



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

Desenvolvimento da fase monolítica de sílica híbrida com os grupos amino e ciano para a determinação de aminoácidos em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos através do acoplamento direto da técnica *in-tube* SPME ao sistema MS/MS.

Luis Felipe Cabral Miranda

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

2019



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

Desenvolvimento da fase monolítica de sílica híbrida com os grupos amino e ciano para a determinação de aminoácidos em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos através do acoplamento direto da técnica *in-tube* SPME ao sistema MS/MS.

Luis Felipe Cabral Miranda

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.**

Orientadora: Profa. Dra. Maria Eugênia Queiroz Nassur

Ribeirão Preto – SP

2019

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.

Miranda, Luis Felipe Cabral.

Desenvolvimento de uma fase monolítica a base de sílica híbrida duplamente ligada para determinação direta de aminoácidos e neurotransmissores em amostras de plasma por in-tube SPME-MS/MS.. Ribeirão Preto, 2019.

**117 p.:** il.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química analítica

Orientador: Nassur, Maria Eugênia Queiroz

1. monolito de sílica híbrida bifuncional
2. *In-tube* SPME-MS/MS.
3. Aminoácidos.
4. Amostras de plasma
5. Esquizofrenia.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: Luis Felipe Cabral Miranda

Título do trabalho: Desenvolvimento de uma fase monolítica a base de sílica híbrida duplamente ligada para determinação direta de aminoácidos e neurotransmissores em amostras de plasma por in-tube SPME-MS/MS.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Química.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho aos  
meu pais, Maria Helena e  
Jair pelo exemplo de vida,  
apoio e motivação.*

## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Dra. Maria Eugênia Queiroz Nassur pela valiosa orientação, paciência e ajuda incansável durante a realização deste trabalho. Sou grato por todos os ensinamentos, acompanhamento e conhecimento compartilhado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (nº do processo 2015/07619-1) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, processo Nº 26/2014, 466805/2014-4) pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

Aos professores Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira, Dra. Rogéria Rocha Gonçalves Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes e pelo incentivo e conhecimentos transmitidos.

Aos amigos de laboratório Vinicius Ricardo Acquaro Jr e Eduardo José Crevelin pela ajuda incansável e momentos de descontração no decorrer deste trabalho.

Aos amigos de laboratório Caroline Grecco Dias, Israel Donizete de Souza, Jonas Carneiro, Diego Soares Domingues, Camila Marchioni, Andresa Bresler, Igor Gustavo, Monia Lemos, Yzadora Souza, Lidia Miranda, Tamires Valim e agregados do laboratório do profº Anderson pelos momentos de descontração no decorrer deste trabalho.

Aos técnicos de laboratório Mércia, Tiago, Valdir, Luiza e Zanato pela ajuda e descontração na preparação das aulas práticas durante o Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE).

A todos os meus amigos de Ribeirão Preto, Marcelo Gonçalves, Guilherme Alves, Fabio Alves, Paulo Fabricio, Laura Ferro, Laura Mattoso, grupo “parabéns tartariga”, Wendell Camilo, Marianne Lesur, Gabriela Pirani, Alexandre Custódio, Cristiano Messias e vários outros pela amizade, apoio e companheirismo.

A minha namorada Fernanda de Rezende pelo amor, amizade e incentivo, sendo essencial no final desta trajetória.

A toda minha família, em especial meus pais por todo o amor, ajuda e apoio que me fizeram chegar até aqui.

À Deus por me dar forças e fazer meu caminho se cruzar com o de pessoas tão queridas, eu agradeço.

A todos os que não citei, mas que de alguma forma me ajudaram na concretização deste trabalho.

## Resumo

CABRAL MIRANDA, L. F. **Desenvolvimento de uma fase monolítica a base de sílica híbrida duplamente ligada para determinação direta de aminoácidos e neurotransmissores em amostras de plasma por *in-tube* SPME-MS/MS**. 2019. 117f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A esquizofrenia é um transtorno neuropsiquiátrico que atinge aproximadamente 1% da população mundial, caracterizada principalmente pela perda ou diminuição das capacidades mentais (embotamento emocional), por alucinações (percepções irreais, sobretudo auditivas) e delírios. As teorias neurobiológicas defendem que a esquizofrenia é essencialmente causada por alterações bioquímicas e estruturais do cérebro, em especial por disfunções serotoninérgica, dopaminérgica e glutamatérgica, embora alterações em outros neurotransmissores estejam também envolvidas na fisiopatologia desta doença. Neste contexto, a determinação de aminoácidos (AA) em fluidos biológicos é uma importante ferramenta para a elucidação dos sistemas neurais e diagnóstico da doença. A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) tem sido considerada a técnica analítica de referência para bioanálises. Recentes avanços na área de preparo de amostras incluem o acoplamento direto de técnicas de microextração ao sistema de espectrometria de massas (MS/MS). Nesta tese, o método empregando a técnica de microextração em fase sólida no capilar (*in-tube* SPME) acoplada diretamente ao sistema MS/MS (*in-tube* SPME-MS/MS) foi desenvolvido e validado para a determinação dos AAs (alanina, serina, leucina, isoleucina, aspartato, lisina, metionina, tirosina, triptofano e glutamato) em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos. O capilar monolítico de sílica híbrida com grupos amino e ciano incorporados foi sintetizado pelo processo sol-gel e caracterizado (microscopia eletrônica de varredura, infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), adsorção e dessorção de nitrogênio, e difração de raios X) para a extração seletiva *in-tube* SPME. A fase monolítica apresentou estrutura homogênea e porosa formando uma rede contínua e segundo os espectros FTIR, os grupos amino e ciano foram incorporados. A área superficial específica e o volume total de poros obtidos foram de  $64.12 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  e  $0.064 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ , respectivamente, já a capacidade sortiva foi de 2,56 a  $7,52 \text{ } \mu\text{g cm}^{-3}$  para para todos os analitos. Segundo os parâmetros de validação analítica avaliados, principalmente a faixa de linearidade, o método *in-tube* SPME-MS/MS é adequado para a determinação de AA em amostras de plasma. Em razão da seletividade tanto do capilar monolítico desenvolvido quanto do sistema MS/MS (modo MRM), o inovador acoplamento direto da técnica *in-tube* SPME ao sistema MS/MS foi aplicado com sucesso na determinação de AAs em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos.

**Palavras-chave:** Acoplamento direto *in-tube* SPME-MS/MS, fase monolítica de sílica híbrida com os grupos amino e ciano incorporados, aminoácidos, amostras de plasma, esquizofrenia.

## Abstract

CABRAL MIRANDA, L. F. Development of a silica-based monolithic phase containing amino and ciano groups to determine amino acids in schizophrenic patients' plasma samples by direct coupling of in-tube SPME with tandem mass spectrometry. 2019. 117f. Thesis (Ph.D. - Degree) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Schizophrenia is a chronic neuropsychiatric disorder that affects approximately 1% of the world population. This disorder is characterized by decreased mental capacity or even its loss, hallucinations, and delusions. Neurobiological theories say that schizophrenia stems from biochemical and structural alterations in the brain due to dysfunction in the glutamatergic, dopaminergic, and serotonergic systems. However, alterations in other neurotransmitters are also related to the pathophysiology of this disorder. In this context, determining amino acids and neurotransmitters in biological fluids is a powerful tool to elucidate neural systems. Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) has been considered the analytical reference technique for bioanalyses. Newly developed methods in the sample preparation field include devices such as solid-phase microextraction (SPME) with biocompatible phases, which is directly coupled to the MS/MS instrumentation. This Thesis describes direct coupling of the in-tube solid-phase microextraction (in-tube SPME) technique to a tandem mass spectrometry system (MS/MS) to determine amino acids (AA) and neurotransmitters (NT) (alanine, serine, isoleucine, leucine, aspartic acid, glutamic acid, lysine, methionine, tyrosine, and tryptophan) in schizophrenic patients' plasma samples. An innovative organic-silica hybrid monolithic capillary with bifunctional groups (amino and cyano) was synthesized by the sol-gel process; characterized by scanning electron microscopy, Fourier-transform infrared spectrometry, X-ray diffraction, nitrogen sorption experiments, and adsorption experiments; and applied in selective extraction in-tube SPME. The monolithic phase comprised a homogeneous, continuous, and porous skeleton consisting of interconnected particles. According to the FTIR spectra, ciano and amino grupos were incorporated into the monolithic structure. The specific BET surface area and pore volume were  $64.12 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  and  $0.064 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ , respectively. The monolithic capillary presented sorption capacity (binding affinity) of 2.56 to  $7.52 \mu\text{g cm}^{-3}$  for the analytes. According to the evaluated analytical validation parameters (mainly

linearity), the proposed method proved to be suitable for amino acid determination in plasma samples. The selectivity of both the monolithic capillary and the MS/MS system enabled direct coupling of the in-tube SPME technique with MS/MS and its successful application to determine the target AA and NT in schizophrenic patients' plasma samples.

Keywords: direct coupling in-tube SPME-MS/MS; organic-silica hybrid monolith capillary with amino and cyano; amino acids; plasma samples, schizophrenia

## Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura dos aminoácidos estudados neste trabalho.....	26
Figura 2. Reações de hidrólise e condensação durante o processo sol-gel utilizando o precursor TEOS. ....	40
Figura 3. Precursores Sol-Gel a base de silício. ....	41
Figura 4. Esquema In-tube SPME-MS/MS. As linhas em azul sinalizam a trajetória da fase móvel bombeada pela QSM ou pelo reservatório A; (a) Válvula MS/MS na posição 1; (b) Válvula MS/MS na posição 2. QSM – Quaternary Solvent Manager; ESI = Electro spray Ionizatio .....	56
Figura 5. (a) Avaliação da sorção dos diferentes monolitos sintetizados a partir dos procedimentos de 1 a 4 (Tabela 3). O procedimento analítico está descrito no item 3.6. ....	65
Figura 6. (a) Avaliação de metanol e etanol como solvente de síntese. (b) Áreas dos picos dos analitos obtidas após extração utilizando capilares obtidos pelos procedimentos 1 (60°C) e procedimento 6 (22°C). O procedimento é descrito no item 3.6. ....	67
Figura 7. MEV em diferentes ampliações do monolito híbrido com cianopropil e aminopropil sintetizado. (a) capilar monolítico (200 x); (b) zoom demonstrando a morfologia do monolito híbrido (5000 x).; (c) zoom da parte inferior, demonstrando a ligação do monolito. ....	68
Figura 8. Espectro FTIR do monólito de sílica híbrida.....	70
Figura 9. Espectro de difração de raios-x do monolito de sílica híbrida contendo os grupos cianopropil e aminopropil incorporados. ....	72
Figura 10. Rotas de fragmentação para a formação do íon $[M + H - H_2O - CO]$ ....	74
Figura 11. Representação da estrutura dos íons envolvidos nas transições MS/MS para: (a) GABA (Ácido $\gamma$ -aminobutírico), (b) glutamato, (c) alanina e (d) triptofano, (e) metionina, (f) tirosina, (g) leucina, (h) isoleucina, (i) lisina, (j) aspartato e (k) serina .....	75
Figura 12. Áreas dos picos cromatográficos dos analitos das análises in-tube SPME-MS/MS de amostras de plasma (200 $\mu$ L) de plasma, utilizando diferentes solventes para reconstituir o extrato seco após a etapa de pré-preparo da amostra. Os solventes avaliados foram os seguintes: acetonitrila com 0,1 % de hidróxido de	

amônio, acetonitrila, acetonitrila com 0,1% (v/v) de ácido fórmico e acetonitrila com 0,2% (v/v) de ácido fórmico. HA = hidróxido de amônio; AF = Ácido fórmico.....	76
Figura 13. Cromatogramas das análises in-tube SPME-DAD para a otimização do tempo para a sorção dos analitos junto ao capilar e exclusão dos interferentes da amostra de plasma. O capilar monolítico foi conectado ao DAD e após a etapa do pré-preparo das amostras d de plasma (item 3.5), o extrato seco foi reconstituído em solução de acetonitrila com 0,1% (v/v) de ácido fórmico e 10 µL foram injetados. Sorção dos analitos utilizando ACN como fase móvel durante (a) 2 min, (b) 5 min e (c) 10 min. ....	78
Figura 14. Otimização do volume de solução da amostra, após precipitação das proteínas de 200 µL plasma (item 3.5). O extrato seco foi reconstituído em 25, 50 e 100 µL de solução de acetonitrila com 0,1% (v/v) de ácido fórmico e 10 µL foram injetados.....	79
Figura 15. Otimização da fase móvel (acetonitrila e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico) para etapa de pré concentração dos analitos. Após a precipitação das proteínas (seção 3.5) o extrato seco foi reconstituído em 50 µL de acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico e 10 µL foram injetados. AF= ácido fórmico.....	79
Figura 16. Avaliação da água, água com 0,01% (v/v) de ácido fórmico e água com 10% (v/v) de acetonitrila como fase móvel para a eluição dos analitos. Após a precipitação das proteínas (seção 3.5) da amostra de plasma, o extrato seco foi reconstituído em 50 µL de acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico e 10 µL foram injetados.....	81
Figura 17. (a) Avaliação do efeito da infusão combinada pós coluna capilar na resposta analítica do método in-tube SPME-MS/MS; (b) Avaliação do comprimento do capilar na resposta analítica do método in tube SPME-MS/MS. Após a precipitação das proteínas (seção 3.5) o extrato seco foi reconstituído em 50 µL de acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico e 10 µL foram injetados.....	82
Figura 18. Curvas analíticas referentes a resposta analítica de soluções padrão (CAA, de 0.150 a 4.5 µMol mL <sup>-1</sup> ) injetadas diretamente no espectrômetro de massas (MS/MS) em função da massa de analito injetada (Qi). Qi = Vi x CAA, onde Vi corresponde ao volume injetado). (a) soluções padrão de triptofano; (b) soluções padrão de leucina.....	83
Figura 19. Isoterma de adsorção do capilar monolítico de sílica híbrida para triptofano e leucina. Soluções padrão em água foram injetadas no sistema in-tube SPME-	

