Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Desenvolvimento de métodos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem* para análises de fármacos (LC-MS/MS no modo *column switching* com capilar monolítico de sílica híbrida), aminoácidos e neurotransmissores (HILIC-MS/MS) em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos

DIEGO SOARES DOMINGUES

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: **Química**.

RIBEIRÃO PRETO – SP

2015

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

DIEGO SOARES DOMINGUES

Desenvolvimento de métodos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem* para análises de fármacos (LC-MS/MS no modo *column switching* com capilar monolítico de sílica híbrida), aminoácidos e neurotransmissores (HILIC-MS/MS) em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: **Química**.

Área de Concentração: Química Analítica

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Eugênia Queiroz Nassur

RIBEIRÃO PRETO - SP

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Domingues, Diego Soares

Desenvolvimento de métodos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem* para análises de fármacos (LC-MS/MS no modo *column switching* com capilar monolítico de sílica híbrida), aminoácidos e neurotransmissores (HILIC-MS/MS) em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos.

152 p. : il. ; 30cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química Analítica.

Orientadora: Nassur, Maria Eugênia Queiroz.

1. Aminoácidos. 2. Amostras de plasma. 3. Antipsicótico. 4. Column switching. 5. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em *tandem*. 6. Esquizofrenia. 7. Interação hidrofílica. 8. Monitorização terapêutica. 9. Monolito híbrido. 10. Neurotransmissores.

DIEGO SOARES DOMINGUES

Desenvolvimento de métodos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem* para análises de fármacos (LC-MS/MS no modo *column switching* com capilar monolítico de sílica híbrida), aminoácidos e neurotransmissores (HILIC-MS/MS) em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: **Química**.

Área de Concentração: Química Analítica

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Eugênia Queiroz Nassur

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof^a. Dr^a. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos pacientes e familiares que participaram deste estudo

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter conseguido superar todas as adversidades encontradas neste período.

A minha orientadora e amiga Prof^a. Dr^a. Maria Eugênia Queiroz Nassur, pela orientação, paciência e ajuda incansável durante toda a trajetória do doutorado, pelos esforços não medidos e pela confiança em mim depositada no desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro, concedendo a Bolsa, sem a qual não poderia ter realizado este trabalho.

Ao amigo Eduardo José Crevelin por toda ajuda e conhecimentos transmitidos, sem os quais, este trabalho não poderia ter sido desenvolvido.

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes pela ajuda no desenvolvimento inicial deste projeto e pela oportunidade de estar presente na banca de defesa.

Aos Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira e Eduardo Costa Figueiredo pela oportunidade de estar presente na banca de defesa.

A minha querida amiga, mãe, orientadora, Prof^a. Dr^a. Suzana Lucy Nixdorf por estar sempre presente em cada momento da minha vida, sendo inspiração de caráter e profissionalismo.

Ao amigo de laboratório Israel Donizeti de Souza pela grande ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Ao amigo Vinicius Ricardo Acquaro Junior pela ajuda incansável, disponibilidade e amizade.

Aos amigos de laboratório Luis Fellipe Cabral Miranda, Mônia Lemos e Tamires Valim pelos momentos de descontração e alegria.

A Natália Michelato pelo apoio incondicional e por todo sentimento demonstrado durante esta trajetória.

Ao meu irmão Denis por todo incentivo e amizade.

Aos meus pais, Acacio e Malu, por todos os esforços realizados.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para que eu pudesse realizar este trabalho.

EPÍGRAFE

*Mama told me when I was young
Come sit beside me, my only son
And listen closely to what I say.
And if you do this*

*It will help you some sunny day.
Take your time... Don't live too fast,
Troubles will come and they will pass.
Go find a woman and you'll find love,
And don't forget son,
There is someone up above.*

*And be a simple kind of man.
Be something you love and understand.
Baby, be a simple kind of man.
Oh won't you do this for me son,
If you can?*

*Forget your lust for the rich man's gold
All that you need is in your soul,
And you can do this if you try.
All that I want for you my son,
Is to be satisfied.*

*And be a simple kind of man.
Be something you love and understand.
Baby, be a simple kind of man.
Oh won't you do this for me son,
If you can?*

*Boy, don't you worry.
You'll find yourself.
Follow your heart,
And nothing else.
You can do this,
If you try.
All that I want for you my son,
Is to be satisfied.*

*And be a simple kind of man.
Be something you love and understand.
Baby, be a simple kind of man.
Oh won't you do this for me son,
If you can?*

*Baby, be a simple, be a simple man
Oh, be something you love and understand
Baby, be a simple kind of man*

Simple Man - Lynyrd Skynyrd

RESUMO

DOMINGUES, D.S. **Desenvolvimento de métodos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem* para análises de fármacos (LC-MS/MS no modo *column switching* com capilar monolítico de sílica híbrida), aminoácidos e neurotransmissores (HILIC-MS/MS) em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos.** 2015. 152f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

A esquizofrenia é um transtorno neuropsiquiátrico crônico que afeta aproximadamente 1% da população mundial. As teorias neurobiológicas descrevem que a esquizofrenia é essencialmente causada por alterações bioquímicas e estruturais do cérebro, devido às disfunções nos sistemas glutamatérgico, dopaminérgico e serotoninérgico. Desta forma, a determinação das concentrações de aminoácidos e neurotransmissores em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos pode auxiliar na avaliação da eficácia da terapia. Além dos antipsicóticos, medicação de primeira linha no tratamento inicial da esquizofrenia, a maioria dos pacientes também faz uso concomitante de outras classes de fármacos, tais como antidepressivos, anticonvulsivantes e ansiolíticos para minimizar os sintomas associados a esta doença. Nesta tese, um método empregando a precipitação de proteínas (PPT) e a cromatografia líquida por interação hidrofílica acoplada à espectrometria de massas em *tandem* (HILIC-MS/MS) foi adequadamente desenvolvido e validado para a determinação de aminoácidos (aspartato, serina, glicina, alanina, metionina, leucina, tirosina e triptofano) e neurotransmissores (glutamato e ácido γ -aminobutírico) em amostras de plasma de 35 pacientes esquizofrênicos em tratamento com clozapina (27 pacientes) e olanzapina (8 pacientes) para avaliar a eficácia do tratamento, tendo como controle 38 voluntários saudáveis. O método HILIC-MS/MS apresentou linearidade do LIQ ($9,7 \text{ pmol mL}^{-1}$ - $13,3 \text{ nmol mL}^{-1}$) ao LSQ ($19,4 \text{ nmol mL}^{-1}$ - 800 nmol mL^{-1}), tempo de análise de 3,0 min, exatidão com EPR de -18 a 19% e precisão com CV de 0,1 a 16% (LIQ). A análise de variância (ANOVA), seguida por teste post-hoc de Duncan, revelou que os níveis médios plasmáticos (nmol mL^{-1}) de metionina ($F_{2,70} = 3,14$, $p = 0,049$) de pacientes esquizofrênicos em tratamento com olanzapina foram significativamente mais elevados, quando comparados aos valores obtidos com o grupo controle (voluntários saudáveis), já o nível de glutamato em pacientes esquizofrênicos em tratamento com clozapina apresentaram tendência a valores mais altos ($F_{2,70} = 2,50$, $p = 0,090$). Já os métodos, PPT/LC-MS/MS e LC-MS/MS no modo *column switching* utilizando uma coluna monolítica de sílica híbrida com grupos cianopropil na primeira dimensão, foram desenvolvidos e validados para a determinação dos antipsicóticos (olanzapina, quetiapina, clozapina, haloperidol e clorpromazina), antidepressivos (mirtazapina, paroxetina, citalopram, sertralina, imipramina, clomipramina e fluoxetina), anticonvulsivantes (carbamazepina e lamotrigina), e ansiolíticos (diazepam e clonazepam) em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos para fins de monitorização terapêutica. O método PPT/LC-MS/MS apresentou linearidade do LIQ ($0,2 \text{ ng mL}^{-1}$ - $5,0 \text{ ng mL}^{-1}$) ao LSQ ($40,5 \text{ ng mL}^{-1}$ - $10,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), exatidão com EPR de -9,7 a 8,0%, e precisão com CV de 0,1 a 12%. Já o método LC-MS/MS no modo *column switching* apresentou linearidade do LIQ ($63,0 \text{ pg mL}^{-1}$ - $1250,0 \text{ pg mL}^{-1}$) ao LSQ ($40,5 \text{ ng mL}^{-1}$ - $10,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), exatidão com EPR de -14 a 12% e precisão com CV de 0,6 a 6,5%. A pré-concentração seletiva dos fármacos na coluna monolítica com grupos cianopropil incorporados e a remoção dos componentes endógenos da amostra biológica, antes da separação cromatográfica, favoreceram a seletividade e detectabilidade do método LC-MS/MS no modo *column switching*. Este método quando comparado ao de referência PPT/LC-MS/MS, através da análise de 10 amostras de pacientes esquizofrênicos, não apresentou diferença significativa (teste t) entre as concentrações plasmáticas, podendo ser aplicado na monitorização terapêutica. Além deste fato, este método automatizado favoreceu a precisão, a exatidão e a frequência analítica.

Palavras-chave: Aminoácidos, amostras de plasma, antipsicóticos, column switching, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em *tandem*, esquizofrenia, interação hidrofílica, monitorização terapêutica, monolito híbrido, neurotransmissores.

ABSTRACT

DOMINGUES, D.S. **Development of methods for liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for drug analysis (LC-MS/MS in column switching mode with monolithic capillary hybrid silica), amino acids and neurotransmitters (HILIC-MS/MS) in plasma samples of schizophrenic patients.** 2015. 152f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Schizophrenia is a chronic neuropsychiatric disorder that affects approximately 1% of the world population. According to neurobiological theories, schizophrenia stems from biochemical and structural alterations in the brain due to dysfunction in the glutamatergic, dopaminergic, and serotonergic systems. Determining the concentrations of amino acids and neurotransmitters in plasma samples from schizophrenic patients may assist evaluation of therapy effectiveness. In addition to antipsychotics (the first-line drug in the initial treatment of schizophrenia), most patients concomitantly use other classes of drugs such as antidepressants, anticonvulsants, and anxiolytics to minimize the symptoms associated with this disease. To evaluate treatment efficacy, in this thesis a method based on protein precipitation (PPT) and hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to *tandem* mass spectrometry (HILIC-MS/MS) has been properly developed and validated to determine amino acids (aspartate, serine, glycine, alanine, methionine, leucine, tyrosine, and tryptophan) and neurotransmitters (glutamate and γ -aminobutyric acid) in plasma samples obtained from 35 schizophrenia patients treated with clozapine (27 patients) or olanzapine (8 patients); 38 healthy volunteers served as controls. The HILIC-MS/MS method was linear for concentrations ranging from the LLOQ (9.7 pmol mL^{-1} - $13.3 \text{ nmol mL}^{-1}$) to the ULOQ ($19.4 \text{ nmol mL}^{-1}$ - 800 nmol mL^{-1}). The analysis time was 3.0 min. In the case of accuracy, RSE ranged from -18 to 19%. As for precision, CV lay between 0.1 and 16% (LLOQ). Analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc Duncan showed that the average methionine serum levels (nmol mL^{-1}) ($F_{2,70} = 3.14$, $p = 0.049$) in schizophrenic patients treated with olanzapine were significantly higher as compared with the control group (healthy volunteers). The glutamate level in schizophrenic patients treated with clozapine tended to higher values ($F_{2,70} = 2.50$, $p = 0.090$). Concerning the analytical methods, PPT/LC-MS/MS and LC-MS/MS operating in the column-switching mode were developed and validated to determine antipsychotic (olanzapine, quetiapine, clozapine, haloperidol, and chlorpromazine), antidepressants (mirtazapine, paroxetine, citalopram, sertraline, imipramine, clomipramine, and fluoxetine), anticonvulsants (carbamazepine and lamotrigine), and anxiolytics (diazepam and clonazepam) in plasma samples taken from schizophrenic patients for therapeutic drug monitoring. A monolithic hybrid column containing silica with cyanopropyl groups in the first dimension was employed. The PPT/LC-MS/MS method was linear from the LLOQ (0.2 ng mL^{-1} - 5.0 ng mL^{-1}) to the ULOQ (40.5 ng mL^{-1} - $10.5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$). In the case of accuracy, RSE ranged from -9.7 to 8.0%; as for precision, CV lay between 0.1 and 12%. LC-MS/MS in the column-switching mode was linear from the LLOQ (63.0 pg mL^{-1} - $1250.0 \text{ pg mL}^{-1}$) to the ULOQ (40.5 ng mL^{-1} - $10.5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$). RSE ranged from -14 to 12%; CV lay between 0.6 and 6.5%. The drugs were selectively pre-concentrated in the monolithic column containing silica incorporated with cyanopropyl groups. For the LC-MS/MS method operating in the column-switching mode, the endogenous components of the biological sample of the LC-MS/MS method were removed before analysis. Analysis of 10 plasma samples obtained from schizophrenic patients did not reveal any significant differences (t test) between the LC-MS/MS method and the reference PPT/LC-MS/MS method. Therefore, LC-MS/MS can be applied in therapeutic monitoring, with the advantage that this method offers improved precision, accuracy, and analytical frequency.

Keywords: Amino acids, drugs, column switching, hydrophilic interaction, neurotransmitters, hybrid monolith, liquid chromatography-*tandem* mass spectrometry, plasma samples, schizophrenia, therapeutic drug monitoring.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura geral dos aminoácidos.	25
Figura 2 - Estruturas dos principais neurotransmissores e aminoácidos relacionados à sintomatologia da esquizofrenia.	31
Figura 3 - Estruturas químicas dos fármacos administrados no tratamento da esquizofrenia..	35
Figura 4 - Analisador de massas do tipo quadrupolo operando em modo de aquisição SRM.	38
Figura 5 - Correlação da HILIC com as demais formas de cromatografia líquida. RPLC: cromatografia líquida em fase reversa; NPLC: cromatografia líquida em fase normal; IC: cromatografia de troca iônica. Adaptado de [133].	45
Figura 6 - Esquema do mecanismo de separação em um sistema HILIC. Adaptado de [133].	46
Figura 7 - Sistema de column switching. A: <i>straight-flush</i> (direto) e B: <i>back-flush</i> (reverso).	53
Figura 8 - Sistema <i>column switching</i> em modo <i>straight-flush</i> (direto), destacando a configuração da válvula de seis pórticos.	72
Figura 9 - Cromatogramas SRM dos AAs e NTs de um paciente esquizofrênico. Concentrações plasmáticas; Glicina: 320,0 nmol mL ⁻¹ , Alanine: 271,9 nmol mL ⁻¹ , GABA: 5,2 nmol mL ⁻¹ , Serina: 222,9 nmol mL ⁻¹ , Leucina: 226,7 nmol mL ⁻¹ , Aspartato: 13,5 nmol mL ⁻¹ , Metionina: 27,5 nmol mL ⁻¹ , Glutamato: 28,6 nmol mL ⁻¹ , Triptofano: 147,5 nmol mL ⁻¹ , e Tirosina: 217,1 nmol mL ⁻¹	77
Figura 10 - Rotas de fragmentação para a formação de [M + H – H ₂ O – CO] ⁺	79
Figura 11 - Cromatogramas LC-MS/MS das amostras de plasma branco (sobrescrito na esquerda), e amostras de plasma enriquecidas com os fármacos nas concentrações do LIQ...	89
Figura 12 - Cromatogramas SRM (método PPT/LC-MS/MS) de amostra de plasma de um paciente esquizofrênico. Concentrações plasmáticas: sertralina: 28,0 ng mL ⁻¹ ; clozapina: 1152,0 ng mL ⁻¹ e lamotrigina: 5666,0 ng mL ⁻¹	98
Figura 13 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura da seção transversal do capilar monolítico híbrido de sílica com grupos cianopropil incorporados.	101
Figura 14 - Espectros de infravermelho das fases monolíticas de a) sílica pura, b) sílica híbrida com grupos cianopropil incorporados.	103
Figura 15 - Cromatograma de íons totais (TIC) das soluções padrão de fármacos a 250 ng mL ⁻¹ diluídas em: a) metanol; b) pH 3,0 (acetato de amônio/ácido fórmico 5 mmol L ⁻¹); c) pH 7,0 (acetato de amônio/hidróxido de amônio 5 mmol L ⁻¹) e d) pH 10,0 (acetato de amônio/hidróxido de amônio 5 mmol L ⁻¹) pré-concentrados na coluna monolítica com grupos cianopropil incorporados.	105
Figura 16 - Influência do pH da amostra (solução padrão de 250 ng mL ⁻¹) na pré-concentração dos a) fármacos e b) padrões deuterados na fase monolítica híbrida contendo grupos cianopropil.	107
Figura 17 - Cromatogramas LC-MS/MS no modo <i>column switching</i> das amostras de plasma branco (sobrescrito na esquerda), e amostras de plasma enriquecidas com os fármacos nas concentrações do LIQ.	109
Figura 18 - Cromatogramas SRM (método LC-MS/MS no modo <i>column switching</i>) de amostra de plasma de um paciente esquizofrênico. Concentrações plasmáticas: citalopram: 149,0 ng mL ⁻¹ ; clozapina: 1267,0 ng mL ⁻¹ e lamotrigina: 3326,0 ng mL ⁻¹	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Métodos LC-MS/MS para determinação de neurotransmissores e aminoácidos em fluidos biológicos	39
Tabela 2 - Métodos LC-MS/MS para determinação de fármacos em fluidos biológicos	41
Tabela 3 - Vantagens e desvantagens da cromatografia líquida no modo <i>column switching</i> ..	52
Tabela 4 - Análises de diferentes substâncias em fluidos biológicos utilizando a técnica LC no modo <i>column switching</i>	54
Tabela 5 - Condições LC-MS/MS no modo <i>column switching</i>	70
Tabela 6 - Transições dos íons, configurações do instrumento e tempos de retenção para cada um dos aminoácidos e neurotransmissores estudados	76
Tabela 7 - Valores de <i>pK_a</i> s dos aminoácidos e neurotransmissores avaliados neste trabalho.	78
Tabela 8 - Faixas lineares de trabalho (FLT), equações de regressão linear, coeficientes de determinação, <i>Lack of Fit</i> com nível de significância de 0,05%, LIQs e padrão interno utilizado para cada um dos aminoácidos e neurotransmissores	81
Tabela 9 - Exatidão (%EPR) e precisão (%CV) intra e interensaio do método HILIC-MS/MS para a determinação de aminoácidos e neurotransmissores em amostras de plasma	82
Tabela 10 - Fatores de matriz normalizados (FMN) para as amostras de plasma de controle de qualidade baixo (QCB) e alto (QCA) enriquecidas com os aminoácido e neurotransmissores	84
Tabela 11 - Comparação das concentrações plasmáticas dos aminoácidos e neurotransmissores (nmol mL ⁻¹) entre pacientes esquizofrênicos e voluntários saudáveis (controle)	85
Tabela 12 - Transições dos íons, configurações do instrumento e tempos de retenção para cada um dos fármacos estudados para o método PPT/LC-MS/MS	88
Tabela 13 - Faixas lineares de trabalho (FLT), equações de regressão linear, coeficientes de determinação com <i>Lack of Fit</i> com nível de significância de 0,05%, LIQs e padrão interno utilizado para cada um dos fármacos para o método PPT/LC-MS/MS	91
Tabela 14 - Exatidão (%EPR) e precisão (%CV) intra e interensaio para o método PPT/LC-MS/MS	92
Tabela 15 - Fatores de matriz normalizados (FMN) para as amostras de controle de qualidade baixo (QCB) e alto (QCA) para cada fármaco no método PPT/LC-MS/MS	96
Tabela 16 - Níveis plasmáticos dos fármacos avaliados em amostras de pacientes esquizofrênicos para o método PPT/LC-MS/MS	97
Tabela 17 - Tempos de retenção para cada um dos fármacos estudados para o método LC-MS/MS no modo <i>column switching</i>	100
Tabela 18 - Valores de <i>pK_a</i> s dos fármacos pré-concentrados na coluna monolítica com grupos cianopropil incorporados	106
Tabela 19 - Faixas lineares de trabalho (FLT), equações de regressão linear, coeficientes de determinação, <i>Lack of Fit</i> com nível de significância de 0,05%, LIQs e padrão interno utilizado para cada um dos fármacos para o método LC-MS/MS no modo <i>column switching</i>	110
Tabela 20 - Exatidão (%EPR) e precisão (%CV) intra e interensaio para o método LC-MS/MS no modo <i>column switching</i>	111
Tabela 21 - Fatores de matriz normalizados (FMN) para as amostras de controle de qualidade baixo (QCB) e alto (QCA) para cada fármaco no método LC-MS/MS no modo <i>column switching</i>	115
Tabela 22 - Métodos analíticos para a determinação de fármacos em amostras de plasma utilizando capilares com diferentes fases estacionárias para a pré-concentração	117

Tabela 23 - Níveis plasmáticos dos fármacos avaliados em amostras de pacientes esquizofrênicos	119
Tabela 24 - Fatores de enriquecimento para os fármacos avaliados neste trabalho	121
Tabela 25 - Concentrações plasmáticas médias e desvios padrão dos fármacos avaliados pelo teste t para os métodos desenvolvidos em amostras de plasma de pacientes com esquizofrenia	123

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1D	Primeira coluna
2D	Segunda coluna
5-HT	Serotonina
AAs	Aminoácidos
ACN	Acetonitrila
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazole-4-propionico
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização química a pressão atmosférica
APG	Antipsicóticos de primeira geração
API	Ionização a pressão atmosférica
ASG	Antipsicóticos de segunda geração
BET	Brunauer, Emmett e Teller
BSM	Bomba Binária
C18	Octadecilsilano
C6	Hexilsilano
C8	Octilsilano
CE	Eletroforese capilar
CID	Dissociação induzida por colisão
CN-TEOS	3-cianopropiltrietoxisilano
CQA	Controle de qualidade alto
CQB	Controle de qualidade baixo
CQM	Controle de qualidade médio
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
CV	Coeficiente de variação
DC	Corrente contínua
EC	Energia de colisão
ECD	Eletroquímica
ECRs	Ensaio clínicos controlados por placebo e randomizados
EPR	Erro Padrão Relativo
ESI	<i>Electrospray</i>
FLD	Fluorescência
FLT	Faixa linear de trabalho

FMN	Fator de matriz normalizado por padrão interno
FTIR	Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier
GABA	Ácido γ -aminobutírico
HILIC	Cromatografia líquida por interação hidrofílica
HILIC-MS/MS	Cromatografia líquida por interação hidrofílica acoplada à espectrometria de massas em <i>tandem</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IC	Cromatografia de troca iônica
<i>in-tube</i> SPME	Microextração em fase sólida “no tubo”
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em <i>tandem</i>
LIQ	Limite inferior de quantificação
LLE	Extração líquido-líquido
LSD	Ácido D-lisérgico
LSQ	Limite superior de quantificação
LTP	Potenciação de longo prazo
<i>m/z</i>	Razão massa-carga
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MS	Espectrometria de massas
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial
NL	Varredura de perda neutra
NMDA	N-metil-D-aspartato
NP	Fase normal
NPLC	Cromatografia líquida em fase normal
NTs	Neurotransmissores
PAHs	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
PCP	Cloridrato de fenciclidina
PI	Padrões internos
PIS	Varredura de íons precursores
PPT	Precipitação de proteínas
QSM	Bomba Quaternária
RF	Radiofrequência sinusoidal
RP	Fase reversa
RPLC	Cromatografia líquida em fase reversa

SEC	Cromatografia de exclusão por tamanho
SHMT	Serina hidroximetil transferase
SNC	Sistema nervoso central
SPE	Extração em fase sólida
SRM	Monitoramento de reações selecionadas
TDM	Monitorização terapêutica
TEOS	Tetraetoxisilano
TIC	Cromatograma de íons totais
TMOS	Tetrametoxisilano
VC	Voltagem do cone

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Esquizofrenia.....	18
1.2. Aminoácidos e neurotransmissores na esquizofrenia.....	25
1.3. Fármacos na esquizofrenia	32
1.4. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em <i>tandem</i> na determinação de fármacos, aminoácidos e neurotransmissores em fluidos biológicos	36
1.4.1. Cromatografia líquida por interação hidrofílica - HILIC	43
1.4.2. Cromatografia líquida no modo <i>column switching</i>	51
1.4.3. Fases monolíticas híbridas organo-sílica.....	55
2. OBJETIVOS	58
3. MATERIAIS E MÉTODOS	60
3.1. Determinação de aminoácidos e neurotransmissores em amostras de plasma empregando o método HILIC-MS/MS	60
3.1.1. Materiais e reagentes	60
3.1.2. Amostras de plasma.....	60
3.1.3. Preparo dos calibradores.....	61
3.1.4. Preparo da amostra de plasma	61
3.1.5. Análise HILIC-MS/MS	61
3.1.6. Validação analítica	62
3.1.6.1. <i>Linearidade</i>	62
3.1.6.2. <i>Exatidão</i>	63
3.1.6.3. <i>Precisão</i>	63
3.1.6.4. <i>Efeito residual</i>	64
3.1.6.5. <i>Efeito de matriz</i>	64
3.2. Determinação de fármacos em amostras de plasma empregando as técnicas de PPT/LC/MS-MS e LC-MS/MS no modo <i>column switching</i>	65
3.2.1. Materiais e reagentes	65
3.2.2. Síntese do capilar monolítico híbrido com grupos cianopropil incorporados para as análises LC-MS/MS no modo <i>column switching</i>	65
3.2.3. Caracterização morfológica e espectroscópica do capilar monolítico híbrido cianopropil	66
3.2.4. Amostras de plasma.....	66
3.2.5. Preparo dos calibradores.....	67
3.2.6. Preparo da amostra de plasma	68
3.2.7. Análise LC-MS/MS.....	68
3.2.7.1. <i>Otimização da etapa de pré-concentração dos fármacos na coluna capilar monolítica - 1D para LC-MS/MS no modo column switching</i>	71

3.2.7.2.	<i>Otimização das condições LC-MS/MS no modo column switching</i>	71
3.2.8.	Validação analítica	73
3.2.8.1.	<i>Seletividade</i>	73
3.2.9.	Amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos	73
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
4.1.	Determinação de aminoácidos e neurotransmissores em amostras de plasma empregando o método HILIC-MS/MS	75
4.1.1.	Preparo de amostra	75
4.1.2.	Otimização das condições HILIC-MS/MS.....	75
4.1.3.	Principais fragmentações dos aminoácidos e neurotransmissores e a detecção por HILIC-MS/MS	79
4.1.4.	Validação analítica	81
4.1.4.1.	<i>Seletividade</i>	81
4.1.4.2.	<i>Linearidade e limite de quantificação</i>	81
4.1.4.3.	<i>Exatidão e precisão</i>	82
4.1.4.4.	<i>Efeito residual e efeito de matriz</i>	83
4.1.5.	Avaliação do método HILIC-MS/MS utilizando amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos	84
4.2.	Determinação de fármacos em amostras de plasma empregando a técnica de PPT/LC/MS-MS.....	87
4.2.1.	Otimização e desenvolvimento da metodologia PPT/LC-MS/MS.....	87
4.2.2.	Validação analítica	90
4.2.2.1.	<i>Seletividade</i>	90
4.2.2.2.	<i>Linearidade e limite de quantificação</i>	90
4.2.2.3.	<i>Exatidão e precisão</i>	90
4.2.2.4.	<i>Efeito residual e efeito de matriz</i>	95
4.2.3.	Avaliação do método PPT/LC-MS/MS nas análises de amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos	97
4.3.	Determinação de fármacos em amostras de plasma empregando a técnica de LC-MS/MS no modo <i>column switching</i>	100
4.3.1.	Caracterização morfológica e espectroscópica do capilar monolítico híbrido cianopropil	101
4.3.2.	Otimização da etapa de pré-concentração dos fármacos na coluna capilar monolítica com grupos cianopropil incorporados - 1D	104
4.3.3.	Configuração do sistema bidimensional com o capilar monolítico com grupos cianopropil incorporados	106
4.3.4.	Validação analítica	108
4.3.4.1.	<i>Seletividade</i>	108
4.3.4.2.	<i>Linearidade e limite de quantificação</i>	108

4.3.4.3.	<i>Exatidão e Precisão</i>	<i>110</i>
4.3.4.4.	<i>Efeito residual e efeito de matriz.....</i>	<i>114</i>
4.3.5.	Comparação de métodos analíticos para a determinação de fármacos em amostras de plasma utilizando capilares com diferentes fases estacionárias (<i>in-tube</i> SPME/LC) para a pré-concentração	116
4.3.6.	Avaliação do método LC-MS/MS no modo <i>column switching</i> utilizando amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos.....	119
4.4.	Comparação entre os métodos PPT/LC/MS-MS e LC-MS/MS no modo <i>column switching</i> para determinação de fármacos em amostras de plasma	121
5.	CONCLUSÕES.....	126
	REFERÊNCIAS	129
	ANEXOS	150
	ANEXO A - SUMULA CURRICULAR.....	150
	ANEXO B - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	152

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Esquizofrenia

A esquizofrenia tem sido considerada como o mais grave dos transtornos neuropsiquiátricos, afetando aproximadamente 1% da população mundial. É uma doença crônica e debilitante, caracterizada por vários sintomas como, diminuição das capacidades mentais (embotamento emocional), alucinações (percepções irreais, sobretudo auditivas) e delírios. As funções mais básicas são acometidas, principalmente aquelas relacionadas à independência, liberdade ou autossuficiência [1-3].

A esquizofrenia tem sido manifestada a partir do final da adolescência até a idade adulta, ocorrendo mais frequentemente em homens, os quais são afetados mais severamente do que as mulheres. Após o surgimento de sintomas como delírios, alucinações, prejuízo da cognição, vontade e emoção, há substancial deterioração funcional [4].

Caracteristicamente, a esquizofrenia apresenta difícil regressão, sendo mais habitual manifestar-se na forma crônica - cerca de 95% dos pacientes [5]. Destes, aproximadamente 15% tornam-se capazes de manter uma rotina próxima da normalidade, incluindo vida familiar, interações sociais e atividade laboral remunerada [6]. O suicídio é a principal causa de morte prematura entre pacientes esquizofrênicos e estima-se uma taxa de suicídio em torno de 10% [7]. Além de uma elevada taxa de suicídio, a incidência de tentativas de suicídio em pacientes com esquizofrenia é de duas a cinco vezes maiores do que a encontrada na população geral [8].

Atualmente, a esquizofrenia não é caracterizada como uma doença única, mas como um grupo de patologias, atingindo todas as classes sociais e grupos humanos [9-11].

A manifestação do transtorno psicótico esquizofrênico ocorre de maneira peculiar em cada paciente. No entanto, para diagnosticar a doença, é necessário considerar se há a presença de pelo menos dois sintomas psicóticos, durante no mínimo um mês, proeminentes por pelo menos seis meses [12].

Os sinais e sintomas característicos da esquizofrenia podem ser agrupados em dois grandes grupos: sintomas positivos e negativos.

Os sintomas positivos estão relacionados a um acréscimo ou distorção das funções normais, tais como:

- Alucinações (percepção de algo inexistente como real) que podem ocorrer em qualquer modalidade sensorial (auditivas, visuais, olfativas, gustativas e táteis);

- Perturbações da forma e do curso do pensamento (como incoerência, tangencialidade, desagregação e falta de lógica);
- Comportamento desorganizado, bizarro ou inadequado;
- Agitação psicomotora;
- Negligência dos cuidados pessoais e
- Delírios (interpretação errônea da realidade) dos mais variados temas - persecutórios, referenciais, somáticos, religiosos ou grandiosos.

Os delírios persecutórios são os mais frequentes. Neles, o indivíduo acredita que certos gestos, comentários, passagens de livros, letras de música, figuras ou outros fatores ambientais são direcionados pra si [13].

Por sua vez, os sintomas negativos são aqueles que incluem limitações da intensidade e amplitude:

- Da expressão afetiva (embotamento afetivo);
- Da fluência e produtividade do pensamento (alogia);
- Na volição;
- Isolacionismo;
- Anedonia e
- Prejuízo atencional.

Sintomas negativos são de difícil avaliação porque ocorrem em uma linha contínua com a normalidade, são inespecíficos e podem decorrer de uma variedade de outros fatores (por exemplo, efeitos adversos de medicamentos, transtorno do humor, subestimação ambiental ou desmoralização) [13].

As causas da esquizofrenia ainda não são conhecidas. Porém, há consenso em atribuir a desorganização da personalidade, verificada na esquizofrenia, à interação de variáveis culturais, psicológicas e biológicas, entre as quais se destacam as de natureza genética. Assim, ao longo do tempo muitas teorias foram criadas para explicar o surgimento da doença:

- Teoria familiar

As teorias familiares, apesar de terem bastante interesse histórico, são as que possuem menor fundamento científico. Surgiram na década de 1950, algumas baseadas no tipo de comunicação entre os vários elementos das famílias e outras mais ligadas às estruturas

familiares. Dos estudos desenvolvidos surge o conceito “mãe esquizofrenogênica”, mães possessivas e dominadoras, como geradoras de personalidades esquizofrênicas. Estudos posteriores, contudo, não ratificaram esta hipótese [11].

- Teoria psicanalítica

As teorias psicanalíticas ou de relação precoce têm como base a teoria freudiana da psicanálise, e remetem para a fase oral do desenvolvimento psicológico, na qual a ausência de gratificação verbal ou da relação inicial entre mãe e bebê conduz igualmente as personalidades frias ou desinteressadas ou indiferentes no estabelecimento das relações. A ausência de relações interpessoais satisfatórias estaria assim na origem da esquizofrenia. A teoria psicanalítica atual postula que os vários sintomas da esquizofrenia possuem um significado para cada paciente em particular, por exemplo: delírios, de modo semelhante às alucinações, são tentativas regressivas e repressivas de criarem uma nova realidade ou expressarem medos ou impulsos ocultos [11].

- Teoria genética

Segundo a teoria genética da etiologia esquizofrênica, o risco de desenvolver este transtorno está diretamente associado ao grau de parentesco biológico de um indivíduo afetado [14], isto é, parentes em primeiro grau de um indivíduo afetado apresentam um risco maior de manifestação da doença do que os parentes em segundo grau. No caso de um dos pais sofrer de esquizofrenia, a prevalência da doença nos descendentes diretos é de 12% [11]. Na situação em que ambos os pais se encontram atingidos pelo transtorno, esse valor sobe para 40%. No entanto, mesmo na ausência de histórico familiar, a doença pode ainda ocorrer, pois sabe-se que cerca de 81% dos doentes com esquizofrenia não têm qualquer familiar em primeiro grau atingido pela doença e cerca de 91% não têm sequer um familiar afetado [13].

