar, J.; *Talanta* **2015**, *138*, 1.
120. Martens-Lobenhoffer, J.; Bode-Boger, S. M.; *J. Chromatogr. B* **2015**, *990*, 164.
121. Kasagic-Vujanovic, I.; Jancic-Stojanovic, B.; Rakic, T.; Ivanovic, D.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2015**, *38*, 919.
122. Kahsay, G.; Song, H. Y.; Van Schepdael, A.; Cabooter, D.; Adams, E.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *87*, 142.
123. Meyer-Monath, M.; Chatellier, C.; Cabooter, D.; Rouget, F.; Morel, I.; Lestremau, F.; *Talanta* **2015**, *138*, 231.

124. Holcapek, M.; Cervena, B.; Cifkova, E.; Lisa, M.; Chagovets, V.; Vostalova, J.; Bancirova, M.; Galuszka, J.; Hill, M.; *J. Chromatogr. B* **2015**, *990*, 52.
125. Wang, S. H.; Wu, H. Y.; Huang, X. L.; Geng, P. W.; Wen, C. C.; Ma, J. S.; Zhou, Y. F.; Wang, X. Q.; *J. Chromatogr. B* **2015**, *990*, 118.
126. Magiera, S.; Baranowski, J.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2015**, *109*, 171.
127. Konstantina S.; Tsoukali, H.; Nikolaos R.; Gika, H.; Wilson, I. D.; Georgios, T.; *J. Sep. Sci.* **2010**, *33*, 716.
128. Cao, M. S.; Fraser, K.; Huege, J.; Featonby, T.; Rasmussen, S.; Jones, C.; *Metabolomics* **2015**, *11*, 696.
129. Meissen, J. K.; Hirahatake, K. M.; Adams, S. H.; Fiehn, O.; *Metabolomics* **2015**, *11*, 707.
130. Tufi, S.; Lamoree, M.; de Boer, J.; Leonards, P.; *J. Chromatogr. B* **2015**, *1395*, 79.
131. Vorkas, P. A.; Isaac, G.; Anwar, M. A.; Davies, A. H.; Want, E. J.; Nicholson, J. K.; Holmes, E.; *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 4184.
132. Teleki, A.; Sanchez-Kopper, A.; Takors, R. *Anal. Biochem.* **2015**, *475*, 4.
133. Godejohann M.; *J. Chromatogr. A* **2006**, *1156*, 87.
134. Sfakianaki, A. G.; Stalikas, C. D.; *Food Chem.* **2015**, *184*, 188.
135. Zuo, R.; Zhou, S.; Zuo, Y.; Deg, Y.; *Food Chem.* **2015**, *182*, 242.
136. Trivedi, D. K.; Iles, R. K.; *Biomed. Chromatogr.* **2015**, *29*, 240.
137. Rubio, N. C.; Hastedt, M.; Gonzalez, J.; Pragst, F.; *Int. J. Legal Med.* **2015**, *129*, 69.
138. Yuan, Y.; Liao, Z. J.; Wang, F. L.; Zhang, H. L.; Guo, Y.; Li, R. P.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2013**, *36*, 958.