MS/MS e a quantidade adsorvida na fase monolítica foi estimada para plotagem desta curva. O ponto de saturação ocorre quando um aumento na concentração dos compostos (CAA) não causou aumento significativo na quantidade adsorvida no capilar monolítico. ....	84
Figura 20. Curvas analíticas realizadas por adição de padrão do método in-tube SPME-MS/MS. (a) realizadas a partir do pré tratamento de 200 µL de plasma (seção 3.5); (b) realizadas em plasma sintético enriquecida com alanina (290 µmol mL <sup>-1</sup> ), leucina somado com isoleucina (218 µmol mL <sup>-1</sup> ), metionina (10 µmol mL <sup>-1</sup> ) e tirosina (40 µmol mL <sup>-1</sup> ) pré tratada de forma análoga ao plasma (seção 3.5).....	88
Figura 21. Cromatogramas representativos da análise In-tube SPME-MS/MS de amostra de plasma de paciente esquizofrênico. ....	92

## Lista de tabelas

Tabela 1. Aplicações da técnica <i>in-tube</i> SPME-LC na análise de diferentes substâncias .....	32
Tabela 2 Recentes métodos analíticos empregando fases monolíticas de sílica híbrida .....	38
Tabela 3. Diferentes procedimentos avaliados para o procedimento de síntese da fase monolítica no capilar de sílica fundida .....	52
Tabela 4. Etapas do método <i>in-tube</i> SPME-MS/MS .....	57
Tabela 5. Transições MS/MS (modo SRM), energia do cone (PC), energia de colisão (CE) e transições selecionadas (Íon precursor e íons produtos) para cada um dos analitos em estudado. Íon produto 1 foi utilizado para quantificação enquanto o íon produto 2 foi utilizado para qualificação.....	73
Tabela 6. Parâmetros de linearidade para método <i>in tube</i> SPME-MS/MS em amostras de plasma .....	86
Tabela 7. Média dos coeficientes angulares (b) das curvas analíticas (n = 4) obtidas pela análise de amostras de plasma e aquosas enriquecidas com os analitos.....	87
Tabela 8. Precisão e exatidão intra e interensaios do método <i>in-tube</i> SPME-MS/MS para a determinação de alanina, serina, isoleucina, leucina, aspartato, glutamato, lisina, metionina, tirosina e triptofano em amostra de plasma .....	90
Tabela 9. Concentrações (nmol mL <sup>-1</sup> ) médias de alanina, leu/iso, metionina, tirosina, triptofano, serina, glutamato, lisina e aspartato determinadas em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos, n= 6.....	92
Tabela 10. Comparação do método <i>in-tube</i> SPME-MS/MS proposto com os descritos na literatura .....	93

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	Serotonina
AA	Aminoácidos
ACN	Acetonitrila
AF	Ácido fórmico
AMPA	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazole-4-propionico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APTES	(3-aminopropil)trietoxissilano
BET	BET Brunauer, Emmet e Teller
BJH	BJH Barret, Joyner e Halenda
BMA	Butil metacrilato
CE	Energia de colisão
CG-MS/MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas em tandem
CN-TEOS	3-cianopropiltrietoxissilano
CQ	Controle de qualidade
CQA	Controle de qualidade alto
CQB	Controle de qualidade baixo
CQM	Controle de qualidade médio
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
CV	Coefficiente de variação
DAD	Detector de arranjo de diodos
Dp	Diâmetro médio dos mesoporos
DP	Potencial do cone
DRX	Difração de raio-X
EGDMA	Etileno glicol dimetacrilato
ELL	Extração líquido-líquido
EPR	Erro padrão relativo
EtOH	Etanol
FD	Detector de fluorescência
FTIR	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho por transformada de Fourier
HA-UF	monolito funcionalizado com hialuronato
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
<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
LSQ	Limite superior de quantificação

LTP	potenciação de longo prazo
MEPS	Microextração em sorvente empacotado
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NMDA	N-metil-D-aspartato
PCP	cloridrato de fenciclidina
PEEK	“poly ethyl ethyl ketone”.
PEG	Polietilenoglicol
PI	Padrão interno
PPT	Precipitação de proteínas
PRO	1-propanol
PSG	Processo sol-gel
QSM	“ <i>Quaternary Solvent Manager</i> ” bomba quaternária
RMN Ressonância magnética nuclear	Ressonância magnética nuclear
SE	Solvente eutético
SHMT	serina hidroximetil transferase
SNC	Sistema nervoso central
SPE	Extração em fase sólida
SRM	Modo de monitoramento de reações selecionadas
TEOS	Tetraetil ortossilicato
$t_R$	Tempo de retenção
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra performance
UV	detector de ultravioleta
VC <sub>6</sub> IM	1-vinil 3- hexil imidazol
VC <sub>16</sub> IM	1-vinil 3-hexadecil imidazol
$V_m$	Volume de fase imobilizada no capilar
VPBA	Ácido polivinil borônico

## Lista de símbolos

Å	Ångström
µL	microlitro
min	minuto
°C	grau Celsius
L/h	litro/hora
kV	kilovolt
λ	comprimento de onda
µm	micrômetro
Da	Dalton
mg	miligrama
mL.min <sup>-1</sup>	mililitros/minuto
nm	nanômetro
v/v	v/v

## Sumário

1. Introdução.....	22
1.1 Esquizofrenia.....	22
1.2 Aminoácidos e esquizofrenia.....	26
1.3 In-tube SPME (microextração em fase sólida no tubo) .....	30
1.4 Fases extratoras utilizadas na in-tube SPME.....	33
1.5 Fases monolíticas .....	34
1.5.1 Classificação das fases monolíticas .....	35
1.5.2 Fases monolíticas a base de sílica híbrida .....	36
1.5.3 Síntese dos monólitos de sílica híbrida .....	39
1.5.4 Precursores .....	40
1.5.5 Solvente de síntese .....	41
1.5.6 Catálise.....	42
1.5.7 Aditivos direcionadores de poros.....	43
1.6 Monolitos de sílica híbrida bifuncionais .....	43
1.7 Caracterização das fases monolíticas de sílica híbrida .....	44
1.7.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	44
1.7.2 Espectroscopia Vibracional na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) .....	45
1.7.3 Adsorção/dessorção de nitrogênio .....	45
2. Objetivos.....	48
3. Materiais e Métodos.....	50
3.1 Padrões e reagentes .....	50
3.2 Amostras de plasma.....	50
3.3 Síntese do capilar monolítico híbrido com grupos cianopropil e aminopropil incorporados. ....	51
3.4 Caracterização do capilar monolítico de sílica híbrida.....	52
3.5 Pré tratamento das amostras de plasma.....	53

3.6	In-tube SPME-MS/MS .....	53
3.6.1	Condições MS/MS .....	53
3.6.2	Procedimento in-tube SPME-MS/MS.....	54
3.7	Otimização da condições in-tube SPME-MS/MS .....	57
3.8	Avaliação da capacidade de sorção do capilar monolítico .....	58
3.9	Validação analítica .....	59
4.	Resultados e Discussão .....	62
4.1	Síntese do capilar monolítico híbrido com grupos cianopropil e aminopropil incorporados. ....	62
4.2	Caracterização do capilar monolítico de sílica híbrida.....	67
4.2.1	Microscopia eletrônica de Varredura .....	67
4.2.2	Espectroscopia vibracional no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	69
4.2.3	Adsorção/dessorção de nitrogênio .....	70
4.2.4	Difração de Raios-x .....	71
4.3	Otimização do in-tube SPME-MS/MS .....	72
4.3.1	Condições MS/MS .....	72
4.3.2	Otimização da etapa de pré concentração dos analitos .....	76
4.3.3	Otimização da etapa de eluição dos analitos.....	80
4.4	Capacidade de adsorção do capilar monolítico .....	82
4.5	Validação analítica .....	85
4.5.1	Linearidade .....	85
4.5.2	Efeito de matriz.....	86
4.5.3	Efeito residual, precisão e exatidão .....	89
4.5.4	Estabilidade .....	91
4.5.5	Determinação dos aminoácidos em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos.....	91
4.6	Comparação do método proposto com os descritos na literatura .....	92

5. Conclusões .....	96
6. Referencias.....	98

# Introdução

## 1. Introdução

### 1.1 Esquizofrenia

A esquizofrenia é um transtorno neuropsiquiátrico que atinge aproximadamente 1% da população mundial. Esta doença manifesta-se a partir do final da adolescência à idade adulta com maior frequência em indivíduos do sexo masculino (Charlson *et al.*, 2018).

A esquizofrenia é manifestada em sua forma crônica em 95% dos pacientes, onde apenas 15% são capazes de apresentar interações sociais, atividades remuneradas e vida familiar. O número de tentativas de suicídio entre pacientes esquizofrênicos é cerca de 2 a 5 vezes maior que a observada na população, sendo esta a principal causa de morte prematura dos pacientes. Cerca de 10% dos portadores da esquizofrenia tem sucesso na tentativa de suicídio (Siris, 2001; Welham *et al.*, 2008). O transtorno psicótico esquizofrênico é caracterizado como um grupo de patologias que atinge todas as classes sociais, manifestando-se de maneira peculiar em cada paciente.

O diagnóstico da esquizofrenia baseia-se exclusivamente em sua sintomatologia clínica, uma vez que ainda não foi estabelecido nenhum biomarcador direto para esta doença (Janoutova *et al.*, 2016). Os sinais clínicos podem ser divididos em duas categorias: os sintomas positivos e os sintomas negativos.

Os sintomas positivos são aqueles que estão diretamente relacionados aos eventos psicóticos, os quais incluem delírios, alucinações (percepção de algo inexistente como real) que podem ocorrer na audição, visão olfato, paladar, tato. Além disso os pacientes podem apresentar 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 distorções da realidade (Häfner e An Der Heiden, 1997; Afonso, 2002; Welham *et al.*, 2008).

Por outro lado, os sintomas negativos estão relacionados a perda de alguma habilidade mental, podendo envolver, isolamento social, embotamento ou perda de uma gama de funções afetivas e conativas, ou até mesmo deficiência intelectual (Tandon *et al.*, 2009). Geralmente é mais difícil diagnosticar a doença por observação dos sintomas negativos uma vez que são inespecíficos podendo ocorrer

por diversos outros fatores como efeitos adversos de medicamentos, transtornos de humor, subestimação ambiental ou desmoralização (Afonso, 2002).

Apesar da etiologia não ser conhecida, sabe-se que uma série de fatores podem ter um papel considerável no desenvolvimento da doença (Lisman *et al.*, 2008; Janoutova *et al.*, 2016; Stahl, 2018). Desta forma, diversas teorias foram criadas na tentativa de elucidar as causas da doença. Dentre as teorias estabelecidas podemos destacar:

- Teoria psicanalítica.

Baseia-se na teoria freudiana de psicanálise remetendo para fase oral do desenvolvimento psicológico onde a ausência de gratificação verbal ou de relação inicial entre mãe e bebê conduz à frieza ou desinteresse no estabelecimento das relações. Esta ausência estabelecida pela ausência de gratificação na relação inicial seria a causa da esquizofrenia. Atualmente esta teoria postula que vários sintomas possui um significado para cada paciente em particular. Por exemplo, as alucinações são tentativas regressivas e repressivas do paciente criar uma nova realidade ou expressar medos e impulsos ocultos.

- Teoria genética

Diz que o risco de desenvolvimento da doença está diretamente associado ao grau de parentesco biológico de um indivíduo afetado (Gottesman e Erlenmeyer-Kimling, 2001). Fato contrário a esta premissa pode ser observado uma vez que a grande maioria dos pacientes esquizofrênicos sequer possuem um familiar afetado pela doença (Afonso, 2002). Os genes da esquizofrenia codificam 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 (Murray e Frangou, 1996).