A responsabilidade genética para a esquizofrenia parece ser transmitida em um padrão poligênico não-Mendeliano, ou seja, não segue um simples padrão recessivo ou dominante associado a um único gene. Quando se considera a existência de uma base genética multifatorial para uma doença, é fundamental lembrar que não é a doença que é geneticamente determinada, mas sim a suscetibilidade para a doença [15]. No caso da esquizofrenia, os genes não codificam os sintomas, mas sim as proteínas envolvidas nos mecanismos e no funcionamento do sistema nervoso central (SNC). Diferentes fenômenos genéticos podem aumentar a suscetibilidade para a mesma doença, ou seja, os determinantes genéticos das doenças multifatoriais podem ser heterogêneos. No entanto, estas correlações gene/patologia ainda não foram convertidas em

resultados consistentes. Esse fenômeno pode revelar a complexidade genética da esquizofrenia, indicando o envolvimento de diferentes alterações moleculares [16].

- Teoria neurodesenvolvimental

A teoria neurodesenvolvimental relaciona além dos fatores genéticos, a adição dos fatores ambientais. Uma variação genética ou um fator ambiental podem levar a uma cadeia de eventos, em que ocorrendo numa fase sensível; por sua vez, podem determinar um desenvolvimento cerebral alterado, eliciando uma estrutura mais vulnerável ao surgimento e perpetuação da psicose e/ou de outros sintomas que compõem a esquizofrenia [17].

Segundo o modelo neurodesenvolvimental, a esquizofrenia constitui uma patologia da plasticidade e conexão sináptica a qual resulta de uma desconexão (ou conexão disfuncional) entre vários circuitos cerebrais. As complexas fases do processo de desenvolvimento cerebral, como a proliferação neuronal e das células da glia, a migração celular, a diferenciação morfológica e bioquímica e a formação de sinapses, são definidas pela carga genética individual, mas podem ser moduladas por fatores ambientais [18].

Na verdade, o modelo neurodesenvolvimental sugere que, assim como todo o genoma precisar ser pesquisado para identificar os genes que transmitem a susceptibilidade à esquizofrenia, o ambiente ao qual o indivíduo se insere deve ser analisado para localizar fatores de risco ambientais [17]. Consequentemente, a maioria dos modelos etiológicos da esquizofrenia propõe modelos aditivos e/ou efeitos interativos entre múltiplos genes de suscetibilidade e fatores ambientais. Muitos dos eventos ambientais que têm sido associados com um aumento do risco de esquizofrenia ocorrem durante o período pré-natal ou perinatal de vida. Ou seja, muito antes do início considerado típico: no final da adolescência ou início da idade adulta quando surgem os sintomas psicóticos necessários para o diagnóstico da esquizofrenia [19]. Esse atraso entre os eventos ambientais com possível significado etiológico e o aparecimento da doença clínica tem desempenhado um papel importante na idéia de que a esquizofrenia pode ser um transtorno do desenvolvimento neural.

- Teoria neurobiológica

As teorias neurobiológicas defendem que a esquizofrenia é essencialmente causada por alterações bioquímicas e estruturais do cérebro, devido às disfunções nos sistemas glutamatérgico, dopaminérgico e serotoninérgico.

O sistema glutamatérgico é considerado o maior sistema excitatório do SNC humano. Ele se distribui, principalmente, nas estruturas do SNC e está envolvido em funções cognitivas

fundamentais como memória e aprendizado, dentre outras. Os receptores de glutamato podem ser divididos em duas grandes categorias: receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) que são ionotrópicos e os não-NMDA que são metabotrópicos. Os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA são neuroreceptores sofisticados, essenciais para a plasticidade neuronal, incluindo os mecanismos de “potenciação de longo prazo” (LTP), sinaptogênese e excitotoxicidade [20]. Pesquisas recentes também têm demonstrado que receptores glutamatérgicos do tipo NMDA estão envolvidos na fisiopatologia desta doença e podem ser alvos para um tratamento psicofarmacológico. Alterações do sistema glutamatérgico são associadas não apenas na esquizofrenia, mas também em doenças neurológicas como epilepsia, isquemias, doença de Alzheimer e doença de Huntington [21] e transtornos psiquiátricos como dependência de substâncias, transtornos obsessivo compulsivo e afetivo bipolar [22].

A relação entre esquizofrenia e o glutamato adveio, principalmente, dos efeitos psicotogênicos observados após administração do cloridrato de fenciclidina (PCP). A PCP é uma substância utilizada, inicialmente, como anestésico e que teve o uso clínico abolido após relatos associando o medicamento a sintomas psicóticos, uso abusivo (*angel dust*) e à neurotoxicidade. Os usuários de PCP desenvolveram um quadro de psicose induzida, que se assemelha a esquizofrenia. Apenas 30 anos mais tarde foi estabelecido que o quadro psicótico induzido pela PCP se dava pelo bloqueio dos receptores NMDA, sítio de ligação desta droga [23]. Os antagonistas dos receptores NMDA produzem efeitos mais semelhantes aos sintomas da esquizofrenia do que os agonistas dopaminérgicos que geralmente eliciam efeitos comportamentais semelhantes, apenas, a síndrome positiva e aspectos desorganizados da patologia. Neste sentido, a fenciclidina induz grande parte dos sintomas observados na esquizofrenia; por exemplo, os sintomas positivos e negativos bem como prejuízo na aprendizagem e memória.

De uma maneira geral, pode-se afirmar que existam duas hipóteses opostas, mas não totalmente contraditórias, de como o glutamato estaria envolvido na esquizofrenia: {i} hipótese da hipofunção glutamatérgica e {ii} hipótese da hiperfunção glutamatérgica [20, 24].

A teoria dopaminérgica é um modelo neuroquímico para explicar a neurogênese da esquizofrenia, onde diversos estudos indicavam que a efetividade clínica das drogas antipsicóticas estavam diretamente relacionadas à sua afinidade com os receptores dopaminérgicos (receptores D) [25]; ou seja, quanto maior a afinidade da droga com receptores D mais eficaz esta se mostrava em diminuir os sintomas da esquizofrenia. Os receptores D1 e D5 são expressos, principalmente, em neurônios do córtex cerebral e hipocampo e possuem baixa afinidade com a maioria dos antipsicóticos. Já os receptores D2, D3 e D4 são expressos

em altos níveis nos neurônios do núcleo caudado, do putâmen, no núcleo *accumbens*, amígdala, no hipocampo e partes do córtex cerebral, sendo que nestas três últimas estruturas apenas os receptores D2 estão presentes. Este receptor tem alta afinidade com os antipsicóticos típicos enquanto que as drogas atípicas são mais efetivas aos receptores D3 e, especialmente, D4 [26]. Os corpos dos neurônios que sintetizam dopamina estão localizados, primordialmente, em três regiões no cérebro: {i} no núcleo do estriado ventral; {ii} no lobo pré-frontal do córtex cerebral e {iii} no estriado dorsal (sistema extrapiramidal). Tendo em vista que os neurônios dopaminérgicos não estão distribuídos aleatoriamente no encéfalo, a teoria da dopamina considera que as vias dopaminérgicas corticais - mesolímbica, mesocortical, nigroestriatal e tuberoinfundibular - estariam implicadas na mediação dos sintomas positivos e negativos da esquizofrenia.

Alguns pesquisadores defendem que os sintomas negativos podem ser ocasionados por redução dopaminérgica nas áreas de projeção mesocorticais, como o córtex pré-frontal dorsolateral [27]. Vale ressaltar que a transmissão dopaminérgica no córtex pré-frontal é principalmente medida pelos receptores D1 e disfunções nestes receptores têm sido relacionadas com prejuízos cognitivos e os sintomas negativos na esquizofrenia [28].

A teoria da dopamina é criticada na medida em que não descreve as origens etiológicas das disfunções dopaminérgicas [20]. Por outro lado, alguns pesquisadores têm sugerido que as anormalidades nos neurônios dopaminérgicos são uma consequência de alterações nas vias neuronais que influenciam o fluxo de dopamina [29]. Neste sentido, surgiu o interesse pelos sistemas que modulam ou regulam o tônus dopaminérgico, tais como os sistemas glutamatérgico e serotoninérgico [30].

Baseado no antagonismo do LSD (ácido D-lisérgico) nos receptores de serotonina (5-HT) e na similaridade da sua estrutura química foi proposto que o efeito alucinógeno desta droga podia resultar em um antagonismo do 5-HT no sistema nervoso central [31]. O LSD causa efeitos como despersonalização e alucinações visuais, experiências semelhantes a alguns sintomas da esquizofrenia. Devido a estes efeitos e tendo em vista seu antagonismo nos receptores serotoninérgicos, foi proposto que uma deficiência nos níveis de 5-HT poderia ser a causa da esquizofrenia [32]. No entanto, a hipótese serotoninérgica foi rapidamente modificada considerando achados que identificavam que o LSD poderia antagonizar apenas certas ações do 5-HT [31]. Foi então considerada a possibilidade de que um excesso de serotonina no sistema nervoso poderia causar a esquizofrenia.

Particularmente os receptores 5-HT₂ desempenham um papel importante na redução dos sintomas psicóticos e de efeitos extrapiramidais ocasionados pelo antagonismo dos

antipsicóticos nos receptores D2 [27]. Um conjunto importante destes medicamentos atua como antagonistas de serotonina e dopamina. Os medicamentos atípicos apresentam uma ação antipsicótica com baixa indução de sintomas extrapiramidais e uma afinidade maior por receptores serotoninérgicos do que por receptores dopaminérgicos. Segundo a teoria serotoninérgica, a afinidade dessas drogas pelos receptores 5-HT seria responsável por uma melhora dos sintomas negativos e teria ações protetoras sobre a indução de sintomas extrapiramidais [33]. Kapur e Seeman (2001) [34] discordam dessa observação em relação à ação dos atípicos, apontando que: {i} antipsicóticos típicos, como a loxapina e a clorpromazina, mostram grau comparáveis aos atípicos de ocupação 5-HT_{2A} e {ii} os medicamentos atípicos só se tornam efetivos quando a ocupação de D2 excede 65%, limiar que não difere do necessário para a ação do haloperidol. Dessa forma, a teoria serotoninérgica como modelo explicativo da esquizofrenia não tem sido bem aceita na literatura, mas vem exercendo grande influência no estudo e na pesquisa de novos antipsicóticos [35].

Apesar de existirem todas estas hipóteses para a explicação da origem da esquizofrenia, nenhuma delas individualmente consegue dar uma resposta satisfatória às muitas dúvidas que existem em torno das causas da doença, reforçando, assim, a idéia de uma provável etiologia multifatorial [11].

1.2. Aminoácidos e neurotransmissores na esquizofrenia

Os aminoácidos constituem as unidades fundamentais das proteínas, estando ligados covalentemente entre si através de uma ligação peptídica. O que diferencia uma proteína da outra é a sequência com que os aminoácidos estão dispostos. Essencialmente, apenas 20 aminoácidos são responsáveis por produzir todas as proteínas, independente da forma de vida [36].

A estrutura química geral dos aminoácidos (Figura 1) é formada por um carbono central (carbono α) ligado a um grupamento amina ($-\text{NH}_2$), um grupamento carboxila ($-\text{COOH}$) e, um átomo de hidrogênio, variando apenas a cadeia lateral, chamada genericamente de grupamento R, sendo esta a responsável pela diferenciação entre os 20 aminoácidos [36].

Figura 1 - Estrutura geral dos aminoácidos.

A síntese de aminas biogênicas (dopamina, noradrenalina, serotonina e histamina) está relacionada absorção de seus aminoácidos precursores tirosina, triptofano e histidina. Os níveis destes substratos no SNC são influenciados pela concentração sanguínea de valina, leucina, isoleucina e fenilalanina, que têm afinidade pelas mesmas transportadoras de tirosina e triptofano para atravessar a barreira sangue-cérebro. Outros aminoácidos tais como glicina, serina, glutamato e aspartato, apresentam função de neurotransmissores no cérebro e estão envolvidos no desenvolvimento neuronal. Um desequilíbrio químico destes neurotransmissores tem sido postulado na fisiopatologia da esquizofrenia. Assim, as mudanças nas concentrações plasmáticas de aminoácidos pode afetar a suscetibilidade a transtornos psicóticos e influenciar o resultado do tratamento [37].

De acordo com esta hipótese, muitos pesquisadores têm monitorado concentrações de aminoácidos periféricos em pacientes com esquizofrenia durante o tratamento antipsicótico. No entanto, as alterações nas concentrações plasmáticas desses aminoácidos não foram explicadas de forma abrangente. Sendo assim, estudos adicionais são necessários tanto para desvendar o

papel desses aminoácidos na neurofisiologia, quanto para avaliar a eficácia dos antipsicóticos atípicos [37].

Diante dessas observações, as teorias neurobiológicas defendem que a esquizofrenia é essencialmente causada por alterações bioquímicas e estruturais do cérebro, levando em consideração as alterações nos níveis de dopamina, mas também voltando a atenção para os níveis de outros sistemas de neurotransmissão, tais como serotonina, adrenalina, noradrenalina, canabinóides endógenos e, atualmente, um dos principais focos de estudo, o glutamato [2, 20, 38]. Baseado em estudos da literatura, segue abaixo uma breve descrição de cada aminoácido e sua influência na esquizofrenia:

- Glutamato

O glutamato é o aminoácido excitatório mais importante do sistema nervoso central, embora não seja essencial. Dentre as duas hipóteses citadas, a hipótese da hipofunção glutamatérgica correlaciona o bloqueio da função dos receptores NMDA e o aparecimento de surtos psicóticos [39, 40]. Os receptores glutamatérgicos tipo NMDA, tem como co-agonista, o aminoácido glicina, proveniente da serina. Ambos os aminoácidos levam a um aumento da transmissão glutamatérgica. Observou-se que a enzima serina hidroximetil transferase (SHMT) responsável pela clivagem da serina em glicina, encontra-se deficitária em pacientes esquizofrênicos, levando a uma diminuição dos níveis de glutamato nestes pacientes [39, 40].

A hipótese de hiperfunção glutamatérgica foi inicialmente sugerida pelos níveis plasmáticos (glutamato) aumentados em portadores de esquizofrenia e, posteriormente, a partir de evidências neuroquímicas de uma superabundância de sinapses glutamatérgicas no córtex frontal de esquizofrênicos [41-43]. Na avaliação dessa hipótese de hiperfunção glutamatérgica, Dursun et al. [44] avaliaram a adição de um inibidor da liberação de glutamato, a lamotrigina, juntamente com a clozapina no tratamento de esquizofrênicos refratários, e observaram melhora significativa em todo o espectro sintomatológico e psicopatológico em seis pacientes. Saba et al. [45] confirmaram este efeito terapêutico em três outros pacientes e Tiihonen et al. [46] em ensaio duplo-cego.

Tortorella et al. [47] e Van der Heijden et al. [48] encontraram níveis de glutamato em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos superiores aos determinados em amostras controle (pacientes sadios).

Van der Heijden et al. [48] também observaram correlação inversa entre níveis plasmáticos de glutamato e sintomas negativos (alterações cognitivas e transtorno do pensamento). No estudo de Tortorella et al. [47], os níveis plasmáticos de glutamato diminuíram

após terapia com clozapina. No entanto, estes níveis ainda se mantiveram superiores aos níveis de referência (valores estatisticamente significativos).

- Aspartato

O aspartato também é um aminoácido não essencial. Luca et al. [37] determinaram concentrações plasmáticas elevadas de aspartato em amostras de pacientes esquizofrênicos resistentes ao uso de antipsicóticos. Estes autores também observaram que indivíduos esquizofrênicos, após 12 semanas de tratamento com clozapina, não apresentaram alterações nos níveis plasmáticos de aspartato. Portanto, de acordo com esses pesquisadores, concluiu-se que os níveis plasmáticos de aspartato e de glutamato podem ser diferentemente alterados pelo tratamento com antipsicóticos. No entanto, Evins et al. [49] relataram que o tratamento com clozapina aumentou o nível sérico basal de aspartato.

- Serina

Entre os aminoácidos essenciais, a serina é a mais estudada na esquizofrenia pelo seu papel como co-transmissor responsável por regular os receptores NMDA. Vários estudos têm mostrado altos níveis séricos de serina em pacientes com esquizofrenia. Waziri et al. [50] relataram que as concentrações de serina tanto no soro quanto no cérebro de indivíduos esquizofrênicos são mais elevadas.

Macciardi et al. [51] relataram resultados similares. No entanto, Luca et al. [37] determinaram menores concentrações plasmáticas de serina em pacientes esquizofrênicos sem tratamento com antipsicótico. Após a administração de antipsicótico, estes autores não observaram mudanças significativas nos níveis de serina, embora tenham notado melhora significativa nos sintomas psicóticos.

A serina, assim como a glicina, age como neuromoduladora se ligando no receptor excitatório NMDA, o qual está envolvido com os processos de aprendizagem, memória, plasticidade neuronal e desenvolvimento do sistema nervoso central [52].

- Glicina

A glicina é um aminoácido não essencial e um neurotransmissor inibitório; que desempenha também um papel na regulação dos receptores NMDA. Concentrações mais elevadas de glicina foram determinadas no plasma de pacientes com esquizofrenia em comparação com os controles em alguns estudos. No entanto, Carl et al. [53], não relataram diferença significativa entre as concentrações plasmáticas de glicina em pacientes

esquizofrênicos e em voluntários sadios (controle), concluindo não haver qualquer relação entre níveis plasmáticos de glicina e a esquizofrenia.

Por outro lado, Altamura et al. [54] observaram níveis elevados de vários aminoácidos como, glicina, glutamato e serina em amostras de plasma e de urina de pacientes esquizofrênicos, quando comparados aos níveis de referência. Entretanto, os níveis de glutamato foram similares aos obtidos em amostras de outros pacientes psiquiátricos ambulatoriais. Assim, estes aminoácidos merecem atenção no estudo da esquizofrenia. Alguns trabalhos descrevem que há correlação entre os níveis séricos e líquóricos de glicina e serina. Além disso, também há correlação dos mesmos com sintomas esquizofrênicos. Tais estudos sugerem que a serina pode atuar como marcador periférico da esquizofrenia [52]. Os antipsicóticos atuam como neuroprotetores, pois diminuem os níveis de serina e glicina no cérebro de esquizofrênicos.

- GABA

Ácido γ -aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central. Ele desempenha o principal papel na redução da excitabilidade neuronal no sistema nervoso. Em seres humanos, o GABA também é diretamente responsável pela regulação do tônus muscular [55].

O sistema GABAérgico está envolvido principalmente no equilíbrio de excitação e inibição no cérebro. GABA é sintetizado em cerca de 20-30% de todos os neurônios do SNC [56] e é o principal neurotransmissor, sendo responsável por 25-50% das sinapses do cérebro [57]. Por estas razões, espera-se que a maioria das funções cerebrais envolvam a transmissão GABAérgica [58]. Consequentemente, o papel do GABA no processamento de informação é crucial, atuando para manter os processos do SNC sob controle [58, 59].

Um déficit no sistema GABAérgico é fortemente relacionado com a esquizofrenia, resultando em uma irregular transmissão inibitória. Receptores GABAA mostraram-se alterados em cérebros (pós-morte) de pessoas com esquizofrenia. Como a transmissão GABAérgica é vital na modulação da atividade cortical, a alteração na atividade do receptor GABA, em conjunto com uma inadequada farmacologia, poderia perturbar a normalidade do processamento neural, desencadeando um desequilíbrio em outros sistemas, e facilitando o aparecimento dos sintomas da esquizofrenia [60].

Eckstein et al. [61] e Cai et al. [62] relataram que GABA e glutamato teriam níveis com relação oposta em pacientes esquizofrênicos, sendo possível verificar níveis elevados de

GABA, e níveis de glutamato mais baixos. Essas alterações poderiam evidenciar o surgimento da esquizofrenia.

- Alanina

Níveis de alanina relacionados à esquizofrenia têm sido pouco investigados. Luca et al. [37] não encontraram associação entre alanina e esquizofrenia, mas observaram uma redução deste aminoácido durante um tratamento de 12 semanas com clozapina.

- Metionina

Van der Heijden et al. [63] observaram baixos níveis de metionina em pacientes em tratamento com antipsicótico atípico. Além disso, Bjerkenstedt et al. [64] encontram concentrações plasmáticas de metionina mais elevadas em esquizofrênicos não medicados. Finalmente Fekkes et al. [65] relataram que a razão entre taurina e serina-metionina poderia ser uma ferramenta útil no diagnóstico para a psicose aguda.

- Tirosina

Tirosina é um aminoácido aromático não essencial. Luca et al. [37] descreveram que a alta concentração plasmática de tirosina não influencia a razão tirosina/aminoácido neutro de cadeia longa em pacientes com esquizofrenia em tratamento com clozapina. Este aminoácido é o precursor de dopamina, noradrenalina e adrenalina; Por conseguinte, menores concentrações plasmáticas de tirosina em pacientes esquizofrênicos pode ser um marcador periférico da hipótese hiperdopaminérgica para explicar a psicose [66].

- Triptofano

O triptofano é um aminoácido essencial, e em diversos estudos, pesquisadores encontraram menores concentrações de triptofano em pacientes esquizofrênicos e baixa razão triptofano/aminoácido neutro de cadeia longa (aminoácidos que competem com o triptofano para a absorção). Por exemplo, Rao et al. [67] e Tortorella et al. [47] encontraram níveis plasmáticos mais baixos de triptofano em pacientes com esquizofrenia, resultando em baixa absorção neuronal de triptofano, a qual por sua vez pode produzir níveis mais baixos de serotonina no sistema nervoso central destes pacientes.

Triptofano é o precursor da serotonina, e conseqüentemente, a variação oposta de serotonina em relação à tirosina na esquizofrenia, poderia ser um marcador do desequilíbrio

químico da transmissão dopaminérgica e serotoninérgica postuladas na esquizofrenia. Luca et al. [37] observaram aumento significativo nos níveis de triptofano em pacientes com esquizofrenia, após 12 semanas de tratamento com clozapina. No entanto, estes níveis mostraram-se significativamente inferiores aos dos pacientes sadios. Da mesma forma Alfredsson et al. [68] correlacionaram o aumento nas concentrações plasmáticas de triptofano com a melhora dos pacientes durante a fase inicial do tratamento da esquizofrenia.

- Leucina

Luca et al. [37] não encontraram alterações nas concentrações plasmáticas de leucina que pudessem associar à esquizofrenia ou com o uso de antipsicóticos. No entanto Reveley et al. [69] encontraram níveis significativamente mais elevados de leucina em amostras de líquido de pacientes esquizofrênicos.

Diante do exposto, as alterações no metabolismo de aminoácidos podem ser a causa da fisiopatologia da esquizofrenia [70, 71]. Frente a esses relatos, fica evidente que a complexa neurobiologia da esquizofrenia ainda não foi completamente elucidada e, a melhor compreensão desta é essencial para que tratamentos mais eficazes sejam desenvolvidos, ou seja, tratamentos que possam equiparar os níveis de neurotransmissores dos pacientes esquizofrênicos aos níveis dos pacientes sadios.

Alguns pesquisadores têm monitorado as concentrações plasmáticas dos aminoácidos periféricos em pacientes com esquizofrenia, especialmente no tratamento com medicamentos como clozapina e olanzapina (antipsicóticos atípicos ou de segunda geração) [37]. Os aminoácidos e neurotransmissores são importantes biomarcadores indiretos para o diagnóstico da esquizofrenia e a determinação das concentrações plasmáticas destas substâncias pode auxiliar na avaliação da eficácia da terapia com os antipsicóticos [72-77].

A Figura 2 ilustra as estruturas químicas dos principais neurotransmissores e aminoácidos relacionados à sintomatologia da esquizofrenia.

Figura 2 - Estruturas dos principais neurotransmissores e aminoácidos relacionados à sintomatologia da esquizofrenia.

1.3. Fármacos na esquizofrenia

Desde sua introdução, em 1952, os antipsicóticos são a principal forma de tratamento dos sintomas da esquizofrenia [78] e, atualmente, são classificados como “convencionais”, “típicos”, “de primeira geração” (APG) ou “atípicos” ou “de segunda geração” (ASG). Os antipsicóticos típicos estão associados à melhora dos sintomas psicóticos positivos, como delírios e alucinações [79], porém o seu uso está associado ao surgimento de sintomas parkinsonianos agudos e crônicos, tais como distonias e discinesias tardias, bem como ao desenvolvimento de sintomas negativos e depressivos [80]. Os antipsicóticos atípicos, caracterizados pela baixa incidência de eventos adversos extrapiramidais [81], passaram a ser administrados com a retomada do uso da clozapina, possibilitando melhor adesão ao tratamento a longo prazo [82, 83].

No entanto, apesar dos avanços no tratamento da esquizofrenia, vários estudos indicam que aproximadamente, 20% a 30% dos pacientes não apresentam resposta satisfatória ao tratamento com antipsicóticos [84]. Tais pacientes são considerados resistentes ao tratamento ou refratários [85]. Nestes pacientes que não respondem ou não toleram os tratamentos padrões com antipsicóticos são observados a persistência da psicose [86], ocasionando incapacidade permanente [87], e altos gastos para minimizar os sintomas [88, 89], fato que justifica os vários esforços para aperfeiçoar o tratamento da esquizofrenia.

O desenvolvimento da clorpromazina, na década de 1950, foi um marco na história da psiquiatria, gerando uma mudança qualitativa no atendimento da esquizofrenia, ao possibilitar ao paciente o tratamento em regime ambulatorial e redução da permanência hospitalar, bem como do número de internações [90]. A descoberta da atividade antipsicótica da clorpromazina foi por acaso, e somente na década de 1960 foi estabelecido que sua atividade era devido ao bloqueio do receptor dopaminérgico D2 [91]. A partir de então, foi desenvolvida a teoria da atividade hiperdopaminérgica na esquizofrenia – um modelo até hoje aceito, mesmo com modificações. Muitos outros compostos foram criados após a clorpromazina, com base na capacidade de bloqueio dos receptores D2, levando ao desenvolvimento de compostos antagonistas D2 mais “puros”, como o haloperidol e a flufenazina, que requeriam menores doses [34].

Denominados “neurolépticos”, devido à sua capacidade de induzir catalepsia em ratos, estes antipsicóticos, passaram a ser os fármacos de escolha para o tratamento da esquizofrenia até a década de 1980 [92]. A eficácia dos antipsicóticos típicos logo foi demonstrada tanto no tratamento agudo quanto no tratamento de manutenção da esquizofrenia, por vários ensaios

clínicos controlados por placebo e randomizados (ECRs), não havendo evidência de distinção em termos de eficácia entre nenhum fármaco e nem entre as diferentes subclasses [93].

A clozapina e seu perfil “atípico” marcaram uma nova geração de antipsicóticos a partir da década de 1990 [83]. Mas o que caracteriza a atipicidade? Esta definição é necessária, uma vez que é comum que o termo “antipsicótico atípico” seja intercambiável com “novos antipsicóticos”, ou “antipsicóticos de segunda geração” – ASG, com a premissa de que tais compostos são comparáveis em termos clínicos. De fato, a definição de atipicidade permanece pouco clara [94]. Em termos clínicos, a baixa incidência de eventos adversos extrapiramidais é a definição central e mais estrita [83]. Alguns autores distinguem a discinesia tardia dos demais transtornos do movimento extrapiramidais, afirmando que ambos precisam ter evidência de estarem diminuídos para que um antipsicótico seja considerado atípico, mas dado que os transtornos do movimento extrapiramidais são fatores de risco para o desenvolvimento de discinesia tardia, é razoável postular que antipsicóticos atípicos com menor incidência de eventos adversos extrapiramidais estejam associados a menor risco de discinesia tardia. Por fim, a eficácia no tratamento dos sintomas negativos da esquizofrenia refratária também são propostas para a definição de atipicidade [95, 96].

A clozapina atende a todos os critérios de atipicidade descritos anteriormente, até porque todos os critérios foram estabelecidos com base em características da própria clozapina. Entretanto, alguns antipsicóticos ditos atípicos podem não atender a todos os critérios. Como por exemplo, a amisulprida e risperidona podem causar significativa elevação da prolactina; já a risperidona em doses altas (acima de 8mg/dia) não é diferente dos fármacos convencionais, quanto à incidência de eventos adversos extrapiramidais. Nem todos antipsicóticos atípicos apresentam eficácia no tratamento da esquizofrenia refratária ou para os sintomas negativos [95, 96].

Uma hipótese que emergiu no início dos anos 2000 postulou que a atipicidade poderia ser explicada pela afinidade da molécula antipsicótica com os receptores D2 [34]. Os antipsicóticos atípicos seriam aqueles com afinidade mais baixa aos receptores D2 [97]. De fato, esta pode ser uma alternativa para explicar a atipicidade inclusive de compostos como as benzamidas substituídas – amisulprida, sulpirida e remoxiprida – que também podem ser consideradas atípicas em termos clínicos mesmo não se enquadrando no modelo de antagonismo D2/5HT2 [79].

Alguns pesquisadores têm relatado que alguns, mas não todos antipsicóticos atípicos, são superiores em relação aos antipsicóticos típicos em relação à melhora dos sintomas positivos e negativos (e também dos sintomas depressivos). Esta diferença foi evidenciada em estudos

recentes que demonstraram que amissulprida, clozapina, olanzapina e risperidona diferenciam-se em relação aos antipsicóticos convencionais quanto à melhora nos sintomas positivos; amissulprida, clozapina, olanzapina e risperidona em relação à melhora nos sintomas negativos; e amissulprida, aripiprazol, clozapina, olanzapina e quetiapina, em relação aos sintomas depressivos [98]. Em relação ao domínio cognitivo da esquizofrenia, ainda não foi demonstrado, de maneira inequívoca, que os antipsicóticos atípicos sejam diferentes dos agentes convencionais – os efeitos de ambos neste domínio são pequenos [99]. Mesmo com muitas evidências que indicam aumento na eficácia do tratamento da esquizofrenia com fármacos atípicos, alguns estudos consideram este significado clínico modesto, quando se leva em consideração o custo destes novos fármacos [100].

Uma série de fármacos que atuam diretamente no sistema glutamatérgico está atualmente em desenvolvimento. Alguns exemplos são os agonistas da glicina (D-serina e D-cicloserina), que atuam como inibidores seletivos da recaptação de glicina, inibidores da liberação de glutamato (LY-354740 e lamotrigina), agonistas e antagonistas AMPA - ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazole-4-propionico - (LY-293558 e GYKI 52.466) e ampaquinas (CX-516) [4, 101]. Além dos antipsicóticos, grande parte dos pacientes esquizofrênicos também faz uso concomitante de outras classes de fármacos, tais como antidepressivos, anticonvulsivantes e ansiolíticos para minimizar os sintomas associados à esquizofrenia. A politerapia antipsicótica na esquizofrenia é comum. No entanto, não há evidências quanto à eficácia dessa terapia empírica, em relação à monoterapia. Alguns consideram que associações, especialmente de risperidona, olanzapina, quetiapina e ziprasidona são bem toleradas e podem ser mais eficazes no tratamento da esquizofrenia refratária [101].

Ao lado do importante papel da psicoterapia e do ambiente social, está a farmacoterapia, que pode melhorar os sintomas de forma significativa. Encontrar a terapia certa é difícil e sistemas terapêuticos complexos são comuns. A monitorização terapêutica (TDM), pode auxiliar na otimização da terapia, minimizando os efeitos adversos, as respostas negativas, as interações farmacocinéticas ou a baixa adesão [102]. Além da necessidade da monitorização das concentrações plasmáticas desses medicamentos, é importante também avaliar as interações medicamentosas e o controle da conformidade, quando um paciente apresenta resposta desfavorável ao tratamento [103]. Pois apesar das vantagens, a terapia ainda falha em aproximadamente um terço dos pacientes, devido principalmente aos efeitos adversos, inadequado controle das convulsões ou combinação de ambas [104]. A Figura 3 ilustra as estruturas químicas dos fármacos administrados no tratamento da esquizofrenia.

Figura 3 - Estruturas químicas dos fármacos administrados no tratamento da esquizofrenia.

1.4. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem* na determinação de fármacos, aminoácidos e neurotransmissores em fluidos biológicos

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com os vários sistemas de detecção, tais como fluorescência (FLD) [105, 106], eletroquímica (ECD) [107, 108] e espectrometria de massas (MS) [109, 110] têm sido utilizadas para a determinação de neurotransmissores e aminoácidos. Estas técnicas analíticas apresentam algumas limitações como, por exemplo, o ECD apresenta baixa repetitividade analítica, em razão da adsorção de compostos endógenos no eletrodo (degradação histerética), o FLD requer procedimentos de derivatização e algumas vezes a resolução cromatográfica é comprometida pela sobreposição de analitos e picos interferentes. Já os métodos LC-MS, quando comparados aos FLD e ECD, apresentam alta sensibilidade analítica, para determinações em níveis de traços em fluidos biológicos.

Todo equipamento de espectrometria de massas é composto basicamente por um sistema de introdução de amostras, fonte de ionização, analisador de massas e detector. A cromatografia líquida quando acoplada à espectrometria de massas, o sistema de introdução de amostras é realizado através da inserção da amostra pelo injetor LC.

A fonte de ionização mais comumente utilizada para o acoplamento LC-MS é a de *electrospray* (ESI), descrita inicialmente por Fenn [111], onde o analito dissolvido na fase móvel ou em um dos componentes da fase móvel passa através de um capilar de aço inox, à pressão atmosférica, ao qual é aplicada uma voltagem de 3000 a 5000 V. Na saída do capilar são formadas pequenas gotas altamente carregadas (aerrossol) que são dessolvatadas ao se deslocarem em sentido contrário ao posicionamento de um eletrodo em uma região de pressão atmosférica. A dessolvatação é assistida por um fluxo contínuo de gás seco (geralmente N₂) na região do aerossol. À medida que ocorre a dessolvatação, o tamanho das gotas é reduzido até o ponto em que a força de repulsão entre as cargas similares fica maior que as forças de coesão da fase líquida (tensão superficial). Neste momento ocorre a chamada "explosão coulômbica", que gera gotas com tamanhos equivalentes a 10% do tamanho das gotas a partir das quais se originaram. Uma série de explosões passa então a ocorrer até que são produzidos íons do soluto a partir destas gotas, os quais são transferidos para o analisador de massas por uma série de dispositivos de focalização.

O analisador de massas é a parte de um espectrômetro responsável pela separação dos íons de acordo com sua m/z (razão massa-carga). O analisador mais comumente utilizado em análises quantitativas é o quadrupolo [112]. Esse analisador consiste basicamente de quatro barras paralelas, onde as barras opostas são conectadas ao mesmo potencial elétrico. A essas

barras paralelas são aplicados dois tipos de voltagens diferentes, DC (corrente contínua) e RF (radiofrequência sinusoidal), o que causa uma transmissão seletiva dos íons de acordo com a m/z . A capacidade de filtrar íons de acordo com a m/z confere altíssima sensibilidade a esse tipo de analisador, o que explica sua alta utilização em análises quantitativas. Por outro lado, quadrupolos são limitados do ponto de vista quantitativo, visto que apresentam baixa exatidão de massas (tipicamente massas medidas com quadrupolos apresentam exatidão de uma casa decimal) e baixa resolução (resolução unitária).

Os detectores são os dispositivos responsáveis por converter o feixe de íons em sinal elétrico, posteriormente processado pelo sistema de dados do computador de aquisição. O sistema de detecção mais comumente encontrado em sistemas de espectrometria de massas é a multiplicadora de elétrons, onde os íons são convertidos em elétrons por meio de um dinodo de conversão.

