



Avaliação dos parâmetros que afetam a separação em um método cromatográfico utilizando uma coluna HILIC

Mateus Cristofari Gayer¹, Matheus Chimelo Bianchini¹, Murilo Ricardo Sigal Carriço¹, Robson Luiz Puntel², Elton Luis Gasparotto Denardin³, Rafael Roehrs⁴

¹*Aluno do Programa de Pós Graduação em Bioquímica Universidade Federal do Pampa - Campus Uruguaiana (UNIPAMPA), Uruguaiana, Brasil.*

²*Professor do Curso de Ciências da Natureza e do Programa de Pós Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa - Campus Uruguaiana (UNIPAMPA), Uruguaiana, Brasil.*

³*Professor do Curso de Farmácia e do Programa de Pós Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa – Campus Uruguaiana (UNIPAMPA), Uruguaiana, Brasil.*

⁴*Orientador. Professor do Curso de Ciências da Natureza e do Programa de Pós Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa – Campus Uruguaiana (UNIPAMPA), Uruguaiana, Brasil.*

e-mail primeiro autor- mateusgayer.aluno@unipampa.edu.br

Na Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica (do inglês: Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, HILIC) a separação de analitos ocorre através de grupamentos polares ionizáveis ligados quimicamente às partículas de sílica. Esta cromatografia proporciona mecanismos de separação complexos, como a partição dos analitos em uma fase móvel majoritariamente orgânica com uma camada aquosa “pseudo-imobilizada” ao redor das partículas de sílica. Além disso, os grupamentos polares da fase estacionária, proporcionam interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio com as moléculas dos analitos, influenciando fortemente na capacidade de separação da coluna. Dentre as aplicações da HILIC estão as análises de compostos bioativos, como os neurotransmissores, com seus precursores e metabólitos. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar a influência de alguns parâmetros para o desenvolvimento de um método cromatográfico utilizando uma coluna HILIC para a análise das substâncias neuroativas: Serotonina (SE), Octopamina (OC), Dopamina (DA), Tirosina (TIR), Triptofano (TRP), Ácido Homovanílico (HVA). Para isso, foi utilizado um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência acoplado a um Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD) com uma coluna analítica Poroshell 120 Hilic (4,6 X 100 mm, 2,7 µm), os analitos foram detectados nos comprimentos de onda de 210 e 220 nm. Nesse estudo, foi avaliada a influência na separação de diferentes concentrações de Acetato de Amônio (AceA), a presença e o tipo de ácido na fase móvel. Os resultados obtidos mostraram que com concentrações crescentes de AceA (60, 80 e 100 mM, com 10% de fase aquosa) há diminuição no tempo de retenção dos analitos e melhora na simetria dos picos cromatográficos, porém, sem melhorar significativamente a separação, pois ocorreu co-eluição dos picos da TRP, SE e DA.

Para tentar corrigir isso, a fase móvel foi acidificada à pH 6,68 com Ácido Acético, que levou a uma melhor separação, mas esse ácido gera um aumento significativo no sinal/ruído, pela alta interferência nos comprimentos de onda utilizados. Assim, o Ácido Fórmico foi testado e apresentou melhores resultados. Por fim, o fluxo da fase móvel foi reduzido de 0,9 para 0,3 mL/min, este parâmetro não afetou a eficiência da resolução dos picos, porém estendeu o tempo da corrida cromatográfica de 17 para 30 min. Com isso, concluímos que a concentração do sal utilizado e o pH foram parâmetros críticos para a otimização do método cromatográfico para SE, OC, DA, TIR, TRP e HVA utilizando uma coluna HILIC. Além disso, a otimização destes parâmetros pode tornar as análises nessas colunas mais confiáveis e eficientes do que quando se utiliza colunas de Fase Reversa para a análise de substâncias neuroativas.

Agradecimentos: Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, ao programa de Pós Graduação e a UNIPAMPA.

Palavras-chave: HILIC; Otimização; Método cromatográfico; HPLC-DAD; Substâncias neuroativas.