- Teoria neurobiológica

A teoria neurobiológica baseia-se que a esquizofrenia é essencialmente causada por alterações bioquímicas e estruturais do cérebro, principalmente às disfunções nos sistemas, dopaminérgico, glutamatérgico e serotoninérgico.

A teoria dopaminérgica é a mais antiga e começou após a descoberta de que os antipsicóticos tipicamente utilizados no tratamento da doença alteravam os níveis de catecolaminas em determinadas regiões do cérebro (Laruelle *et al.*, 1999). A teoria se concretizou quando comprovado que a eficácia clínica destes antipsicóticos de primeira geração estava diretamente ligada à sua capacidade inibitória aos receptores dopaminérgicos (receptores D), isto é, quanto maior a afinidade do fármaco com receptores D maior a eficiência na terapia resultando no que ficou conhecido como hipótese hiperdopaminérgica (Seeman e Lee, 1975; Creese *et al.*, 1976). Alguns pesquisadores defendem que os sintomas negativos podem ser ocasionados por redução dopaminérgica nas áreas de projeção mesocorticais, como o córtex pré-frontal dorsolateral (Staal *et al.*, 2000). Entretanto, essa teoria inicial tratava a esquizofrenia de maneira generalizada, sem identificar quais regiões do cérebro eram afetadas, além de não relacionar de maneira direta os eventos bioquímicos com as manifestações sintomáticas (Howes e Kapur, 2009). Em outras palavras, a teoria da dopamina não descreve as origens etiológicas das disfunções dopaminérgicas (Bressan e Pilowsky, 2003). Alguns pesquisadores sugerem que as anormalidades nos neurônios dopaminérgicos são uma consequência de alterações nas vias neuronais que influenciam o fluxo de dopamina (Laruelle *et al.*, 1999). Na tentativa de se explicar o mecanismo completo da esquizofrenia pesquisadores buscaram novas teorias envolvendo outros neurotransmissores como a serotonina (Baumeister e Hawkins, 2004; Eggers, 2013) e principalmente o glutamato (Gaspar *et al.*, 2009).

Segundo a teoria serotoninérgica, a afinidade dos fármacos atípicos pelos receptores 5-HT é responsável por uma diminuição dos sintomas negativos da esquizofrenia e teria ações protetoras sobre a indução de sintomas extrapiramidais (Bleich *et al.*, 1988). Kapur e Seeman (Shitij Kapur e Philip Seeman, 2001) discordam dessa afirmação sobre a ação dos fármacos atípicos, afirmando que antipsicóticos típicos e atípicos possuem afinidades semelhantes aos receptores 5-HT<sub>2A</sub>. Esses autores também afirmam que os fármacos atípicos só apresentam eficácia terapêutica quando a ocupação de D<sub>2</sub> é superior a 65%, quantidade semelhante à quantidade de ocupação necessária para eficácia do haloperidol (fármaco típico). A partir destas afirmações, a teoria serotoninérgica não tem sido bem aceita como modelo explicativo da esquizofrenia, mas ainda exerce influência na pesquisa e avaliação de novos antipsicóticos (Meltzer *et al.*, 2003).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório cerebral, sendo essencial para uma série de funções neurais (A. *et al.*, 2009). O sistema glutamatérgico é um sistema excitatório que está envolvido com as funções cognitivas da memória e do aprendizado. Os receptores de glutamato podem ser divididos em dois grandes grupos: receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) que são ionotrópicos e os não-NMDA que são metabotrópicos. Os receptores do tipo NMDA são essenciais para a plasticidade neural incluindo os mecanismos de “potenciação de longo prazo” (LTP), sinaptogenesis e excitotoxicidade. Eles ainda contém canais de cátions específicos, estando diretamente ligados a estímulos eletrofisiológicos, entre eles estão o alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA)-kainato (Monaghan *et al.*, 1989; Nakanishi, 1992; Bressan e Pilowsky, 2003). Os metabotrópicos, estão diretamente relacionados a sinalização intracelular, sendo estes acoplados a proteína G. A fisiopatologia da esquizofrenia está relacionada a receptores glutamatérgicos do tipo NMDA. Desta forma um tratamento psicofarmacológico pode ser aplicado a estes receptores. Outras doenças neurológicas como epilepsia, isquemias, doença de Alzheimer, doença de Huntington e transtornos psiquiátricos como dependência de substâncias, transtornos obsessivo compulsivo e afetivo bipolar também são associadas ao sistema glutamatérgico (Fan *et al.*, 2009; Pregelj, 2009). A relação entre esquizofrenia e o glutamato foi estabelecida observando os efeitos psicotogênicos em pacientes em terapia com cloridrato de fenciclidina (PCP). A PCP é um anestésico que teve o uso clínico abolido após relatos associando o medicamento a sintomas psicóticos e à neurotoxicidade. Pacientes anestesiados com a PCP apresentaram um quadro de psicose induzida semelhante à esquizofrenia. A PCP se ligava pelos receptores NMDA, bloqueando-os e induzindo ao quadro psicótico observado nos pacientes (Coyle, 2006). Existem duas hipóteses opostas e não totalmente contraditórias, da relação do glutamato com a esquizofrenia. A primeira hipótese relacionada com a deficiência na função glutamatérgica (hipótese da hipofunção glutamatérgica) enquanto a segunda está relacionada ao excesso (hipótese da hiperfunção glutamatérgica) (Dursun e Deakin, 2001; Bressan e Pilowsky, 2003). Neste contexto, pesquisadores consideram o estudo de outros moduladores dos receptores NMDA. Inicialmente houve interesse no monitoramento dos níveis de glicina como aminoácido que poderia regular a função dos receptores NMDA (Johnson e Ascher, 1987). Entretanto a D-serina foi consolidada como o

componente endógeno mais potente e alvo dos receptores NMDA uma vez ela poderia se ligar até 100 vezes mais que a glicina (Berger *et al.*, 1998; Wolosker *et al.*, 1999). Deste modo, o estudo da regulação glutamatérgica e seus mecanismos celulares podem trazer importantes informações para se compreender a fisiopatologia da esquizofrenia, assim como na busca por biomarcadores da doença (Gaspar *et al.*, 2009).

Apesar da terapêutica medicamentosa ser fundamental na esquizofrenia, é ainda necessário que o mecanismo de desenvolvimento da doença seja melhor compreendido. Deste modo, a procura por novas hipóteses etiopatológicas podem proporcionar um maior sucesso na busca por biomarcadores que possam detectar a doença nos estágios iniciais, além de candidatos a novos fármacos (Lehman *et al.*, 2004; Miyamoto *et al.*, 2004).

## 1.2 Aminoácidos e esquizofrenia

Aminoácidos são compostos orgânicos que apresentam em sua estrutura geral um grupamento amino (-NH<sub>2</sub>) e um grupamento carboxila (-COOH) e um átomo de hidrogênio ligados a um carbono central. O quarto grupo ligado ao carbono central é o que diferencia os 20 aminoácidos presentes nas proteínas, sendo chamado genericamente de grupo R (Nelson *et al.*, 2008). A figura 1 mostra a estrutura dos aminoácidos estudados neste trabalho.

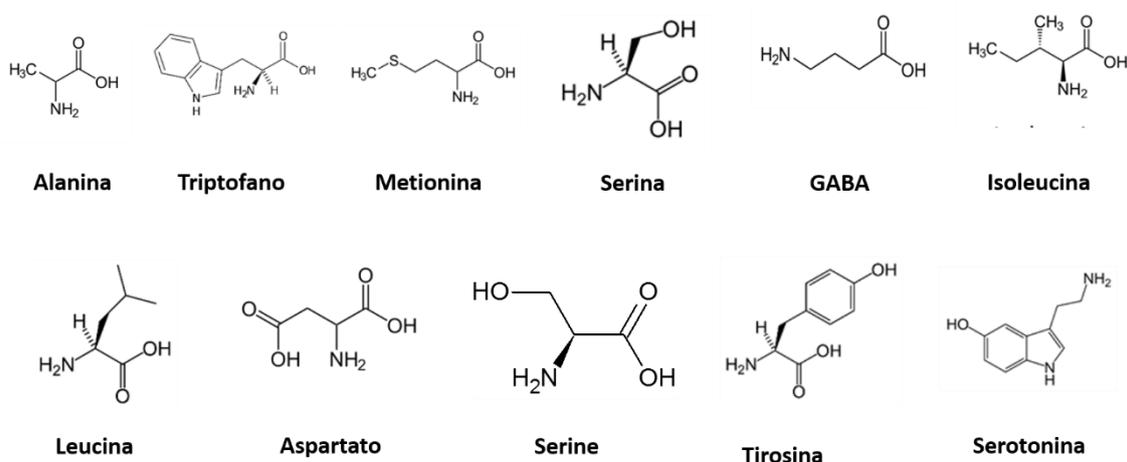


Figura 1. Estrutura dos aminoácidos estudados neste trabalho. Fonte: próprio autor.

Aminas biogênicas são compostos nitrogenados básicos de baixa massa molecular formados por descarboxilação de AA ou aminação e transaminação de aldeídos ou cetonas. Os aminoácidos tirosina, triptofano e histidina são precursores da síntese de aminas biogênicas (dopamina, noradrenalina, serotonina e histamina) que atuam no SNC. Os níveis destes precursores no SNC são influenciados pela concentração plasmática de valina, leucina, isoleucina e fenilalanina. Os aminoácidos, serina, glutamato e aspartato atuam como neurotransmissores no cérebro e estão envolvidos no desenvolvimento neuronal. Um desequilíbrio químico destes neurotransmissores tem sido postulado na fisiopatologia da esquizofrenia e diversos pesquisadores têm buscado elucidar o papel das concentrações plasmáticas dos aminoácidos na esquizofrenia. Desta forma, aminoácidos podem ser utilizados como biomarcadores indiretos para esquizofrenia uma vez que alterações em suas concentrações plasmáticas podem afetar a suscetibilidade a transtornos psicóticos e influenciar o resultado do tratamento (De Luca *et al.*, 2008; Balu e Coyle, 2015; Domingues, *et al.*, 2015; Saleem *et al.*, 2017; Cao *et al.*, 2018; Javitt, 2018; Panizzutti *et al.*, 2018; Mackay *et al.*, 2019).

De acordo com a teoria neurobiológica (item 1.1), a esquizofrenia é causada por alterações bioquímicas e estruturais do cérebro, descrevendo a hipótese dopaminérgica e alterações nos níveis de serotonina, adrenalina, noradrenalina, endocanabinóides e o glutamato. Desta forma vários aminoácidos têm influência direta ou atuam como precursores de outros neurotransmissores na esquizofrenia (Bressan e Pilowsky, 2003; Kessler, 2009). Dentre estes destacamos o glutamato, aspartato, lisina, triptofano, tirosina serina, leucina, isoleucina, GABA, metionina e alanina.

Trabalhos reportados na literatura demonstram elevados níveis plasmáticos de glutamato em relação aos níveis plasmáticos de pacientes saudáveis (Tortorella *et al.*, 2001; Van Der Heijden *et al.*, 2004; Domingues, *et al.*, 2015). Apesar de não ser essencial, o glutamato é o aminoácido excitatório que apresenta atuação mais importante no sistema nervoso central. Os receptores glutamatérgicos tipo NMDA (bloqueados segundo a hipótese da hipofunção glutamatérgica), tem como co-agonista, o aminoácido glicina, proveniente da serina. Um aumento na concentração de ambos os aminoácidos leva a um aumento da transmissão glutamatérgica. Por outro lado, a diminuição da concentração destes leva a uma diminuição da transmissão glutamatérgica. Javitt, *et al* (Javitt, 2018) observaram deficiência na

quantidade da enzima serina hidroximetil transferase (SHMT) (responsável pela clivagem da serina em glicina), em pacientes esquizofrênicos. A deficiência observada nos níveis dessa enzima causou uma diminuição na concentração de glicina causando a hipofunção glutamatérgica (Dursun e Deakin, 2001; Bressan e Pilowsky, 2003; Howes *et al.*, 2015).

No entanto, a apresentação de sintomas da esquizofrenia relacionada a um aumento nos níveis plasmáticos de glutamato e superabundância de sinapses glutamatérgicas no córtex frontal em pacientes é descrito pela hipótese de hiperfunção glutamatérgica. (Deakin e Simpson, 1997; Simpson *et al.*, 1998; Donald C. Goff e Joseph T. Coyle, 2001; Howes *et al.*, 2015; Merritt *et al.*, 2016).

Dursun *et al.* (Dursun *et al.*, 1999) utilizaram a lamotrigina como inibidor da liberação de glutamato em pacientes esquizofrênicos refratários em terapia com clozapina e observaram melhora significativa em todo o espectro sintomatológico e psicopatológico em seis pacientes. Saba *et al.* (G. Saba *et al.*, 2002) confirmaram este efeito terapêutico em três outros pacientes e Tiihonen *et al.* (Tiihonen *et al.*, 2003) em ensaio duplo-cego.