Uma das características das fontes de ionização a pressão atmosférica (ESI) está relacionada à transferência de energia ao analito no processo de ionização. Em todos esses casos, a ionização é dita suave, ou seja, não costuma induzir fragmentação do analito. Essa característica pode ser interessante quando se busca avaliar a presença de diferentes compostos no espectro (por facilitar a visualização/atribuição das espécies) e determinar a massa exata do composto. Entretanto, quando se deseja obter informações estruturais ou aumentar a seletividade de métodos quantitativos, a fragmentação passa a ser desejada. Nesse caso, isso ocorre em condições muito bem controladas dentro do próprio espectrômetro de massas, em dispositivos conhecidos como câmara de colisão ou dentro do próprio analisador (no caso de *Ion Traps*). Essa fragmentação se dá por meio de colisões do analito de interesse, com um gás neutro (em geral, Ar ou N₂). Essa denominação foi mantida por motivos históricos, já que nos primeiros equipamentos desse tipo, a câmara de colisão também era um quadrupolo.

Esse tipo de equipamento consiste num dos mais versáteis sistemas de espectrometria de massas sequencial (MS/MS), já que ambos os quadrupolos podem, dependendo dos resultados necessários trabalhar nos modos varredura ou seleção. O experimento conhecido como varredura de íons produtos (ou íons fragmentos) é dado, onde o primeiro quadrupolo seleciona somente o íon de interesse, e o fragmenta na câmara de colisão e esses fragmentos são separados de acordo com a m/z no segundo quadrupolo. Outros modos de aquisição em MS/MS com fins qualitativos são os modos de varredura de íons precursores (PIS) e varredura de perda neutra (NL). Esses experimentos são utilizados para buscar compostos que apresentem fragmentos em comum, em geral compostos estruturalmente relacionados [113]. Em ambos os casos, o primeiro quadrupolo opera no modo varredura, a diferença está no segundo quadrupolo: no caso

do fragmento em comum ser iônico, utiliza-se o modo PIS e esse analisador seleciona essa massa. No caso do fragmento em comum ser neutro, o MS não consegue detectar essa espécie; nesse caso, o segundo quadrupolo também opera no modo varredura, mas agora com uma diferença de massas de varredura para o primeiro correspondente à massa do fragmento neutro. No caso de experimentos com fins quantitativos, é utilizado o modo de aquisição conhecido como monitoramento de reações selecionadas, SRM. Nesse caso, ambos os quadrupolos operam no seu modo mais sensível (seleção), como demonstrado na Figura 4.

Figura 4 - Analisador de massas do tipo quadrupolo operando em modo de aquisição SRM.

Nos últimos anos, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem*, (LC-MS/MS) com ionização a pressão atmosférica (API) através da ionização por *electrospray* (ESI) ou ionização química a pressão atmosférica (APCI), tem se tornado a técnica analítica de referência para bioanálises [114]. As metodologias API LC-MS/MS apresentam alta seletividade e sensibilidade analítica para a determinação de neurotransmissores e aminoácidos em fluidos biológicos (Tabela 1), as quais podem ser aplicadas na área clínica, fornecendo subsídios para melhor compreensão da neurobiologia da esquizofrenia.

Tabela 1 - Métodos LC-MS/MS para determinação de neurotransmissores e aminoácidos em fluidos biológicos

Analitos	Preparo da Amostra	Análise LC-MS/MS	Limite Quantificação	Referências
24 aminoácidos	Tecidos tireoidianos Extração com MeOH	HILIC amida Eluição por gradiente ESI modo positivo SRM	0,100 a 50,0 ng mL ⁻¹	Qi et al. (2015) [115]
5-HIAA, GLU, glutamina, prolina, triptofano, tiramina, tirosina e valina	Urina PPT acetonitrila	Eluição por gradiente – C18 ESI modo positivo SRM	25-12800 ng mL ⁻¹	Zhai et al. (2015) [116]
19 aminoácidos	Plasma Derivatização com FMOC-Cl	Eluição por gradiente – C18 ESI modo positivo Orbitrap FTMS	0,116- 0,185 nmol mL ⁻¹ (LD)	de Puit et al. (2014) [117]
Triptofano e quinurenina	Plasma PPT TFA	Eluição isocrática – C18 ESI modo positivo SRM	1250 ng mL ⁻¹ e 62,5 ng mL ⁻¹	Huang et al. (2013) [118]
GLU, GABA, colina, acetilcolina, dopamina, 5-HIAA, serotonina, DOPAC e HVA	Tecido cerebral Extração com ácido fórmico	Eluição por gradiente – C18 ESI modo positivo SRM	0,008-2,440 µg g ⁻¹	González et al (2011) [119]
22 aminoácidos	Plasma e soro PPT metanol (HCl 0,1 M) Derivatização: (solução 1-butanol HCl 3 M, 60°C)	Par Iônico (HFBA) Eluição por gradiente - C18 APCI - SRM	1 µM	Harder et al. (2011) [120]
DA, DOPAC, HVA, NE, VMA, MHPG, 5-HT, 5-HIAA, GLU, GABA	Plasma humano PPT acetonitrila Derivatização: cloreto de dansila, pH 11	Eluição por gradiente – C18 ESI modo positivo SRM	0,27-1,63 pmol L ⁻¹ (LD)	Cai et al. (2010) [62]

Continua...

Continuação da Tabela 1

Analitos	Preparo da Amostra	Análise LC-MS/MS	Limite Quantificação	Referências
52 aminoácidos	Plasma e urina Diluição da amostra com FM	PI-RPLC Par Iônico (TDFHA) – C18 Eluição por gradiente ESI modo positivo SRM	11-287 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Waterval et al. (2009) [121]
GLU, glutamina, piroglutamato e GABA	Fluido cerebrospinal Injeção direta da amostra diluída	PI-RPLC Par Iônico (HFBA) Eluição por gradiente Polar – RP 80 A ESI modo positivo SRM	7,8 ng mL ⁻¹	Eckstein et al. (2008) [61]
32 aminoácidos	Plasma, soro ou urina PPT metanol Derivatização: (solução n-butanol HCl 3 M, 60°C)	Eluição isocrática ESI modo positivo C8 SRM	1 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Dietzen et al. (2008) [122]

HILIC: cromatografia líquida por interação hidrofílica, MeOH: metanol, GLU: glutamato, DOPAC: ácido 3,4-dihidroxifenilacético, HVA: ácido homovanílico, NE: noradrenalina, VMA: ácido vanilmandélico, MHPG: 3-metoxi-4-hidroxi fenilglicol, 5-HT: serotonina, 5-HIAA: ácido 5-hydroxindole-3-acético, GABA: γ -ácido aminobutírico, PPT: precipitação, TFA: ácido trifluoroacético, HFBA: ácido heptafluorobutírico, TDFHA: ácido tridecafluoroheptanóico, ESI: ionização eletrospray, SRM: monitoramento de reações selecionadas, LD: limite de detecção, FM: fase móvel.

Na literatura, o emprego da cromatografia líquida com interação hidrofílica para análise de aminoácidos e neurotransmissores é descrita solidamente, no entanto sua aplicação para análise fluídos biológicos foi observada apenas em determinações individuais de analitos. Apenas Qi et al. [115] determinaram simultaneamente vinte e quatro aminoácidos em tecidos tireoidianos utilizando uma coluna HILIC do tipo amida. Diante deste contexto, a aplicação de colunas HILIC para análise simultânea dessas substâncias ainda é pouco explorada, sendo objeto de interesse do presente trabalho.

Em razão da complexidade dos fluidos biológicos, estes não são introduzidos em seu estado in natura em sistemas LC-MS/MS, pois apresentam interferentes, principalmente as proteínas que podem {i} adsorver de forma irreversível junto à coluna analítica, modificando a retenção dos analitos, {ii} coeluir com os analitos durante a separação cromatográfica ou {iii} suprimir a ionização dos analitos, durante processo de ionização. Portanto, a etapa de preparo

de amostras tem sido requerida no desenvolvimento de métodos analíticos, para eliminar os interferentes e pré-concentrar os analitos, quase sempre presentes em níveis de traços em amostras biológicas [123].

As técnicas de preparo de amostras, extração líquido-líquido (LLE), precipitação de proteínas e extração em fase sólida (SPE), associadas à LC-MS/MS têm sido utilizadas no desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de fármacos em diferentes matrizes biológicas, como plasma e soro, Tabela 2.

A química analítica moderna tem sido direcionada para a simplificação, através da hifenação de técnicas, automação (*high-throughput performance*), miniaturização dos sistemas analíticos, minimização do consumo de solvente orgânico e do volume da amostra. Neste contexto, podemos destacar a cromatografia líquida no modo *column switching*.

Tabela 2 - Métodos LC-MS/MS para determinação de fármacos em fluidos biológicos

Analitos	Preparo da amostra	Análise LC-MS/MS	Limite quantificação	Referências
48 Antidepressivos e Antipsicóticos (análise não simultânea)	Soro PPT: ACN/MeOH (9/1)	Fase reversa FM – 5 mM ác. Acético pH 3,9 e MeOH: Solução de amônia ESI+ 20–24°C	1,0 – 100,0 ng/mL	Kirchherr et al. (2006) [124]
10 Antidepressivos 3 Antipsicóticos	Soro PPT: 10% ZnSO ₄ .7H ₂ O / 0,1% ác. Fórmico em MeOH	Fase reversa FM – 0,1% ác. Fórmico em H ₂ O: 0,1% ác. Fórmico em MeOH ESI+	UPLC-MS/MS 3,8 – 100 nmol/L	Hasselstrom J. (2011) [125]
Risperidona Haloperidol Olanzapina Ziprasidona Clozapina Quetiapina	Plasma PPT: citrato de sódio 3,8%	Fase reversa FM- água com 0,2% de ác. Acético: ACN ESI +	7,6 ng/mL 11,2 ng/mL 11,9 ng/mL 11,2 ng/mL 9,7 ng/mL 122,3 ng/mL	Vecchione et al. (2012) [126]

Continua...

Continuação da Tabela 2

Analitos	Preparo da amostra	Análise LC-MS/MS	Limite quantificação	Referências
5 Antidepressivos 4 Antipsicóticos	Soro PPT: 0,05% ZnSO ₄ .7H ₂ O em ACN/MeOH (40/60, v/v)	Fase reversa FM – 2 mM acetato de amônio 0,1% ác. Fórmico e 5% ACN: 2 mM acetato de amônio 0,1% ác. Fórmico e 95% ACN ESI + T:30°C	1,0 – 50,0 ng/mL	Urinovska et al. (2012) [127]
10 Psicotrópicos e Metabolitos	Plasma PPT: ACN	Fase Reversa FM – 10 mM acetato de amônio: ACN ESI+	UPLC-MS/MS 0,5 – 1,0 ng/mL	Ansermot et al. (2013) [128]
88 psicoativos (análise não simultânea)	Sangue LLE: MeOH, ACN e FM	Fase reversa FM – ác. Fórmico 0,1%: MeOH ESI +	0,8 – 128,2 ng/mL	Sempio et al. (2014) [129]
Topiramato Carbamazepina Lamotrigina	Soro PPT: ACN	Fase reversa FM – 25 mM acetato de amônio: ACN ESI- ESI+	0,5 µg/mL	Di Rago et al. (2014) [130]
16 Antipsicóticos 8 Metabolitos	Soro LLE: tampão carbonato (1 M; pH 9,5) metil terc-butil éter	Fase reversa FM – 10 mM acetato de amônio: ACN pH 3,7 T: 40°C ESI+	0,33 – 16,7 ng/mL	Patteet et al. (2014) [102]

PI: padrão interno, LLE: extração líquido-líquido, PPT: precipitação de proteínas, FM: fase móvel, ACN: acetonitrila, MeOH: metanol, ESI: ionização por eletronebulização, APCI: Ionização química a pressão atmosférica, UPLC: cromatografia líquida de ultra eficiência.

1.4.1. Cromatografia líquida por interação hidrofílica - HILIC

O termo HILIC foi proposto por Andrew Alpert em 1990 como um acrônimo de *Hydrophilic Interaction Chromatography* [131], ou seja, cromatografia por interação hidrofílica. Essa técnica tem sido também denominada *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* e *Aqueous Normal Phase*. De uma maneira simples, pode-se dizer que HILIC é um modo de separação cromatográfica que utiliza a fase estacionária da cromatografia líquida normal com a fase móvel da cromatografia líquida em fase reversa. Assim, utiliza uma coluna com fase estacionária hidrofílica (“normal”) e um eluente contendo água, tampão e uma concentração elevada de solvente orgânico miscível com água. A ordem de eluição em um sistema HILIC será praticamente o contrário de um que opera em modo reverso. O fator de retenção é proporcional à polaridade do soluto e inversamente proporcional à polaridade da fase móvel [131].

A cromatografia líquida foi a primeira modalidade da cromatografia a ser desenvolvida e descrita no início do século XX. Na forma clássica, essa técnica foi desenvolvida empregando-se uma fase sólida – usualmente um óxido inorgânico como a sílica ou alumina – a qual é acondicionada dentro de um tubo, servindo como meio de separação através da retenção relativa de cada composto nesta fase (denominada estacionária) [132-134].

Para remover os compostos retidos seletivamente na fase estacionária, uma das técnicas consiste em percolar um líquido sobre ela (denominada fase móvel), o qual arrastará os compostos para fora do tubo de acordo com a maior ou menor interação que cada um tenha com a fase estacionária. Durante muito tempo, essa forma de cromatografia foi praticamente a única a ser utilizada, sendo denominada de cromatografia líquida pelo fato de a fase móvel ser um líquido. A grande variedade de compostos polares facilmente disponíveis para funcionarem como fase estacionária, em especial óxidos (sílica, alumina, magnésia, titânia e zircônia) e outros (talco, carvão ativo, argilas, etc.) fez com que a modalidade de cromatografia líquida, mais empregada durante décadas, fosse baseada em uma fase estacionária polar (ex.: sílica – óxido de sílica) e uma fase móvel não polar (ex.: hexano) ou contendo pequenas quantidades de solventes mais polares (ex.: hexano/ diclorometano) [132-134].

Nesse período, esse era considerado o modo “normal” de operar a cromatografia líquida. Nos anos 1970, surgiram as denominadas fases quimicamente ligadas (*bonded phases*), as quais possibilitaram o uso de fases estacionárias mais hidrofóbicas e fases móveis baseadas em soluções aquosas, contendo solventes orgânicos miscíveis com a água. Esse novo sistema contendo fases estacionárias com grupos apolares ancorados na sílica (octadecilsilano – C18;

octilsilano – C8; hexilsilano – C6, e outros) logo se tornou popular na análise de biomoléculas, em alimentos e na análise de pesticidas de última geração. Tal desenvolvimento deu grande impulso à desenvolvida cromatografia líquida moderna ou simplesmente HPLC. Uma vez que o novo sistema utilizava composições de fases móveis mais polares (acetonitrila-água; metanol-água) do que as fases estacionárias, a ordem de eluição dos compostos era contrária, inversa ou reversa à da cromatografia líquida “normal”. Assim, foi cunhado o termo *reversed phase* (RP) ou fase reversa para descrever esse tipo de cromatografia líquida no qual a polaridade da fase móvel é maior do que a da fase estacionária. Além de cromatografia em “fase normal” (NP) e em “fase reversa” (RP), existem dois outros modos de cromatografia líquida: cromatografia de troca-iônica, baseada principalmente em interações eletrostáticas, importantes na análise de compostos iônicos ou altamente polares, e a cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) [132-134].

Enquanto a troca iônica e a exclusão por tamanho possuem nichos próprios e mais seletivos, a cromatografia em fase normal e em fase reversa possuem uma faixa mais ampla de aplicações. A cromatografia em fase reversa tem sido nos últimos 20 anos, a primeira escolha na análise de moléculas de interesse biológico (aminoácidos, proteínas, fármacos humanos e veterinários), alimentos (carotenóides, lipídeos, vitaminas, etc.) e muitos outros campos de aplicação para análises de compostos de baixa ou média polaridade. Entretanto, a retenção de compostos polares nesse modo (RP) geralmente requer grande quantidade de água na fase móvel para se obter alguma retenção dos analitos, o que ocasiona diversos problemas, tais como a diminuição da sensibilidade em LC-MS empregando ionização via *electrospray*, e a ruptura da estrutura da superfície da fase estacionária (*dewetting*) [132-134].

O uso de troca iônica e emparelhamento de íons também apresentam limitações na análise de compostos polares. Ambos podem funcionar razoavelmente bem quando os analitos são ionizáveis. Porém, os reagentes empregados no emparelhamento de íons geralmente causam supressão de sinal em espectrometria de massas, diminuindo a sensibilidade. Isso pode afetar a análise quantitativa em métodos bioanalíticos. Portanto, existe um espaço não apropriadamente explorado para a análise de solutos polares, sendo a cromatografia, que envolve interação hidrofílica (HILIC), o modo atualmente mais apropriado para preencher tal lacuna (Figura 5) [132-134].

Figura 5 - Correlação da HILIC com as demais formas de cromatografia líquida. RPLC: cromatografia líquida em fase reversa; NPLC: cromatografia líquida em fase normal; IC: cromatografia de troca iônica. Adaptado de [133].

De acordo com a literatura, existem essencialmente três maneiras possíveis para modelar o mecanismo de separação em HILIC. A primeira é dada pela partição dos analitos entre as fases móvel e estacionária (semelhantes às empregadas em RPLC); a segunda trata da adsorção do analito na superfície do adsorvente; e a terceira assume a adsorção preferencial do modificador de fase móvel orgânica sobre a superfície do adsorvente, seguida da partição do analito presente na camada adsorvida [132, 133].

A teoria atual propõe que a retenção em HILIC é causada por partição. Esse fenômeno ainda necessita de uma explicação teórica aprofundada. Neste modo, o mecanismo de separação baseia-se na distribuição diferencial das moléculas do analito injetado entre a fase móvel rica em acetonitrila e uma camada enriquecida com água adsorvida na fase estacionária hidrofílica (Figura 6). Quanto mais hidrofílico o analito, mais o equilíbrio de partição é deslocado para a camada de água imobilizada na fase estacionária, e, assim, uma maior quantidade de analito é retida [132, 133].

Figura 6 - Esquema do mecanismo de separação em um sistema HILIC. Adaptado de [133].

Quando a concentração de acetonitrila (ou algum outro solvente orgânico) aumenta, a água interage mais fortemente com a superfície da fase estacionária polar (por exemplo, sílica). Neste caso, a acetonitrila não pode interagir com os silanóis residuais da fase estacionária, proporcionando uma maior adsorção de moléculas de água sobre eles [133].

Neste contexto, quando a concentração de água na fase móvel é inferior a 20%, a adsorção de água pode ocorrer na forma de múltiplas camadas, podendo criar um excesso de água adsorvida em comparação com a concentração de água no eluente. McCalley e Neue [135], concluíram que cerca de 4-13% do volume dos poros da sílica na fase estacionária foram ocupados por uma camada de água quando havia cerca de 75-90% de acetonitrila no eluente.

As interações no modo HILIC, quando altas concentrações de solventes orgânicos são utilizadas, não são apenas partição do analito entre as fases móvel e estacionária, inclui também interações de hidrogênio entre espécies polares neutras, bem como mecanismos eletrostáticos fracos. Alpert [131] também considerou que interações dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio podem contribuir na sorção dos analitos na fase estacionária. Este autor observou que grupos básicos dos analitos levam a uma hidrofiliabilidade pronunciada e influenciam na retenção e mecanismo de separação. Yoshida [136] de modo semelhante considerou que a retenção em HILIC abrange tanto ligações de hidrogênio (que depende de acidez/basicidade de Lewis) e interações dipolo-dipolo (dependente do momento de dipolo e da polarizabilidade das

moléculas), e demonstrou que o padrão de eluição era similar ao de cromatografia líquida em fase normal (não aquoso), por isso, propôs que o mecanismo deveria ser muito semelhante.

Por outro lado, as interações eletrostáticas podem desempenhar um papel importante na HILIC, devido a ambos os grupos iônicos que tenham sido intencionalmente incorporados na fase estacionária ou a cargas residuais menos intencionais, tais como as dos grupos silanóis dissociados. Estes grupos residuais na superfície da sílica, os quais não podem ser removidos ou bloqueados devido a efeitos estéricos de ligantes ligados, são parcialmente ionizados. Silanóis residuais podem influenciar a separação dos analitos polares, especialmente compostos básicos e biopolímeros, devido à polaridade (ligações de hidrogênio e dipolo-dipolo) e interações entre os grupos básicos e os silanóis residuais ionizados do suporte [132-134].

As interações de analitos ácidos e básicos com a fase estacionária podem ser baseadas tanto em interações hidrofílicas quanto forças eletrostáticas. No entanto, o mecanismo final de separação é muito provavelmente uma sobreposição de partição, interações eletrostáticas ou ligações de hidrogênio com a fase estacionária. Cada mecanismo depende do tipo de fase estacionária utilizada e as condições de tampão, incluindo a quantidade e o tipo de solvente orgânico, concentração de sal e o pH [133].

A fase móvel típica empregada em HILIC consiste em uma solução contendo acetonitrila (ACN) e uma pequena proporção de água. Nesses casos, como na separação de carboidratos, não é necessário o uso de tampões. Em princípio, qualquer solvente aprótico que seja miscível com água (por exemplo, dioxano e THF) pode ser usado como fase móvel em HILIC. Álcoois também podem ser empregados, mas em concentração maior para se obter boa retenção. Para compostos ionizáveis, a escolha de um tampão adequado é difícil devido à baixa solubilidade dos tampões tradicionalmente usados em fase reversa, tais como fosfato em fases móveis contendo altas proporções de solventes orgânicos [132-134].

A seguir apresentamos uma sequência de solventes (modificadores orgânicos) de acordo com o aumento da força de eluição em HILIC:

acetona < isopropanol ~ propanol < acetonitrila < etanol < dioxano < DMF ~ metanol < água

As separações em HILIC são realizadas em modo isocrático com uma elevada quantidade de solvente orgânico, ou com eluição por gradiente, iniciando com pequena quantidade de água e elevadas quantidade do solvente orgânico (solvente mais “fraco”), diminuindo-se ao longo da análise a quantidade do solvente orgânico e aumentando a de água (solvente “forte”) [134].

Considerando que a estabilidade das colunas baseadas em sílica (ainda as mais empregadas em HILIC) é comprometida com o aumento do pH, é comum empregar-se, nesse modo, aditivos ácidos, principalmente ácido fórmico e ácido acético a fim de se controlar o pH da fase móvel, a força iônica do meio e resolver problemas relacionados à baixa ionização de analitos básicos em meio orgânico. Além disso, essas soluções são voláteis o suficiente para serem compatíveis com seu uso no acoplamento LC-MS [132-134].

Uma grande quantidade de colunas cromatográficas podem ser utilizadas para as separações em HILIC. Fases estacionárias típicas em HILIC consistem de um suporte de sílica pura que podem ser modificadas com diversos grupos funcionais polares como cátions ou ânions, ou até à base de polímeros [133, 134].

As fases baseadas em grupos ciano, diol, amino e outros grupos quimicamente ligados são geralmente preparadas por meio de modificação química na superfície da sílica gel, de maneira similar às utilizadas no preparo de fases C18 e C8 empregadas em cromatografia líquida em fase reversa [133, 134].

Uma das primeiras fases quimicamente ligadas a ser utilizada no modo HILIC era constituída de grupos aminopropil quimicamente ligados à sílica. Essas fases requerem tempos longos de equilíbrio quando determinadas soluções tampão são empregadas. Um cuidado importante com as fases do tipo aminopropil de sílica é relativo à sua estabilidade limitada em eluentes aquosos, o que leva à rápida perda de ligante, deteriorando a forma dos picos quando operada no modo HILIC. Para contornar esse problema, desenvolveram-se empacotamentos contendo grupos amino, porém baseados em polímeros orgânicos ao invés de sílica. Essas novas fases podem ser empregadas em condições ácidas ou básicas no modo HILIC, com maior estabilidade [132-134].

Várias colunas apresentando grupos amida quimicamente ligados à sílica foram preparadas especialmente para HILIC e são comercializadas por diferentes empresas. Geralmente, o grupo amida é ligado à superfície da sílica gel por meio de um pequeno espaçador (grupo alquil); em contraste com os grupos amino, não possui caráter básico, dependendo menos do pH e apresentando menor propensão à adsorção irreversível [134].

Outra fase interessante para HILIC baseia-se no grupo diol quimicamente ligado à sílica. A elevada polaridade e as propriedades apropriadas para formação de pontes de hidrogênio dos dióis, juntamente com a maior estabilidade da ligação à estrutura da sílica, sugerem ser essa uma fase bastante apropriada para ser utilizada no modo HILIC. Mesmo assim, existem poucas aplicações de fases do tipo diol em HILIC até o momento [134].

As fases baseadas em cianopropil quimicamente ligadas à sílica foram muito populares no início da HPLC em fase normal. Entretanto, por não apresentarem capacidade de formação de ligações de hidrogênio e, portanto, pouca retenção de compostos polares em fases móveis aquosas orgânicas, não são muito promissoras em HILIC. Outra limitação dessas fases é a instabilidade mecânica na presença de solventes de polaridade intermediária [134].

O emprego de resinas trocadoras de íons para separação de sacarídeos e outros compostos neutros, em condições HILIC, são conhecidas há muito tempo. Apesar de apresentarem baixa eficiência e separações lentas, a seletividade dessas colunas motivou seu posterior desenvolvimento. As colunas de troca iônica atualmente empregadas no modo HILIC são muito mais eficientes. Assim, monossacarídeos, glicóis e glicerol foram separados em resina de troca iônica à base de estireno entrecruzado com divinilbenzeno, usando acetonitrila – água como eluente. Mecanismos mistos envolvendo troca catiônica/troca aniônica/HILIC em resinas à base de sílica têm sido empregados com sucesso para separação de dipeptídeos [133, 134].

Recentemente uma nova fase estacionária baseada no caráter zwitteriônico da sulfoalquilbetaina foi desenvolvida para uso em HILIC. Baseia-se em uma fase polimérica grafitizada com cadeias zwitteriônicas de sulfoalquilbetaina de sal interno de 3-sulfopropildimetilalquil amônio como grupo funcional em sílica de poros largos. A presença de um grupo amônio quaternário e um grupo sulfônico na razão 1:1 na mesma cadeia pendente resulta em uma carga líquida próxima de zero na camada ligada. Essa fase adsorve fortemente água em sua superfície, a qual passa a fazer parte da fase estacionária e controlar o mecanismo da retenção por meio de processos de partição [133, 134].

Vários outros tipos de fases estacionárias foram desenvolvidas e estão em uso no modo HILIC. Colunas capilares monolíticas foram preparadas por polimerização de derivados da fosforilcolina na superfície da sílica gel. Colunas capilares monolíticas foram preparadas pela copolimerização de derivados da betaina com etileno dimetaacrilato para a separação de compostos ácidos, básicos e neutros no modo HILIC, usando fases móveis acetonitrila - água com teores de ACN superiores a 60%. Polímeros polares não iônicos também foram preparados e empregados em HILIC; oligonucleotídeos foram separados em coluna monolítica capilar à base de hidroximetacrilato [132-134].

As primeiras aplicações do HILIC foram inicialmente voltadas à análise de carboidratos. Atualmente existem aplicações que demonstram o uso da técnica desde pequenas moléculas até proteínas. Na análise de pequenas moléculas, especialmente altamente polares, a HILIC destaca-se na análise de compostos de caráter básico, cuja análise por fase reversa requer o uso da técnica de adição de par iônico. Esse campo de aplicação da HILIC tem crescido muito

recentemente, e um grande número de moléculas pequenas, pertencentes a várias funções químicas, têm sido analisadas com sucesso por essa técnica [132-134]. Uma vez que muitos fármacos e drogas veterinárias são compostos de elevada polaridade, a HILIC tem sido empregada na análise dessa classe, especialmente quando presentes em baixas concentrações [137, 138]. Na área de desenvolvimento farmacêutico, a HILIC tem sido bastante utilizada [139, 140], inclusive no estudo de fitoterápicos [141]. Moléculas de tamanho intermediário ou maiores, como vários tipos de toxinas [142, 143], aminoácidos e peptídeos [144, 145], carboidratos [146], proteômica [147] e metabolômica [148], também têm sido analisadas com sucesso empregando-se HILIC.

1.4.2. Cromatografia líquida no modo *column switching*

A cromatografia líquida multidimensional (também conhecida como cromatografia com acoplamento de colunas ou *column switching*) representa uma poderosa ferramenta e um procedimento alternativo para os clássicos métodos baseados em HPLC unidimensional.

Esta técnica pode ser realizada em modo *online* ou *off-line*. No modo *off-line* as frações eluídas da primeira coluna são coletadas manualmente ou em coletor de frações e então reinjetadas na segunda coluna. Essa abordagem tem a vantagem de ser simples e não requerer uma válvula seletora de colunas. Entretanto, os procedimentos demandados são laboriosos e consomem muito tempo. As técnicas *online* têm a vantagem de serem automatizadas por meio de uma válvula seletora de colunas, onde a automatização melhora a confiabilidade e capacidade de processamento de amostras, reduzindo o tempo de análise e a perda de amostras. Uma limitação do acoplamento entre colunas é que as fases móveis usadas devem ser compatíveis uma com a outra [149], Tabela 3.

A cromatografia líquida no modo *column switching* tem sido utilizada para a extração dinâmica e análise *online* dos analitos pré-concentrados. O sistema analítico é montado com duas ou mais colunas com diferentes dimensões e fases estacionárias, válvulas com múltiplos pórticos e uma ou mais bombas de alta pressão. Geralmente, a amostra biológica, após simples pré-tratamento, é percolada pela primeira coluna (1D) para a pré-concentração (sorção) seletiva dos analitos. Após *clean-up* da fase estacionária para a remoção dos componentes endógenos da amostra biológica e acoplamento (comutação) das colunas conectadas à válvula de seis pórticos, os analitos são eluídos para a segunda coluna (2D). Em seguida, as colunas são desacopladas para a separação cromatográfica na segunda coluna (2D) e simultânea regeneração da primeira coluna (1D) [149-157].

A Tabela 3 apresenta algumas vantagens e desvantagens da cromatografia líquida no modo *column switching*, quando comparada à cromatografia líquida convencional.

Tabela 3 - Vantagens e desvantagens da cromatografia líquida no modo *column switching*

<i>Vantagens</i>
Simples pré-tratamento da amostra biológica
Mínimo risco de contaminação da amostra - menor número de etapas manuais
Menor volume da amostra biológica
Menor exposição dos analistas às amostras biológicas
Menor perda de amostra - sistema analítico <i>online</i>
Diferentes mecanismos de sorção – colunas 1D e 2D
Possibilidade de completa automação do sistema analítico
Maior frequência de amostras
Diferentes configurações para o acoplamento das colunas
Maior exatidão e repetitividade dos resultados
Maior seletividade e detectabilidade analítica
Reuso de sorventes
Regeneração da coluna 1D durante a separação cromatográfica na coluna 2D
<i>Desvantagens</i>
Válvulas de comutação, coluna de pré-concentração e bombas de alta pressão são necessárias
Efeito de memória – reuso dos sorventes (coluna 1D)
Sorção dos componentes endógenos da matriz biológica no sorvente - aumento de pressão do sistema analítico
Otimização das etapas de pré-concentração dos analitos, limpeza do sorvente, eluição dos analitos para a coluna 2D e separação cromatográfica
Incompatibilidade entre as fases móveis das colunas 1D e 2D

O desenvolvimento de novas fases estacionárias para a injeção direta de amostras biológicas em cromatografia líquida no modo *column switching* tem simplificado a etapa do preparo da amostra e diminuído o tempo da análise. Estes procedimentos analíticos online diminuem a exposição dos analistas às amostras biológicas, a contaminação destas amostras e eventuais perdas do analito. Além disso, a técnica de cromatografia líquida em modo *column switching* pode favorecer a detectabilidade e a precisão analítica, utilizando modos de injeção de amostras denominados *straight-flush* (direto) ou *back-flush* (reverso) [149], Figura 7.

O modo *straight-flush* ou modo direto é o modo mais simples aplicado ao processamento de amostras biológicas usando a configuração no modo *column switching*. Inicialmente, a amostra é injetada na coluna 1D, os componentes endógenos da matriz biológica são eluídos diretamente para o descarte, e ao comutar a válvula de seis pórticos, a fração (contendo os analitos que estão sendo analisados) é eluída para a coluna analítica (2D) e os analitos são separados [158].

Por outro lado, o modo *back-flush* ou modo reverso, a eluição dos analitos da coluna 1D para a coluna 2D é realizado no sentido oposto empregado na pré-concentração dos analitos. Desta forma, os analitos retidos no início da coluna 1D são transferidos diretamente para a coluna analítica (2D). Depois de eluir a fração de interesse, os componentes endógenos da matriz são removidos da coluna 1D também no fluxo inverso. Nesta abordagem, a coluna analítica é protegida de contaminação dos componentes endógenos da matriz, que são eluídos após dessorção dos analitos [158].

Figura 7 - Sistema de column switching. A: *straight-flush* (direto) e B: *back-flush* (reverso).

A cromatografia líquida no modo *column switching* tem sido utilizada para a determinação de diferentes analitos em alimentos, amostras ambientais e amostras biológicas [159-161]. Além disso, as inovações tecnológicas em ciências dos materiais e robótica têm facilitado o desenvolvimento de novas estratégias nas técnicas de cromatografia líquida no modo *column switching* [158, 162-173]. A Tabela 4 apresenta alguns trabalhos que utilizam a cromatografia líquida no modo *column switching*.

Tabela 4 - Análises de diferentes substâncias em fluidos biológicos utilizando a técnica LC no modo *column switching*

Analito	Amostra Biológica	Coluna 1D	Coluna 2D	Sistema de detecção	Referência
Xantina oxidadase	Leite bovino	RAM-C18	C18	LC-DAD	Li et al. (2014) [157]
11-nor-9-carboxi-tetra-hidrocanabinol	Cabelo humano	C18	C18	LC-MS ³	Park et al. (2014) [156]
Estatinas	Plasma humano	RAM-BSA	C18	LC-UV	Fagundes et al. (2014) [155]
Ácidos alquil mercaptúricos	Urina Humana	RAM-ADS-C18	C18	LC-MS/MS	Eckert et al. (2014) [154]
Clorpromazina	Plasma humano	RAMIP-BSA	C18	LC-UV	Figueiredo et al. (2013) [174]
Quimioterápico	Plasma humano	C18	C18	LC-MS/MS	Wickremsinhe et al. (2013) [175]
Inibidor da topoisomerase	Plasma humano	C18	C18	LC-MS/MS	Kamei et al. (2011) [176]
Sulfonamidas	Leite bovino	RAM-MIP-SG	C18	LC-UV	Xu et al. (2010) [177]
β-bloqueadores	Plasma de rato	RAM-MIP	beta-ciclodextrina fenilcarbamato	LC-UV	Sanbe et al. (2003) [178]
Derivados de ácido 2-arilpropiónico	Plasma de rato	RAM-MIP	C18	LC-UV	Haginaka et al. (2000) [179]

UV: detector de ultravioleta, MS: detector de espectrometria de massas, RAM: material de acesso restrito, MIP; polímero molecularmente impresso, ADS: alquil diol sílica, BSA: albumina sérica bovina, SG: sílica gel.

Na Tabela 4 podemos observar uma variedade de colunas utilizadas em 1D, que vão desde a fase reserva C18 até colunas RAM-MIP que são aplicadas para sorção seletiva dos analitos com exclusão de proteínas das amostras biológicas. Neste contexto, podemos destacar também a utilização de fases estacionárias quimicamente modificadas, como as fases monolíticas de sílica híbrida.

1.4.3. Fases monolíticas híbridas organo-sílica

Uma fase monolítica é um meio contínuo de separação que possui uma estrutura sólida e altamente porosa, de pequenos domínios e canais relativamente grandes, que fornecem altas permeabilidade e eficiência de coluna. Os domínios podem ser micro ou mesoporosos, ter estrutura dupla de poros (micro e mesoporos), ou podem ser não porosos [180]. As fases monolíticas apresentam algumas vantagens, tais como, não necessitam de filtros nas extremidades, bom controle da porosidade, facilidade de incorporação de diferentes grupos (moléculas hidrofóbicas, moléculas carregadas, moléculas para interações específicas, etc.) durante seu preparo e capacidade de sorção superior às colunas capilares abertas.

As fases monolíticas com polímeros orgânicos [181-183] ou à base de sílica [184-186] têm sido utilizadas para análises *in-tube* SPME. Os polímeros monolíticos orgânicos apresentam boa estabilidade em ampla faixa de pH, no entanto, o intumescimento desses polímeros na presença de alguns solventes orgânicos pode levar à diminuição da estabilidade mecânica. Já os monolitos à base de sílica apresentam altas permeabilidade e estabilidade mecânica e não intumescem na presença de solventes orgânicos, mas o preparo convencional é moroso e de baixa reprodutibilidade. Uma alternativa promissora tem sido os monolitos híbridos organo-sílica para as análises *in-tube* SPME [161, 184, 187].

Estes apresentam uma ligação covalente entre a parte orgânica (trialcoxissilano organofuncionalizado) e a parte inorgânica (tetrametoxissilano, TMOS ou tetraetoxissilano, TEOS). Os grupos alcóxidos sob reações de hidrólises e policondensação, processo sol-gel, resultam na matriz de sílica híbrida com grupos orgânicos covalentemente incorporados. O meio ácido favorece as reações de hidrólise, enquanto que o meio alcalino favorece as reações de condensação. Geralmente, os monolitos híbridos são sintetizados via reações sol-gel, em duas etapas. Inicialmente, os silanos são hidrolisados em altas temperaturas em solução água/metanol (co-solvente), na presença de um catalisador ácido (ácido clorídrico, ácido acético). Em uma segunda etapa, dodecilamina é adicionada à solução como um catalizador secundário, aumentando o pH e acelerando as reações de condensação e reduzindo tempo de gelatização. A dodecilamina também atua como *supramolecular template* para formar poros na matriz monolítica. Este procedimento foi adotado para a síntese de monolitos com grupos cianoetil e octil incorporados, os quais foram utilizados, respectivamente, para análises *in-tube* SPME/LC de antidepressivos [161] em amostras de plasma e de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) [184]. Xu e Lee [187] sintetizaram um capilar com monolitos híbridos organo-sílica com grupos mercapto incorporados, via processo sol-gel em uma única etapa. Este

capilar monolítico, após oxidação com peróxido de hidrogênio, gerou grupos sulfônicos, que permitiram a extração *in-tube* SPME de anestésicos (fármacos básicos) em amostras de urina para análises por eletroforese capilar (CE).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Desenvolver e validar método empregando as técnicas analíticas de precipitação de proteínas (PPT) e cromatografia líquida por interação hidrofílica acoplada à espectrometria de massas em *tandem* (HILIC-MS/MS) para análise de aminoácidos e neurotransmissores em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos, para avaliar a eficácia do tratamento, tendo como controle voluntários sadios.

Desenvolver, validar e avaliar os métodos empregando as técnicas analíticas de PPT/LC/MS-MS e LC-MS/MS no modo *column switching* para análise de fármacos (antipsicóticos, antidepressivos, anticonvulsivantes e ansiolíticos) em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos para fins de monitorização terapêutica.

*MATERIAIS E
MÉTODOS*

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Determinação de aminoácidos e neurotransmissores em amostras de plasma empregando o método HILIC-MS/MS

3.1.1. Materiais e reagentes

Os padrões analíticos, aspartato, glutamato, serina, glicina, alanina, GABA, metionina, leucina, tirosina, triptofano e os isótopos estáveis (padrões internos) metionina-d3 e glutamato-d5 foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, USA). A água utilizada para preparar a fase móvel foi purificada em um sistema Milli-Q (Millipore, São Paulo, Brasil). ACN grau HPLC e acetato de amônio foram obtidos do fornecedor JT Baker (Phillipsburg, EUA).

3.1.2. Amostras de plasma

Amostras de plasma de voluntários não expostos a qualquer medicamento durante pelo menos 72 h (plasma branco) foram utilizadas para otimizar e validar o método LC-MS/MS desenvolvido. Estas amostras de plasma branco, bem como as amostras de plasma de voluntários saudáveis (parentes de primeiro grau de pacientes com esquizofrenia) e dos pacientes esquizofrênicos em tratamento com clozapina e olanzapina foram gentilmente fornecidos pela equipe de Enfermagem Psiquiátrica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Estas amostras de plasma foram coletadas de acordo com os critérios estabelecidos pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

As amostras de sangue foram coletadas em um tubo de 6 mL, contendo heparina. Estes tubos foram centrifugados e as amostras de plasma foram armazenadas a -20 °C. Estas amostras de plasma foram analisadas no período de um mês após a coleta. Com base em trabalhos descritos na literatura, os fármacos (analitos) em amostras de plasma são estáveis por 24 horas quando armazenados à temperatura ambiente, em amostras de plasma de pacientes por um período de três ciclos de congelamento/descongelamento ou, quando armazenadas a -20 °C durante seis meses [188-191].

3.1.3. Preparo dos calibradores

As soluções padrão diluídas foram preparadas em água, a partir da diluição das soluções estoque (aquosas), nas seguintes concentrações: 13,3 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ para glicina, 11,2 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ para alanina, 9,5 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ para serina, 7,6 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ para leucina, 4,9 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ para triptofano, 7,5 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ para aspartato, 6,8 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ para glutamato, 6,7 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ para metionina, 5,5 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ para tirosina e 9,7 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ para GABA. Estas soluções são estáveis durante seis meses, à temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ [191].

Para a otimização e validação do método HILIC-MS/MS, amostras de plasma branco foram enriquecidas com soluções padrão resultando nas seguintes concentrações plasmáticas: 13,3 a 800 nmol mL^{-1} para glicina, 11,2 a 700 nmol mL^{-1} para alanina, 9,5 a 600 nmol mL^{-1} para serina, 7,6 a 500 nmol mL^{-1} para leucina, 4,9 a 300 nmol mL^{-1} para triptofano, 7,5 a 500 nmol mL^{-1} para aspartato, 6,8 a 400 nmol mL^{-1} para glutamato, 6,7 a 400 nmol mL^{-1} para metionina, 5,5 a 300 nmol mL^{-1} para tirosina, e 9,7 pmol mL^{-1} a 19,4 nmol mL^{-1} para GABA. As soluções dos padrões internos, glutamato-d5 e metionina-d3, foram preparadas em água nas concentrações de 197,0 nmol mL^{-1} e 1,6 nmol mL^{-1} , respectivamente.

3.1.4. Preparo da amostra de plasma

As proteínas das amostras de plasma (50 μL) foram precipitadas com acetonitrila (100 μL). Este procedimento foi realizado em tubo de ensaio sob agitação em vortex por 5 minutos, e posterior centrifugação por 15 minutos a 9000 g. O sobrenadante do tubo de ensaio foi transferido para um dispositivo de ultrafiltração Amicon Ultra-4 (Millipore, Bedford, MA, EUA) com uma membrana de celulose regenerada e centrifugado durante 30 minutos a 9000 g. O filtrado (5 μL) foi analisado por HILIC-MS/MS.

3.1.5. Análise HILIC-MS/MS

▪ Condições Cromatográficas

Coluna: Ascentis Express HILIC, Supelco (2,7 μm , 100 x 4,6mm), a 40°C ;

Fase Móvel: Solvente A - Acetato de amônio 10 mM e B – Acetonitrila, na proporção 60:40; com fluxo de 500 $\mu\text{L min}^{-1}$.

Modo de eluição: Isocrático.

▪ Condições MS/MS

Equipamento: Waters® UPLC-MS/MS (Xevo TQD), equipado com fonte de ionização por electrospray e analisador de massas do tipo quadrupolo. A fonte de íons operou no modo positivo, nas seguintes condições: gás de dessolvatação: N₂ a 650 °C; gás de colisão: argônio; temperatura da fonte de ionização: 150 °C; voltagem do capilar: 0,5 kV; e fluxo de dessolvatação: 900 L Hr⁻¹. Todos os AAs (aminoácidos) e NTs (neurotransmissores) foram analisados no modo de monitoramento de reações selecionadas (SRM). O dwell time estabelecido para cada transição foi de 0,048 s, e o interscan delay foi configurado no modo automático. Os dados foram adquiridos usando o software MassLynx V4.1.

3.1.6. Validação analítica

A validação analítica do método proposto (HILIC-MS/MS) foi realizada com amostras (plasma branco de referência) enriquecidas com os analitos em diferentes concentrações, segundas normas estabelecidas pela RESOLUÇÃO RDC N.º 27, DE 17 DE MAIO DE 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA [192]. A linearidade, exatidão, precisão, limite de quantificação, efeito residual, efeito da matriz e seletividade foram avaliados.

3.1.6.1. Linearidade

Cinco curvas analíticas foram construídas e avaliadas com amostras de branco de referência enriquecidas com seis diferentes concentrações dos analitos e com adições dos padrões internos deuterados. Os sinais analíticos (áreas dos picos dos compostos endógenos) da amostra de branco de referência foram subtraídos das áreas dos analitos obtidas com as amostras enriquecidas. A razão entre estes valores e a área do padrão interno foi utilizada para a construção das curvas analíticas (eixo y), já o eixo x foi representado pelas concentrações dos analitos adicionadas às amostras (concentração nominal) [193].

Os calibradores (pontos da curva analítica) foram aprovados quando o coeficiente de variação (CV) foi menor ou igual a 20% (vinte por cento) em relação à concentração nominal referente ao limite inferior de quantificação (LIQ); e o CV menor ou igual a 15% (quinze por

cento) em relação à concentração nominal para os outros pontos da curva analítica, incluindo o limite superior de quantificação (LSQ).

3.1.6.2. *Exatidão*

A exatidão foi determinada em ensaios realizados em um mesmo dia (exatidão intraensaios) e em 3 (três) dias consecutivos (exatidão interensaios). Sendo que, os ensaios foram realizados com 5 (cinco) replicatas em 5 (cinco) diferentes concentrações: limite inferior de quantificação (LIQ), controle de qualidade baixo (CQB), controle de qualidade médio (CQM), controle de qualidade alto (CQA) e limite superior de quantificação (LSQ).

A exatidão foi expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR), não se admitindo valores fora da faixa de $\pm 15\%$ (quinze por cento) do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual não se admitiu valores fora da faixa de $\pm 20\%$ (vinte por cento) do valor nominal, segundo a fórmula a seguir:

$$\text{EPR} = \frac{(\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal})}{\text{Valor nominal}} \times 100$$

3.1.6.3. *Precisão*

A precisão foi determinada em ensaios realizados em um mesmo dia (precisão intraensaios) e em ensaios realizados em 3 (três) dias consecutivos (precisão interensaios). Cada ensaio foi realizado com 5 (cinco) replicatas em 5 (cinco) diferentes concentrações: limite inferior de quantificação (LIQ), controle de qualidade baixo (CQB), controle de qualidade médio (CQM), controle de qualidade alto (CQA) e limite superior de quantificação (LSQ).

A precisão foi expressa como coeficiente de variação (CV%), não se admitindo valores superiores a 15% (quinze por cento), exceto para o LIQ, para o qual se admitiu valores menores ou iguais a 20% (vinte por cento), segundo a fórmula a seguir:

$$\text{CV} = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração média experimental}} \times 100$$

3.1.6.4. Efeito residual

Para avaliar o efeito residual, 3 (três) alíquotas do extrato da mesma amostra de branco de referência foram injetados no sistema LC-MS/MS, sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma ou mais amostras enriquecidas com os analitos em concentrações correspondentes ao limite superior de quantificação (LSQ). Os cromatogramas obtidos foram comparados com aqueles de amostras enriquecidas com os analitos em concentrações correspondentes ao limite inferior de quantificação (LIQ).

Os seguintes critérios foram avaliados: as respostas de picos interferentes nos tempos de retenção dos analitos devem ser inferiores a 20% (vinte por cento) da resposta (sinal analítico) dos analitos das amostras enriquecidas com concentrações correspondentes ao LIQ, e as respostas de picos interferentes no tempo de retenção do padrão interno devem ser inferiores a 5% (cinco por cento) da resposta (sinal analítico) do padrão interno.

3.1.6.5. Efeito de matriz

As áreas dos analitos de amostras de plasma branco de referência (n= 5) enriquecidas com os analitos em concentrações que representam o CQB e CQA *versus* as áreas dos padrões internos foram comparadas com as áreas das soluções padrão dos analitos nas mesmas concentrações referidas *versus* as áreas dos padrões internos.

Para cada amostra foi obtido o fator de matriz normalizado por padrão interno (FMN), onde, o coeficiente de variação (CV) dos FMNs relativos a todas as amostras deve ser inferior a 15% (quinze por cento), segundo a fórmula a seguir:

$$\text{FMN} = \frac{\text{Resposta do analito em matriz/Resposta do PI em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução/Resposta do PI em solução}}$$

3.2. Determinação de fármacos em amostras de plasma empregando as técnicas de PPT/LC/MS-MS e LC-MS/MS no modo *column switching*

3.2.1. Materiais e reagentes

Os padrões analíticos dos fármacos carbamazepina, mirtazapina, imipramina, fluoxetina, olanzapina, clonazepan, clorpromazina, citalopram, clozapina, haloperidol, lamotrigina, diazepam, sertralina, clomipramina, paroxetina, quetiapina, carbamazepina-d10, imipramina-d3, diazepam-d5, sertralina-d3, fluoxetina-d6, clomipramina-d3, clonazepan-d4, citalopram-d6, clozapina-d4, paroxetina-d6, haloperidol-d4 e quetiapina-d8 foram adquiridos da Cerilliant Corporation (Texas, USA). A água utilizada para preparar a fase móvel foi purificada em um sistema Milli-Q (Millipore, São Paulo, Brasil). ACN grau HPLC e acetato de amônio e ácido fórmico foram obtidos do fornecedor JT Baker (Phillipsburg, EUA). TEOS (98%), 3-cianopropiltrietoxissilano (CN-TEOS) (98%), N-dodecilamina (99%) e Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (95%), foram obtidos da Sigma Aldrich (St. Louis, USA).

3.2.2. Síntese do capilar monolítico híbrido com grupos cianopropil incorporados para as análises LC-MS/MS no modo *column switching*

Anterior ao procedimento de polimerização, os capilares de sílica fundida (530 μm D.I. e 4,5 cm de comprimento) foram lavados, respectivamente, com 40 mL HCl (1 mol L⁻¹), 40 mL de água, 40 mL de NaOH (1 mol L⁻¹) e 40 mL de água. Posteriormente, os capilares foram secos a 160°C por 8 h.

O desenvolvimento do capilar de sílica fundida com monolitos híbridos com grupos cianopropil incorporados foi realizada conforme procedimento descrito na literatura [161] com algumas modificações.

Em um tubo Eppendorf de 1,5 mL foram adicionados: 180 μL de etanol, 25 μL de ácido acético (2 mol L⁻¹), 110 μL de CN-TEOS e 110 μL de TEOS. Esta mistura foi agitada em agitador de tubos do tipo vortex por 30 s e posteriormente, aquecida em banho termostatzado a 60°C por 5 h. Após atingir a temperatura ambiente, 10 mg de N-dodecilamina foram adicionados ao meio reacional e o tubo agitado por 40 s. Com o auxílio de uma microseringa, o capilar sílica fundida pré-tratado foi preenchido com a mistura reacional, e ambas as

extremidades deste capilar foram vedadas com septos de silicone. Este capilar foi mantido em estufa a 40°C por 15 h para a polimerização. Posteriormente, este capilar foi lavado com 2 mL de etanol e 2 mL de água, para a remoção do surfactante e dos subprodutos da reação. Em seguida o capilar foi seco a 60°C por 30 h.

3.2.3. Caracterização morfológica e espectroscópica do capilar monolítico híbrido cianopropil

Aproximadamente 0,5 cm do capilar monolítico foi cortado, recoberto com ouro e analisado por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) em um equipamento Evo-Zeiss do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP (DQ-FFCLRP).

As fases monolíticas foram avaliadas por Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) utilizando um equipamento Shimadzu-IRPrestige-21, DQ-FFCLRP. Para obtenção dos espectros, uma porção da solução de síntese (a mesma de preenchimento dos capilares) foi deixada em um Eppendorf e submetida às mesmas condições experimentais do capilar. Em seguida, uma pequena porção do bloco monolítico foi macerada e pastilhada com brometo de potássio.

Para avaliar a área superficial específica e os volumes dos poros, experimentos de adsorção-dessorção de nitrogênio foram conduzidos a 77 K num analisador Micrometrics ASAP 2010. O tratamento dos dados foi realizado pelo método BET (Brunauer, Emmett e Teller).

3.2.4. Amostras de plasma

Para otimizar e validar os métodos PPT/LC-MS/MS e LC-MS/MS no modo *column switching* desenvolvidos, foram utilizadas amostras de plasma de voluntários que não tinham sido expostos a qualquer fármaco durante pelo menos 72 h (plasma branco). Estas amostras de plasma branco e as dos pacientes esquizofrênicos foram gentilmente fornecidas pela equipe de Enfermagem Psiquiátrica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. As amostras de plasma foram coletadas de acordo com os critérios estabelecidos pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Os fármacos em análise, segundo testes de estabilidade no injetor automático (amostra pré-preparo) e nas condições de análise à temperatura ambiente mostraram-se estáveis. Segundo resultados descritos na literatura, os fármacos em análise presentes em amostras de plasma mostraram-se estáveis a -20 °C durante seis meses, assim como após três ciclos de congelamento/descongelamento [188-191].

3.2.5. Preparo dos calibradores

As soluções padrão estoque dos analitos foram preparadas em metanol com concentração inicial de 200 µg mL⁻¹. Essas soluções são estáveis por dois meses a -20 °C [195, 196].

As soluções dos padrões internos (PI) foram preparadas em metanol nas seguintes concentrações: haloperidol-d4 (20,5 ng mL⁻¹), clonazepam-d4 e paroxetina-d6 (80,0 ng mL⁻¹), imipramina-d3 (185,0 ng mL⁻¹), citalopram-d6 e sertralina-d3 (205,0 ng mL⁻¹), clomipramina-d3 e quetiapina-d8 (260,0 ng mL⁻¹), diazepam-d5 e fluoxetina-d6 (6550,0 ng mL⁻¹), clozapina-d4 (850,0 ng mL⁻¹), e carbamazepina-d10 (5,5 µg mL⁻¹).

Para a otimização e validação dos métodos desenvolvidos, as amostras de plasma branco foram enriquecidas com as soluções padrão dos PI e dos analitos, resultando em concentrações plasmáticas que contemplaram o intervalo terapêutico. Para o método PPT/LC/MS-MS as concentrações plasmáticas foram as seguintes: 0,2 a 40,5 ng mL⁻¹ para haloperidol e olanzapina, 0,5 a 155,0 ng mL⁻¹ para mirtazapina e paroxetina, 0,5 a 360,0 ng mL⁻¹ para clorpromazina e imipramina, 0,5 a 510,0 ng mL⁻¹ para clomipramina e quetiapina, 2,5 a 155,0 ng mL⁻¹ para clonazepam, 2,5 a 405 ng mL⁻¹ para citalopram e sertralina, 2,5 a 1050,0 ng mL⁻¹ para diazepam e fluoxetina, 1,5 a 1550,0 ng mL⁻¹ para clozapina, 0,5 a 10500,0 ng mL⁻¹ para carbamazepina, e 5,0 a 10500,0 ng mL⁻¹ para lamotrigina.

Para o método LC-MS/MS no modo *column switching* as concentrações plasmáticas foram as seguintes: 0,075 a 40,5 ng mL⁻¹ para haloperidol e olanzapina, 0,625 a 155,0 ng mL⁻¹ para clonazepam, 0,125 a 155,0 ng mL⁻¹ para mirtazapina, 0,250 a 155,0 ng mL⁻¹ para paroxetina, 0,125 a 360,0 ng mL⁻¹ para clorpromazina e imipramina, 0,250 a 510,0 ng mL⁻¹ para clomipramina, 0,125 a 510,0 ng mL⁻¹ para quetiapina, 1,250 a 405,0 ng mL⁻¹ para citalopram, 0,625 a 405,0 ng mL⁻¹ para sertralina, 0,313 a 1050,0 ng mL⁻¹ para diazepam e fluoxetina, 0,188 a 1550,0 ng mL⁻¹ para clozapina, 0,063 a 10500,0 ng mL⁻¹ para carbamazepina, e 1,250 a 10500,0 ng mL⁻¹ para lamotrigina.

3.2.6. Preparo da amostra de plasma

Para o método PPT/LC/MS-MS, as proteínas das amostras de plasma (200 μL) foram precipitadas com acetonitrila na proporção 2:1 (v/v). Após agitação (vortex) por 1 minuto, o extrato foi centrifugado por 30 minutos a 9000 g. O sobrenadante (500 μL) foi seco em concentrador a vácuo (Eppendorf, Brasil), e o extrato foi reconstituído (100 μL) com a fase móvel: acetato de amônio 5 mmol L^{-1} com 0.1% ácido fórmico:acetonitrila (90:10 v/v). 10 μL desta solução foi injetada no sistema LC-MS/MS.

Para o método LC-MS/MS no modo *column switching*, as proteínas das amostras de plasma (200 μL) foram precipitadas com acetonitrila (400 μL). Este procedimento foi realizado em tubo eppendorf sob agitação em vortex por 1 min, e posterior centrifugação por 30 minutos a 9000 g. O sobrenadante (500 μL) transferido para um tubo eppendorf foi seco em um concentrador a vácuo (Eppendorf, Brasil) e o extrato foi reconstituído em 100 μL de solução tampão de acetato de amônio 5 mmol/hidróxido de amônio 5 mmol L^{-1} a pH 10,0. Diferentes valores de pH (3,0, 7,0, 10,0) da solução de amônio foram avaliados para estabelecer a capacidade de sorção do capilar monolítico.

3.2.7. Análise LC-MS/MS

▪ Condições Cromatográficas PPT/LC/MS-MS

Coluna: XSelect CSH C18 XP (2,5 μm , 100 x 2,1mm), a 40°C;

Fase móvel: Utilizando como solvente (A) Acetato de amônio 5 mM + 0,1% de ácido fórmico e (B) acetonitrila.

Modo de eluição: Gradiente. Sendo: 90% A (0 min), 90-20% A (10,0 min), e 90% A (15,0 min). Um tempo de 5 minutos é necessário para condicionamento da coluna para a próxima injeção, com vazão de 300 $\mu\text{L min}^{-1}$.

▪ Condições Cromatográficas LC-MS/MS no modo *column switching*

Coluna 1D: Capilar monolítico híbrido cianopropil (45 x 0,53 mm),

Coluna 2D: XSelect CSH C18 XP (2,5 μm , 100 x 2,1mm), a 40°C;

Bomba Quaternária (QSM): Fase móvel consistiu de solvente (A) água e (B) acetonitrila.

Bomba Binária (BSM): Utilizando como solvente (A) Acetato de amônio 5 mM + 0,1% de ácido fórmico e (B) acetonitrila.

As composições das fases móveis tanto para a QSM (coluna 1D), quanto para a BSM (coluna 2D) são ilustradas na Tabela 5.

Modo de eluição: Gradiente.

▪ Condições MS/MS

Equipamento: Waters® UPLC-MS/MS (Xevo TQD), equipado com fonte de ionização por electrospray e analisador de massas do tipo quadrupolo. A fonte de íons por electrospray operou no modo positivo, nas seguintes condições: gás de dessolvatação: N₂ a 600 °C; gás de colisão: argônio; temperatura da fonte de ionização: 150 °C; voltagem do capilar: 0,5 kV; e fluxo de dessolvatação: 600 L Hr⁻¹.

Todos os fármacos foram analisados no modo SRM. O dwell time foi estabelecido para cada transição separadamente e o interscan delay foi configurado no modo automático. Os dados foram adquiridos usando o software MassLynx V4.1.

Tabela 5 - Condições LC-MS/MS no modo *column switching*

t (min)	Bomba	Vazão ($\mu\text{L min}^{-1}$)	%B	Posição da Válvula	Comentários
0,00	QSM	100	0	1	Pré-concentração dos fármacos e remoção dos componentes endógenos do capilar monolítico (1D)
0,00	BSM	100	30	1	Condicionamento da coluna analítica (2D)
5,00	QSM	100	30	2	Eluição dos fármacos do capilar monolítico (1D) para a coluna analítica (2D)
7,01	BSM	300	30	1	Separação cromatográfica na coluna analítica (2D)
10,00	BSM	300	80	1	
10,01	QSM	100	100	1	Limpeza do capilar monolítico (1D)
10,01	BSM	300	30	1	Recondicionamento das colunas para a injeção seguinte
15,01	QSM	100	0	1	
17,01	BSM	100	30	1	
20,00	Todas	-	-	1	Final do ciclo

QSM: bomba quaternária e BSM: bomba binária

Bomba QSM: A = Água, B = Acetonitrila;

Bomba BSM: A = Acetato de amônio 5 mmol L⁻¹ (0,1% ácido fórmico), B = Acetonitrila

3.2.7.1. Otimização da etapa de pré-concentração dos fármacos na coluna capilar monolítica - 1D para LC-MS/MS no modo column switching

Inicialmente, avaliamos a influência do pH da amostra, na pré-concentração dos fármacos no capilar monolítico com grupamentos cianopropil incorporados. Para a realização deste experimento, 50 μL da solução padrão da mistura dos fármacos na concentração de 250 ng mL^{-1} em metanol foram adicionados em tubo de ensaio e evaporados à secura sob fluxo de N_2 . Este resíduo seco foi reconstituído com 50 μL de solução tampão e 5 μL foram injetados no sistema MS-MS. Soluções aquosas com diferentes valores de pH, tais como pH 3,0 (acetato de amônio/ácido fórmico 5 mmol L^{-1}), pH 7,0 (acetato de amônio/hidróxido de amônio 5 mmol L^{-1}), pH 10,0 (acetato de amônio/hidróxido de amônio 5 mmol L^{-1}) foram avaliadas. A solução dos fármacos em metanol também foi avaliada.

Para avaliar a influência da matriz biológica na pré-concentração dos fármacos, analisamos amostras de plasma enriquecidas com os fármacos, após procedimento de precipitação de proteínas. Para a realização deste experimento, inicialmente, as proteínas de uma amostra de plasma (200 μL) enriquecida com os fármacos (62,5 ng mL^{-1}) foram precipitadas com acetonitrila (400 μL). Após a agitação e centrifugação, o sobrenadante foi coletado e seco sob fluxo de N_2 . O resíduo seco foi reconstituído com 50 μL da solução tampão a pH 10 (acetato de amônio/hidróxido de amônio 5 mmol L^{-1}) e 5 μL foram injetados no sistema LC. Com o objetivo de diminuir o volume da amostra de plasma e avaliar menores concentrações plasmáticas, avaliamos a pré-concentração dos fármacos na coluna 1D, com o volume de amostra de plasma de 100 μL na concentração plasmática de 10 ng mL^{-1} .

3.2.7.2. Otimização das condições LC-MS/MS no modo column switching

A coluna analítica e a coluna capilar monolítica foram conectadas na válvula de injeção de 6 canais do equipamento, conforme mostrado no esquema da Figura 8. A coluna monolítica foi conectada nos canais 1 e 4 da válvula de injeção, a bomba quaternária (QSM) no canal 3, a bomba binária (BSM) no canal 5 e a entrada da coluna analítica no canal 6. A bomba quaternária foi conectada à coluna 1D (monolítica) e a bomba binária à coluna 2D (coluna analítica).

Com a válvula na *Posição 1*, ambas as colunas são condicionadas com a composição inicial das fases móveis. Posteriormente, 5 μL de amostra foram injetados e a fase móvel composta por água (solvente fraco) foi percolada pelo capilar monolítico com vazão de 100 μL

min^{-1} , para a sorção dos analitos e remoção dos componentes endógenos da amostra de plasma da fase estacionária (Tabela 5).

Após 5 min, a válvula do injetor foi mudada para a *Posição 2*. Neste arranjo, a solução de acetato de amônio 5 mM+0,1 % de ácido fórmico:acetonitrila (70:30 v/v) foi percolada pelo capilar monolítico com vazão de $100 \mu\text{L min}^{-1}$ para a eluição dos fármacos e transporte destes para a coluna analítica (Tabela 5).

No tempo de 7 min, a válvula do injetor retornou à *Posição 1*. No período de 7,01 a 17 min foi realizada a separação cromatográfica dos fármacos e limpeza da coluna analítica com vazão de $300 \mu\text{L min}^{-1}$ (BSM). Após este período, a composição da fase móvel foi retornada à condição inicial para reequilíbrio da coluna analítica para injeção da próxima amostra. Já no período de 10,01 a 15 min foi realizada a limpeza da coluna monolítica (QSM). Após este período, a composição da fase móvel retornou à condição inicial para reequilíbrio da coluna monolítica, para injeção da próxima amostra (Tabela 5). Diferentes tempos de acoplamento/desacoplamento e condições sorção/dessorção foram testados até a obtenção das condições ótimas descritas anteriormente.

Figura 8 - Sistema *column switching* em modo *straight-flush* (direto), destacando a configuração da válvula de seis pórticos.

3.2.8. Validação analítica

A validação analítica dos métodos propostos foi realizada com amostras (plasma branco de referência) enriquecidas com os analitos em diferentes concentrações, segundas normas estabelecidas pela RESOLUÇÃO RDC N.º 27, DE 17 DE MAIO DE 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. A linearidade, exatidão, precisão, limite de quantificação, efeito residual, efeito da matriz e seletividade foram avaliados como descritos no item 3.1.6 com exceção da seletividade.

3.2.8.1. Seletividade

Foram analisadas 06 amostras de plasma branco de referência e os cromatogramas obtidos foram comparados com amostras de plasma branco enriquecidas com os analitos na concentração que representa o LIQ. Picos interferentes no tempo de retenção dos analitos devem ser inferiores a 20% (vinte por cento) dos sinais analíticos dos fármacos no cromatograma referente ao LIQ. As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do PI devem ser inferiores a 5% (cinco por cento) da resposta do PI.

3.2.9. Amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos

Para avaliar a aplicabilidade do método PPT/LC-MS/MS, 51 amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos em tratamento junto à Enfermaria de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (EPQU-HCFMRP) foram analisadas para fins de monitorização terapêutica.

Para avaliar a aplicabilidade do método LC-MS/MS no modo *column switching*, 10 amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos em tratamento foram analisadas para fins de monitorização terapêutica.

*RESULTADOS E
DISCUSSÃO*

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação de aminoácidos e neurotransmissores em amostras de plasma empregando o método HILIC-MS/MS

4.1.1. Preparo de amostra

A etapa de precipitação das proteínas das amostras de plasma e a redução do volume de amostra injetada (5 μ L) diminuíram a quantidade de compostos interferentes inseridos no sistema LC-MS/MS. Este procedimento de preparo da amostra influenciou tanto na viscosidade da amostra quanto na tensão superficial das gotículas durante o processo de ionização em ESI. O último favorece a evaporação do solvente e a capacidade do analito para atingir a fase gasosa. Consequentemente, este passo minimiza o efeito de matriz; favorecendo a capacidade de detecção, precisão e exatidão do método. A precipitação de proteínas com acetonitrila constitui uma técnica de preparo de amostra eficiente que é frequentemente utilizada em estudos metabolômicos [126, 197, 198].

4.1.2. Otimização das condições HILIC-MS/MS

As condições cromatográficas foram otimizadas para a obtenção de resolução cromatográfica adequada, picos simétricos e rápida análise. Em nosso teste preliminar, duas colunas, uma coluna Ascentis[®] Express HILIC (4,6 x 100 mm, 2,7 μ m) e uma coluna Kinetex[®] C18 (2,1 x 100 mm, 1,7 μ m), foram avaliadas para a separação dos analitos. A maioria dos analitos não apresentou retenção (sorção) satisfatória na coluna C18, devido à elevada polaridade destes compostos, os quais foram eluídos próximos ao volume morto da coluna. Já a coluna HILIC, com a mesma fase móvel (acetato de amônio 10 mmol L⁻¹ e acetonitrila), em diferentes proporções, apresentou maior capacidade de sorção, bem como melhor resolução. Os solventes orgânicos normalmente utilizados em RPLC, metanol e acetonitrila, também têm sido utilizados em HILIC. Embora estes apresentem retenções semelhantes, a acetonitrila, solvente orgânico aprótico polar, é mais utilizada em aplicações envolvendo a HILIC [199]. A fase móvel constituída de formiato de amônio e acetonitrila também foi avaliada. A fase móvel

contendo solução de acetato de amônio apresentou separação cromatográfica mais satisfatória. Três diferentes concentrações molares de acetato de amônio (5 mmol L⁻¹, 10 mmol L⁻¹ e 20 mmol L⁻¹) foram avaliadas. A concentração molar de acetato de amônio 10 mmol L⁻¹ não só melhorou a detectabilidade, como também a simetria dos picos. A eluição isocrática com a fase móvel composta por (A) acetato de amônio 10 mmol L⁻¹ e (B) acetonitrila (com 10% de acetato de amônio 10 mmol L⁻¹), na proporção de 60:40 v/v, foi selecionada. As condições cromatográficas foram estabelecidas para a separação dos 10 analitos com tempo total de análise de 3,0 minutos (Tabela 6 e Figura 9).