Além do glutamato, aspartato também está relacionado com a fisiopatologia da esquizofrenia. Concentrações elevadas de aspartato foram encontradas no plasma de pacientes esquizofrênicos resistentes ao uso de antipsicóticos por Luca *et al.* (De Luca *et al.*, 2008). Os autores concluíram ainda que os níveis plasmáticos de aspartato e glutamato podem ser alterados de forma diferente pelo tratamento com antipsicóticos. Experimentos realizados pelos autores em plasma de pacientes esquizofrênicos sob terapia com clozapina demonstraram que concentração plasmática de aspartato permaneceu constante enquanto a de glutamato aumentou. Por outro lado, Evins *et al.* (Evins *et al.*, 1997) observou um aumento nos níveis séricos de aspartato e glutamato em pacientes sob terapia com clozapina.

Por outro lado a lisina é um aminoácido essencial e seus níveis plasmáticos podem afetar os sintomas da esquizofrenia. Bjerkenstedt *et al.* analisaram plasma de pacientes esquizofrênicos encontrando elevados níveis de lisina (Meltzer, 1989). No entanto, trabalhos mais recentes publicados na literatura sugerem que um aumento na concentração plasmática de lisina pode diminuir significativamente os sintomas da esquizofrenia (Wass *et al.*, 2011; Zeinoddini *et al.*, 2014).

O triptofano pertence à classe dos aminoácidos essenciais e atua como precursor da síntese de serotonina. Trabalhos publicados na literatura tem encontrado menores

concentrações de triptofano em pacientes esquizofrênicos quando comparadas às concentrações no plasma de voluntários sadios (Rao *et al.*, 1990; Tortorella *et al.*, 2001; De Luca *et al.*, 2008; Domingues, Crevelin, De Moraes, *et al.*, 2015; Chiappelli *et al.*, 2016). Luca *et al.* (De Luca *et al.*, 2008) observaram um aumento significativo nas concentrações plasmáticas de pacientes esquizofrênicos em terapia com clozapina. No entanto essas concentração ainda eram baixas quando comparadas aos voluntários sadios.

A tirosina é um aminoácido aromático não essencial precursor de noradrenalina, adrenalina e dopamina. O trabalho de Luca *et al.* (De Luca *et al.*, 2008) reporta alta concentração de tirosina em soro de pacientes esquizofrênicos em terapia com a clozapina. Por outro lado a comparação dos níveis plasmáticos de tirosina em pacientes esquizofrênicos em terapia com clozapina e voluntários sadios feita por Domingues *et al.* (Domingues, Crevelin, De Moraes, *et al.*, 2015) demonstrou resultados diferentes. No trabalho de Domingues *et al.* não houve diferença significativa na concentração de tirosina no plasma dos pacientes esquizofrênicos em terapia com clozapina e dos indivíduos saudáveis. O trabalho de Domingues *et al.* reportou ainda menores concentrações de tirosina em plasma de pacientes esquizofrênicos em terapia com olanzapina. A diminuição das concentrações plasmáticas de tirosina em pacientes esquizofrênicos pode ser um marcador periférico da hipótese hiperdopaminérgica para explicar a psicose.

A serina pertence ao grupo de aminoácidos essenciais e vem sendo muito estudada pela sua atividade nos receptores NMDA. Com os avanços na teoria glutamatérgica, houve um grande aumento no interesse em outros moduladores dos receptores NMDA. Primeiramente, a glicina recebeu destaque como aminoácido que poderia regular a função destes receptores (Johnson e Ascher, 1987). Entretanto, com a comprovação de que a D-Serina poderia se ligar até 100x mais potentemente que a glicina (Berger *et al.*, 1998), este aminoácido se consolidou como o mais potente componente endógeno e alvo de interesse desse receptor (Wolosker *et al.*, 1999). Waziri *et al.* (Waziri *et al.*, 1984) relataram que as concentrações de serina tanto no soro quanto no cérebro de indivíduos esquizofrênicos são mais elevadas.

Pesquisadores têm encontrado altas concentrações de leucina e isoleucina em amostras de soro de pacientes esquizofrênicos (Reveley *et al.*, 1987; Tortorella *et al.*, 2001).

Um trabalho reportado por Van der Heijden *et al.* (Van Der Heijden *et al.*, 2005) demonstrou baixos níveis de metionina em pacientes em tratamento com antipsicótico atípico. Além disso, Bjerkenstedt *et al.* (Meltzer, 1989) encontram concentrações plasmáticas de metionina mais elevadas em pacientes esquizofrênicos sem terapia medicamentosa.

Alanina é um antagonista endógeno do sítio NMDA-glicina que pode ter efeitos benéficos sobre a esquizofrenia. Guochuan *et al* (Tsai *et al.*, 2006) realizaram um ensaio duplo-cego ministrando D-alanina em pacientes esquizofrênicos em terapia com antipsicóticos durante 6 semanas. Os resultados mostraram os pacientes que receberam D-alanina apresentaram uma diminuição nos sintomas positivos e negativos sem nenhum efeito adverso. Níveis de alanina relacionados à esquizofrenia têm sido pouco investigados. Luca *et al* (De Luca *et al.*, 2008) não encontraram associação entre alanina e esquizofrenia, mas observaram uma redução deste aminoácido durante um tratamento de 12 semanas com clozapina.

Portanto, os aminoácidos e neurotransmissores são importantes biomarcadores indiretos para o diagnóstico da esquizofrenia e a determinação de suas concentrações plasmáticas tem auxiliado no ajuste de doses de antipsicóticos no tratamento de pacientes esquizofrênicos. (Agrafiotou *et al.*, 2009; He *et al.*, 2012; Janečková *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014).

### 1.3 *In-tube SPME (microextração em fase sólida no tubo)*

Dentre os recentes avanços em técnicas de preparo de amostra, destaca-se o acoplamento direto da técnica de extração com o instrumento de análise, o uso de fases seletivas e a miniaturização dos sistemas analíticos. Este último item tem como objetivo a redução do volume de amostra, da fase extratora e do solvente orgânico (Kataoka *et al.*, 2009; Kataoka, 2011).

A microextração em fase sólida (SPME, do inglês “solid phase microextraction”), desenvolvida por Pawliszyn *et al* (Arthur e Pawliszyn, 1990) baseia-se na miniaturização da técnica clássica de extração em fase sólida (SPE, do inglês “solid phase extraction”), muito empregada em procedimentos analíticos até hoje.

A SPME utilizando microextração em coluna capilar permite automatização ou acoplamento online com o método de separação ou detecção. Na primeira dimensão desde sistema, os analitos são extraídos e pré-concentrados por sorção junto a uma fase estacionária do capilar. As duas abordagens principais desta técnica são a OTT (do inglês “open tubular trapping”) (Mol *et al.*, 1993) e *in-tube* SPME (microextração em fase sólida no capilar) (Eisert e Pawliszyn, 1997). A primeira abordagem, OTT, se refere ao acoplamento da técnica de extração com a cromatografia gasosa, enquanto a segunda abordagem, *in-tube* SPME, se refere ao acoplamento da técnica de SPME com a cromatografia líquida (*in-tube* SPME-LC). Neste trabalho utilizamos a técnica de *in-tube* SPME, porém sem a utilização da coluna analítica para a separação dos analitos.

A extração da amostra na *in-tube* SPME pode ser realizada de duas maneiras: (1) *flow-through*, quando a amostra passa de maneira contínua pelo capilar para a pré-concentração dos analitos, em única direção; e (2) ciclos aspirar/dispensar, no qual a amostra é repetidamente aspirada e dispensada através do capilar. O modo *flow-through* apresenta dois modos de eluição: (a) fluxo direto e (b) fluxo inverso. No fluxo direto a eluição dos analitos ocorre no mesmo sentido da etapa de sorção (Kataoka e Saito, 2012; Moliner-Martinez *et al.*, 2015; Fernández-Amado *et al.*, 2016).

No fluxo inverso, a fase móvel para eluição dos analitos percola no sentido contrário ao sentido empregado na etapa de sorção. Desta forma, os analitos são rapidamente eluídos para a coluna analítica evitando a dispersão dos analitos e conseqüentemente minimiza o alargamento do pico cromatográfico (Pan *et al.*, 2014).

No modo ciclos aspirar e dispensar, o capilar é conectado entre a agulha do injetor automático e o loop do LC, ou no lugar do loop do LC junto à válvula de seis pórticos. A vazão, volume de amostra, e o número de ciclos aspirar/dispensar, são controlados pelo programa do injetor automático. A amostra é percolada no capilar contendo a fase extratora para a extração (sorção dos analitos e eluição de interferentes). Em seguida, acopla-se (comutação) o capilar com a coluna analítica, que estão conectadas à válvula, para que os analitos sejam eluídos para a coluna analítica (coluna de LC). Na última etapa do processo, o capilar é desacoplado da

coluna para que ocorra a separação cromatográfica e simultânea regeneração do capilar (Campíns-Falcó *et al.*, 1993; Kataoka e Saito, 2012).

A técnica *in-tube* SPME tem sido aplicada para análise de diversos compostos em diferentes amostras complexas, incluindo material biológico e ambiental (Tabela 1).

Tabela 1. Aplicações da técnica *in-tube* SPME-LC na análise de diferentes substâncias

<b>Analitos</b>	<b>Amostra</b>	<b>Fase estacionária</b>	<b>Técnica analítica</b>	<b>Referência</b>
Aminoácidos	plasma	Capilar monolítico de sílica híbrida com grupos amino e ciano	MS/MS	Presente trabalho (Miranda <i>et al.</i> , 2019)
Estrogênicos	Água	Tubo PEEK revestido com aerogel de polidopamina	HPLC-DAD C18	Feng, et al, 2019 (Feng <i>et al.</i> )
Ésteres metílicos de ácidos graxos	Amostras de comida	Capilar monolítico (uréia e formaldeído) funcionalizado com hialuronato revestido com nanopartículas de prata	HPLC-DAD C18	Jiang et al, 2019(Jiang <i>et al.</i> , 2019)
fluoroquinolonas	Água	Capilar monolítico metálico-orgânico (copolimerização de EGDMA com ácido 4-vinil benzoico)	HPLC-FD C18	Pang, et al, 2019 (Pang <i>et al.</i> , 2019)
Ésteres de ftalatos	água	Tubo PEEK empacotado com aerogel de MF funcionalizado com polidopamina	HPLC-DAD C18	Wang, et al, 2019 (Wang <i>et al.</i> , 2019)
Clorpromazina, clozapina, olanzapina, quetiapina e metabólitos	Plasma	Capilar monolítico orgânico (BMA, EGDMA, PRO) (10 cm x 530 µm i.d.)	UHPLC-MS/MS C18	Beloti; Queiroz, et al 2019. (Beloti <i>et al.</i> , 2019)
Endocanabinóides	Plasma humano	Capilar sílica revestido com líquido iônico polimérico (VC <sub>6</sub> IM e VC <sub>16</sub> IM) (10 cm x 530 µm i.d.)	UHPLC-MS/MS C18	SOUZA, QUEIROZ, 2019 (Souza <i>et al.</i> , 2019)
Hidrocarbonetos policíclicos aromático	Água de torneira e de chuva	Nanocompósitos de hidróxido bimetálico Co-Al (20 cm x 750 µm)	HPLC-DAD C18	WANG et al., 2018 (Wang, X. <i>et al.</i> , 2018)
Glicoproteínas	Plasma de rato	Capilar monolítico (VPBA-EGDMA) incorporado com óxido de grafeno	HPLC-UV C8	WANG; CHEN, 2018.(Wang e Chen, 2018)
Anti-inflamatório não esteroidais	Plasma humano e água	Capilar monolítico a base de SE-EGDMA (10 cm x 0,02 mm i.d.)	HPLC-UV C18	WANG; LI; CHEN, 2018 (Wang, R. <i>et al.</i> , 2018)
Triazóis	Água de rio, lago e esgoto	Capilar monolítico (VP-EGDMA) (20 cm x 320 µm i.d.)	HPLC-DAD C18	PANG et al., 2018 (Pang <i>et al.</i> , 2018)

Tabela 1 continua...

Continuação da tabela 1...