Tabela 6 - Transições dos íons, configurações do instrumento e tempos de retenção para cada um dos aminoácidos e neurotransmissores estudados

Analito	Íon Precursor (<i>m/z</i>)	Íon Produto (<i>m/z</i>)	VC (V)	EC (eV)	Íon de Confirmação (<i>m/z</i>)	tr (min)
Glicina	76,0	29,9	20	12	47,9	2,43
Alanina	90,0	44,0	20	10	62,0	2,39
Serina	106,0	60,0	20	10	88,0	2,33
GABA	104,1	87,0	20	12	45,0	2,74
Leucina	132,1	86,0	20	10	44,0	2,33
Triptofano	205,2	188,1	20	12	146,0	2,23
Aspartato	134,1	74,0	20	12	88,0	1,83
Glutamato	148,1	84,0	20	15	102,1	1,76
Metionina	150,0	104,0	20	15	56,0	2,31
Tirosina	182,1	136,1	25	15	91,0	2,21
Padrões Internos						
Metionina-d3	153,1	56,0	20	15	107,1	2,32
Glutamato-d5	153,1	88,0	20	15	89,0	1,77

Voltagem do cone (VC), energia de colisão (EC) e tempo de retenção (tr).

Wu et. al. (2013) avaliaram a influência da composição da fase móvel em fases estacionárias zwitteriônicas em separações HILIC de 14 aminoácidos com concentração de acetonitrila variando de 60 a 90%, com uma concentração constante de acetato de amônio de 10 mmol L⁻¹. Quando os autores usaram acetonitrila em concentrações menores que 60%, a maioria dos aminoácidos apresentaram baixa retenção. Assim, metionina, leucina e triptofano eluíram rapidamente, devido à baixa hidrofiliabilidade. Para altas concentrações de acetonitrila (>80%), fortes retenções para todos os aminoácidos foram observadas. Aspartato e glutamato são mais fortemente retidos em altas concentrações de acetonitrila [200].

No presente trabalho, utilizando uma coluna de sílica, a fase móvel com uma concentração de acetonitrila de 40%, resultou em adequada resolução cromatográfica para os 10 aminoácidos e neurotransmissores, para concentrações superiores a 40% de acetonitrila, os analitos aspartato e glutamato eram mais fortemente retidos, apresentando distorções nos picos, Figura 9.

Figura 9 - Cromatogramas SRM dos AAs e NTs de um paciente esquizofrênico. Concentrações plasmáticas; Glicina: 320,0 nmol mL⁻¹, Alanine: 271,9 nmol mL⁻¹, GABA: 5,2 nmol mL⁻¹, Serina: 222,9 nmol mL⁻¹, Leucina: 226,7 nmol mL⁻¹, Aspartato: 13,5 nmol mL⁻¹, Metionina: 27,5 nmol mL⁻¹, Glutamato: 28,6 nmol mL⁻¹, Triptofano: 147,5 nmol mL⁻¹, e Tirosina: 217,1 nmol mL⁻¹.

Os mecanismos de separação em HILIC ainda não estão completamente compreendidos. As interações eletrostáticas desempenham um papel importante nesse mecanismo, devido a cargas residuais, tais como as dos grupos silanóis ionizados ou parcialmente ionizados. Estes

grupos silanóis podem influenciar a separação dos analitos polares devido à polaridade (ligações de hidrogênio e dipolo-dipolo) ou às interações eletrostáticas com os grupos básicos.

As interações dos analitos ácidos e básicos com a fase estacionária podem ser baseadas nas interações hidrofílicas ou eletrostáticas. No entanto, o mecanismo final de separação é muito provavelmente uma sobreposição de partição, interações eletrostáticas ou ligações de hidrogênio com a fase estacionária. Neste trabalho, aminoácidos e neurotransmissores apresentam polaridades variadas devido aos valores de *pKas* (Tabela 7). O pH aproximadamente 5,0 da fase móvel utilizada [(acetato de amônio 10 mmol L⁻¹ e acetonitrila (com 10% de acetato de amônio 10 mmol L⁻¹), na proporção de 60:40 v/v] influenciou a ionização dos analitos. Como exemplo, o aspartato e o glutamato apresentam três valores de *pKas*, em pH 5,0, explicando as interações eletrostáticas desses analitos com a fase estacionária. Este fato, não exclui as interações de partição entre a sílica e os analitos presentes, nem as interações de hidrogênio com a água e com os grupos silanóis.

Tabela 7 - Valores de *pKas* dos aminoácidos e neurotransmissores avaliados neste trabalho

Aminoácido/Neurotransmissor	<i>pKa1</i>	<i>pKa2</i>	<i>pKa3</i>
Glicina	2,34	9,60	-
Alanina	2,34	9,69	-
Serina	2,21	9,15	-
GABA	4,23	10,43	-
Leucina	2,36	9,60	-
Triptofano	2,83	9,39	-
Aspartato	1,88	9,60	3,65
Glutamato	2,19	9,67	4,25
Metionina	2,28	9,21	-
Tirosina	2,20	10,07	9,11

Segundo Buszewski et al. (2012), quando a concentração de acetonitrila estiver entre 30 e 70%, a fase adsorvida consiste em pelo menos três camadas de uma mistura de acetonitrila e água. Isto está de acordo com estudos anteriores que demonstram uma multicamada de água adsorvida em sílica. O número de monocamadas adsorvidas de acetonitrila pura foi de cerca de dois, enquanto que a da água pura foi cerca de três [133].

Biomoléculas polares, tais como aminoácidos, nucleotídeos e nucleosídeos, tipicamente necessitam de derivatização, antes de serem analisadas por RPLC. No modo HILIC, neste caso usando sílica como fase estacionária, os analitos foram analisados sem a derivatização,

eliminando esta etapa morosa no preparo de amostras biológicas. A HILIC apresenta vantagens, quando comparada à NPLC e RPLC. Por exemplo, analisa adequadamente substâncias polares em amostras complexas que geralmente, eluem próximo ao volume morto em colunas RP. Os analitos polares apresentam alta solubilidade na porção aquosa da fase móvel (orgânica/solução aquosa) usada em HILIC, superando os problemas de fraca solubilidade nas fases móveis da NPLC [133].

4.1.3. Principais fragmentações dos aminoácidos e neurotransmissores e a detecção por HILIC-MS/MS

Os AAs e NTs avaliados neste estudo compartilham uma característica estrutural comum: têm uma cadeia lateral de hidrocarboneto não polar, e a maioria dos íons de quantificação sofrem uma perda neutra de 46 unidades de massa, atribuído como íons de produtos $[M + H - H_2O - CO]^+$. O íon produto $[M + H - H_2O - CO]^+$ é originário da molécula protonada $[M + H]^+$; onde o íon A1 sofre uma perda neutra de uma molécula de H_2O (18 Da), para formar o íon acílio A2 como um intermediário. Em seguida, o íon acílio A2 sofre uma perda neutra de 28 Da (CO), para dar origem ao íon estável imínio A3 (Figura 10), como reportado na literatura [201].

Figura 10 - Rotas de fragmentação para a formação de $[M + H - H_2O - CO]^+$.

Por outro lado, íons de quantificação de compostos como GABA e triptofano sofrem perda neutra de 17 *Da*. Em relação ao íon produto $[M + H - H_2O - CO]^+$, os íons produtos originários da perda neutra de NH_3 são predominantes no espectro MS/MS desses compostos [202].

Para o glutamato, os íons produtos com m/z 130 $[M + H - H_2O]^+$, 102 $[M + H - H_2O - CO]^+$, e 84 $[M + H - 2H_2O - CO]^+$ são observados no espectro MS/MS. O íon produto com m/z 84 é o mais intenso, sendo selecionado como íon de quantificação [203].

O espectro MS/MS do aspartato apresenta íons produtos com m/z 88 $[M + H - H_2O - CO]^+$ e m/z 74 $[M + H - H_2O - C_2H_2O]^+$. Neste caso, o sinal do íon produto com m/z 74 é o mais intenso no espectro, sendo utilizado como íon de quantificação. Todas as transições SRM e os parâmetros utilizados no estudo estão listados na Tabela 6.

Baseado nos cromatogramas SRM ilustrados na Figura 9, os AAs e NTs apresentaram tempos de retenção muito próximos devido à semelhante polaridade. No entanto, essa proximidade não afetou a confiabilidade para a identificação e quantificação desses analitos, pois cada substância foi avaliada separadamente em seu canal específico SRM, não sendo observados sinais de interferência. Além disso, as proteínas (compostos endógenos) da matriz biológica (amostras de plasma) não apresentaram sinal analítico nas transições SRM selecionadas.

4.1.4. Validação analítica

4.1.4.1. Seletividade

As coeluições dos analitos observadas nos cromatogramas SRM (Figura 9), devido às semelhanças estruturais destas substâncias, não interferiram na identificação e quantificação dos mesmos, já que foram utilizadas transições específicas para cada analito. Nas análises das amostras de plasma não foram identificados interferentes para estas transições sendo, portanto este método considerado seletivo.

4.1.4.2. Linearidade e limite de quantificação

O método HILIC-MS/MS apresentou faixas lineares de trabalho (FLT) que variaram do LIQ (9,7 pmol mL⁻¹ - 13,3 nmol mL⁻¹) ao LSQ (19,4 nmol mL⁻¹ - 800 nmol mL⁻¹), com coeficientes de determinação de 0,9998 para a maioria dos analitos. As curvas analíticas (n=5) apresentaram CVs menores que 10%. A linearidade do método também foi comprovada pelo test *Lack of Fit* (Tabela 8).

Tabela 8 - Faixas lineares de trabalho (FLT), equações de regressão linear, coeficientes de determinação, *Lack of Fit* com nível de significância de 0,05%, LIQs e padrão interno utilizado para cada um dos aminoácidos e neurotransmissores

Analito	FLT (nmol mL ⁻¹)	Equação de Regressão	R ²	<i>Lack of Fit</i>	LIQ (nmol mL ⁻¹)	Padrão Interno
				<i>p</i>		
Glicina	13,3 - 800	y = 0,0005x + 0,0002	0,9968	0,203	13,3	Glutamato-d5
Alanina	11,2 - 700	y = 0,0068x - 0,0027	0,9996	0,661	11,2	Glutamato-d5
GABA	9,7a - 19,4	y = 0,0009x + 0,0035	0,9998	0,764	9,7a	Metionina-d3
Serina	9,5 - 600	y = 0,0082x - 0,0021	0,9982	0,314	9,5	Glutamato-d5
Leucina	7,6 - 500	y = 0,0471x - 0,0194	0,9998	0,979	7,6	Glutamato-d5
Aspartato	7,5 - 500	y = 0,0083x - 0,0033	0,9998	0,978	7,5	Glutamato-d5
Metionina	6,7 - 400	y = 0,0446x - 0,0123	0,9998	0,942	6,7	Metionina-d3
Glutamato	6,8 - 400	y = 0,0432x - 0,0187	0,9998	0,953	6,8	Glutamato-d5
Triptofano	4,9 - 300	y = 0,0478x - 0,0121	0,9998	0,959	4,9	Glutamato-d5
Tirosina	5,5 - 300	y = 0,0185x - 0,004	0,9998	0,995	5,5	Glutamato-d5

p: p-valor; a: pmol mL⁻¹.

4.1.4.3. Exatidão e precisão

A Tabela 9 apresenta os valores de exatidão intra e interensaio avaliados entre o LIQ e o LSQ. Os valores de EPR variaram de -18,9 a 19,1% (intra-ensaio) e de -11,2 a 16,2%, (interensaio). A precisão intra e interensaio apresentou valores de CV na faixa de 0,1 a 16,2% (intra-ensaio) e de 0,1 a 13,0% (interensaio), estando em congruência com os valores preconizados pela ANVISA.

Tabela 9 - Exatidão (%EPR) e precisão (%CV) intra e interensaio do método HILIC-MS/MS para a determinação de aminoácidos e neurotransmissores em amostras de plasma

Analito	Concentração adicionada (nmol mL ⁻¹)	Exatidão		Precisão	
		Intra-ensaio	Interensaio	Intra-ensaio	Interensaio
		(%EPR) n=5		(%CV) n=5	
Glicina	13,3a	-18,9	-11,2	16,2	12,6
	40,0b	-1,3	2,0	6,6	10,5
	300,0c	-0,1	-0,1	1,1	1,5
	700,0d	0,3	0,2	0,2	1,1
	800,0e	-2,8	1,7	6,9	7,7
Alanina	11,2a	19,1	16,2	6,4	7,6
	33,7b	3,5	6,5	1,9	4,2
	300,0c	0,6	1,4	1,2	1,8
	600,0d	0,5	0,1	0,2	1,2
	700,0e	-0,4	-0,2	4,6	4,8
Serina	9,5a	8,1	6,0	3,8	3,1
	28,6b	8,2	5,1	0,6	8,5
	200,0c	1,2	0,8	1,1	2,3
	500,0d	1,6	0,6	1,5	3,3
	600,0e	-0,3	-2,1	4,4	4,1
GABA	0,0097a	11,8	11,1	14,9	9,8
	0,029b	5,8	5,3	4,8	10,3
	2,0c	0,5	0,6	0,1	0,1
	16,8d	0,1	0,1	0,1	0,2
	19,4e	0,1	0,1	0,2	0,2
Leucina	7,6a	16,3	9,0	10,1	8,2
	22,9b	5,9	6,1	3,4	7,5
	200,0c	-0,2	-0,3	0,1	1,6
	400,0d	0,5	0,3	1,0	1,0
	500,0e	0,3	0,3	4,0	7,5

Continua...

Continuação da Tabela 9

Analito	Concentração adicionada (nmol mL ⁻¹)	Exatidão		Precisão	
		Intra-ensaio	Interensaio	Intra-ensaio	Interensaio
		(%EPR) n=5		(%CV) n=5	
Aspartato	7,5a	16,3	11,9	10,2	13,0
	22,6b	-1,5	-0,3	7,2	9,0
	200,0c	1,3	1,2	2,6	2,9
	400,0d	0,5	0,8	1,3	1,7
	500,0e	1,5	0,1	1,7	5,7
Metionina	6,7a	13,3	11,0	3,9	4,0
	20,1b	9,9	6,9	0,6	8,2
	200,0c	0,2	0,4	2,5	2,2
	300,0d	0,3	0,1	0,1	0,6
	400,0e	-0,1	0,4	2,1	3,2
Glutamato	6,8a	12,7	5,7	9,6	3,9
	20,4b	0,2	4,4	3,1	6,0
	200,0c	0,2	0,1	1,5	3,0
	300,0d	-0,2	-0,2	0,9	1,4
	400,0e	2,4	0,5	1,3	5,5
Tryptofano	4,9a	11,0	8,6	4,0	3,9
	14,7b	4,2	3,1	4,7	8,3
	100,0c	0,2	-0,1	1,4	2,0
	200,0d	0,1	0,2	0,3	0,5
	300,0e	1,0	0,6	0,6	4,5
Tirosina	5,5a	11,2	6,0	10,1	5,1
	16,6b	2,7	1,9	7,6	9,0
	100,0c	0,8	0,6	1,4	2,3
	200,0d	-0,4	0,4	1,4	1,5
	300,0e	2,5	0,5	4,6	8,7

a: LIQ, b: CQB, c: CQM, d: CQA e e: LSQ.

4.1.4.4. Efeito residual e efeito de matriz

O sinal analítico, nas amostras de plasma branco injetadas após as análises do calibrador LSQ, não foi superior a 20% dos sinais dos analitos nas concentrações do LIQ, e inferiores a 5% do sinal do padrão interno.

Em razão do preparo da amostra de plasma (PPT) descrito e o processo de ionização por ESI, não observamos supressão iônica. Nenhuma distorção significativa nos cromatogramas SRM foi evidenciada nos tempos de retenção de cada analito e padrão. Os CVs dos fatores de matriz normalizados calculados a partir dos cinco lotes de matriz não foram maiores do que 15% (Tabela 10).

Tabela 10 - Fatores de matriz normalizados (FMN) para as amostras de plasma de controle de qualidade baixo (QCB) e alto (QCA) enriquecidas com os aminoácido e neurotransmissores

Analito	CQs Adicionados (nmol mL ⁻¹)	FMN (%CV) n=3
Glicina	40,0a	14,1
	700,0b	6,6
Alanina	33,7a	11,8
	600,0b	7,3
Serina	28,6a	13,9
	500,0b	4,3
GABA	0,029a	4,7
	16,8b	7,6
Leucina	22,9a	9,6
	400,0b	11,1
Aspartato	22,6a	2,0
	400,0b	9,1
Metionina	20,1a	5,7
	300,0b	5,0
Glutamato	20,4a	5,5
	300,0b	10,3
Tryptofano	14,7a	2,4
	200,0b	3,8
Tirosina	16,6a	6,9
	200,0b	1,1

a: CQB; b: CQA.

4.1.5. Avaliação do método HILIC-MS/MS utilizando amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos

O método HILIC-MS/MS foi aplicado para avaliar o tratamento de pacientes esquizofrênicos. As concentrações de AAs e NTs de amostras de plasma de 35 pacientes esquizofrênicos em tratamento com clozapina (27 pacientes) e olanzapina (8 pacientes) foram comparadas com as concentrações plasmáticas de 38 voluntários saudáveis (Tabela 11). A maioria destes pacientes esquizofrênicos apresentou níveis plasmáticos mais elevados de clozapina (0,2 - 1,5 µg mL⁻¹) e olanzapina (0,003 - 0,04 µg mL⁻¹) do que os estabelecidos para o intervalo terapêutico [204]. Os níveis plasmáticos destes fármacos foram determinados através da metodologia LC-MS/MS descrita no item 3.2 para fins de monitorização terapêutica. As concentrações de AAs e NTs determinadas em amostras de plasma de voluntários saudáveis estão de acordo com valores descritos na literatura [205, 206].

Tabela 11 - Comparação das concentrações plasmáticas dos aminoácidos e neurotransmissores (nmol mL⁻¹) entre pacientes esquizofrênicos e voluntários saudáveis (controle)

Analito	Grupo	N	Média (nmol mL ⁻¹)	Desvio Padrão	Erro Padrão	F _{2,70}	p
Glicina	Clozapina	27	200,93	77,12	14,84	0,079	0,924
	Olanzapina	8	191,23	58,71	20,75		
	Controle	38	204,29	94,37	15,30		
Alanina	Clozapina	27	264,91	36,54	7,03	0,328	0,722
	Olanzapina	8	270,09	29,09	10,28		
	Controle	38	260,91	28,12	4,56		
GABA	Clozapina	27	4,61	3,80	0,73	0,272	0,763
	Olanzapina	8	3,96	1,85	0,65		
	Controle	38	5,00	4,04	0,65		
Serina	Clozapina	27	150,51	57,51	11,06	0,747	0,477
	Olanzapina	8	172,44	57,32	20,26		
	Controle	38	145,77	54,80	8,89		
Leucina	Clozapina	27	161,62	57,75	11,11	0,055	0,946
	Olanzapina	8	158,05	38,49	13,61		
	Controle	38	164,60	56,68	9,19		
Aspartato	Clozapina	27	8,05	4,31	0,83	0,284	0,754
	Olanzapina	8	9,51	5,53	1,95		
	Controle	38	8,68	5,51	0,89		
Metionina	Clozapina	27	32,34	10,72	2,06	3,144	0,049
	Olanzapina	8	42,52	15,80	5,58		
	Controle	38	32,39	9,63	1,56		
Glutamato	Clozapina	27	34,59	13,07	2,51	2,495	0,090
	Olanzapina	8	29,99	16,16	5,71		
	Controle	38	27,71	10,67	1,73		
Tryptofano	Clozapina	27	46,85	14,27	2,74	1,171	0,316
	Olanzapina	8	51,29	14,74	5,21		
	Controle	38	53,03	17,49	2,83		
Tirosina	Clozapina	27	57,54	13,72	2,64	0,366	0,695
	Olanzapina	8	52,44	15,56	5,50		
	Controle	38	57,04	16,07	2,60		

n: número de amostras; F: F-calculado; p: p-valor com nível de significância de 0,05.

A análise de variância (ANOVA), seguida por teste post-hoc de Duncan, revelou que os níveis médios plasmáticos (nmol mL⁻¹) de metionina (F_{2,70} = 3,14, p = 0,049) de pacientes

esquizofrênicos em tratamento com olanzapina foram significativamente mais elevados, quando comparados aos valores obtidos com o grupo controle (voluntários saudáveis), já o nível de glutamato em pacientes esquizofrênicos em tratamento com clozapina tendem a ser mais elevados ($F_{2,70} = 2,50$, $p = 0,090$), Tabela 11.

Estas alterações, são também, provavelmente, resultantes de interações entre estes antipsicóticos com medicamentos co-administrados (antidepressivos, anticonvulsivantes e ansiolíticos), principalmente no caso da clozapina. No entanto, é necessário avaliar um maior número de indivíduos de cada grupo.

Em concordância com a literatura, após administração crônica de clozapina, os níveis de glutamato foram significativamente menores do que os determinados no pré-tratamento, e, significativamente maiores do que os encontrados nos controles saudáveis [47].

4.2. Determinação de fármacos em amostras de plasma empregando a técnica de PPT/LC/MS-MS

4.2.1. Otimização e desenvolvimento da metodologia PPT/LC-MS/MS

A etapa do preparo das amostras de plasma (precipitação de proteínas), antes da análise por LC-MS/MS, proporcionou a remoção de grande parte dos componentes endógenos, principalmente as proteínas. Este procedimento minimizou o efeito da matriz (supressão ou aumento do sinal dos íons) e possíveis danos à coluna cromatográfica, como a adsorção de proteínas.

Neste trabalho, os analitos foram detectados inicialmente no modo *full-scan* com ionização nos modos positivo e negativo. As moléculas protonadas $[M + H]^+$ dos analitos alvo foram submetidos a dissociação induzida por colisão (CID). Todos os fármacos avaliados apresentam caráter básico, conseqüentemente, o modo de ionização positivo apresentou a melhor resposta analítica. Para selecionar a melhor transição MS/MS para cada analito, foram realizadas infusões diretas para cada analito e avaliados pelo menos dois pares de íons precursor/produto. Com base na detectabilidade e especificidade, os pares de íons foram selecionados para a determinação dos fármacos (Tabela 12).

Para a obtenção de resolução cromatográfica adequada, rápido tempo de análise e picos simétricos, a composição da fase móvel, a fase estacionária da coluna e eluição por gradiente foram otimizadas. Um teste preliminar envolveu duas colunas, uma coluna XSelect Charged Surface Hybrid (CSH) C18 XP (2,1x 100 mm, 2,5 μ m) e uma coluna Kinetex[®] C18 (2,1 x 100 mm, 1,7 μ m). Ambas as colunas C18 separaram a maioria dos analitos, mas a XSelect apresentou a resolução cromatográfica adequada. Os aditivos de fase móvel, acetato e formiato de amônio, também foram avaliados. A adição de acetato de amônio favoreceu tanto a simetria do pico quanto a resolução dos fármacos. Já a adição de baixas concentrações de ácido fórmico (0,1%) favoreceu a detectabilidade e simetria dos picos. Considerando a solubilidade do acetato de amônio na acetonitrila e sua influência na detectabilidade, a fase móvel: (A) solução de acetato de amônio 5 mmol L⁻¹ (com 0,1% de ácido fórmico) e (B) acetonitrila mostrou-se como a melhor condição, onde foi possível separar os dezesseis fármacos em 8,0 min (Tabela 12 e Figura 11).

Tabela 12 - Transições dos íons, configurações do instrumento e tempos de retenção para cada um dos fármacos estudados para o método PPT/LC-MS/MS

Analito	Íon Precursor (<i>m/z</i>)	Íon Produto (<i>m/z</i>)	VC (V)	EC (eV)	Íon de Confirmação (<i>m/z</i>)	tr (min)
Haloperidol	376,1	123,0	40	45	165,0	5,23
Olanzapina	313,3	84,1	45	20	256,2	1,49
Clonazepam	316,0	270,1	50	25	214,1	6,38
Mirtazapina	266,2	72,1	40	20	195,0	3,25
Paroxetina	330,2	70,0	50	25	192,2	5,49
Citalopram	325,3	109,1	45	25	262,0	5,01
Sertralina	306,2	159,0	25	30	275,1	6,25
Clorpromazina	319,2	86,1	40	20	58,1	6,23
Imipramina	281,2	86,0	30	15	57,9	5,68
Clomipramina	315,2	86,0	35	15	57,9	6,45
Quetiapina	384,3	253,2	45	20	221,0	4,84
Diazepam	285,1	193,1	50	35	154,2	7,64
Fluoxetina	310,1	43,9	25	10	148,2	6,16
Clozapina	327,2	192,2	40	40	270,2	4,62
Carbamazepina	237,1	194,1	35	20	-	5,78
Lamotrigina	256,1	58,0	55	40	144,9	2,99
Padrões Internos						
Haloperidol-d4	380,2	127,1	45	45	169,1	5,21
Clonazepam-d4	320,1	274,1	50	30	218,1	6,36
Paroxetina-d6	336,2	76,1	30	35	198,2	5,48
Citalopram-d6	331,2	108,9	35	25	262,1	5,01
Sertralina-d3	309,1	159,0	20	25	275,0	6,25
Imipramina-d3	284,3	89,0	35	15	208,2	5,69
Clomipramina-d3	318,2	89,0	40	20	60,9	6,44
Quetiapina-d8	392,3	258,1	50	30	286,1	4,80
Diazepam-d5	290,1	198,1	55	30	153,9	7,59
Fluoxetina-d6	316,2	44,1	25	15	154,1	6,13
Clozapina-d4	331,2	192,2	50	50	272,4	4,58
Carbamazepina-d10	247,2	204,1	35	20	-	5,72

Voltagem do cone (VC), energia de colisão (EC) e tempo de retenção (tr).

Figura 11 - Cromatogramas LC-MS/MS das amostras de plasma branco (sobrescrito na esquerda), e amostras de plasma enriquecidas com os fármacos nas concentrações do LIQ.

4.2.2. Validação analítica

4.2.2.1. Seletividade

A seletividade do método PPT/LC-MS/MS (modo SRM) foi comprovada pelos cromatogramas de amostra de plasma branco, e desta enriquecida com os fármacos em concentrações correspondentes ao LIQ (Figura 11). Nestes cromatogramas não foram observadas coeluições de interferentes nos tempos de retenção dos analitos.

4.2.2.2. Linearidade e limite de quantificação

O método PPT/LC-MS/MS apresentou resposta linear entre o limite inferior de quantificação ($0,2 \text{ ng mL}^{-1}$ - $5,0 \text{ ng mL}^{-1}$) e o limite superior de quantificação ($40,5 \text{ ng mL}^{-1}$ - $10,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), com coeficiente de determinação superior a 0,9979 e coeficientes de variação dos calibradores menores que 12%. As faixas lineares de trabalho foram estabelecidas com base nos intervalos terapêuticos preconizados. A linearidade do método foi também comprovada pelo *Lack of Fit* com *p*-valor maior que 0,801 (Tabela 13). A Tabela 13 apresenta as faixas lineares de trabalho, coeficientes de determinação (R^2), LIQ, valores de *p* para o *Lack of Fit* e padrão interno utilizado para cada fármaco.

4.2.2.3. Exatidão e precisão

A Tabela 14 ilustra a exatidão e a precisão intra e interensaio do método, avaliado entre o LIQ e o LSQ. A exatidão apresentou valores de EPR variando de -9,7 a 8,0% (exatidão intra-ensaio) e de -9,1 a 7,9% (exatidão interensaio). A precisão do método estabeleceu valores de CV variando de 0,1 a 11,9% (precisão intra-ensaio) e 0,1 a 10,4% (precisão interensaio) (Tabela 14).

Tabela 13 - Faixas lineares de trabalho (FLT), equações de regressão linear, coeficientes de determinação com *Lack of Fit* com nível de significância de 0,05%, LIQs e padrão interno utilizado para cada um dos fármacos para o método PPT/LC-MS/MS

Analito	FLT (ng mL ⁻¹)	Equação de Regressão	R ²	<i>Lack of Fit</i>	LIQ (ng mL ⁻¹)	Padrão Interno
				<i>p</i>		
Haloperidol	0,2-40,5	y= 0,0750x + 0,0168	0,9989	0,975	0,2	Haloperidol-d4
Olanzapina	0,2-40,5	y= 0,0258x + 0,0293	0,9999	0,932	0,2	Haloperidol-d4
Clonazepam	2,5-155,0	y= 0,0205x + 0,2265	0,9995	0,923	2,5	Clonazepam-d4
Mirtazapina	0,5-155,0	y= 0,2787x + 1,8921	0,9989	0,975	0,5	Clonazepam-d4
Paroxetina	0,5-155,0	y= 0,0206x + 0,0012	0,9990	0,801	0,5	Paroxetina-d6
Citalopram	2,5-405,0	y= 0,0009x + 0,0124	0,9979	0,905	2,5	Citalopram-d6
Sertralina	2,5-405,0	y= 0,0067x + 0,0172	0,9999	0,865	2,5	Sertralina-d3
Clorpromazina	0,5-360,0	y= 0,0047x + 0,0155	0,9982	0,942	0,5	Imipramina-d3
Imipramina	0,5-360,0	y= 0,0040x + 0,1600	0,9987	0,921	0,5	Imipramina-d3
Clomipramina	0,5-510,0	y= 0,0050x + 0,0194	0,9988	0,893	0,5	Clomipramina-d3
Quetiapina	0,5-510,0	y= 0,0082x + 0,6111	0,9992	0,915	0,5	Quetiapina-d8
Diazepam	2,5-1050,0	y= 0,0016x + 0,2173	0,9994	0,973	2,5	Diazepam-d5
Fluoxetina	2,5-1050,0	y= 0,0025x + 0,0974	0,9987	0,939	2,5	Fluoxetina-d6
Clozapina	1,5-1550,0	y= 0,0012x + 0,3043	0,9998	0,908	1,5	Clozapina-d4
Carbamazepina	0,5-10500,0	y= 0,0002x + 0,1902	0,9998	0,986	0,5	Carbamazepina-d10
Lamotrigina	5,0-10500,0	y= 2E-05x + 0,0249	0,9999	0,963	5,0	Carbamazepina-d10

p: p-valor com nível de significância de 0,05.

Tabela 14 - Exatidão (%EPR) e precisão (%CV) intra e interensaio para o método PPT/LC-MS/MS

Analito	Concentração adicionada (ng mL ⁻¹)	Exatidão		Precisão	
		Intra-ensaio	Interensaio	Intra-ensaio	Interensaio
		(%EPR) n=5		(%CV) n=5	
Haloperidol	0,2a	-9,7	-9,1	2,0	2,6
	0,5b	8,0	7,9	1,4	1,0
	20,5c	-3,9	-4,2	8,7	8,7
	32,5d	3,8	1,9	7,1	7,1
	40,5e	-4,7	-4,3	8,9	7,8
Olanzapina	0,2a	5,1	7,4	2,0	2,2
	0,5b	7,8	5,7	2,7	3,3
	20,5c	-0,2	-0,1	4,3	3,7
	32,5d	-0,1	0,3	2,5	2,3
	40,5e	-2,6	0,6	6,6	8,9
Clonazepam	2,5a	-7,6	-5,1	2,8	3,0
	5,0b	-8,3	-6,3	2,4	3,1
	80,0c	5,1	3,0	8,7	8,7
	125,0d	0,0	1,3	10,2	9,1
	155,0e	-2,0	-1,5	8,8	7,6
Mirtazapina	0,5a	-3,5	-3,7	0,2	0,2
	1,5b	-4,2	-4,3	0,6	0,4
	80,0c	7,1	6,7	5,1	4,5
	125,0d	-1,2	-1,3	0,1	0,2
	155,0e	-1,9	-0,2	5,4	5,8
Paroxetina	0,5a	6,2	6,4	3,7	3,4
	1,5b	5,0	5,3	1,7	1,7
	80,0c	4,4	3,2	6,6	6,4
	125,0d	-2,2	-2,0	8,5	7,4
	155,0e	2,3	1,7	11,9	10,4

Continua...

Continuação da Tabela 14

Analito	Concentração adicionada (ng mL ⁻¹)	Exatidão		Precisão	
		Intra-ensaio	Interensaio	Intra-ensaio	Interensaio
		(%EPR) n=5		(%CV) n=5	
Citalopram	2,5a	-4,7	-2,9	1,5	1,0
	5,0b	-2,8	-2,9	1,0	1,5
	205,0c	-5,9	-5,6	3,0	2,7
	325,0d	0,3	0,4	6,2	5,4
	405,0e	-7,7	-7,3	2,6	2,4
Sertralina	2,5a	-6,6	-6,6	1,7	1,7
	5,0b	-3,2	-3,2	4,4	4,5
	205,0c	3,3	2,4	9,7	8,8
	325,0d	-0,6	-0,1	10,4	9,0
	405,0e	-0,5	0,0	6,8	6,0
Clorpromazina	0,5a	7,2	7,6	3,5	3,4
	1,5b	6,6	7,4	5,6	5,0
	185,0c	-5,8	-5,3	5,5	4,9
	290,0d	-3,3	-3,6	2,6	2,3
	360,0e	2,4	1,4	9,5	8,6
Imipramina	0,5a	5,0	4,7	0,9	0,8
	1,5b	0,5	0,6	1,1	1,1
	185,0c	3,8	3,6	1,4	1,2
	290,0d	-3,2	-2,8	6,6	5,8
	360,0e	-0,7	0,5	7,1	6,5
Clomipramina	0,5a	4,4	5,0	5,0	4,6
	1,5b	1,5	1,5	1,2	1,2
	260,0c	1,7	1,8	0,7	0,7
	410,0d	3,0	3,0	0,1	0,1
	510,0e	-1,4	-2,5	2,8	3,6

Continua...

Continuação da Tabela 14

Analito	Concentração adicionada (ng mL ⁻¹)	Exatidão		Precisão	
		Intra-ensaio	Interensaio	Intra-ensaio	Interensaio
		(%EPR) n=5		(%CV) n=5	
Quetiapina	0,5a	-4,2	-3,4	1,9	1,8
	1,5b	-1,9	-2,0	0,8	0,7
	260,0c	0,2	-1,3	0,1	2,7
	410,0d	1,7	0,7	1,5	2,2
	510,0e	-0,5	-1,8	3,8	4,2
Diazepam	2,5a	3,2	2,8	2,6	2,6
	5,0b	-5,7	-5,5	1,5	1,9
	550,0c	-1,7	-1,9	3,1	2,7
	850,0d	-0,8	-1,0	5,4	4,7
	1050,0e	-3,5	-3,1	1,3	1,4
Fluoxetina	2,5a	-5,4	-5,4	1,6	1,5
	5,0b	-3,2	-3,2	0,9	0,8
	550,0c	2,4	2,2	1,4	1,3
	850,0d	-2,0	-2,5	0,1	1,1
	1050,0e	-0,4	-1,1	4,4	4,1
Clozapina	1,5a	-3,4	-3,4	1,3	1,2
	4,5b	0,1	-1,5	2,0	3,0
	850,0c	-2,7	-3,0	2,6	2,3
	1270,0d	-4,1	-3,8	3,2	2,9
	1550,0e	-3,0	-3,1	4,0	3,5
Carbamazepina	0,5a	3,8	3,8	1,1	1,1
	1,5b	3,3	3,3	1,8	1,7
	5500,0c	4,8	7,0	4,1	5,3
	8500,0d	6,3	7,1	4,0	3,8
	10500,0e	6,1	4,8	4,2	4,4

Continua...

Continuação da Tabela 14

Analito	Concentração adicionada (ng mL ⁻¹)	Exatidão		Precisão	
		Intra-ensaio	Interensaio	Intra-ensaio	Interensaio
		(%EPR) n=5		(%CV) n=5	
Lamotrigina	5,0a	3,2	5,1	1,8	1,3
	15,0b	3,3	3,3	0,8	0,7
	5500,0c	-0,1	-0,4	0,8	0,8
	8500,0d	0,7	0,7	0,2	0,2
	10500,0e	0,5	0,5	0,1	0,1

a: LIQ, b: CQB, c:CQM, d: CQA e e: LSQ.

4.2.2.4. Efeito residual e efeito de matriz

O sinal analítico, nas amostras de plasma branco injetadas após as análises do calibrador LSQ, não foi superior a 0,5% dos sinais dos analitos nas concentrações do LIQ, e inferiores a 0,1% do sinal do padrão interno.

Nenhuma distorção significativa nos cromatogramas SRM foi evidenciada nos tempos de retenção de cada analito e padrão. Os CVs dos fatores de matriz normalizados calculados a partir dos cinco lotes de matriz não foram maiores do que 12,2%. (Tabela 15).

Tabela 15 - Fatores de matriz normalizados (FMN) para as amostras de controle de qualidade baixo (QCB) e alto (QCA) para cada fármaco no método PPT/LC-MS/MS

Analito	CQs Adicionados (ng mL⁻¹)	FMN (%CV) n=3
Haloperidol	0,5a	3,5
	32,5b	9,6
Olanzapina	0,5a	8,6
	32,5b	6,4
Clonazepam	5,0a	6,8
	125,0b	10,6
Mirtazapina	1,5a	6,5
	125,0b	6,0
Paroxetina	1,5a	6,2
	125,0b	8,6
Citalopram	5,0a	5,0
	325,0b	5,9
Sertralina	5,0a	5,8
	325,0b	12,2
Clorpromazina	1,5a	10,3
	290,0b	8,8
Imipramina	1,5a	6,9
	290,0b	4,9
Clomipramina	1,5a	6,4
	410,0b	7,9
Quetiapina	1,5a	5,2
	410,0b	3,2
Diazepam	5,0a	4,6
	850,0b	6,5
Fluoxetina	5,0a	7,2
	850,0b	9,6
Clozapina	4,5a	4,1
	1270,0b	2,7
Carbamazepina	1,5a	3,3
	8500,0b	4,7
Lamotrigina	15,0a	3,2
	8500,0b	5,5

a: CQB; b: CQA.

4.2.3. Avaliação do método PPT/LC-MS/MS nas análises de amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos

A Tabela 16 apresenta as concentrações plasmáticas dos fármacos avaliados em amostras de plasma de 51 pacientes esquizofrênicos atendidos no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. A Figura 12 ilustra os cromatogramas das amostras de plasma de pacientes submetidos à politerapia com sertralina, clozapina, e lamotrigina. Muitos dos pacientes avaliados apresentaram concentrações plasmáticas fora do intervalo terapêutico, em razão das interações farmacocinéticas entre os medicamentos prescritos no tratamento da esquizofrenia.

Tabela 16 - Níveis plasmáticos dos fármacos avaliados em amostras de pacientes esquizofrênicos para o método PPT/LC-MS/MS

Fármacos	Intervalo Terapêutico (ng mL⁻¹)	Níveis Recomendados para TDM^a	Níveis Plasmáticos (ng mL⁻¹)	Número de Pacientes
Haloperidol	1-10	1	1	1
Olanzapina	20-80	1	3-40	11
Citalopram	50-110	2	18-149	3
Sertralina	10-150	2	11-53	7
Imipramina	175-300	1	240	1
Clomipramina	230-450	1	14-402	2
Fluoxetina	120-500	2	99-742	3
Clozapina	350-600	1	204-1507	35
Lamotrigina	3000-14000	2	1136-5666	6

^a: De acordo com Hiemke et al. [204].

Figura 12 - Cromatogramas SRM (método PPT/LC-MS/MS) de amostra de plasma de um paciente esquizofrênico. Concentrações plasmáticas: sertralina: 28,0 ng mL⁻¹; clozapina: 1152,0 ng mL⁻¹ e lamotrigina: 5666,0 ng mL⁻¹.

A monitorização terapêutica é uma importante ferramenta para ajustar as doses dos medicamentos prescritos e consequentemente aumentar a eficácia do tratamento e diminuir os efeitos adversos. Pacientes em terapia com a mesma dose de um medicamento podem apresentar diferentes concentrações plasmáticas do fármaco (princípio ativo), devido às distintas capacidades de absorção, distribuição, metabolização e excreção interpacientes. Além das peculiaridades genéticas, doenças concomitantes, idade ou interações com outros fármacos administrados. Os pacientes avaliados neste estudo receberam diferentes doses dos medicamentos, especialmente os antipsicóticos. Este fato também contribuiu para as diferentes concentrações plasmáticas determinadas.

A TDM avalia se as concentrações plasmáticas determinadas contemplam o intervalo terapêutico preconizado, avalia a adesão do paciente ao tratamento, a biotransformação do fármaco e interações medicamentosas [204].

Considerando os antipsicóticos, dentre os onze pacientes em tratamento com olanzapina, cinco apresentaram níveis plasmáticos abaixo do intervalo terapêutico. Para aqueles tratados com clozapina (35 pacientes), cinco deles apresentaram níveis subterapêuticos, e vinte e quatro, níveis considerados tóxicos (overdose). Para o paciente em tratamento com haloperidol, a concentração plasmática determinada está em concordância com o intervalo terapêutico preconizado (Tabela 16).

Para os antidepressivos, um dos dois pacientes em tratamento com clomipramina, apresentou nível plasmático abaixo do intervalo terapêutico, e o outro, nível normal. Dentre os três pacientes em terapia com fluoxetina, um apresentou concentração plasmática em nível subterapêutico, e dois, níveis normais. Para os sete pacientes em tratamento com sertralina, todos apresentaram níveis plasmáticos dentro do intervalo terapêutico. Porém, àqueles em tratamento com imipramina (um paciente), e citalopram (um paciente) apresentaram seus níveis plasmáticos em concordância com o intervalo terapêutico preconizado.

Para o anticonvulsivante lamotrigina, três dentre os seis pacientes em tratamento com este fármaco apresentaram níveis plasmáticos abaixo do intervalo terapêutico preconizado [204].

4.3. Determinação de fármacos em amostras de plasma empregando a técnica de LC-MS/MS no modo *column switching*

Com base nos parâmetros otimizados no método PPT/LC-MS/MS (Tabela 12), foram utilizados os mesmos valores de m/z (íon precursor, íon produto e íon de confirmação), voltagem do cone (VC) e energia de colisão (EC) no presente método. Já os tempos de retenção dos analitos foram diferentes, devido a etapa de pré-concentração no capilar monolítico (Tabela 17).

Tabela 17 - Tempos de retenção para cada um dos fármacos estudados para o método LC-MS/MS no modo *column switching*

Analito	tr (min)
Haloperidol	8,56
Olanzapina	7,40
Clonazepam	9,23
Mirtazapina	7,51
Paroxetina	8,64
Citalopram	8,44
Sertralina	9,01
Clorpromazina	9,01
Imipramina	8,77
Clomipramina	9,11
Quetiapina	8,37
Diazepam	9,89
Fluoxetina	8,95
Clozapina	8,29
Carbamazepina	8,94
Lamotrigina	7,47
Padrões Internos	
Haloperidol-d4	8,54
Clonazepam-d4	9,22
Paroxetina-d6	8,63
Citalopram-d6	8,44
Sertralina-d3	9,00
Imipramina-d3	8,77
Clomipramina-d3	9,11
Quetiapina-d8	8,36
Diazepam-d5	9,87
Fluoxetina-d6	8,94
Clozapina-d4	8,27
Carbamazepina-d10	8,90

Tempo de retenção (tr).

4.3.1. Caracterização morfológica e espectroscópica do capilar monolítico híbrido cianopropil

O pré-tratamento do capilar de sílica fundida é uma etapa importante a ser realizada, afim de se aumentar a concentração de grupos silanóis na superfície interior, uma vez que estes grupos são sítios ativos durante a síntese pelo processo sol-gel [207].

A Figura 13 ilustra as imagens MEV da seção transversal do capilar sintetizado nas condições otimizadas descritas anteriormente em 200x e 30.000x de ampliação. A estrutura do monolito (polimerização *in-situ*) permaneceu confinada no interior do capilar, ou seja, quimicamente ligada (ligação covalente) à superfície interna (Figura 13). Na síntese *in-situ* o bloco monolítico é quimicamente ligado à parede interna do capilar por meio de ligações siloxano. Uma das grandes vantagens desse tipo de síntese é que dispensa o uso de filtros nas extremidades do capilar, contribuindo para a redução da pressão no sistema analítico e eliminação de um meio propício para a sorção de componentes endógenos da amostra biológica [187, 208]. Foi possível reutilizar o capilar desenvolvido mais de cem vezes, sem alterações significativas na sua capacidade de sorção. Esta reutilização indicou que esta fase era robusta. Os fatores de enriquecimento obtidos com o capilar monolítico cianopropil foram pelo menos dez vezes maiores que os fatores de enriquecimento obtidos com injeções diretas da solução padrão.

Figura 13 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura da seção transversal do capilar monolítico híbrido de sílica com grupos cianopropil incorporados.

A Figura 14.a) representa o espectro de FTIR do capilar monolítico de sílica pura sintetizado a partir de TEOS, e a Figura 14.b) o monolito sintetizado a partir de TEOS e CN-

TEOS, onde é possível perceber em comum as principais bandas dos modos vibracionais da sílica: 800 cm^{-1} atribuída ao estiramento simétrico da ligação Si-O-Si, 1100 cm^{-1} atribuída o estiramento assimétrico e a banda larga em 3500 cm^{-1} atribuída aos grupos OH, respectivamente [209, 210]. O alargamento desta última banda, associada a presença da banda em $\sim 1630\text{ cm}^{-1}$ revela a presença de água adsorvida no material [211]. A adsorção de água em materiais a base de sílica é um processo bastante comum, pois a presença de grupos silanóis residuais torna a superfície bastante hidrofílica. Na ausência desta água adsorvida seria esperado uma banda bastante fina em $\sim 3740\text{ cm}^{-1}$, correspondente aos grupos silanóis isolados. A banda em 960 cm^{-1} também é atribuída a vibração de Si-OH. A banda em $\sim 2925\text{ cm}^{-1}$, no espectro da sílica pura (Figura 14.a), é referente a vibração C-H, que pode ser proveniente de resíduos de álcool ou agente porogênico remanescentes na estrutura monolítica. As bandas em 1341 e $\sim 2960\text{ cm}^{-1}$ são devidas ao estiramento $-\text{CH}_2-$ do grupo cianopropil [210, 212]. A banda em 2259 cm^{-1} , relacionada ao estiramento $-\text{CN}$, confirmou com sucesso a incorporação dos monômeros cianopropiltrietoxissilano na estrutura do monolito [213].

A área superficial específica e os volumes dos poros obtidos pelos experimentos de adsorção-dessorção de nitrogênio para o capilar monolítico de sílica híbrida com grupos cianopropil incorporados foram $15\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$ e $3,37\text{ cm}^3\text{ g}^{-1}$, respectivamente. Este capilar comparado ao capilar monolítico com grupos cianoetil reportados por Zheng et al [161] apresentou menor área superficial específica e maiores volumes dos poros. A retenção dos analitos no sorvente monolítico se deve principalmente a interações intermoleculares que ocorrem entre as moléculas alvo e os grupos funcionais incorporados à estrutura de sílica. Entretanto, parâmetros físicos estruturais da fase sorvente, tais como os volumes dos poros e área superficial específica, podem influenciar neste processo de extração. O primeiro parâmetro está relacionado à permeabilidade e acessibilidade dos mesoporos no material sintetizado, enquanto que o segundo parâmetro relaciona-se ao tamanho da superfície disponível para tais interações.

Figura 14 - Espectros de infravermelho das fases monolíticas de a) sílica pura, b) sílica híbrida com grupos cianopropil incorporados.

4.3.2. Otimização da etapa de pré-concentração dos fármacos na coluna capilar monolítica com grupos cianopropil incorporados - 1D

Após o simples pré-tratamento das amostras de plasma (precipitação de proteínas), os extratos secos foram reconstituídos com soluções de amônio predefinidas. Inicialmente, avaliamos a influência do pH da amostra, na pré-concentração dos fármacos no capilar monolítico com grupos cianopropil incorporados. Para este experimento somente o capilar foi conectado ao espectrômetro de massas.

A Figura 15 representa o cromatograma de íons totais (TIC) das diferentes condições testadas para o capilar monolítico com grupos ciano incorporados. Para a solução dos fármacos em metanol, observou-se baixa retenção dos analitos na fase monolítica, visto que todos saíram próximo ao V_0 , Figura 15.a). No tempo de 5 min, com a mudança de posição da válvula do injetor, a fase móvel mudou de água para acetonitrila, e em 8 minutos observou-se uma banda cromatográfica de baixa intensidade, devido a eluição de alguns fármacos sorvidos no capilar.

Em pH 3,0, Figura 15.b), observamos baixa sorção dos fármacos na fase cianopropil e dois picos de eluição no início do cromatograma. Já em pH 7,0, Figura 15.c), o tempo de retenção dos fármacos no capilar foi maior, mas ainda observamos perda dos analitos na etapa de pré-concentração.

Para os fármacos em solução tampão a pH 10,0; Figura 15.d), observamos satisfatória sorção para a maioria dos fármacos, os quais apresentam valores de pK_a acima de 8, Tabela 18. Desta forma, em pH 10,0 tem-se maior quantidade de espécies parcialmente ionizadas ou não ionizadas, aumentando a interação com a fase estacionária. Nesta condição, o mecanismo de sorção da fase monolítica com grupos cianopropil incorporados se deve a interações do tipo dipolo-dipolo e dipolo-dipolo induzido entre o grupo ciano e os fármacos [161]. A contribuição da interação com os grupos silanóis residuais na superfície dos poros também deve ser levada em consideração [214].

Alguns fármacos, como lamotrigina, clonazepam, mirtazapina, olanzapina, diazepam e carbamazepina foram parcialmente eluídos no início da pré-concentração, no entanto, este fato não influenciou nas etapas de validação analítica.

O tempo de pré-concentração foi de 5 min sendo, esta condição (diluição da amostra com solução tampão pH 10,0) selecionada para as etapas posteriores na montagem do sistema bidimensional.

Figura 15 - Cromatograma de íons totais (TIC) das soluções padrão de fármacos a 250 ng mL^{-1} diluídas em: a) metanol; b) pH 3,0 (acetato de amônio/ácido fórmico 5 mmol L^{-1}); c) pH 7,0 (acetato de amônio/hidróxido de amônio 5 mmol L^{-1}) e d) pH 10,0 (acetato de amônio/hidróxido de amônio 5 mmol L^{-1}) pré-concentrados na coluna monolítica com grupos cianopropil incorporados.

O pré-tratamento da amostra de plasma e a limpeza da fase monolítica após a sorção dos analitos promoveu a remoção dos compostos endógenos da amostra de plasma, evitando o entupimento do capilar e minimizando o efeito de matriz no processo de ionização.

Tabela 18 - Valores de $pKas$ dos fármacos pré-concentrados na coluna monolítica com grupos cianopropil incorporados

Fármaco	$pKa1$	$pKa2$
Olanzapina	7,20	14,20
Lamotrigina	5,87	14,98
Mirtazapina	6,67	-
Clozapina	7,50	-
Quetiapina	7,06	15,12
Citalopram	9,78	-
Haloperidol	8,66	-
Paroxetina	9,77	-
Carbamazepina	13,96	-
Imipramina	9,40	-
Clonazepam	11,89	-
Fluoxetina	9,80	-
Clorpromazina	9,30	-
Sertralina	9,85	-
Clomipramina	9,20	-
Diazepam	9,40	-

4.3.3. Configuração do sistema bidimensional com o capilar monolítico com grupos cianopropil incorporados

As colunas monolítica e analítica foram conectadas na válvula do injetor do sistema bidimensional e diferentes condições de pré-concentração (1D), eluição dos fármacos e separação cromatográfica (2D) foram avaliadas para a obtenção de satisfatória detectabilidade analítica, ou seja, determinação dos fármacos no intervalo terapêutico.

Dentre as condições avaliadas, a pré-concentração dos fármacos ocorreu de 0-5 min com a válvula de injeção na *Posição 1*, eluição de 5-7 min com a válvula de injeção na posição 2 e separação cromatográfica de 7 a 10 min com a válvula de injeção na *Posição 1*.

Após essa etapa foram feitos testes para melhorar a separação cromatográfica e resposta analítica. Nesta etapa, o melhor resultado foi obtido com a eluição por gradiente, como demonstrado na Tabela 5.

Posteriormente, com os tempos de acoplamento/desacoplamento em linha, composição e proporções das fases móveis e gradientes de eluição estabelecidos, avaliou-se a sorção dos

analitos nos diferentes valores de pH, Figura 16. O resultado já anunciado foi confirmado que a amostra diluída em solução tampão pH 10 apresentou maior detectabilidade analítica.

Figura 16 - Influência do pH da amostra (solução padrão de 250 ng mL⁻¹) na pré-concentração dos a) fármacos e b) padrões deuterados na fase monolítica híbrida contendo grupos cianopropil.

4.3.4. Validação analítica

4.3.4.1. Seletividade

A seletividade do método LC-MS/MS no modo *column switching* (modo SRM) foi confirmada pelos cromatogramas de uma amostra de plasma branco, e desta enriquecida com os fármacos em concentrações correspondentes ao LIQ (Figura 17) onde não foram observadas coeluições nos tempos de retenção dos analitos em estudo.

4.3.4.2. Linearidade e limite de quantificação

O método LC-MS/MS no modo *column switching* apresentou resposta linear dentro dos intervalos de calibração adotados. Para todos os analitos estudados, a linearidade variou entre o limite inferior de quantificação ($63,0 \text{ pg mL}^{-1}$ - $1250,0 \text{ pg mL}^{-1}$) e o limite superior de quantificação ($40,5 \text{ ng mL}^{-1}$ - $10,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), com coeficiente de determinação superior a 0,9945 e coeficientes de variação dos calibradores menores que 7%. As faixas lineares de trabalho foram estabelecidas com base nos intervalos terapêuticos preconizados. A linearidade do método foi também comprovada pelo *Lack of Fit* (Tabela 19). Os valores de LIQ (Tabela 19) corresponderam a menor concentração determinada com precisão com CV inferior a 7% e exatidão com valores de EPR menores que 14%. A Tabela 4 apresenta as faixas lineares de trabalho, coeficientes de determinação (R^2), LIQ, valores de p para o *Lack of Fit* e padrão interno utilizado para cada fármaco.

Figura 17 - Cromatogramas LC-MS/MS no modo *column switching* das amostras de plasma branco (sobrescrito na esquerda), e amostras de plasma enriquecidas com os fármacos nas concentrações do LIQ.

Tabela 19 - Faixas lineares de trabalho (FLT), equações de regressão linear, coeficientes de determinação, *Lack of Fit* com nível de significância de 0,05%, LIQs e padrão interno utilizado para cada um dos fármacos para o método LC-MS/MS no modo *column switching*

Analito	FLT (ng mL ⁻¹)	Equação de Regressão	R ²	<i>Lack of Fit</i>	LIQ (ng mL ⁻¹)	Padrão Interno
				<i>p</i>		
Haloperidol	0,075-40,5	y = 0,077x + 0,0173	0,9985	0,987	0,075	Haloperidol-d4
Olanzapina	0,075-40,5	y = 0,0121x - 0,0003	0,9974	0,965	0,075	Haloperidol-d4
Clonazepam	0,625-155,0	y = 0,0227x - 0,013	0,9993	0,953	0,625	Clonazepam-d4
Mirtazapina	0,125-155,0	y = 0,6038x + 0,5485	0,9985	0,995	0,125	Clonazepam-d4
Paroxetina	0,250-155,0	y = 0,0165x + 0,0036	0,9945	0,901	0,250	Paroxetina-d6
Citalopram	1,250-405,0	y = 0,0006x + 0,0006	0,9988	0,979	1,250	Citalopram-d6
Sertralina	0,625-405,0	y = 0,0043x + 0,0068	0,9973	0,898	0,625	Sertralina-d3
Clorpromazina	0,125-360,0	y = 0,0028x - 0,0049	0,9983	0,922	0,125	Imipramina-d3
Imipramina	0,125-360,0	y = 0,0073x + 0,0141	0,9982	0,901	0,125	Imipramina-d3
Clomipramina	0,250-510,0	y = 0,0046x + 0,0098	0,9961	0,865	0,250	Clomipramina-d3
Quetiapina	0,125-510,0	y = 0,0104x + 0,0142	0,9976	0,805	0,125	Quetiapina-d8
Diazepam	0,313-1050,0	y = 0,0021x + 0,0367	0,9972	0,923	0,313	Diazepam-d5
Fluoxetina	0,313-1050,0	y = 0,003x + 0,027	0,9932	0,956	0,313	Fluoxetina-d6
Clozapina	0,188-1550,0	y = 0,0016x + 0,128	0,9966	0,943	0,188	Clozapina-d4
Carbamazepina	0,063-10500,0	y = 0,0005x + 0,0413	0,9940	0,876	0,063	Carbamazepina-d10
Lamotrigina	1,250-10500,0	y = 2E-05x + 5E-05	0,9994	0,995	1,250	Carbamazepina-d10

p: p-valor com nível de significância de 0.05.

4.3.4.3. Exatidão e Precisão

A Tabela 20 ilustra a exatidão e a precisão intra e interensaio do método, avaliado entre o LIQ e o LSQ. A exatidão apresentou valores de EPR variando de -14,0 a 10,7% (exatidão intra-ensaio) e de -13,7 a 11,8% (exatidão interensaio). A precisão do método estabeleceu valores de CV variando de 0,7 a 6,5% (precisão intra-ensaio) e 0,6 a 6,4% (precisão interensaio) (Tabela 20).

Tabela 20 - Exatidão (%EPR) e precisão (%CV) intra e interensaio para o método LC-MS/MS no modo *column switching*

Analito	Concentração adicionada (ng mL ⁻¹)	Exatidão		Precisão	
		Intra-ensaio	Interensaio	Intra-ensaio	Interensaio
		(%EPR) n=5		(%CV) n=5	
Haloperidol	0,075a	4,9	4,6	1,1	1,1
	0,225b	-3,3	-3,6	3,2	2,8
	20,5c	-2,9	-3,1	2,1	1,9
	32,5d	-0,2	-0,5	3,7	3,3
	40,5e	-0,8	-0,5	5,4	4,7
Olanzapina	0,075a	10,4	9,2	4,3	4,5
	0,225b	-3,0	-3,9	4,7	4,7
	20,5c	3,1	4,2	2,2	3,0
	32,5d	4,6	2,9	5,9	6,4
	40,5e	-1,1	-1,0	6,1	5,3
Clonazepam	0,625a	10,7	11,8	2,3	3,2
	1,875b	-6,0	-5,4	4,3	4,1
	80,0c	-2,9	-2,3	3,2	3,1
	125,0d	-2,4	-1,8	1,8	2,1
	155,0e	1,4	0,5	5,5	5,2
Mirtazapina	0,125a	-12,9	-11,9	1,5	2,3
	0,375b	-2,8	-2,0	4,2	4,0
	80,0c	1,2	2,9	5,1	5,6
	125,0d	-3,1	-3,3	6,5	5,6
	155,0e	1,0	1,2	4,8	4,1
Paroxetina	0,250a	2,1	2,1	1,0	0,8
	0,750b	-1,6	-1,3	2,3	2,1
	80,0c	2,4	2,6	1,0	1,0
	125,0d	5,9	6,1	3,9	3,4
	155,0e	-3,0	-3,1	4,2	3,6

Continua...

Continuação da Tabela 20

Analito	Concentração adicionada (ng mL ⁻¹)	Exatidão		Precisão	
		Intra-ensaio	Interensaio	Intra-ensaio	Interensaio
		(%EPR) n=5		(%CV) n=5	
Citalopram	1,250a	4,2	3,7	2,6	2,6
	3,750b	-5,1	-4,2	3,0	3,0
	205,0c	-3,0	-2,9	1,9	1,9
	325,0d	2,0	2,3	3,5	3,5
	405,0e	-0,6	-0,7	3,7	3,7
Sertralina	0,625a	-11,5	-10,7	3,1	3,0
	1,875b	-8,9	-8,2	1,8	2,1
	205,0c	-5,5	-4,5	2,9	3,4
	325,0d	2,9	2,0	0,8	2,1
	405,0e	-1,0	-0,7	4,9	4,2
Clorpromazina	0,125a	4,9	4,7	2,7	2,4
	0,375b	-1,1	-0,6	2,7	2,6
	185,0c	-0,6	-0,2	3,2	2,9
	290,0d	3,5	2,9	5,1	4,6
	360,0e	-1,2	-2,0	2,3	2,6
Imipramina	0,125a	-6,1	-6,6	3,2	3,0
	0,375b	-5,2	-5,5	3,0	2,7
	185,0c	0,1	0,3	2,0	1,8
	290,0d	0,6	0,6	1,7	1,5
	360,0e	0,5	0,8	2,7	2,4
Clomipramina	0,250a	-2,4	-0,5	4,0	4,9
	0,750b	-7,0	-7,8	3,2	3,3
	260,0c	0,4	0,2	4,3	3,7
	410,0d	-2,8	-3,4	3,4	3,3
	510,0e	2,9	2,3	1,4	1,8

Continua...

Continuação da Tabela 20

Analito	Concentração adicionada (ng mL ⁻¹)	Exatidão		Precisão	
		Intra-ensaio	Interensaio	Intra-ensaio	Interensaio
		(%EPR) n=5		(%CV) n=5	
Quetiapina	0,125a	4,1	6,3	1,9	4,6
	0,375b	-5,4	-4,4	2,8	3,3
	260,0c	-0,7	-0,2	2,7	2,5
	410,0d	-3,7	-3,5	1,7	1,5
	510,0e	1,2	1,4	4,4	3,9
Diazepam	0,313a	-11,5	-10,3	2,3	3,0
	0,939b	0,7	1,6	3,1	3,3
	550,0c	-2,2	-1,8	1,4	1,4
	850,0d	2,1	2,1	2,4	2,1
	1050,0e	-1,3	-1,6	4,4	3,9
Fluoxetina	0,313a	-1,3	-0,9	2,3	2,1
	0,939b	6,9	7,4	2,1	2,0
	550,0c	2,1	2,6	2,7	2,5
	850,0d	-4,4	-4,2	4,0	3,5
	1050,0e	3,0	2,6	3,0	2,7
Clozapina	0,188a	-4,5	-4,6	3,2	2,8
	0,564b	-3,6	-2,8	2,2	2,4
	850,0c	1,5	1,8	4,6	4,0
	1270,0d	0,8	1,5	3,4	3,3
	1550,0e	-1,5	-1,7	2,5	2,2
Carbamazepina	0,063a	-14,0	-13,7	3,4	3,0
	0,189b	-6,5	-6,5	2,6	2,3
	5500,0c	1,3	1,5	0,8	0,9
	8500,0d	1,9	1,8	1,2	1,1
	10500,0e	2,0	2,1	1,4	1,2

Continua...

Continuação da Tabela 20

Analito	Concentração adicionada (ng mL ⁻¹)	Exatidão		Precisão	
		Intra-ensaio	Interensaio	Intra-ensaio	Interensaio
		(%EPR) n=5		(%CV) n=5	
Lamotrigina	1,250a	3,8	4,8	2,0	2,9
	3,750b	10,3	10,1	0,7	0,6
	5500,0c	9,4	9,1	3,5	3,1
	8500,0d	9,7	9,7	2,4	2,1
	10500,0e	10,0	9,9	2,7	2,3

a: LIQ, b: CQB, c:CQM, d: CQA e e: LSQ.

4.3.4.4. Efeito residual e efeito de matriz

O sinal analítico, nas amostras de plasma branco injetadas após as análises do calibrador LSQ, não foi superior a 0,5% dos sinais dos analitos nas concentrações do LIQ, e inferiores a 0,1% do sinal do padrão interno.

Nenhuma distorção significativa nos cromatogramas SRM foi evidenciada nos tempos de retenção de cada analito e padrão. Os CVs dos fatores de matriz normalizados calculados a partir dos cinco lotes de matriz não foram maiores do que 11,8% (Tabela 21).

Tabela 21 - Fatores de matriz normalizados (FMN) para as amostras de controle de qualidade baixo (QCB) e alto (QCA) para cada fármaco no método LC-MS/MS no modo *column switching*

Analito	CQs Adicionados (ng mL ⁻¹)	FMN (%CV) n=3
Haloperidol	0,225a	2,9
	32,5b	2,9
Olanzapina	0,225a	7,9
	32,5b	11,8
Clonazepam	1,875a	4,7
	125,0b	3,4
Mirtazapina	0,375a	6,3
	125,0b	6,0
Paroxetina	0,750a	6,1
	125,0b	1,5
Citalopram	3,750a	4,3
	325,0b	4,5
Sertralina	1,875a	3,0
	325,0b	1,6
Clorpromazina	0,375a	1,8
	290,0b	7,2
Imipramina	0,375a	6,2
	290,0b	2,0
Clomipramina	0,750a	3,8
	410,0b	4,0
Quetiapina	0,375a	4,5
	410,0b	3,9
Diazepam	0,939a	3,9
	850,0b	3,5
Fluoxetina	0,939a	5,6
	850,0b	3,8
Clozapina	0,564a	3,0
	1270,0b	2,1
Carbamazepina	0,189a	5,0
	8500,0b	3,4
Lamotrigina	3,750a	2,7
	8500,0b	3,8

a: CQB; b: CQA.

4.3.5. Comparação de métodos analíticos para a determinação de fármacos em amostras de plasma utilizando capilares com diferentes fases estacionárias (*in-tube* SPME/LC) para a pré-concentração

O método padronizado (LC-MS/MS no modo *column switching*) apresentou valores de LIQ (0,063-1,250 ng mL⁻¹) menores que os descritos na literatura para a determinação de fármacos em amostras de plasma utilizando a técnica *in-tube* SPME-LC com os seguintes capilares: capilar monolítico orgânico-inorgânico híbrido cianoetil (0,23-9,83 ng mL⁻¹) [161], OV-1701 (20-50 ng mL⁻¹) [215], poli (N-isopropilacrilamida-co- dimetacrilato de etileno) (poli (NIPAAm-co-EDMA)) (41,1-238,1 ng mL⁻¹) [183] ou polipirrol (10-15 ng mL⁻¹) [216], Tabela 22.

O método proposto neste projeto, quando comparado ao descrito por Zheng et al. [161] para a determinação de antidepressivos em amostras de plasma por *in-tube* SPME-LC-MS/MS (capilar monolítico orgânico-inorgânico híbrido cianoetil), apresentou menor tempo de análise (20 min), incluindo a etapa de pré-concentração, e empregou menor volume de plasma (200 µL) para a determinação simultânea de um número maior de fármacos (16 fármacos) de diferentes classes, 05 antipsicóticos, 07 antidepressivos, 02 anticonvulsivantes e 02 ansiolíticos prescritos na terapia da esquizofrenia.

Tabela 22 - Métodos analíticos para a determinação de fármacos em amostras de plasma utilizando capilares com diferentes fases estacionárias para a pré-concentração

Analitos	Volume de Amostra (μL)	Tempo Total de Análise (min)	Tipo do Capilar e Dimensões	Técnica Analítica	LIQ (ng mL^{-1})	Referência
Mirtazapina	500	15	OV-1701 (14% cianopropilfenil metilpolisiloxano) 80 cm x 250 μm ID	<i>in-tube</i> SPME/LC-UV	50,0	Queiroz et al.(2008) [215]
Citalopram					50,0	
Paroxetina					50,0	
Duloxetina					20,0	
Fluoxetina					40,0	
Sertralina					40,0	
Doxepina	700	12	Poli(N-isopropilacrilamida-co- dimetacrilato de etileno) (poli (NIPAAm-co-EDMA))monolitico 15 cm x 250 μm ID	<i>in-tube</i> SPME/LC-UV	107,8	Ma et al. (2009) [183]
Clozapina					41,1	
Imipramina					238,1	
S-Norfluoxetina	200	21	Polipirrol (PPY) 60 cm x 250 μm ID	<i>in-tube</i> SPME/LC-UV	15,0	Queiroz et al. (2009) [216]
R-Norfluoxetina					15,0	
S-Fluoxetina					10,0	
R-Fluoxetina					10,0	
Trazodona	500	30	Monolito híbrido sílica-cianoetil 15 cm x 250 μm ID	<i>in-tube</i> SPME/LC-MS/MS	0,34	Zheng et al. (2010) [161]
Clozapina					9,83	
Citalopram					0,49	
Doxepina					0,77	
Paroxetina					5,00	
Fluvoxamina					2,19	
Amitriptilina					0,23	
Fluoxetina					0,30	
Sertralina					9,56	
Clomipramina					0,35	

Continua...

Continuação da Tabela 22

Analitos	Volume de Amostra (μL)	Tempo Total de Análise (min)	Tipo do Capilar e Dimensões	Técnica Analítica	LIQ (ng mL^{-1})	Referência
Haloperidol	200	20	Monolito híbrido sílica-cianopropil 4.5 cm x 530 μm ID	LC-MS/MS no modo <i>column switching</i>	0,075	Este trabalho
Olanzapina					0,075	
Clonazepam					0,625	
Mirtazapina					0,125	
Paroxetina					0,250	
Citalopram					1,250	
Sertralina					0,625	
Clorpromazina					0,125	
Imipramina					0,125	
Clomipramina					0,250	
Quetiapina					0,125	
Diazepam					0,313	
Fluoxetina					0,313	
Clozapina					0,188	
Carbamazepina					0,063	
Lamotrigina					1,250	

4.3.6. Avaliação do método LC-MS/MS no modo *column switching* utilizando amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos

As análises das amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos em tratamento com os fármacos em estudo comprovaram a aplicabilidade do método desenvolvido. A Figura 18 ilustra os cromatogramas das amostras de plasma de pacientes em politerapia com citalopram, clozapina e lamotrigina. A Tabela 23 apresenta os níveis plasmáticos de dez pacientes esquizofrênicos, os quais contemplam os intervalos terapêuticos preconizados. As análises das amostras destes pacientes apresentaram valores de CV inferiores a 5,0%, e os cromatogramas não mostraram interferências nos tempos de retenção dos analitos.