<b>Analitos</b>	<b>Amostra</b>	<b>Fase estacionária</b>	<b>Técnica analítica</b>	<b>Referência</b>
Micotoxinas	Grãos de arroz	Capilar monolítico (copolimerização MAA-DVB) (20 cm x 0,25 mm i.d.)	HPLC-DAD C18	WU et al., 2018 (Wu, F. <i>et al.</i> , 2018)
Antidepressivos tricíclicos	Plasma humano	Partículas de RAM-MIP-BSA empacotadas (10 cm x 4,6 mm i.d.)	MS/MS	Santos et al., 2017 (Santos <i>et al.</i> , 2017)

BMA = butil metacrilato; EGDMA = Etileno glicol dimetacrilato; PRO = 1 propanol MF = Melamina-formaldeído; HPLC-UV = cromatografia líquida de alta performance acoplada com detector de ultravioleta; DAD = detector de arranjo de diodo; HPLC = cromatografia líquida de alta performance; UHPLC = cromatografia líquida de ultra performance; MS/MS = espectrometria de massas em tandem; FD = detector de fluorescência; in-tube SPME-MS/MS = micro extração em fase sólida no capilar diretamente acoplada ao espectrômetro de massas em tandem; HPLC-DAD = cromatografia líquida de alta performance acoplada com detector de arranjo de diodo; HA-UF = monolito funcionalizado com hialuronato; VC<sub>6</sub>IM = 1-vinil 3- hexil imidazol; VC<sub>16</sub>IM = 1-vinil 3-hexadecil imidazol; SE = solvente eutético; VPBA = Ácido polivinil borônico

#### 1.4 Fases extratoras utilizadas na in-tube SPME

Uma grande variedade de fases extratoras está disponível comercialmente para as diversas aplicações. Fases extratoras baseadas em difenilpolidimetilsiloxano, (como TRB-5 e TRB-35), polietilenoglicol (Omegawax 250), polímeros (Supel Q-PLOT) e cianopropilfenil metilpolisiloxano (OV1701, 14%) têm sido empregadas para análises de amostras ambientais e de fármacos em fluido biológicos. A fase extratora é selecionada com base na regra “similar solubiliza similar”. Desta forma, colunas apolares como as colunas a base de polidimetilsiloxano são utilizadas para extração de compostos hidrofóbicos, enquanto que colunas polares como as colunas a base de polietileno glicol (PEG) são utilizadas para extração de compostos hidrofílicos. (Saito *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2013; Queiroz e Melo, 2013).

Apesar da variedade de fases comercialmente disponíveis, pesquisas recentes vêm desenvolvendo novas fases extratoras na busca por aumento na seletividade, capacidade de sorção, sensibilidade e robustez dos métodos analíticos. Dentre as fases extratoras mais comumente empregadas em *in-tube* SPME, podemos citar polímeros molecularmente impressos, materiais monolíticos orgânicos ou de sílica híbrida, materiais de acesso restrito, entre outras para

revestimento ou preenchimento dos capilares de extração (Queiroz e Melo, 2013; Moliner-Martinez *et al.*, 2015; Beloti *et al.*, 2019; Costa Queiroz *et al.*, 2019).

Muitos trabalhos têm demonstrando a grande eficácia das fases monolíticas (Domingues, Souza, *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2017; Wang, R. *et al.*, 2018; Beloti *et al.*, 2019; Jiang *et al.*, 2019; Pang *et al.*, 2019). Essas fases correspondem a materiais de alta porosidade que apresentam uma estrutura continua constituída de macroporos, mesoporos e microporos que favorecem a alta retenção, eficiência, permeabilidade, elevados fluxos e baixos valores de pressão, além da possibilidade de ser sintetizada *in situ* (Zheng *et al.*, 2009a; Domingues, Souza, *et al.*, 2015; Beloti *et al.*, 2019; Gama *et al.*, 2019).

Neste trabalho um inovador monolito híbrido bifuncional (contendo grupos ciano e amino) a base de sílica foi sintetizado para ser aplicado como fase extratora no método *in-tube* SPME-MS/MS para determinação de aminoácidos em amostras de plasma.

### 1.5 Fases monolíticas

Segundo a IUPAC: “monolito é uma forma moldada, material fabricado e rígido com uma microestrutura homogênea que não exhibe qualquer componente estrutural distinguível por microscopia óptica”. Outra definição é utilizada na ciência das separações: “material de alta porosidade que apresenta uma estrutura continua constituída de macroporos mesoporos e microporos” (Alemán *et al.*, 2007). Os domínios podem ser microporosos, mesoporosos, estrutura dupla de poros (microporos e mesoporos), ou podem ser não porosos (Ishizuka *et al.*, 2001). Os macroporos (poros maiores que 50 nm) fornecem permeabilidade para que os solventes possam fluir pela estrutura do material sem causar um aumento significativo na pressão, enquanto que os mesoporos (poros entre 2 a 50 nm) fornecem uma área superficial elevada para a separação (Xu *et al.*, 2011; Nema *et al.*, 2014). É possível ainda, que haja a existência de microporos (poros menores que 2 nm) (Ishizuka *et al.*, 2001; Siouffi, 2003; Nordborg *et al.*, 2011).

A primeira publicação sobre fases monolítica ocorreu na década de 1950 por Robert Synge que relatou pela primeira vez membranas com estruturas similares às fases conhecidas hoje como monolítica (Mould e Synge, 1952; Mould e Synge,

1954). Estas membranas foram obtidas por ciclos de evaporação de uma solução coloidal e aplicadas na separação de polissacarídeos. Só na década de 1970 que fases monolíticas foram sintetizadas para aplicação em HPLC e CG. Cerca de 30 anos mais tarde o grupo do professor Tanaka publicou trabalhos (Ishizuka *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2000) que foram utilizados como base pela empresa Merk para a fabricação da primeira coluna monolítica à base de sílica comercial chamada de Chromolith®.

As fases monolíticas têm sido extensivamente estudadas em razão das suas excelentes características físico-químicas, possibilidade de síntese *in situ*, as quais as tornam meios inovadores frente aos materiais particulados (Svec, 2006b; Gama *et al.*, 2019). Os materiais monolíticos tem sido aplicados em diferentes áreas da química como suportes para extração em fase sólida (Tripp *et al.*, 2001; Vlakh *et al.*, 2004), imobilização de enzimas (Josić e Buchacher, 2001; Křenková e Foret, 2004; Svec, 2006a) e fase extratora em métodos analíticos online (Domingues, Souza, *et al.*, 2015; Wu, F. *et al.*, 2018; Beloti *et al.*, 2019; Miranda *et al.*, 2019; Pang *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2019).

### 1.5.1 Classificação das fases monolíticas

Os monolitos podem ser classificados de acordo com o material utilizado na sua preparação. Estes materiais são categorizados principalmente em três tipos: poliméricos (orgânicos), a base de sílica (inorgânicos) ou híbridos (Wu *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2011; Nema *et al.*, 2014).

Monolitos orgânicos geralmente são preparados via polimerização radicalar. Este tipo de polimerização ocorre em um meio reacional composto por um iniciador radicalar que sofre decomposição fotoquímica ou térmica, monômeros orgânicos (acrilatos orgânicos), agentes reticulantes e solventes porôgenos. O monolito formado é biocompatível, estável em uma grande faixa de pH e altamente poroso. Por outro lado, este tipo de material pode ter sua estabilidade mecânica comprometida uma vez que pode sofrer rachaduras e intumescimentos quando submetidos a solventes orgânicos (Nordborg *et al.*, 2011; Ou *et al.*, 2015).

Por outro lado os monolitos de sílica, são mais resistentes a solventes orgânicos, maior estabilidade mecânica e maior eficiência nas separações. No entanto, seu preparo envolve procedimento laborioso com várias etapas de síntese e baixa reprodutibilidade (Tanaka *et al.*, 2002; Bai *et al.*, 2011; Nordborg *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2011).

Os monolitos a base de sílica híbrida são uma excelente alternativa em relação aos orgânicos e aos de sílica por apresentarem boa estabilidade (mecânica e química), simples e reprodutível procedimento de síntese e por conciliar as vantagens oferecidas pelos monolitos orgânicos e de sílica (Li *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2011). Em virtude das vantagens que os monolitos organo-sílica possuem frente aos demais, este trabalho dará enfoque a este tipo de material, levantando e discutindo questões relacionadas a síntese, caracterização e aplicações.

### 1.5.2 Fases monolíticas a base de sílica híbrida

Hayes e Malik (Hayes e Malik, 2000) foram os primeiros a publicar um procedimento de síntese para obtenção de fases monolíticas a base de sílica híbrida. Esses autores utilizaram os precursores cloreto de Noctadecilmetil [3-(trimetoxissilil)propil]amônio (C18-TMS) e TMOS para obtenção de um monolito de sílica contendo grupos octadecil incorporados, os quais propiciaram interações relevantes com os analitos durante o processo cromatográfico. Esta síntese foi realizada *in-situ* em capilares de sílica fundida e aplicados na separação eletroforética de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, aldeídos e cetonas. A síntese proposta por Hayes e Malik foi considerada orgânico-inorgânico porque envolveu a combinação de dois tipos de precursores: o monômero inorgânico tetrametoxissilano (TMOS) e o monômero contendo o grupo funcional (C18-TMS). A incorporação do grupo funcional foi eficiente e homogênea quando comparado com a incorporação via derivatização porque a síntese e a funcionalização da sílica ocorreram em uma única etapa dando origem a fases mais estáveis. Os procedimentos atuais de síntese basearam-se neste trabalho pioneiro. Além disso, grupos C18, C8, C3, fenil, vinil e aminopropil já foram utilizados com sucesso para separações em colunas capilares e no preparo de amostras utilizando a técnica SPME (Ou *et al.*, 2015). Além destes, outros grupos funcionais como nitrila,

isocianato, tiocianato, carboxílico estão disponíveis como grupos funcionais de agentes precursores (Sol–Gel Precursors).

As fases monolíticas de sílica híbrida apresentam como principais vantagens a boa biocompatibilidade, alta estabilidade química e física, maior tempo de vida útil, maior reprodutibilidade no procedimento de síntese e maior flexibilidade no ajuste da seletividade comparada as fases de sílica e orgânicas (Li *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2011). Essas excelentes propriedades físico-químicas têm sido confirmada pelos trabalhos publicados, que relataram aplicações diversificadas tanto no âmbito de síntese quanto de aplicações (Ou *et al.*, 2015; Narciso Meirelles *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2019). A Tabela 2 ilustra recentes trabalhos que desenvolveram fases monolíticas a base de sílica híbrida para métodos de extração e separação.

A combinação de monômeros orgânicos e inorgânicos na síntese dos monolitos de sílica híbrida, permite a obtenção de materiais seletivos (grande número de monômeros orgânicos disponíveis) com estabilidade térmica e robustez característica dos monolitos inorgânicos (Hoffmann *et al.*, 2006).

Tabela 2 Recentes métodos analíticos empregando fases monolíticas de sílica híbrida

Aplicação do monolito	Precursores sol-gel	Técnica analítica	LIQ (ng mL <sup>-1</sup> )	Referência
Enantioseparação de AA	TMOS, VTMS, Silano A174	Nano-LC	ni	Xu et al, 2019 (Xu <i>et al.</i> , 2019)
Separação de peptídeos	BTME, TMOS	LC-UV	ni	Wu et al 2018 (Wu, C. <i>et al.</i> , 2018)
Separação de alquilbenzenos	APTMS, TMOS C4-TriMOS	cLC-MS/MS	ni	Liu et al, 2017 (Liu <i>et al.</i> , 2017)
extração de peptídeos em ovos por EFS.	VTMS, TMOS	EC-UV	ni	Zhang et al, 2017 (Zhang <i>et al.</i> , 2017)
Extração de sulfonamidas em água.	PP/PVA/GO	LC-UV	0,4 -0,8	Chullasat et al, 2017(Chullasat <i>et al.</i> , 2017)
Extração de fármacos em plasma por <i>in-tube</i> SPME	CN-TEOS, TEOS	LC-MS/MS	63-1250.10 <sup>-3</sup>	Domingues et al, 2015 (Domingues, Souza, <i>et al.</i> , 2015)
Extração de fármacos em plasma por MEPS	CN-TEOS, TEOS	LC-MS/MS	0,05–1.00	De Souza et al, 2015 (De Souza <i>et al.</i> , 2015)

BTME = 1,2-bis(trimetoxissilil) etano; TMOS = tetrametilortosilicato; PEG = polietilenoglicol; VTMS = Viniltrimetoxissilano; Silano A174 = 3-trimetoxissilil propil metacrilato; APTMS = aminopropiltrimetoxissilano; C4-TriMOS = butiltrimetoxissilano; cLC = cromatografia líquida capilar; ni = Não informado; EFS= extração em fase sólida. PP = polipirrol, PVA álcool polivinílico; GO = oxido de grafeno; MEPS = Microextração em sorvente empacotado.

### 1.5.3 Síntese dos monólitos de sílica híbrida

O processo sol-gel (PSG) tem sido aplicado para o preparo das fases monolíticas a base de sílica. Este processo constitui-se uma metodologia bastante estabelecida pela literatura e já reportada por Ebelmen (Hench e West, 1990) em 1846 para síntese de materiais inorgânicos transparentes. Esta metodologia tem sido utilizada para a obtenção de diversos tipos de materiais, tais como vidros, dispositivos ópticos, filmes, cerâmicas e monolitos (Ciriminna *et al.*, 2013).