Tabela 23 - Níveis plasmáticos dos fármacos avaliados em amostras de pacientes esquizofrênicos

Fármacos	Intervalo Terapêutico (ng mL⁻¹)	Níveis Recomendados para TDM^a	Níveis Plasmáticos (ng mL⁻¹)	Número de Pacientes
Haloperidol	1-10	1	1	1
Olanzapina	20-80	1	4-23	2
Citalopram	50-110	2	18-149	3
Sertralina	10-150	2	11-28	2
Imipramina	175-300	1	240	1
Clomipramina	230-450	1	402	1
Fluoxetina	120-500	2	99	1
Clozapina	350-600	1	434-1507	8
Lamotrigina	3000-14000	2	1136-5666	4

^a: De acordo com Hiemke et al. [204].

Figura 18 - Cromatogramas SRM (método LC-MS/MS no modo *column switching*) de amostra de plasma de um paciente esquizofrênico. Concentrações plasmáticas: citalopram: 149,0 ng mL⁻¹; clozapina: 1267,0 ng mL⁻¹ e lamotrigina: 3326,0 ng mL⁻¹.

4.4. Comparação entre os métodos PPT/LC/MS-MS e LC-MS/MS no modo *column switching* para determinação de fármacos em amostras de plasma

Segundo estudo de linearidade dos métodos desenvolvidos (Tabela 13 e Tabela 19), o método LC-MS/MS no modo *column switching* apresentou menores valores de LIQs e faixa linear mais ampla ($63,0 \text{ pg mL}^{-1}$ - $10,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), quando comparado ao método PPT/LC-MS/MS ($0,2 \text{ ng mL}^{-1}$ - $10,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), provavelmente, em razão da etapa de pré-concentração no capilar monolítico. Para comprovar este fato, o fator de enriquecimento do método LC-MS/MS no modo *column switching* foi determinado pela razão entre os sinais analíticos obtidos com amostras de plasma enriquecidas com os fármacos na concentração de 250 ng mL^{-1} e os sinais analíticos das soluções padrão dos fármacos (250 ng mL^{-1}) injetadas diretamente no sistema PPT/LC-MS/MS, Tabela 24.

Os fatores de enriquecimento variaram de 2 a 8 vezes, sendo o menor para o citalopram (2,1) e o maior para a carbamazepina (8,4).

Tabela 24 - Fatores de enriquecimento para os fármacos avaliados neste trabalho

Fármacos	Fator de Enriquecimento
Haloperidol	3,7
Olanzapina	2,3
Clonazepam	4,2
Mirtazapina	3,8
Paroxetina	4,5
Citalopram	2,1
Sertralina	4,2
Clorpromazina	5,3
Imipramina	3,6
Clomipramina	4,9
Quetiapina	4,2
Diazepam	7,5
Fluoxetina	7,3
Clozapina	8,0
Carbamazepina	8,4
Lamotrigina	3,8

Quanto ao efeito residual, exatidão e precisão analítica intra e interensaios, os métodos desenvolvidos apresentaram valores que estão em concordância aos preconizados pela ANVISA.

A exatidão do método LC-MS/MS no modo *column switching* foi também comprovada pela comparação entre as concentrações plasmáticas de dez amostras de pacientes esquizofrênicos determinadas por este método inovador *versus* concentrações obtidas com as mesmas amostras empregando o método de referência, PPT/LC-MS/MS.

O teste t foi utilizado para observar a significância entre as médias obtidas em nível de 0,05%. A Tabela 25 apresenta os valores médios das concentrações plasmáticas e o desvio padrão dos fármacos avaliados em dez pacientes esquizofrênicos, onde para todos os pacientes o valor de p foi maior que 0,05%, mostrando que não existe diferença significativa entre os métodos.

Tabela 25 - Concentrações plasmáticas médias e desvios padrão dos fármacos avaliados pelo teste t para os métodos desenvolvidos em amostras de plasma de pacientes com esquizofrenia

Fármacos	Métodos	Concentrações Plasmáticas $\pm$ Desvio Padrão (ng mL ⁻¹) n=3				
		Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4	Paciente 5
Haloperidol	Column switching PPT					
Olanzapina	Column switching PPT					
Citalopram	Column switching PPT					
Sertralina	Column switching PPT					
Imipramina	Column switching PPT					
Clomipramina	Column switching PPT					
Fluoxetina	Column switching PPT					
Clozapina	Column switching PPT	818,73 $\pm$ 2,78	433,58 $\pm$ 5,03			1266,93 $\pm$ 2,50
Lamotrigina	Column switching PPT	1135,81 $\pm$ 57,64	433,93 $\pm$ 3,84			1267,14 $\pm$ 1,92
		1135,61 $\pm$ 62,71			5665,92 $\pm$ 0,51	3326,19 $\pm$ 8,67
					5666,11 $\pm$ 5,81	3325,93 $\pm$ 67,84
	p-valor	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Continua...

Continuação da Tabela 25

Fármacos	Métodos	Concentrações Plasmáticas $\pm$ Desvio Padrão (ng mL ⁻¹) n=3				
		Paciente 6	Paciente 7	Paciente 8	Paciente 9	Paciente 10
Haloperidol	Column switching	1,37 $\pm$ 0,02				
	PPT	1,37 $\pm$ 0,03				
Olanzapina	Column switching					4,37 $\pm$ 0,08
	PPT					4,26 $\pm$ 0,09
Citalopram	Column switching	148,66 $\pm$ 0,92	35,15 $\pm$ 0,87			
	PPT	148,68 $\pm$ 3,55	35,33 $\pm$ 1,42			
Sertralina	Column switching					
	PPT					
Imipramina	Column switching					
	PPT					
Clomipramina	Column switching				401,82 $\pm$ 4,09	
	PPT				401,62 $\pm$ 7,78	
Fluoxetina	Column switching					98,76 $\pm$ 2,38
	PPT					98,81 $\pm$ 1,69
Clozapina	Column switching	688,60 $\pm$ 6,30	1507,09 $\pm$ 3,46	1253,33 $\pm$ 3,08	751,55 $\pm$ 4,82	
	PPT	688,57 $\pm$ 1,85	1507,16 $\pm$ 6,08	1253,22 $\pm$ 3,48	751,52 $\pm$ 2,38	
Lamotrigina	Column switching			2897,23 $\pm$ 2,52		
	PPT			2897,45 $\pm$ 23,64		
	p-valor	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

p-valor a nível de significância de 0,05%.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

O simples procedimento de preparo de amostras (precipitação de proteínas), combinado com a cromatografia líquida por interações hidrofílicas mostrou-se eficaz na minimização do efeito da matriz e na separação de substâncias polares em amostra biológica complexa, como o plasma humano. Em razão da especificidade e detectabilidade do sistema HILIC-MS/MS em *tandem* no modo SRM foi desenvolvido um método confiável com limites de quantificação adequados para a determinação de 10 aminoácidos e neurotransmissores em amostras de plasma. Este método foi utilizado com êxito nas análises de 35 amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos em tratamento com clozapina (27 pacientes) e olanzapina (8 pacientes), para avaliar a eficácia do tratamento, tendo como controle 38 voluntários saudáveis. A análise de variância (ANOVA), seguida por teste post-hoc de Duncan, revelou que os níveis médios plasmáticos (nmol mL^{-1}) de metionina ($F_{2,70} = 3,14$, $p = 0,049$) de pacientes esquizofrênicos em tratamento com olanzapina foram significativamente mais elevados, quando comparados aos valores obtidos com o grupo controle (voluntários saudáveis), já o nível de glutamato em pacientes esquizofrênicos em tratamento com clozapina apresentaram tendência a valores mais altos ($F_{2,70} = 2,50$, $p = 0,090$).

O método PPT/LC-MS/MS desenvolvido foi utilizado com sucesso na análise simultânea dos antipsicóticos (olanzapina, quetiapina, clozapina, haloperidol, clorpromazina), antidepressivos (mirtazapina, paroxetina, citalopram, sertralina, imipramina, clomipramina, fluoxetina), anticonvulsivantes (carbamazepina e lamotrigina), e ansiolíticos (diazepam e clonazepam) em amostras de plasma de 51 pacientes esquizofrênicos. Muitos destes pacientes apresentaram concentrações plasmáticas fora do intervalo terapêutico preconizado, em razão das interações farmacocinéticas entre os medicamentos prescritos no tratamento da esquizofrenia. Assim, a monitorização terapêutica é de extrema importância para aumentar a eficácia do tratamento e minimizar os efeitos tóxicos dos fármacos.

A pré-concentração dos fármacos na coluna monolítica de sílica híbrida com grupos cianopropil incorporados e a remoção dos componentes endógenos da amostra biológica, antes da separação cromatográfica favoreceram a seletividade e detectabilidade do método LC-MS/MS no modo *column switching*. Os macroporos do capilar monolítico (baixa pressão do sistema analítico) facilitaram a percolação da amostra biológica, já os grupos cianopropil incorporados permitiram sorção seletiva dos fármacos por interações dipolo-dipolo e dipolo-dipolo induzido. Como este capilar foi sintetizado diretamente no capilar, o uso de filtros de aço inox nas extremidades, meio muito propício para a sorção dos componentes endógenos,

não foi necessário. A estabilidade química e mecânica da fase monolítica foi demonstrada pela reutilização deste capilar por mais de uma centena de vezes.

O método LC-MS/MS no modo *column switching*, quando comparado ao de referência PPT/LC-MS/MS, apresentou menores limites de quantificação (níveis subterapêuticos) e faixa linear mais ampla. As concentrações plasmáticas de 10 amostras de pacientes esquizofrênicos determinadas pelos métodos, PPT/LC-MS/MS e LC-MS/MS no modo *column switching* não apresentaram diferenças significativas (teste t). Além deste fato, o método inovador automatizado favoreceu a precisão, a exatidão e a frequência analítica.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- 1 HAFNER, H., AN DER HEIDEN, W. Epidemiology of schizophrenia. **Canadian Journal of Psychiatry**, v. 42, n. 2, p. 139-151, 1997.
- 2 SANTANA, A.F.F.D.A., CHIANCA, T.C.M., Cardoso, C.S. Qualidade de vida de pacientes com esquizofrenia internados em hospital de custódia. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 58, n. 3, p. 187-194, 2009.
- 3 VAN OS, J., KAPUR, S. Schizophrenia. **Lancet**, v. 374, n. 9690, p. 635-645, 2009.
- 4 MIYAMOTO, S., LAMANTIA, A.S., DUNCAN, G.E., SULLIVAN, P., GILMORE, J.H., LIEBERMAN, J.A. Recent advances in the neurobiology of schizophrenia. **Molecular Interventions**, v. 3, n. 1, p. 27-39, 2003.
- 5 POPOVIC, D., BENABARRE, A., CRESPO, J.M., GOIKOLEA, J.M., GONZALEZ-PINTO, A., GUTIERREZ-ROJAS, L., MONTES, J.M., VIETA, E. Risk factors for suicide in schizophrenia: systematic review and clinical recommendations. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 130, n. 6, p. 418-426, 2014.
- 6 MCGRATH, J., SAHA, S., CHANT, D., WELHAM, J. Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality. **Epidemiologic Reviews**, v. 30, p. 67-76, 2008.
- 7 MELTZER, H.Y., MATSUBARA, S., LEE, J.C. Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D-1, D-2 and serotonin₂ pKi values. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 251, n. 1, p. 238-246, 1989.
- 8 SIRIS, S.G. Suicide and schizophrenia. **Journal of Psychopharmacology**, v. 15, n. 2, p. 127-135, 2001.
- 9 MARTIN, A.K., ROBINSON, G., DZAFIC, I., REUTENS, D., MOWRY, B. Theory of mind and the social brain: implications for understanding the genetic basis of schizophrenia. **Genes, Brain, and Behavior**, v. 13, n. 1, p. 104-117, 2014.
- 10 RAKHADE, S.N., LOEB, J.A. Focal reduction of neuronal glutamate transporters in human neocortical epilepsy. **Epilepsia**, v. 49, n. 2, p. 226-236, 2008.
- 11 KAPLAN, H.I., SADOCK, B.J. **Compêndio de Psiquiatria**. 9 ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 1584 p.
- 12 JOHANN, R.V.O., VAZ, C.E. Condições afetivas e de relacionamento interpessoal em homens portadores de esquizofrenia em tratamento com haloperidol ou clozapina. **Interação em Psicologia**, v. 10, n. 1, p. 151-156, 2006.
- 13 AFONSO, P. **Esquizofrenia: Conhecer a Doença**. 2 ed. Lisboa: Climepsi Editores, 2002. 136 p.

-
- 14 GOTTESMAN, I.I., ERLÉNMEYER-KIMLING, L. Family and twin strategies as a head start in defining prodromes and endophenotypes for hypothetical early-interventions in schizophrenia. **Schizophrenia Research**, v. 51, n. 1, p. 93-102, 2001.
 - 15 FATEMI, S.H., FOLSOM, T.D. The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia, revisited. **Schizophrenia Bulletin**, v. 35, n. 3, p. 528-548, 2009.
 - 16 FRANGOU, S., MURRAY, R.M. Imaging as a tool in exploring the neurodevelopment and genetics of schizophrenia. **British Medical Bulletin**, v. 52, n. 3, p. 587-596, 1996.
 - 17 TSUANG, M.T., STONE, W.S., FARAONE, S.V. Genes, environment and schizophrenia. **British Journal of Psychiatry**, v. 178, p. S18-S24, 2001.
 - 18 ARARIPE NETO, A.G.D.A., BRESSAN, R.A., BUSATTO FILHO, G. Fisiopatologia da esquizofrenia: aspectos atuais. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 34, p. 198-203, 2007.
 - 19 LEWIS, D.A., LEVITT, P. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. **Annual Review of Neuroscience**, v. 25, p. 409-432, 2002.
 - 20 BRESSAN, R.A., PILOWSKY, L.S. Hipótese glutamatérgica da esquizofrenia. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, n. 3, p. 177-183, 2003.
 - 21 FAN, J., COWAN, C.M., ZHANG, L.Y., HAYDEN, M.R., RAYMOND, L.A. Interaction of postsynaptic density protein-95 with NMDA receptors influences excitotoxicity in the yeast artificial chromosome mouse model of Huntington's disease. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 35, p. 10928-10938, 2009.
 - 22 PREGELJ, P. Psychosis and depression - a neurobiological view. **Psychiatria Danubina**, v. 21 Suppl 1, p. 102-105, 2009.
 - 23 COYLE, J.T. Glutamate and schizophrenia: beyond the dopamine hypothesis. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 26, n. 4-6, p. 365-384, 2006.
 - 24 DURSUN, S.M., DEAKIN, J.F.W. Augmenting antipsychotic treatment with lamotrigine or topiramate in patients with treatment-resistant schizophrenia: a naturalistic caseseries outcome study. **Journal of Psychopharmacology**, v. 15, n. 4, p. 297-301, 2001.
 - 25 REYNOLDS, G.P. Receptor mechanisms in the treatment of schizophrenia. **Journal of psychopharmacology**, v. 18, n. 3, p. 340-345, 2004.
 - 26 STONE, J.M., MORRISON, P.D., PILOWSKY, L.S. Glutamate and dopamine dysregulation in schizophrenia--a synthesis and selective review. **Journal of Psychopharmacology**, v. 21, n. 4, p. 440-452, 2007.
 - 27 STAAL, W.G., HIJMAN, R., HULSHOFF POL, H.E., KAHN, R.S. Neuropsychological dysfunctions in siblings discordant for schizophrenia. **Psychiatry Research**, v. 95, n. 3, p. 227-235, 2000.

-
- 28 CALLICOTT, J.H., EGAN, M.F., MATTAY, V.S., BERTOLINO, A., BONE, A.D., VERCHINKSI, B., WEINBERGER, D.R. Abnormal fMRI response of the dorsolateral prefrontal cortex in cognitively intact siblings of patients with schizophrenia. **American Journal of Psychiatry**, v. 160, n. 4, p. 709-719, 2003.
- 29 LARUELLE, M., ABI-DARGHAM, A., GIL, R., KEGELES, L., INNIS, R. Increased dopamine transmission in schizophrenia: relationship to illness phases. **Biological Psychiatry**, v. 46, n. 1, p. 56-72, 1999.
- 30 MOGHADDAM, B. Stress activation of glutamate neurotransmission in the prefrontal cortex: implications for dopamine-associated psychiatric disorders. **Biological Psychiatry**, v. 51, n. 10, p. 775-787, 2002.
- 31 BLEICH, A., BROWN, S.L., KAHN, R., VAN PRAAG, H.M. The role of serotonin in schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin**, v. 14, n. 2, p. 297-315, 1988.
- 32 DUVAL, F., MOKRANI, M.C., BAILEY, P., CORREA, H., CROCQ, M.A., SON DIEP, T., MACHER, J.P. Serotonergic and noradrenergic function in depression: clinical correlates. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 2, n. 3, p. 299-308, 2000.
- 33 IQBAL, N., VAN PRAAG, H.M. The role of serotonin in schizophrenia. **European Neuropsychopharmacology**, v. 5 Suppl, p. 11-23, 1995.
- 34 KAPUR, S., SEEMAN, P. Does fast dissociation from the dopamine d(2) receptor explain the action of atypical antipsychotics?: A new hypothesis. **American Journal of Psychiatry**, v. 158, n. 3, p. 360-369, 2001.
- 35 MELTZER, H.Y., LI, Z., KANEDA, Y., ICHIKAWA, J. Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 27, n. 7, p. 1159-1172, 2003.
- 36 JUNIOR, W.E.F. Proteínas: hidrólise, precipitação e um tema para o ensino de química. **Química Nova na Escola**, v. 24, p. 12-16, 2006.
- 37 DE LUCA, V., VIGGIANO, E., MESSINA, G., VIGGIANO, A., BORLIDO, C., VIGGIANO, A., MONDA, M. Peripheral amino acid levels in schizophrenia and antipsychotic treatment. **Psychiatry Investigation**, v. 5, n. 4, p. 203-8, 2008.
- 38 ZUARDI, A.W., CRIPPA, J.A.S., GUIMARÃES, F.S. **Cannabis e Saúde Mental – Uma Revisão sobre a Droga de Abuso e o Medicamento**. Ribeirão Preto: FUNPEC-Editora, 2008. 283 p.
- 39 JAVITT, D.C. Glutamatergic theories of schizophrenia. **Israel Journal of Psychiatry and Related Sciences**, v. 47, n. 1, p. 4-16, 2010.
- 40 JENTSCH, J.D., ROTH, R.H. The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. **Neuropsychopharmacology**, v. 20, n. 3, p. 201-225, 1999.

-
- 41 GOFF, D.C., COYLE, J.T. The emerging role of glutamate in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. **American Journal of Psychiatry**, v. 158, n. 9, p. 1367-1377, 2001.
- 42 DEAKIN, J.F., SIMPSON, M.D. A two-process theory of schizophrenia: evidence from studies in post-mortem brain. **Journal of Psychiatric Research**, v. 31, n. 2, p. 277-295, 1997.
- 43 SIMPSON, M.D., SLATER, P., DEAKIN, J.F. Comparison of glutamate and gamma-aminobutyric acid uptake binding sites in frontal and temporal lobes in schizophrenia. **Biological Psychiatry**, v. 44, n. 6, p. 423-427, 1998.
- 44 DURSUN, S.M., SZEMIS, A., ANDREWS, H., REVELEY, M.A. The effects of clozapine on levels of total cholesterol and related lipids in serum of patients with schizophrenia: a prospective study. **Journal of Psychiatry & Neuroscience**, v. 24, n. 5, p. 453-455, 1999.
- 45 SABA, G., DUMORTIER, G., KALALOU, K., BENADHIRA, R., DEGRASSAT, K., GLIKMAN, J., JANUEL, D. Lamotrigine-clozapine combination in refractory schizophrenia: three cases. **Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 14, n. 1, p. 86-94, 2002.
- 46 TIIHONEN, J., HALLIKAINEN, T., RYYNANEN, O.P., REPO-TIIHONEN, E., KOTILAINEN, I., ERONEN, M., TOIVONEN, P., WAHLBECK, K., PUTKONEN, A. Lamotrigine in treatment-resistant schizophrenia: a randomized placebo-controlled crossover trial. **Biological Psychiatry**, v. 54, n. 11, p. 1241-1248, 2003.
- 47 TORTORELLA, A., MONTELEONE, P., FABRAZZO, M., VIGGIANO, A., DE LUCA, L., M.A.J., M. Plasma concentrations of amino acids in chronic schizophrenics treated with clozapine. **Neuropsychobiology**, v. 44, n. 4, p. 167-171, 2001.
- 48 VAN DER HEIJDEN, F.M.M.A., TUINIER, S., FEKKES, D., SIJBEN, A.E.S., KAHN, R.S., VERHOEVEN, W.M.A. Atypical antipsychotics and the relevance of glutamate and serotonin. **European Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 3, p. 259-265, 2004.
- 49 EVINS, A.E., AMICO, E.T., SHIH, V., GOFF, D.C. Clozapine treatment increases serum glutamate and aspartate compared to conventional neuroleptics. **Journal of Neural Transmission**, v. 104, n. 6-7, p. 761-766, 1997.
- 50 WAZIRI, R., WILCOX, J., SHERMAN, A.D., MOTT, J. Serine Metabolism and Psychosis. **Psychiatry Research**, v. 12, n. 2, p. 121-136, 1984.
- 51 MACCIARDI, F., LUCCA, A., CATALANO, M., MARINO, C., ZANARDI, R., SMERALDI, E. Amino acid patterns in schizophrenia: some new findings. **Psychiatry Research**, v. 32, n. 1, p. 63-70, 1990.

-
- 52 SUMIYOSHI, T., ANIL, A.E., JIN, D., JAYATHILAKE, K., LEE, M., MELTZER, H.Y. Plasma glycine and serine levels in schizophrenia compared to normal controls and major depression: relation to negative symptoms. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2004.
- 53 CARL, G.F., BROGAN, M.P., YOUNG, B.K. Is plasma serine a marker for psychosis? **Biological Psychiatry**, v. 31, n. 11, p. 1130-1135, 1992.
- 54 ALTAMURA, C.A., MAURI, M.C., FERRARA, A., MORO, A.R., D'ANDREA, G., ZAMBERLAN, F. Plasma and platelet excitatory amino acids in psychiatric disorders. **American Journal of Psychiatry**, v. 150, n. 11, p. 1731-1733, 1993.
- 55 KASTER, T.S., DE JESUS, D., RADHU, N., FARZAN, F., BLUMBERGER, D.M., RAJJI, T.K., FITZGERALD, P.B., DASKALAKIS, Z.J. Clozapine potentiation of GABA mediated cortical inhibition in treatment resistant schizophrenia. **Schizophrenia Research**, v. 165, n. 2-3, p.157-162, 2015.
- 56 VARJU, P., KATAROVA, Z., MADARASZ, E., SZABO, G. GABA signalling during development: new data and old questions. **Cell and Tissue Research**, v. 305, n. 2, p. 239-246, 2001.
- 57 PETROFF, O.A., ROTHMAN, D.L. Measuring human brain GABA in vivo: effects of GABA-transaminase inhibition with vigabatrin. **Molecular Neurobiology**, v. 16, n. 1, p. 97-121, 1998.
- 58 SASAKI, K., FAN, L.W., TIEN, L.T., MA, T.G., LOH, H.H., HO, I.K. The interaction of morphine and gamma-aminobutyric acid (GABA)ergic systems in anxiolytic behavior: Using mu-opioid receptor knockout mice. **Brain Research Bulletin**, v. 57, n. 5, p. 689-694, 2002.
- 59 ROBERTS, E. Living systems are tonically inhibited, autonomous optimizers, and disinhibition coupled to variability generation is their major organizing principle - inhibitory command-control at levels of membrane, genome, metabolism, brain, and society. **Neurochemical Research**, v. 16, n. 3, p. 409-421, 1991.
- 60 HINTON, T., JOHNSTON, G. The role of GABA-A receptors in schizophrenia. **Cell Science Reviews**, v. 5, p. 180-194, 2008.
- 61 ECKSTEIN, J.A., AMMERMAN, G.M., REVELES, J.M., ACKERMANN, B.L. Analysis of glutamine, glutamate, pyroglutamate, and GABA in cerebrospinal fluid using ion pairing HPLC with positive electrospray LC/MS/MS. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 171, n. 2, p. 190-196, 2008.
- 62 CAI, H.L., ZHU, R.H., LI, H.D. Determination of dansylated monoamine and amino acid neurotransmitters and their metabolites in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 396, n. 1, p. 103-111, 2010.

-
- 63 VAN DER HEIJDEN, F.M., FEKKES, D., TUINIER, S., SIJZEN, A.E., KAHN, R.S., VERHOEVEN, W.M. Amino acids in schizophrenia: evidence for lower tryptophan availability during treatment with atypical antipsychotics? **Journal of Neural Transmission**, v. 112, n. 4, p. 577-585, 2005.
- 64 BJERKENSTEDT, L., EDMAN, G., HAGENFELDT, L., SEDVALL, G., WIESEL, F.A. Plasma amino acids in relation to cerebrospinal fluid monoamine metabolites in schizophrenic patients and healthy controls. **British Journal of Psychiatry**, v. 147, p. 276-282, 1985.
- 65 FEKKES, D., PEPPLINKHUIZEN, L., VERHEIJ, R., BRUINVELS, J. Abnormal plasma levels of serine, methionine, and taurine in transient acute polymorphic psychosis. **Psychiatry Research**, v. 51, n. 1, p. 11-18, 1994.
- 66 MELTZER, H.Y. Clinical studies on the mechanism of action of clozapine: the dopamine-serotonin hypothesis of schizophrenia. **Psychopharmacology**, v. 99 Suppl, p. S18-27, 1989.
- 67 RAO, M.L., GROSS, G., STREBEL, B., BRAUNIG, P., HUBER, G., KLOSTERKOTTER, J. Serum amino acids, central monoamines, and hormones in drug-naive, drug-free, and neuroleptic-treated schizophrenic patients and healthy subjects. **Psychiatry Research**, v. 34, n. 3, p. 243-257, 1990.
- 68 ALFREDSSON, G., WIESEL, F.A. Relationships between clinical effects and monoamine metabolites and amino-acids in sulpiride-treated schizophrenic-patients. **Psychopharmacology**, v. 101, n. 3, p. 324-331, 1990.
- 69 REVELEY, M.A., DEBELLEROCHE, J., RECORDATI, A., HIRSCH, S.R. Increased Csf amino-acids and ventricular enlargement in schizophrenia - a preliminary-study. **Biological Psychiatry**, v. 22, n. 4, p. 413-420, 1987.
- 70 LEE, M., JAYATHILAKE, K., DAI, J., MELTZER, H.Y. Decreased plasma tryptophan and tryptophan/large neutral amino acid ratio in patients with neuroleptic-resistant schizophrenia: relationship to plasma cortisol concentration. **Psychiatry Research**, v. 185, n. 3, p. 328-333, 2011.
- 71 KASPAR, H., DETTMER, K., GRONWALD, W., OEFNER, P.J. Advances in amino acid analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 2, p. 445-452, 2009.
- 72 AGRAFIOTOU, P., SOTIROPOULOS, S., PAPPA-LOUISI, A. Direct RP-HPLC determination of underivatized amino acids with online dual UV absorbance, fluorescence, and multiple electrochemical detection. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 7, p. 949-954, 2009.
- 73 ALARCÓN-FLORES, M.I., ROMERO-GONZÁLEZ, R., FRENICH, A.G., MARTÍNEZ VIDAL, J.L., REYES, R.C. Rapid determination of underivatized amino acids in fertilizers by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 2, n. 11, p. 1745-1751, 2010.

-
- 74 CHEN, X., GAO, D., LIU, F., GAO, X., WANG, S., ZHAO, Y., LIU, H., JIANG, Y. A novel quantification method for analysis of twenty natural amino acids in human serum based on N-phosphorylation labeling using reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 836, p. 61-71, 2014.
- 75 HE, Y., YU, Z., GIEGLING, I., XIE, L., HARTMANN, A.M., PREHN, C., ADAMSKI, J., KAHN, R., LI, Y., ILLIG, T., WANG-SATTTLER, R., RUJESCU, D. Schizophrenia shows a unique metabolomics signature in plasma. **Translational Psychiatry**, v. 2, p. e149, 2012.
- 76 JANECKOVA, H., HRON, K., WOJTOWICZ, P., HLIDKOVA, E., BARESOVA, A., FRIEDECKY, D., ZIDKOVA, L., HORNIK, P., BEHULOVA, D., PROCHAZKOVA, D., VINOHRADSKA, H., PESKOVA, K., BRUHEIM, P., SMOLKA, V., STASTNA, S., ADAM, T. Targeted metabolomic analysis of plasma samples for the diagnosis of inherited metabolic disorders. **Journal of Chromatography A**, v. 1226, p. 11-17, 2012.
- 77 OLADIPO, O.O., WEINDEL, A.L., SAUNDERS, A.N., DIETZEN, D.J. Impact of premature birth and critical illness on neonatal range of plasma amino acid concentrations determined by LC-MS/MS. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 104, n. 4, p. 476-479, 2011.
- 78 MUESER, K.T., MCGURK, S.R. Schizophrenia. **Lancet**, v. 363, n. 9426, p. 2063-2072, 2004.
- 79 KOSTER, L.S., CARBON, M., CORRELL, C.U. Emerging drugs for schizophrenia: an update. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 19, n. 4, p. 511-531, 2014.
- 80 BRESSAN, R.A., COSTA, D.C., JONES, H.M., ELL, P.J., PILOWSKY, L.S. Typical antipsychotic drugs -- D(2) receptor occupancy and depressive symptoms in schizophrenia. **Schizophrenia Research**, v. 56, n. 1-2, p. 31-36, 2002.
- 81 MELTZER, H.Y., MATSUBARA, S., LEE, J.C. The ratios of serotonin₂ and dopamine₂ affinities differentiate atypical and typical antipsychotic drugs. **Psychopharmacology Bulletin**, v. 25, n. 3, p. 390-392, 1989.
- 82 CASTRO, A.P., ELKIS, H. Rehospitalization rates of patients with schizophrenia discharged on haloperidol, risperidone or clozapine. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 29, n. 3, p. 207-212, 2007.
- 83 LEUCHT, S., BARNES, T.R.E., KISSLING, W., ENGEL, R.R., CORRELL, C., KANE, J.M. Relapse prevention in schizophrenia with new-generation antipsychotics: a systematic review and exploratory meta-analysis of randomized, controlled trials. **American Journal of Psychiatry**, v. 160, n. 7, p. 1209-1222, 2003.
- 84 MELTZER, H.Y., BOBO, W.V., LEE, M.A., COLA, P., JAYATHILAKE, K. A randomized trial comparing clozapine and typical neuroleptic drugs in non-treatment-resistant schizophrenia. **Psychiatry Research**, v. 177, n. 3, p. 286-293, 2010.

-
- 85 CHAKOS, M., LIEBERMAN, J., HOFFMAN, E., BRADFORD, D., SHEITMAN, B. Effectiveness of second-generation antipsychotics in patients with treatment-resistant schizophrenia: a review and meta-analysis of randomized trials. **American Journal of Psychiatry**, v. 158, n. 4, p. 518-526, 2001.
- 86 ELKIS, H., MELTZER, H.Y. Refractory schizophrenia. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 29 Suppl 2, p. S41-47, 2007.
- 87 LINDENMAYER, J.P. Treatment refractory schizophrenia. **Psychiatric Quarterly**, v. 71, n. 4, p. 373-384, 2000.
- 88 ROSENHECK, R.A., LESLIE, D.L., SINDELAR, J., MILLER, E.A., LIN, H., STROUP, T.S., MCEVOY, J., DAVIS, S.M., KEEFE, R.S., SWARTZ, M., PERKINS, D.O., HSIAO, J.K., LIEBERMAN, J. Cost-effectiveness of second-generation antipsychotics and perphenazine in a randomized trial of treatment for chronic schizophrenia. **American Journal of Psychiatry**, v. 163, n. 12, p. 2080-2089, 2006.
- 89 HAYHURST, K.P., BROWN, P., LEWIS, S.W. The cost-effectiveness of clozapine: a controlled, population-based, mirror-image study. **Journal of Psychopharmacology**, v. 16, n. 2, p. 169-175, 2002.
- 90 HEGARTY, J.D., BALDESSARINI, R.J., TOHEN, M., WATERNAUX, C., OEPEN, G. One hundred years of schizophrenia: a meta-analysis of the outcome literature. **American Journal of Psychiatry**, v. 151, n. 10, p. 1409-1416, 1994.
- 91 CARLSSON, A. Antipsychotic drugs, neurotransmitters, and schizophrenia. **American Journal of Psychiatry**, v. 135, n. 2, p. 165-173, 1978.
- 92 SEEMAN, P. Atypical neuroleptics: role of multiple receptors, endogenous dopamine, and receptor linkage. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 358, p. 14-20, 1990.
- 93 DAVIS, J.M., SCHAFFER, C.B., KILLIAN, G.A., KINARD, C., CHAN, C. Important issues in the drug treatment of schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin**, v. 6, n. 1, p. 70-87, 1980.
- 94 REMINGTON, G., KAPUR, S. Atypical antipsychotics: are some more atypical than others? **Psychopharmacology**, v. 148, n. 1, p. 3-15, 2000.
- 95 LIEBERMAN, J.A. Understanding the mechanism of action of atypical antipsychotic drugs. A review of compounds in use and development. **British Journal of Psychiatry**, v. 150, n. 22, p. 7-18, 1993.
- 96 KERWIN, R.W. The new atypical antipsychotics. A lack of extrapyramidal side-effects and new routes in schizophrenia research. **British Journal of Psychiatry**, v. 164, n. 2, p. 141-148, 1994.
- 97 SEEMAN, P., TALLERICO, T. Antipsychotic drugs which elicit little or no Parkinsonism bind more loosely than dopamine to brain D2 receptors, yet occupy high levels of these receptors. **Molecular Psychiatry**, v. 3, n. 2, p. 123-134, 1998.