No PSG ocorre a formação de uma rede polimérica inorgânica através de reações de gelificação. Estas reações promovem a transição do meio reacional de um estado líquido para um sólido, onde os precursores orgânicos e inorgânicos são geralmente alcóxidos de silício ou outros metais. Durante o processo, as reações de gelificação levam à formação de um estado sol, que se caracteriza por apresentar oligômeros que formarão cadeias de dimensões coloidais e partículas primárias dispersas. O desenvolvimento do processo conduz ao estado gel que apresenta conectividade entre as unidades de dimensões coloidais, formando uma rede tridimensional (Hench e West, 1990). A transição do estado de sol para gel é evidenciado pelo aumento da viscosidade da solução de síntese. Nesta etapa os grupos funcionais dos monômeros híbridos não participam diretamente das reações sol gel, entretanto são incorporados à estrutura do produto final.

O PSG consiste em duas etapas básicas: reações de hidrólise e condensação de precursores alcóxidos em meio ácido ou básico. Geralmente, as reações de hidrólise e condensação ocorrem simultaneamente, assim que a hidrólise é iniciada. A hidrólise leva a formação de grupos silanóis ( $\equiv\text{Si}-\text{OH}$ ), enquanto que as reações de condensação levam a formação de ligações siloxano ( $\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$ ). A cinética das reações de hidrólise e condensação é fortemente influenciada pelo tamanho do grupo alcóxido, resultante de impedimentos estéricos. O volume dos grupos alcóxidos e a presença de ramificações acarretam em menor taxa de hidrólise. Dentre os alcóxidos mais comumente empregados destacam-se o metóxi ( $\text{OCH}_3$ ), o etóxi ( $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ) e o n-própoxi ( $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ). Durante a síntese dos monólitos as reações sol-gel (ilustradas na Figura 2) promovem a formação de uma rede tridimensional altamente entrecruzada e porosa. (Hench e West, 1990; Brinker e Scherer, 2013; Ou *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017).

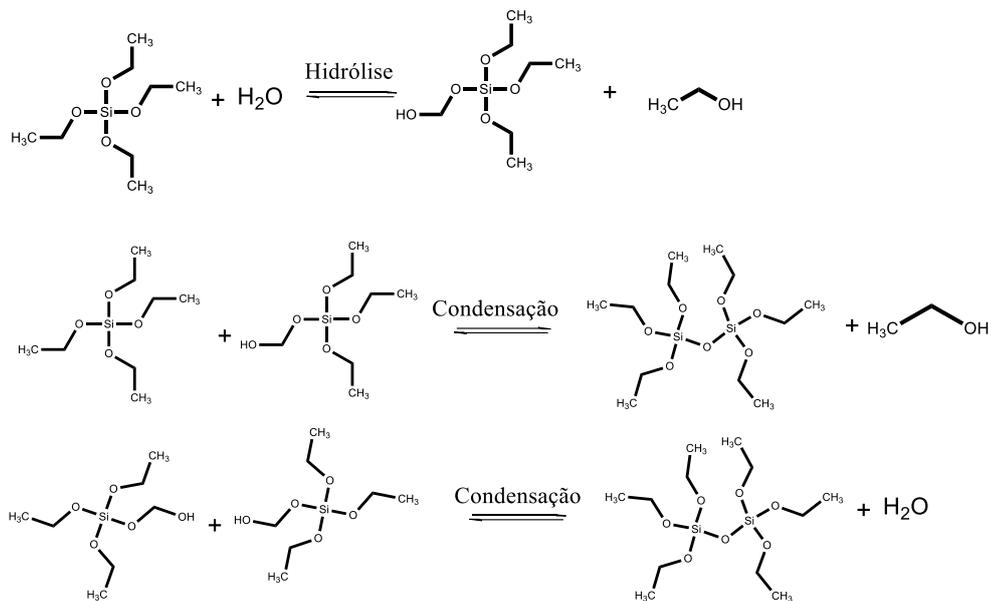


Figura 2. Reações de hidrólise e condensação durante o processo sol-gel utilizando o precursor TEOS. Fonte: próprio autor.

A principal vantagem do PSG advém da versatilidade de reagentes de síntese disponíveis que torna possível controlar as características físico-químicas do material obtido de acordo com a finalidade desejada. Essas características físico-químicas são determinadas pela quantidade e natureza dos precursores, solventes, catalizadores, aditivos ou até pela implementação de procedimentos de modificação pós síntese.

#### 1.5.4 Precursores

A síntese das fases monolíticas de sílica híbrida via procedimento sol-gel utiliza dois tipos de precursores: os tetralcoxissilanos e os alquiltrialcoxissilanos. O primeiro tipo é composto por um átomo de silício central ligado a quatro funções alcóxidos enquanto que o segundo tipo possui três funções alcóxidos e um grupo funcional orgânico ligado ao átomo de silício. Atualmente existe uma grande variedade de alquiltrialcoxissilanos com diferentes grupos orgânicos (C18, C8, C2, aminopropil, cianopropil, alil, dentre outros), que aumenta a quantidade de materiais a base de sílica híbrida que podem ser obtidos a partir da combinação destes precursores (figura 3, onde R pode ser um grupo funcional orgânico). Os

tetraalcoxissilanos, os mais comumente utilizados são tetrametoxissilano (TMOS) e o tetraetoxissilano (TEOS).

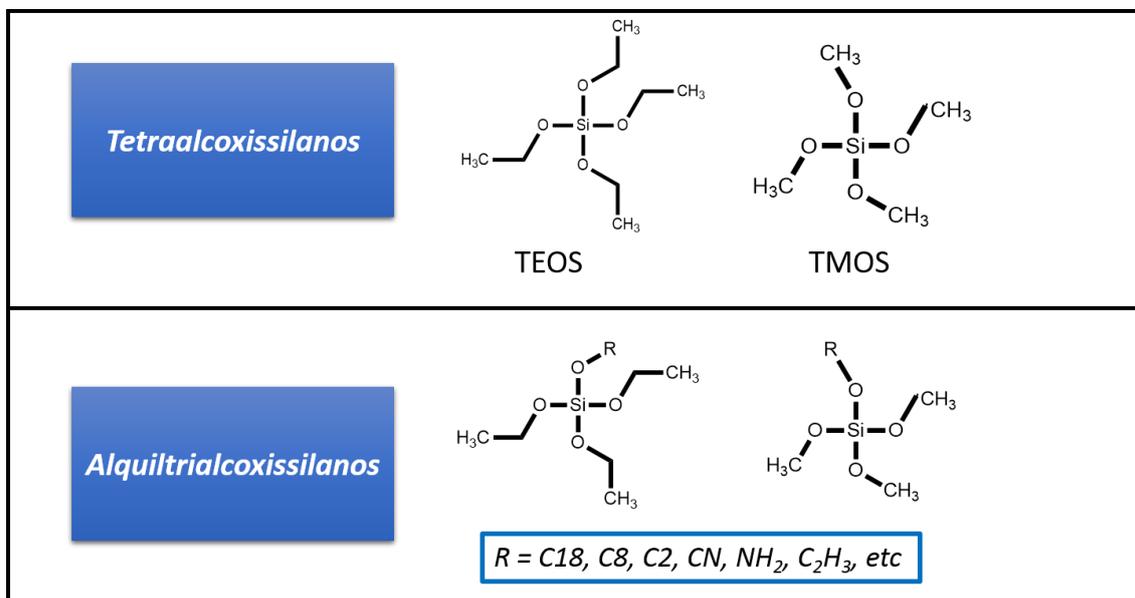


Figura 3. Precursores Sol-Gel a base de silício. Fonte: próprio autor.

A cinética das reações de hidrólise e condensação é afetada pelas características físico-químicas dos precursores. Efeitos estéricos e indutivos, podem aumentar a velocidade das reações de acordo com o grau de substituição e da natureza dos substituintes (Brinker, 1988). A reação de hidrólise é mais rápida para alcóxidos com cadeias alquílicas menores (Yoldas, 1986). Apesar de precursores a base de silício serem os mais aplicados, alguns trabalhos tem explorado o uso de precursores a base de titânio (Konishi *et al.*, 2009) zircônio (Randon *et al.*, 2010), germânio (Fang *et al.*, 2007) e alumina (Zajickova *et al.*, 2011).

#### 1.5.5 Solvente de síntese

O solvente de síntese solvata os reagentes presentes no meio reacional para evitar a separação líquido-líquido da solução de síntese. A homogeneidade da solução garante a incorporação mais uniforme do precursor híbrido na estrutura do monólito. Em soluções muito diluídas de alcóxidos, a formação da rede tridimensional por incorporação dos precursores é mais lenta. Soluções mais diluídas têm menor taxa de choque efetivo (responsável pela reação dos precursores) (Brinker, 1988; Wagh *et al.*, 1998; Brinker e Scherer, 2013; Ciriminna *et al.*, 2013).

### 1.5.6 Catálise

As As reações de hidrólise e condensação são dependentes do pH e podem ser catalisadas em uma única ou em duas etapas. Nas reações em uma etapa o pH do meio reacional é estritamente ácido ou alcalino. Dependendo das propriedades dos precursores utilizados, os próprios monômeros são suficientes para acidificar ou alcalinizar o meio reacional não sendo necessária a adição de catalisador. Por outro lado, na catálise em duas etapas as reações são processadas em pH ácido e também em pH alcalino em cada etapa. Nesta abordagem, geralmente, a hidrólise dos precursores é realizada em meio ácido e posteriormente o meio reacional é alcalinizado pela adição de um segundo tipo de catalisador (hidróxido de amônio ou n-dodecilamina são os mais utilizados) (Brinker, 1988; Hench e West, 1990; Siouffi, 2003; Al-Oweini e El-Rassy, 2009).

A reação de hidrólise em meio ácido ocorre via mecanismo  $S_N2$ . O grupo alcóxido sofre protonação gerando um intermediário instável que sofre ataque nucleofílico pela molécula de água, liberando álcool. Por outro lado na catálise básica ( $S_N2$ ) o centro de silício sofre ataque nucleofílico dos íons hidroxila (Hench e West, 1990).

A acidez dos grupos silanóis influencia diretamente na etapa de condensação. O grupo silanol ionizado ataca um centro eletrofilico de um precursor neutro presente no meio reacional. Geralmente, em pH ácido a cinética da reação de hidrólise é maior do que a condensação dos precursores, resultando em redes de sílica com estruturas mais lineares ou randomicamente ramificadas. A catálise alcalina resulta na formação de uma rede de sílica altamente ramificada e mais compactada (Hench e West, 1990; Kabir *et al.*, 2013).

Existem catalisadores anfóteros que aumentam a velocidade da reação tanto em meio básico como em meio ácido. Um exemplo deste tipo de catalisador é o ânion fluoreto, que catalisa reações de hidrólise (Iler, K. R., 1979). Apesar de também apresentar atividade catalítica em meio ácido, o mecanismo da catálise feita com o fluoreto é semelhante ao da catálise realizada em meio básico. Isto porque a catálise com fluoreto origina materiais com morfologias semelhantes à dos materiais obtidos por catálise alcalina. No entanto, o raio iônico do fluoreto é menor que o raio iônico do ânion hidróxido fazendo com que o fluoreto aumente a coordenação do silício acima de quatro. Desta forma, ocorre a formação de um intermediário que reage

rapidamente, acelerando as reações de hidrólise em meio básico (Rodríguez *et al.*, 1992). Nos últimos anos diferentes autores têm reportado o uso do íon fluoreto como catalisador na síntese de monólitos via sol gel para aplicações como, monolito para digestão de proteínas (Liu *et al.*, 2018), produção de nanopartículas de prata em aerogéis de sílica para redução de compostos (Yi *et al.*, 2019), monolitos poliméricos para troca de solvente em dispositivo microfluídico de fluxo contínuo (Keng *et al.*, 2016), dentre outros (Drisko *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2013; Casey *et al.*, 2019).

#### 1.5.7 Aditivos direcionadores de poros

As fases monolíticas empregadas como sorventes, apresentam uma ótima permeabilidade, o que permite a percolação de amostras biológicas ou soluções utilizadas como fase móvel em LC. A aplicação do material depende da existência de macroporos, mesoporos e microporos distribuídos na estrutura monolítica. Além disso, a área superficial, o diâmetro e a acessibilidade dos mesoporos podem aumentar a capacidade de sorção do monólito. Neste contexto, tensoativos ou polímeros de elevada massa molecular direcionadores de poros têm sido utilizados na síntese de fases monolíticas. Neste trabalho o CTAB foi utilizado como agente direcionador de poros.

#### 1.6 Monolitos de sílica híbrida bifuncionais

A síntese dos monolitos de sílica híbrida pode envolver mais de um precursor funcionalizado originando um monólito híbrido bifuncionalizado. Monolitos bifuncionalizados podem ser sintetizados diretamente por co-condensação de tetralcoxisilanos com tetralcoxisilanos, chamadas de “one pot”. O principal desafio na incorporação de mais de um tipo de precursor híbrido pode ser acertar as velocidades de hidrólise de ambos os precursores alquiltrialcoxissilanos com o precursor tetralcoxisilano (Zhao *et al.*, 2019).

Por apresentarem mais de um mecanismo de sorção dos analitos de interesse, os materiais híbridos bifuncionais apresentam alta eficiência de extração e capacidade de sorção (Kulkarni *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2019). Chen *et al.* (Chen *et al.*, 2010) desenvolveram um monolito híbrido bifuncional contendo grupos octil e sulfônico para

eletrocromatografia capilar. Os autores também desenvolveram outro monolito híbrido para extração de giberelinas utilizando a técnica de extração em fase sólida (SPE, do inglês, “solid phase microextraction”) (Chen *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2015). Malik *et al* (Kulkarni *et al.*, 2006) desenvolveram um revestimento polimérico bifuncional contendo grupos ciano e polidimetilsiloxano para extração de compostos polares e apolares em amostras aquosas.

Zhao *et al.* (Zhao *et al.*, 2019) desenvolveram um monolito bifuncionalizado com grupos tiol e amino para separação e pré concentração de espécies inorgânicas de arsênio. O monolito híbrido bifuncionalizado foi utilizado como fase sorvente no procedimento SPME e foi capaz de eluir as espécies de arsênio (III e V) separadamente utilizando diferentes eluentes. Além disso, Chen *et al.* (Chen *et al.*, 2012) desenvolveram um monolito híbrido bifuncionalizado com grupos sulfo e vinil para pré concentração de peptídeos de baixa abundância.

Neste contexto, o presente trabalho descreve a síntese e aplicação de um monólito híbrido bifuncional empregado como fase sorvente no procedimento in-tube SPME-MS/MS para determinação de aminoácidos em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos.

## 1.7 Caracterização das fases monolíticas de sílica híbrida

A caracterização dos monolitos de sílica híbrida está entre os pré requisitos que devem ser considerados quando se tenta implementar um processo de síntese. As técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), adsorção/dessorção de nitrogênio, difração de raios-x (DRX) têm sido utilizadas na caracterização de materiais híbridos (Al-Oweini e El-Rassy, 2009; Chen *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2018; Miranda *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2019).

### 1.7.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A MEV é uma ferramenta de caracterização muito aplicada nas mais diversas áreas a mais de 50 anos. Informações morfológicas da estrutura do material podem ser obtidas em escala nanométrica (resolução varia de acordo com o equipamento). A técnica se baseia na incidência de um feixe de elétrons sobre a amostra, que

permanece fixa num suporte metálico. A interação entre este feixe (primário) e a amostra emite elétrons secundários, retroespalhados, raios-X, e outros. Apenas elétrons secundários e retroespalhados são monitorados com um arranjo de detectores do equipamento e utilizados para a confecção da imagem da superfície da amostra. Monolitos à base de sílica híbrida são analisadas por MEV mediante ao recobrimento metálico ou de carbono devido à sua baixa condutividade elétrica (Vernon-Parry, 2000). A MEV tem sido empregada para comparar a superfície de monolitos híbridos sintetizados em diferentes condições (Meinusch et al., 2015; Liu et al., 2017) avaliar a interconectividade dos poros (Zheng et al., 2007; Chen et al., 2010; De Souza et al., 2015; Domingues, Crevelin, De Moraes, et al., 2015) e a homogeneidade radial de capilares preparados “in situ” (Roux et al., 2008; Zheng et al., 2010).

### *1.7.2 Espectroscopia Vibracional na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)*

A FTIR vem sendo utilizada na identificação de grupos funcionais presentes em diversos tipos de amostras. A identificação é baseada na medida da radiação (na região do infravermelho) absorvida pela amostra submetida a um feixe. Geralmente as o grupos funcionais absorvem a radiação entre 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . A absorção em cada comprimento de onda está relacionada com um modo normal de vibração dos grupamentos químicos (Infrared Spectroscopy).

### *1.7.3 Adsorção/dessorção de nitrogênio*

Os ensaios de adsorção/dessorção são baseados na adsorção de gases, que se caracterizam pelo enriquecimento da concentração do adsorbato na superfície da amostra (Dąbrowski, 2001). A amostra é inserida em uma câmara que é preenchida com uma quantidade conhecida de nitrogênio. A temperatura da câmara é mantida constante enquanto a pressão no sistema é registrada em intervalos de tempos regulares. A medida que o gás vai se adsorvendo na amostra a pressão da câmara diminui. Os dados são coletados e utilizados na confecção de isotermas que relacionam a quantidade de gás adsorvido em função da pressão relativa ( $P/P_0$ ). O

tipo de isoterma (segundo a IUPAC I, II, III, IV, V ou VI) revela informações a respeito da porosidade do adsorvente (Sing, 1985).

O método BET (Brunauer *et al.*, 1938) e BJH (Barrett *et al.*, 1951) são utilizados no tratamento dos dados obtidos pelas isoterms de adsorção. O primeiro método é empregado na obtenção da área superficial dos adsorventes porosos enquanto que o segundo método é empregado para a determinação dos tamanhos dos mesoporos.

# Objetivos

## 2. Objetivos

- Sintetizar através do processo sol-gel (polimerização *in-situ* no capilar de sílica fundida) a fase monolítica de sílica híbrida com grupos ciano e amino incorporados.

- Caracterizar a fase monolítica de sílica híbrida com grupos ciano e amino incorporados através das técnicas de microscopia eletrônica de varredura, infravermelho com transformada de Fourier, adsorção e dessorção de nitrogênio, e difração de raios X.

- Desenvolver e validar o método *in-tube* SPME acoplado diretamente ao sistema MS/MS para determinação de alanina, serina, isoleucina, leucina, aspartato, glutamato, lisina, metionina, tirosina e triptofano em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos.

Materiais e

Métodos

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Padrões e reagentes

Os padrões analíticos, aspartato, glutamato, serina, glicina, alanina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), metionina, leucina, tirosina, triptofano e os isótopos estáveis (padrões internos) metionina-d<sub>3</sub> e Alanina <sup>13</sup>C<sub>3</sub><sup>15</sup>N foram obtidas da Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Tetraetilortossilicato TEOS (98%), 3-cianopropiltriétoxissilano (CN-TEOS) (98%), aminopropiltriétoxissilano (APTES) e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (95%), hidróxido de sódio (98%), etanol, propanol e ácido clorídrico foram obtidos 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). Acetonitrila (ACN) e metanol grau HPLC-MS, fluoreto de amônio (98%) e acetato de amônio foram obtidos da JT Baker (Phillipsburg, EUA).

#### 3.2 Amostras de plasma

Amostras de plasma de voluntários não expostos a qualquer medicamento durante pelo menos 72 h foram utilizadas para otimizar e validar o método *in-tube* SPME-MS/MS desenvolvido. Estas amostras de plasma de pacientes sadios e dos pacientes esquizofrênicos 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 e congeladas à temperatura de 80°C negativos até o momento da análise. Com base em trabalhos descritos na literatura (Sahai e Uhlhaas, 1985; Schaefer *et al.*, 1987; González *et al.*, 2014), aminoácidos em 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 por pelo menos seis meses. O plasma sintético (utilizado para avaliação do efeito de matriz) foi preparado de acordo com procedimento previamente reportado na literatura (Holme e Heaton, 1993) e utilizado em uma semana.

### 3.3 Síntese do capilar monolítico híbrido com grupos cianopropil e aminopropil incorporados.

A fase monolítica de sílica híbrida com grupos cianopropil e aminopropil foi sintetizado pelo procedimento sol-gel em uma etapa. Inicialmente a síntese do monolito foi realizada em coluna de aço inox (síntese *in situ*). Em um tubo eppendorf® de 2 mL imerso em banho de gelo foram adicionados 280 µL de TEOS, 140 µL de APTES, 140 µL de CN-TEOS, 110 µL de etanol, 20 µL de água, 25 mg de CTAB e 50 µL de fluoreto de amônio ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Após agitação em vortex, a mistura reacional foi rapidamente inserida em um tubo capilar, selada e mantida a 40°C por 15 horas. Em seguida o sorvente monolítico foi lavado com 10 mL de solvente (metanol, etanol, propanol e água foram avaliados como solventes de lavagem) e seco em estufa a 60°C por 48 horas.

A síntese *in situ* da fase monolítica também foi realizada em capilares de sílica fundida (530 µm D.I. e 10 cm de comprimento). Para tanto estes capilares foram pré tratados com HCl ( $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  durante 30 minutos), com água (até o pH da solução eluída pelo capilar estar próximo de 7), NaOH ( $1 \text{ mol L}^{-1}$  durante 2 horas), novamente com água até pH da solução eluída pelo capilar estar próximo de 7 e com MeOH durante 30 minutos. Posteriormente, os capilares foram colocados para secagem a 160°C por 3 h. A síntese do capilar monolítico também foi realizada em uma única etapa de acordo com o seguinte procedimento: Em um tubo Eppendorf de 2,0 mL, imerso em banho de gelo foram adicionados: 5 mg de CTAB, 20 µL de etanol, 100 µL água, 28 µL de CN-TEOS, 28 µL de APTES, 55 µL de TEOS e 10 µL de fluoreto de amônio ( $10 \text{ mMol L}^{-1}$ ). Esta mistura foi agitada em agitador de tubos do tipo vortex por 5 s e rapidamente transferida para o capilar sílica fundida pré-tratado. Ambas as extremidades do capilar foram vedadas com septos de silicone e este foi mantido a 40°C por 15 h para a polimerização. Posteriormente, este capilar foi lavado com 2 mL de etanol para a remoção do surfactante e subprodutos da reação e em seguida seco a 60°C por 48 h. Diferentes razões molares dos precursores (TEOS, CN-TEOS e APTES), temperaturas de envelhecimento (22 e 60°C), quantidade de CTAB (5 e 7 mg) e a razão etanol/água (20:100 v/v e 50:50 v/v) foram avaliadas para otimizar o procedimento de síntese. A Tabela 3 ilustra os parâmetros experimentais avaliados na otimização da síntese da fase monolítica.

Tabela 3. Diferentes procedimentos avaliados para o procedimento de síntese da fase monolítica no capilar de sílica fundida

Procedimento	TEOS (μL)	APTES (μL)	CN-TEOS (μL)	H <sub>2</sub> O/EtOH (μL)	TEOS/APTES/CN-TEOS (μL)	Temperatura de envelhecimento (°C)
1	56	28	28	100:20	2:1:1	60
2	38	38	38	100:20	1:1:1	60
3	56	56	0	100:20	1:1:0	60
4	56	0	56	100:20	1:0:1	60
5	56	28	28	50:50	2:1:1	60
6	56	28	28	100:20	2:1:1	22

EtOH = etanol

### 3.4 Caracterização do capilar monolítico de sílica híbrida.

A caracterização química e física da fase monolítica sintetizada foi realizada para comprovar a incorporação dos reagentes de síntese junto à fase e elucidar a morfologia. A fase monolítica de sílica híbrida com grupos aminopropil e cianopropil incorporados desenvolvida neste trabalho foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), infravermelho com transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*), adsorção/dessorção de N<sub>2</sub> e difração de raios-x. As análises realizadas permitiram a completa caracterização da fase, tanto do ponto de vista físico, quanto do ponto de vista químico. Todas as medidas foram realizadas em equipamentos do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo (FFCLRP-USP), exceto as medidas de adsorção/dessorção de nitrogênio, que foram realizadas no Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás.

Para a caracterização morfológica do capilar monolítico por MEV, inicialmente as fases monolíticas foram recobertos com carbono por 90 s em equipamento Bal-Tec SCD050 Sputter (Fürstentum Liechtenstein) e posteriormente,

analisados em um microscópio eletrônico de varredura Zeiss EVO 50 (Cambridge UK).

A incorporação dos grupos ciano, amino e dos demais reagentes de síntese no capilar monolítico foi comprovada por FTIR. Tais análises foram realizadas num equipamento ABB Bomem series MB100 *Spectrometer*, resolução de 2 cm<sup>-1</sup>. Para obtenção dos espectros, uma pequena porção do capilar monolítico foi macerada e pastilhada com brometo de potássio (KBr).

Os experimentos de adsorção/dessorção de nitrogênio foram realizados a 77 K num analisador Micrometrics ASAP 2020 Plus. O tratamento dos dados foi realizado pelos métodos BET (Brunauer *et al.*, 1938) e BJH (Barrett *et al.*, 1951).

A análise de difração de raios-x foi realizada em um difratômetro Siemens-Bruker D5005-AXS, com radiação de CuK $\alpha$ , monocromador de grafite, a  $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$  e 0.02° s<sup>-1</sup>, no intervalo de 5–70° (2 $\theta$ ).

### 3.5 *Pré tratamento das amostras de plasma*

Inicialmente, as proteínas das amostras de plasma (200  $\mu\text{L}$ ) foram precipitadas com 400  $\mu\text{L}$  de acetonitrila gelada (0°C). Este procedimento foi realizado sob agitação em vortex e posterior centrifugação por 30 min a 9000 g. O sobrenadante (500  $\mu\text{L}$ ) foi transferido para um tubo eppendorf e submetido a secagem em pré concentrador a vácuo (Eppendorf, Brasil). O extrato seco foi reconstituído em 50  $\mu\text{L}$  de acetonitrila com 0,1% (solução da amostra) (v/v) de ácido fórmico e 10  $\mu\text{L}$  foram injetados no sistema in tube SPME-MS/MS.