-
- 98 LEUCHT, S., CORVES, C., ARBTER, D., ENGEL, R.R., LI, C., DAVIS, J.M. Second-generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a meta-analysis. **Lancet**, v. 373, n. 9657, p. 31-41, 2009.
- 99 KEEFE, R.S., BILDER, R.M., DAVIS, S.M., HARVEY, P.D., PALMER, B.W., GOLD, J.M., MELTZER, H.Y., GREEN, M.F., CAPUANO, G., STROUP, T.S., MCEVOY, J.P., SWARTZ, M.S., ROSENHECK, R.A., PERKINS, D.O., DAVIS, C.E., HSIAO, J.K., LIEBERMAN, J.A. Neurocognitive effects of antipsychotic medications in patients with chronic schizophrenia in the CATIE Trial. **Archives of General Psychiatry**, v. 64, n. 6, p. 633-647, 2007.
- 100 LIEBERMAN, J.A. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia: efficacy, safety and cost outcomes of CATIE and other trials. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 68, n. 2, p. e04, 2007.
- 101 BUCHANAN, R.W., JAVITT, D.C., MARDER, S.R., SCHOOLER, N.R., GOLD, J.M., MCMAHON, R.P., HERESCO-LEVY, U., CARPENTER, W.T. The Cognitive and Negative Symptoms in Schizophrenia Trial (CONSIST): the efficacy of glutamatergic agents for negative symptoms and cognitive impairments. **American Journal of Psychiatry**, v. 164, n. 10, p. 1593-1602, 2007.
- 102 PATTEET, L., MAUDENS, K.E., SABBE, B., MORRENS, M., DE DONCKER, M., NEELS, H. High throughput identification and quantification of 16 antipsychotics and 8 major metabolites in serum using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Clinica Chimica Acta**, v. 429, p. 51-58, 2014.
- 103 JUENKE, J.M., BROWN, P.I., URRY, F.M., JOHNSON-DAVIS, K.L., MCMILLIN, G.A. Simultaneous UPLC-MS/MS assay for the detection of the traditional antipsychotics haloperidol, fluphenazine, perphenazine, and thiothixene in serum and plasma. **Clinica Chimica Acta**, v. 423, p. 32-34, 2013.
- 104 MARTINC, B., ROSKAR, R., GRABNAR, I., VOVK, T. Simultaneous determination of gabapentin, pregabalin, vigabatrin, and topiramate in plasma by HPLC with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 962, p. 82-88, 2014.
- 105 YOSHITAKE, T., FUJINO, K., KEHR, J., ISHIDA, J., NOHTA, H., YAMAGUCHI, M. Simultaneous determination of norepinephrine, serotonin, and 5-hydroxyindole-3-acetic acid in microdialysis samples from rat brain by microbore column liquid chromatography with fluorescence detection following derivatization with benzylamine. **Analytical Biochemistry**, v. 312, n. 2, p. 125-133, 2003.
- 106 FOTOPOULOU, M.A., IOANNOU, P.C. Post-column terbium complexation and sensitized fluorescence detection for the determination of norepinephrine, epinephrine and dopamine using high-performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 462, n. 2, p. 179-185, 2002.
- 107 ZHANG, S., XU, Q., ZHANG, W., JIN, L.T., JIN, J.Y. In vivo monitoring of the monoamine neurotransmitters in rat brain using microdialysis sampling with liquid chromatography electrochemical detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 427, n. 1, p. 45-53, 2001.

-
- 108 WANG, Y.S., FICE, D.S., YEUNG, P.K.F. A simple high-performance liquid chromatography assay for simultaneous determination of plasma norepinephrine, epinephrine, dopamine and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 21, n. 3, p. 519-525, 1999.
- 109 ARMSTRONG, M., JONSCHER, K., REISDORPH, N.A. Analysis of 25 underivatized amino acids in human plasma using ion-pairing reversed-phase liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, n. 16, p. 2717-2726, 2007.
- 110 YAO, X., ZHOU, G.S., TANG, Y.P., PANG, H.Q., QIAN, Y.F., GUO, S., MO, X., ZHU, S.Q., SU, S.L., QIAN, D.W., JIN, C., QIN, Y., DUAN, J.A. Direct determination of underivatized amino acids from Ginkgo biloba leaves by using hydrophilic interaction ultra high performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 17, p. 2878-2887, 2013.
- 111 YAMASHITA, M., FENN, J.B. Negative-Ion Production with the Electrospray Ion-Source. **Journal of Physical Chemistry**, v. 88, n. 20, p. 4671-4675, 1984.
- 112 FERGUSON, R.E., MCCULLOH, K.E., ROSENSTO, H.M. Observation of Products of Ionic Collision Processes and Ion Decomposition in a Linear Pulsed Time-of-Flight Mass Spectrometer. **Journal of Chemical Physics**, v. 42, n. 1, p. 100-106, 1965.
- 113 MAZZARINO, M., DE LA TORRE, X., DI SANTO, R., FIACCO, I., ROSI, F., BOTRE, F. Mass spectrometric characterization of tamoxifene metabolites in human urine utilizing different scan parameters on liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, n. 6, p. 749-760, 2010.
- 114 XU, R.N.X., FAN, L.M., RIESER, M.J., EL-SHOUBAGY, T.A. Recent advances in high-throughput quantitative bioanalysis by LC-MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, n. 2, p. 342-355, 2007.
- 115 QI, W.S., GUAN, Q., SUN, T.Q., CAO, Y.J., ZHANG, L., GUO, Y.L. Improving detection sensitivity of amino acids in thyroid tissues by using phthalic acid as a mobile phase additive in hydrophilic interaction chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 870, p. 75-82, 2015.
- 116 ZHAI, X.J., CHEN, F., ZHU, C.R., LU, Y.N. A simple LC-MS/MS method for quantitative analysis of underivatized neurotransmitters in rats urine: assay development, validation and application in the CUMS rat model. **Biomedical Chromatography**, v. 29, n. 8, p.45-56, 2015.
- 117 DE PUIT, M., ISMAIL, M., XU, X. LCMS analysis of fingerprints, the amino acid profile of 20 donors. **Journal of Forensic Sciences**, v. 59, n. 2, p. 364-370, 2014.
- 118 HUANG, Y., LOUIE, A., YANG, Q., MASSENKOFF, N., XU, C., HUNT, P.W., GEE, W. A simple LC-MS/MS method for determination of kynurenine and tryptophan

- concentrations in human plasma from HIV-infected patients. **Bioanalysis**, v. 5, n. 11, p. 1397-1407, 2013.
- 119 GONZALEZ, R.R., FERNANDEZ, R.F., VIDAL, J.L., FRENICH, A.G., PEREZ, M.L. Development and validation of an ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass-spectrometry (UHPLC-MS/MS) method for the simultaneous determination of neurotransmitters in rat brain samples. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 198, n. 2, p. 187-194, 2011.
- 120 HARDER, U., KOLETZKO, B., PEISSNER, W. Quantification of 22 plasma amino acids combining derivatization and ion-pair LC-MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 7-8, p. 495-504, 2011.
- 121 WATERVAL, W.A.H., SCHEIJEN, J.L.J.M., ORTMANS-PLOEMEN, M.M.J.C., HABETS-VAN DER POEL, C.D., BIERAU, J. Quantitative UPLC-MS/MS analysis of underivatized amino acids in body fluids is a reliable tool for the diagnosis and follow-up of patients with inborn errors of metabolism. **Clinica Chimica Acta**, v. 407, n. 1-2, p. 36-42, 2009.
- 122 DIETZEN, D.J., WEINDEL, A.L., CARAYANNOPOULOS, M.O., LANDT, M., NORMANSELL, E.T., REIMSCHISEL, T.E., SMITH, C.H. Rapid comprehensive amino acid analysis by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: comparison to cation exchange with post-column ninhydrin detection. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, n. 22, p. 3481-3488, 2008.
- 123 SINGLETON, C. Recent advances in bioanalytical sample preparation for LC-MS analysis. **Bioanalysis**, v. 4, n. 9, p. 1123-1140, 2012.
- 124 KIRCHHERR, H., KUHN-VELTEN, W.N. Quantitative determination of forty-eight antidepressants and antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry: a multi-level, single-sample approach. **Journal of Chromatography B**, v. 843, n. 1, p. 100-113, 2006.
- 125 HASSELSTROM, J. Quantification of antidepressants and antipsychotics in human serum by precipitation and ultra high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 1, p. 123-128, 2011.
- 126 VECCHIONE, G., CASETTA, B., CHIAPPARINO, A., BERTOLINO, A., TOMAIUOLO, M., CAPPUCCI, F., GATTA, R., MARGAGLIONE, M., GRANDONE, E. A reliable and rapid tool for plasma quantification of 18 psychotropic drugs by ESI tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 67-68, p. 104-113, 2012.
- 127 URINOVSKA, R., BROZMANOVA, H., SISTIK, P., SILHAN, P., KACIROVA, I., LEMR, K., GRUNDMANN, M. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of five antidepressants and four atypical antipsychotics and their main metabolites in human serum. **Journal of Chromatography B**, v. 907, p. 101-107, 2012.

-
- 128 ANSERMOT, N., BRAWAND-AMEY, M., KOTTELAT, A., EAP, C.B. Fast quantification of ten psychotropic drugs and metabolites in human plasma by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for therapeutic drug monitoring. **Journal of Chromatography A**, v. 1292, p. 160-172, 2013.
- 129 SEMPIO, C., MORINI, L., VIGNALI, C., GROPPA, A. Simple and sensitive screening and quantitative determination of 88 psychoactive drugs and their metabolites in blood through LC-MS/MS: application on postmortem samples. **Journal of Chromatography B**, v. 970, p. 1-7, 2014.
- 130 DI RAGO, M., SAAR, E., RODDA, L.N., TURFUS, S., KOTSOS, A., GEROSTAMOULOS, D., DRUMMER, O.H. Fast targeted analysis of 132 acidic and neutral drugs and poisons in whole blood using LC-MS/MS. **Forensic Science International**, v. 243, p. 35-43, 2014.
- 131 ALPERT, A.J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. **Journal of Chromatography**, v. 499, p. 177-196, 1990.
- 132 HEMSTROM, P., IRGUM, K. Hydrophilic interaction chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 12, p. 1784-1821, 2006.
- 133 BUSZEWSKI, B., NOGA, S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 1, p. 231-247, 2012.
- 134 LANÇAS, F.M. Cromatografia Líquida com Interação Hidrofílica (HILIC). **Scientia Chromatographica** v. 2, n. 1, p. 49-57, 2010.
- 135 MCCALLEY, D.V., NEUE, U.D. Estimation of the extent of the water-rich layer associated with the silica surface in hydrophilic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1192, n. 2, p. 225-229, 2008.
- 136 YOSHIDA, T. Peptide separation by Hydrophilic-Interaction Chromatography: a review. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 60, n. 3, p. 265-280, 2004.
- 137 GARBIS, S.D., MELSE-BOONSTRA, A., WEST, C.E., VAN BREEMEN, R.B. Determination of folates in human plasma using hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 22, p. 5358-5364, 2001.
- 138 BROWN, S.D., WHITE, C.A., BARTLETT, M.G. Hydrophilic interaction liquid chromatography/electrospray mass spectrometry determination of acyclovir in pregnant rat plasma and tissues. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 16, n. 19, p. 1871-1876, 2002.
- 139 STREGE, M.A., STEVENSON, S., LAWRENCE, S.M. Mixed-mode anion-cation exchange/hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray mass

- spectrometry as an alternative to reversed phase for small molecule drug discovery. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 19, p. 4629-4633, 2000.
- 140 IDBORG, H., ZAMANI, L., EDLUND, P.O., SCHUPPE-KOISTINEN, I., JACOBSSON, S.P. Metabolic fingerprinting of rat urine by LC/MS Part 1. Analysis by hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 828, n. 1-2, p. 9-13, 2005.
- 141 KOH, H.L., LAU, A.J., CHAN, E.C. Hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry for the determination of underivatized dencichine (beta-N-oxalyl-L-alpha,beta-diaminopropionic acid) in Panax medicinal plant species. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, n. 10, p. 1237-1244, 2005.
- 142 DELL'AVERSANO, C., HESS, P., QUILLIAM, M.A. Hydrophilic interaction liquid chromatography--mass spectrometry for the analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins. **Journal of Chromatography A**, v. 1081, n. 2, p. 190-201, 2005.
- 143 CIMINIELLO, P., DELL'AVERSANO, C., FATTORUSSO, E., FORINO, M., MAGNO, S., SANTELIA, F., TSOUKATOU, M. Investigation of the toxin profile of Greek mussels *Mytilus galloprovincialis* by liquid chromatography-mass spectrometry. **Toxicon**, v. 47, n. 2, p. 174-181, 2006.
- 144 DOMINGUES, D.S., CREVELIN, E.J., DE MORAES, L.A., CECILIO HALLAK, J.E., DE SOUZA CRIPPA, J.A., COSTA QUEIROZ, M.E. Simultaneous determination of amino acids and neurotransmitters in plasma samples from schizophrenic patients by hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 5, p. 780-787, 2015.
- 145 VAN DORPE, S., VERGOTE, V., PEZESHKI, A., BURVENICH, C., PEREMANS, K., DE SPIEGELEER, B. Hydrophilic interaction LC of peptides: columns comparison and clustering. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 6-7, p. 728-739, 2010.
- 146 FU, Q., LIANG, T., ZHANG, X., DU, Y., GUO, Z., LIANG, X. Carbohydrate separation by hydrophilic interaction liquid chromatography on a 'click' maltose column. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 18, p. 2690-2697, 2010.
- 147 BOERSEMA, P.J., MOHAMMED, S., HECK, A.J. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 1, p. 151-159, 2008.
- 148 CUBBON, S., ANTONIO, C., WILSON, J., THOMAS-OATES, J. Metabolomic applications of HILIC-LC-MS. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 29, n. 5, p. 671-684, 2010.
- 149 KATAOKA, H., SAITO, K. Recent advances in column switching sample preparation in bioanalysis. **Bioanalysis**, v. 4, n. 7, p. 809-832, 2012.
- 150 RAO, R.N., VALI, R.M., SHINDE, D.D. On-line 2D-LC-ESI/MS/MS determination of rifaximin in rat serum. **Biomedical Chromatography**, v. 23, n. 11, p. 1145-1150, 2009.

-
- 151 JAYAMANNE, M., GRANELLI, I., TJERNBERG, A., EDLUND, P.O. Development of a two-dimensional liquid chromatography system for isolation of drug metabolites. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 3, p. 649-657, 2010.
- 152 RAY, J.A., KUSHNIR, M.M., PALMER, J., SADJADI, S., ROCKWOOD, A.L., MEIKLE, A.W. Enhancement of specificity of aldosterone measurement in human serum and plasma using 2D-LC-MS/MS and comparison with commercial immunoassays. **Journal of Chromatography B**, v. 970, p. 102-107, 2014.
- 153 LI, X., WANG, F., XU, B., YU, X.W., YANG, Y., ZHANG, L., LI, H.D. Determination of the free and total concentrations of vancomycin by two-dimensional liquid chromatography and its application in elderly patients. **Journal of Chromatography B**, v. 969, p. 181-189, 2014.
- 154 ECKERT, E., GOEN, T. Rapid determination of four short-chain alkyl mercapturic acids in human urine by column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 965, p. 54-60, 2014.
- 155 FAGUNDES, V.F., LEITE, C.P., PIANETTI, G.A., FERNANDES, C. Rapid and direct analysis of statins in human plasma by column-switching liquid chromatography with restricted-access material. **Journal of Chromatography B**, v. 947-948, p. 8-16, 2014.
- 156 PARK, M., KIM, J., PARK, Y., IN, S., KIM, E., PARK, Y. Quantitative determination of 11-nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol in hair by column switching LC-ESI-MS(3). **Journal of Chromatography B**, v. 947-948, p. 179-185, 2014.
- 157 LI, D.Q., ZHAO, J., LI, S.P., ZHANG, Q.W. Discovery of xanthine oxidase inhibitors from a complex mixture using an online, restricted-access material coupled with column-switching liquid chromatography with a diode-array detection system. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 7, p. 1975-1984, 2014.
- 158 SADILEK, P., SATINSKY, D., SOLICH, P. Using restricted-access materials and column switching in high-performance liquid chromatography for direct analysis of biologically-active compounds in complex matrices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 5, p. 375-384, 2007.
- 159 ORTIZ-VILLANUEVA, E., BENAVENTE, F., GIMENEZ, E., YILMAZ, F., SANZ-NEBOT, V. Preparation and evaluation of open tubular C18-silica monolithic microcartridges for preconcentration of peptides by on-line solid phase extraction capillary electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 846, p. 51-59, 2014.
- 160 ZHANG, Y., LIU, H.Y., ZHANG, X.Y., LEI, H., BAI, L.G., YANG, G.L. On-line solid phase extraction using organic-inorganic hybrid monolithic columns for the determination of trace beta-lactam antibiotics in milk and water samples. **Talanta**, v. 104, p. 17-21, 2013.
- 161 ZHENG, M.M., WANG, S.T., HU, W.K., FENG, Y.Q. In-tube solid-phase microextraction based on hybrid silica monolith coupled to liquid chromatography-mass

- spectrometry for automated analysis of ten antidepressants in human urine and plasma. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 48, p. 7493-7501, 2010.
- 162 SOUVERAIN, S., RUDAZ, S., VEUTHEY, J.L. Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis. **Journal of chromatography B**, v. 801, n. 2, p. 141-156, 2004.
- 163 CASSIANO, N.M., BARREIRO, J.C., MORAES, M.C., OLIVEIRA, R.V., CASS, Q.B. Restricted-access media supports for direct high-throughput analysis of biological fluid samples: review of recent applications. **Bioanalysis**, v. 1, n. 3, p. 577-594, 2009.
- 164 SAUNDERS, K.C., GHANEM, A., HON, W.B., HILDER, E.F., HADDAD, P.R. Separation and sample pre-treatment in bioanalysis using monolithic phases: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 652, n. 1-2, p. 22-31, 2009.
- 165 XU, L., SHI, Z.G., FENG, Y.Q. Porous monoliths: sorbents for miniaturized extraction in biological analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, n. 10, p. 3345-3357, 2011.
- 166 NAMERA, A., NAKAMOTO, A., SAITO, T., MIYAZAKI, S. Monolith as a new sample preparation material: Recent devices and applications. **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 8, p. 901-924, 2011.
- 167 DELAUNAY, N., PICHON, V., HENNION, M.C. Immunoaffinity solid-phase extraction for the trace-analysis of low-molecular-mass analytes in complex sample matrices. **Journal of Chromatography B**, v. 745, n. 1, p. 15-37, 2000.
- 168 TAMAYO, F.G., TURIEL, E., MARTIN-ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: Recent developments and future trends. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, n. 1-2, p. 32-40, 2007.
- 169 LASAKOVA, M., JANDERA, P. Molecularly imprinted polymers and their application in solid phase extraction. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 5-6, p. 799-812, 2009.
- 170 AUGUSTO, F., CARASEK, E., SILVA, R.G.C., RIVELLINO, S.R., BATISTA, A.D., MARTENDAL, E. New sorbents for extraction and microextraction techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2533-2542, 2010.
- 171 SEGRO, S.S., TRAN, M., KESANI, S., ALHENDAL, A., TURNER, E.B., MALIK, A. Sol-gel microextraction phases for sample preconcentration in chromatographic analysis. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 19, p. 3075-3096, 2010.
- 172 HO, T.D., CANESTRARO, A.J., ANDERSON, J.L. Ionic liquids in solid-phase microextraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 695, n. 1-2, p. 18-43, 2011.
- 173 LUCENA, R., SIMONET, B.M., CARDENAS, S., VALCARCEL, M. Potential of nanoparticles in sample preparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 4, p. 620-637, 2011.

- 174 OLIVEIRA, I.M.G., DA SILVA, L.M., SANTOS-NETO, A.J., FLORENZANO, F.H., FIGUEIREDO, E.C. A new restricted access molecularly imprinted polymer capped with albumin for direct extraction of drugs from biological matrices: the case of chlorpromazine in human plasma. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 24, p. 7687-796, 2013.
- 175 WICKREMSINHE, E.R., LEE, L.B., SCHMALZ, C.A., TORCHIA, J., RUTERBORIES, K.J. High sensitive assay employing column switching chromatography to enable simultaneous quantification of an amide prodrug of gemcitabine (LY2334737), gemcitabine, and its metabolite dFdU in human plasma by LC-MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 932, p. 117-122, 2013.
- 176 KAMEI, T., UCHIMURA, T., NISHIMIYA, K., KAWANISHI, T. Method development and validation of the simultaneous determination of a novel topoisomerase 1 inhibitor, the prodrug, and the active metabolite in human plasma using column-switching LC-MS/MS, and its application in a clinical trial. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 30, p. 3415-3422, 2011.
- 177 XU, W.J., SU, S.F., JIANG, P., WANG, H.S., DONG, X.C., ZHANG, M. Determination of sulfonamides in bovine milk with column-switching high performance liquid chromatography using surface imprinted silica with hydrophilic external layer as restricted access and selective extraction material. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 46, p. 7198-7207, 2010.
- 178 SANBE, H., HAGINAKA, J. Restricted access media-molecularly imprinted polymer for propranolol and its application to direct injection analysis of beta-blockers in biological fluids. **Analyst**, v. 128, n. 6, p. 593-597, 2003.
- 179 HAGINAKA, J., SANBE, H. Uniform-sized molecularly imprinted polymers for 2-arylpropionic acid derivatives selectively modified with hydrophilic external layer and their applications to direct serum injection analysis. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 21, p. 5206-5210, 2000.
- 180 FARIA, A.M., BOTTOLI, C.B.G., JARDIM, I.C.S.F., COLLINS, C.H. Fases estacionárias monolíticas para separações cromatográficas. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 300-309, 2006.
- 181 WEN, Y., FENG, Y.Q. Preparation and evaluation of hydroxylated poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) monolithic capillary for in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1160, n. 1-2, p. 90-98, 2007.
- 182 FAN, Y., FENG, Y.-Q., ZHANG, J.-T., DA, S.-L., ZHANG, M. Poly(methacrylic acid-ethylene glycol dimethacrylate) monolith in-tube solid phase microextraction coupled to high performance liquid chromatography and analysis of amphetamines in urine samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1074, n. 1-2, p. 9-16, 2005.
- 183 MA, Q., CHEN, M., SHI, Z.G., FENG, Y.Q. Preparation of a poly(N-isopropylacrylamide-co-ethylene dimethacrylate) monolithic capillary and its

- application for in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 15-16, p. 2592-2600, 2009.
- 184 ZHENG, M.M., LIN, B., FENG, Y.Q. Hybrid organic-inorganic octyl monolithic column for in-tube solid-phase microextraction coupled to capillary high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1164, n. 1-2, p. 48-55, 2007.
 - 185 LIM, L.W., HIROSE, K., TATSUMI, S., UZU, H., MIZUKAMI, M., TAKEUCHI, T. Sample enrichment by using monolithic precolumns in microcolumn liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1033, n. 2, p. 205-212, 2004.
 - 186 GU, X., WANG, Y., ZHANG, X. Large-bore particle-entrapped monolithic precolumns prepared by a sol-gel method for on-line peptides trapping and preconcentration in multidimensional liquid chromatography system for proteome analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1072, n. 2, p. 223-232, 2005.
 - 187 XU, L., LEE, H.K. Preparation, characterization and analytical application of a hybrid organic-inorganic silica-based monolith. **Journal of Chromatography A**, v. 1195, n. 1-2, p. 78-84, 2008.
 - 188 SCHAEFER, A., PIQUARD, F., HABEREY, P. Plasma Amino-Acids Analysis - Effects of Delayed Samples Preparation and of Storage. **Clinica Chimica Acta**, v. 164, n. 2, p. 163-169, 1987.
 - 189 SAHAI, S., UHLHAAS, S. Stability of Amino-Acids in Human-Plasma. **Clinica Chimica Acta**, v. 148, n. 3, p. 255-259, 1985.
 - 190 BREIER, M., WAHL, S., PREHN, C., FUGMANN, M., FERRARI, U., WEISE, M., BANNING, F., SEISSLER, J., GRALLERT, H., ADAMSKI, J., LECHNER, A. Targeted Metabolomics Identifies Reliable and Stable Metabolites in Human Serum and Plasma Samples. **Plos One**, v. 9, n. 2, p. e89728, 2014.
 - 191 GONZALEZ, O., BLANCO, M.E., IRIARTE, G., BARTOLOME, L., MAGUREGUI, M.I., ALONSO, R.M. Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect. **Journal of Chromatography A**, v. 1353, p. 10-27, 2014.
 - 192 ANVISA. Disponível em:
<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/564310004b60537e891f9baf8fded4db/RDC+27+12+-Valida%C3%A7%C3%A3o+de+M%C3%A9todos+Bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 27 jul 2015.
 - 193 LE, A., NG, A., KWAN, T., CUSMANO-OZOG, K., COWAN, T.M. A rapid, sensitive method for quantitative analysis of underivatized amino acids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Journal of Chromatography B**, v. 944, p. 166-174, 2014.

-
- 194 YAN, L., ZHANG, Q., ZHANG, J., ZHANG, L., LI, T., FENG, Y., ZHANG, L., ZHANG, W., ZHANG, Y. Hybrid organic-inorganic monolithic stationary phase for acidic compounds separation by capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1046, n. 1-2, p. 255-261, 2004.
- 195 ZHANG, G., TERRY, A.V., JR., BARTLETT, M.G. Simultaneous determination of five antipsychotic drugs in rat plasma by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B**, v. 856, n. 1-2, p. 20-28, 2007.
- 196 BHATT, J., SUBBAIAH, G., SINGH, S. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of risperidone and its active metabolite 9-hydroxyrisperidone in human plasma. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, n. 14, p. 2109-2114, 2006.
- 197 LEE, D.Y., BOWEN, B.P., NORTHEN, T.R. Mass spectrometry-based metabolomics, analysis of metabolite-protein interactions, and imaging. **BioTechniques**, v. 49, n. 2, p. 557-565, 2010.
- 198 FINOULST, I., PINKSE, M., VAN DONGEN, W., VERHAERT, P. Sample preparation techniques for the untargeted LC-MS-based discovery of peptides in complex biological matrices. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, v. 2011, p. 1-14, 2011.
- 199 BERNAL, J., ARES, A.M., POL, J., WIEDMER, S.K. Hydrophilic interaction liquid chromatography in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 42, p. 7438-7452, 2011.
- 200 WU, Z.Y., LIU, J.F., SHI, H., MARRIOTT, P.J. The retention behaviour of amino acids in hydrophilic interaction liquid chromatography on zwitterionic stationary phases. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 14, p. 2217-2222, 2013.
- 201 CHOI, S.S., SONG, M.J., KIM, O.B., KIM, Y. Fragmentation patterns of protonated amino acids formed by atmospheric pressure chemical ionization. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 27, n. 1, p. 143-151, 2013.
- 202 BOURCIER, S., BENOIST, J.F., CLERC, F., RIGAL, O., TAGHI, M., HOPPILLIARD, Y. Detection of 28 neurotransmitters and related compounds in biological fluids by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, n. 9, p. 1405-1421, 2006.
- 203 LU, W., KIMBALL, E., RABINOWITZ, J.D. A high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantitation of nitrogen-containing intracellular metabolites. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 17, n. 1, p. 37-50, 2006.
- 204 HIEMKE, C., BAUMANN, P., BERGEMANN, N., CONCA, A., DIETMAIER, O., EGBERTS, K., FRIC, M., GERLACH, M., GREINER, C., GRUNDER, G., HAEN, E., HAVEMANN-REINECKE, U., SIROT, E.J., KIRCHHERR, H., LAUX, G., LUTZ, U.C., MESSER, T., MULLER, M.J., PFUHLMANN, B., RAMBECK, B., RIEDERER, P., SCHOPPEK, B., STINGL, J., UHR, M., ULRICH, S., WASCHGLER, R., ZERNIG,

- G. AGNP Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Psychiatry: Update 2011. **Pharmacopsychiatry**, v. 44, n. 6, p. 195-235, 2011.
- 205 LI, Q.Z., HUANG, Q.X., LI, S.C., YANG, M.Z., RAO, B. Simultaneous determination of glutamate, glycine, and alanine in human plasma using precolumn derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate and high-performance liquid chromatography. **Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, v. 16, n. 5, p. 355-360, 2012.
- 206 GOLDSTEIN, D.S., EISENHOFER, G., KOPIN, I.J. Sources and significance of plasma levels of catechols and their metabolites in humans. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 305, n. 3, p. 800-811, 2003.
- 207 LI, W., FRIES, D.P., MALIK, A. Sol-gel stationary phases for capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1044, n. 1-2, p. 23-52, 2004.
- 208 WU, M., WU, R., ZHANG, Z., ZOU, H. Preparation and application of organic-silica hybrid monolithic capillary columns. **Electrophoresis**, v. 32, n. 1, p. 105-115, 2011.
- 209 MCKEAN, A., VELLA-BRINCAT, J., BEGG, E. Prescribing and monitoring clozapine in christchurch. **Australasian Psychiatry**, v. 16, n. 4, p. 263-267, 2008.
- 210 MATKÓ, S., TOLDY, A., KESZEI, S., ANNA, P., BERTALAN, G., MAROSI, G. Flame retardancy of biodegradable polymers and biocomposites. **Polymer Degradation and Stability**, v. 88, n. 1, p. 138-145, 2005.
- 211 INNOCENZI, P. Infrared spectroscopy of sol-gel derived silica-based films: a spectral-microstructure overview. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 316, n. 2-3, p. 309-319, 2003.
- 212 AL-OWEINI, R., EL-RASSY, H. Synthesis and characterization by FTIR spectroscopy of silica aerogels prepared using several Si(OR)₄ and R''Si(OR')₃ precursors. **Journal of Molecular Structure**, v. 919, n. 1-3, p. 140-145, 2009.
- 213 WAHAB, M. Hybrid periodic mesoporous organosilica materials prepared from 1,2-bis(triethoxysilyl)ethane and (3-cyanopropyl)triethoxysilane. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 69, n. 1-2, p. 19-27, 2004.
- 214 MALDANER, L., COLLINS, C.H., JARDIM, I.C.S.F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1559-1568, 2010.
- 215 SILVA, B.J.G., LANÇAS, F.M., QUEIROZ, M.E.C. In-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography (in-tube SPME/LC) analysis of nontricyclic antidepressants in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 862, n. 1-2, p. 181-188, 2008.
- 216 SILVA, B.J.G., LANÇAS, F.M., QUEIROZ, M.E.C. Determination of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in human plasma by polypyrrole-coated capillary in-tube

solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 49, p. 8590-8597, 2009.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A - SUMULA CURRICULAR

1. FORMAÇÃO

Ano	Título	Instituição
2008	Graduação	Universidade Estadual de Londrina - UEL
2011	Mestrado	Universidade Estadual de Londrina - UEL
2015	Doutorado	Universidade de São Paulo - USP

2. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

2.1) DOMINGUES, D.S.; SOUZA, I.D. Queiroz, M.E.C. Analysis of drugs in plasma samples from schizophrenic patients by column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry with organic-inorganic hybrid cyanopropyl monolithic column. Journal of Chromatography. B (Print) **JCR**, p. 26-35, 2015.

2.2) SOUZA, I.D.; DOMINGUES, D.S.; QUEIROZ, M.E.C. Hybrid silica monolith for microextraction by packed sorbent to determine drugs from plasma samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Talanta (Oxford) **JCR**, v. 140, p. 166-175, 2015.

2.3) JARDIM, V.C.; MELO, L.P.; DOMINGUES, D.S.; QUEIROZ, M.E.Q. Determination of parabens in urine samples by microextraction using packed sorbent and ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography. B (Print) **JCR**, v. 974, p. 35-41, 2015.

2.4) DOMINGUES, D.S.; CREVELIN, E.J.; MORAES, L.A.B.; HALLAK, J.E.C.; CRIPPA, J. A. S.; QUEIROZ, M. E. Q. Simultaneous determination of amino acids and neurotransmitters in plasma samples from schizophrenic patients by hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry. Journal of Separation Science (Print) **JCR**, v. 38, p. 780-787, 2014.

3. ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

3.1) DOMINGUES, D.S.; SOUZA, I.D.; PINTO, M.A.L.; HALLAK, J.E.C.; CRIPPA, J. A. S.; QUEIROZ, M.E.C. Determination of drugs in plasma samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for therapeutic drug monitoring of schizophrenic patients. Journal of Analytical Toxicology, 2015.

4. LISTA DE FINANCIAMENTOS À PESQUISA

4.1) Bolsa do CNPq de *Doutorado*, Cota Institucional (Demanda Social), Processo: 141747/2012-9, Vigência de 05/2012 a 08/2015.

5. CURSO MINISTRADO

5.1) Análise de Fármacos em Fluidos Biológicos por LC-MS/MS. 2014. EVTOX – Escola de Verão em Toxicologia. Ribeirão Preto.

6. RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

6.1) DOMINGUES, D. S.; SOUZA, I. D.; QUEIROZ, M. E. C. Two-dimensional ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry system to determine drugs in plasma samples from the schizophrenic patients. 38th International Symposium on Chromatography, 2014, Riva Del Garda.

6.2) SOUZA, I. D.; DOMINGUES, D. S.; QUEIROZ, M. E. C. Síntese do sorvente monolítico híbrido (Sílica) para análises MEPS/LC-MS/MS de fármacos em plasma. Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins, 2014, Campos do Jordão.

6.3) DOMINGUES, D. S.; SOUZA, I. D.; QUEIROZ, M. E. C. Determinação de fármacos em plasma de pacientes esquizofrênicos por 2D(monolítico/C18)-LC-MS/MS. Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins, 2014, Campos do Jordão.

6.4) SOUZA, I. D.; DOMINGUES, D. S.; QUEIROZ, M. E. C. Synthesis and characterization of cyanopropyl and aminopropyl hybrid silica monolithic sorbents to extract drugs from plasma samples by microextraction in a packed syringe (MEPS). 38th International Symposium on Chromatography, 2014, Riva Del Garda.

6.5) DOMINGUES, D. S.; CREVELIN, E. J.; MORAES, L. A. B.; QUEIROZ, M. E. C. A HILIC-MS/MS method to determine underivatized amino acids and neurotransmitters in human plasma samples to elucidate schizophrenia. 15th International Symposium on Advances in Extraction Technologies, 2013, João Pessoa.

6.6) SOUZA, I. D.; DOMINGUES, D. S.; QUEIROZ, M. E. C. Monolithic silica sorbents to extract antidepressants from aqueous samples by microextraction in a packed syringe (MEPS). 15th International Symposium on Advances in Extraction Technologies, 2013, João Pessoa.

6.7) DOMINGUES, D. S.; JARDIM, V. C.; QUEIROZ, M. E. C. Otimização da etapa de derivatização para análises de aminoácidos em amostras de plasma por cromatografia líquida com detecção fluorimétrica (LC-FLD). XIV Colacro - Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas, 2012, Florianópolis.

ANEXO B - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

"Campus" de Ribeirão Preto

Of.CEtP/FFCLRP-USP/147I-jsl

Ribeirão Preto, 08 de novembro de 2011.

Prezada Pesquisadora,

Comunicamos a V. Sa. que o trabalho intitulado **"CROMATOGRAFIA LÍQUIDA BIDIMENSIONAL COM DETECÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM TANDEM (2D-LC-MS/MS) PARA DETERMINAÇÃO DE NEUROTRANSMISSORES, AMINOÁCIDOS E FÁRMACOS EM AMOSTRAS DE PLASMA PARA ELUCIDAÇÃO DA NEUROBIOLOGIA DA ESQUIZOFRENIA E MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA"** foi reanalisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FFCLRP-USP, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Processo CEP-FFCLRP nº 591/2011 - 2011.1.1664.59.2.

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª ANA RAQUEL LUCATO CIANFLONE
Coordenadora

À Senhora
Prof. Dr. Maria Eugênia Costa Queiroz
Docente do Departamento de Química da FFCLRP - USP

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa da FFCLRP
Fone: (16) 3602-4811
Fax: (16) 3633-2660 (direto) ou 3633-5015
Avenida Bandeirantes, 3900 - bloco 3 - sala 16 - 14040-901 - Ribeirão Preto - SP - Brasil
Homepage: <http://www.ffclrp.usp.br> - e-mail: coetp@ffclrp.usp.br