### 3.6 *In-tube SPME-MS/MS*

#### 3.6.1 *Condições MS/MS*

Equipamento: Waters® UPLC-MS/MS (Xevo TQD), equipado com fonte de ionização por electrospray e analisador de massas do tipo quadrupolo. Os parâmetros otimizados do espectrômetro de massas foram: voltagem do capilar, 0,50 kV; temperatura da fonte, 150 °C; temperatura de dessolvatação, 300 °C; fluxo do gás de dessolvatação, 600 L h<sup>-1</sup> (N<sub>2</sub>, 99.9% de pureza); fluxo do cone de gás, 20 L

$\text{h}^{-1}$ . Os aminoácidos foram analisados por monitoramento de reações selecionadas (SRM, do inglês “*selected reaction monitoring*”), utilizando argônio (99,9999% de pureza) como gás de colisão para obtenção dos íons-produto, que foram selecionados de acordo com a intensidade do sinal de cada fragmento, durante o processo de otimização. Os dados foram adquiridos utilizando o software MassLynx V4.1. O software QuanLynx foi utilizado para o processamento de dados e quantificação. Duas transições específicas foram otimizadas para cada composto, a fim de se obter maior seletividade e confiabilidade no método. A primeira transição (sinal de maior intensidade) foi utilizada para quantificação do composto, a segunda para análise qualitativa.

Inicialmente, soluções padrão de  $500 \text{ nmol mL}^{-1}$  de cada analito foram infundidas diretamente no espectrômetro de massas a fim de se obter as condições de energia de colisão, energia do cone e transições SRM de maior intensidade (maior sinal analítico e maior detectabilidade).

### 3.6.2 Procedimento *in-tube* SPME-MS/MS

O método *in-tube* SPME-MS/MS foi realizado conectando uma extremidade do capilar monolítico (entrada do solvente) à bomba Quaternária (QSM, do inglês “*Quaternary Solvent Manager*”), enquanto a outra extremidade (saída do solvente) foi conectada à válvula de 6 canais do espectrômetro de massas, como ilustrado na Figura 4. A válvula do espectrômetro de massas pode assumir duas posições: posição 1 (o eluato do capilar é direcionado para o descarte) e posição 2 (o eluato do capilar é direcionado para uma câmara de mistura, o qual será diluído com a solução de infusão (solução de acetonitrila com 2% de ácido fórmico) bombeada do reservatório A (por uma seringa automática) com um vazão de  $10 \mu\text{L min}^{-1}$ . (Figura xa e xb, respectivamente). Inicialmente, a fase móvel proveniente da bomba quaternária ( $100 \mu\text{L min}^{-1}$ ) transportou a amostra do injetor (SM, sample manager) para a coluna monolítica (localizada no CM, column manager) e em seguida para a válvula do espectrômetro de massas. A válvula do espectrômetro de massas foi posicionada automaticamente na posição 1 (descarte) durante a etapa de pré concentração, lavagem e condicionamento e na posição 2 (câmara de ionização por eletrospray e TQD) durante a etapa de eluição (Tabela 4). A detectabilidade do

método *in tube* SPME-MS/MS com e sem a infusão combinada pós capilar também foi avaliada.

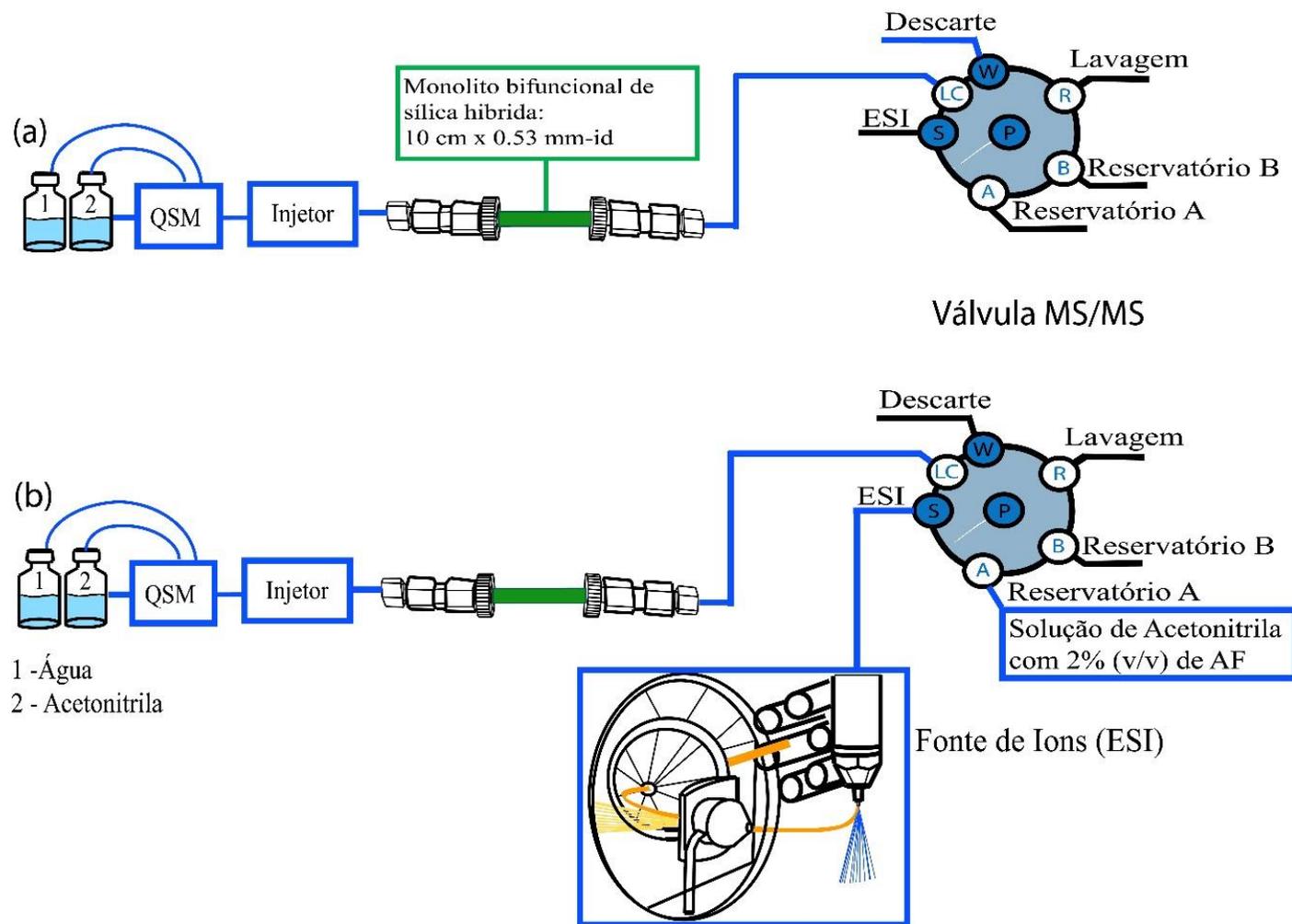


Figura 4. Esquema In-tube SPME-MS/MS. As linhas em azul sinalizam a trajetória da fase móvel bombeada pela QSM ou pelo reservatório A; (a) Válvula MS/MS na posição 1; (b) Válvula MS/MS na posição 2. QSM – Quaternary Solvent Manager; ESI = Electro spray Ionizatio. Fonte: próprio autor.

Tabela 4. Etapas do método *in-tube* SPME-MS/MS

Fase móvel	A: Água B: Acetonitrila		Posição da válvula	Comentários
	% A	% B		
0.0	0	100	1	Pré concentração dos analitos e exclusão dos interferentes.
2.0	100	0	2	Início da eluição dos analitos do capilar monolítico para o espectrômetro de massas.
4.0	100	0	2	Início da infusão pós capilar de acetonitrila com 2% de ácido fórmico
7.0	100	0	1	Fim da etapa de eluição dos analitos e início do gradiente de lavagem da coluna capilar.

### 3.7 Otimização da condições *in-tube* SPME-MS/MS

Para a otimização do método *in-tube* SPME-MS/MS, 200  $\mu$ L de plasma foram utilizados. Os parâmetros foram otimizados considerando a capacidade de sorção do capilar e a detectabilidade no espectrômetro de massas em tandem. O procedimento *in-tube* SPME-MS/MS foi realizado em quatro etapas: (1<sup>a</sup>) pré concentração dos analitos no capilar monolítico, (2<sup>a</sup>) remoção dos interferentes da matriz biológica, (3<sup>a</sup>) eluição dos analitos e (4<sup>a</sup>) lavagem do capilar monolítico para reutilização. Desta forma, foram avaliados (a) o diluente da amostra, denominado “solvente da amostra” (composição e volume), (b) fase móvel para a pré concentração dos analitos, (c) fase móvel para remoção dos interferentes, (d) fase móvel para eluição analitos e (e) tempo para a pré concentração dos analitos. Para tanto, 10  $\mu$ L da solução da amostra (após etapa prévia de pré-tratamento da amostra) foram injetados no sistema UPLC-MS/MS. As soluções utilizadas como solvente da amostra avaliadas foram as seguintes: solução aquosa em diferentes valores de pH (pH 4, 7 e 10) (pH ajustado com a adição de soluções de hidróxido de amônio ou de ácido fórmico); soluções de H<sub>2</sub>O:acetonitrila em diferentes proporções 2:1, 1:1, 1:4 (v/v); acetonitrila e

acetonitrila com adição de hidróxido de amônio (0,1%) ou ácido fórmico (0,1% e 0,2%). Os volumes 25 e 50  $\mu\text{L}$  foram avaliados como volume de solvente da amostra. A vazão da fase móvel (50 e 100  $\mu\text{L min}^{-1}$ ) para os solventes da amostra (água, acetonitrila e acetonitrila com adição de 0,1% de ácido fórmico) foi otimizada. Este último parâmetro foi avaliado considerando a pressão máxima que suporta o capilar de sílica suporta (100  $\mu\text{L min}^{-1}$ ).

Após a otimização dos solventes de pré concentração e eluição, a etapa seguinte foi a otimização da exclusão dos interferentes do plasma. Para tanto, injetou-se 10  $\mu\text{L}$  de amostras de plasma pré tratadas (item 3.5) no sistema *in-tube* SPME-DAD, com intervalo de comprimento de onda de 200 – 750 nm durante toda a análise.

O último parâmetro a ser otimizado foi o comprimento do capilar utilizado. Esta etapa foi feita levando em consideração a sorção e a pressão do sistema, uma vez que pressões mais altas podem diminuir o tempo de vida útil do capilar. Inicialmente o método *in tube* SPME-MS/MS foi desenvolvido utilizando um capilar monolítico de aproximadamente 5 cm de comprimento como fase extratora. A avaliação de um capilar monolítico de 10 cm foi realizada para aumentar a capacidade de sorção e conseqüentemente, a detectabilidade.

### 3.8 Avaliação da capacidade de sorção do capilar monolítico

A avaliação da capacidade de adsorção ( $C_{\text{ads}}$ ) do monolito foi realizada segundo procedimentos da literatura (De Gisi *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2019). Os ensaios foram realizados em triplicata para dois capilares monolíticos sintetizados em dias diferentes. Os coeficientes de variação destes ensaios para ambos os capilares foram inferiores a 15% para soluções padrão em acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico.

As soluções padrão dos aminoácidos foram preparadas em acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico em diferentes concentrações (CAA, de 0.150 a 4.5  $\mu\text{Mol mL}^{-1}$ ) para avaliar a máxima capacidade de sorção ( $Q_{\text{max}}$  ng  $\text{cm}^{-3}$  do capilar monolítico. Essas soluções foram injetadas separadamente no sistema *in-tube* SPME-MS/MS. A quantidade adsorvida ( $Q$ , ng) foi determinada utilizando uma curva de calibração e o valor de  $Q_{\text{max}}$  foi estimado baseado na seguinte equação  $Q_{\text{max}} = (Q \times V_i)/V_m$  onde  $V_i = 5 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^{-3}$ , corresponde ao volume de

solução injetada, e  $V_m = 22.6 \text{ cm}^3$ , corresponde à estimativa do volume fase monolítica imobilizada no interior do capilar. O valor de Q foi baseado no ponto de saturação do gráfico Q versus CAA.

### 3.9 Validação analítica

A validação deste método foi baseada nas normas da ANVISA, RESOLUÇÃO - RDC Nº 27, DE 17 DE MAIO DE 2012, que dispõe dos requisitos mínimos para validação de métodos bioanalíticos.

As faixas lineares das curvas de calibração foram estabelecidas com base nas concentrações de AA e NT geralmente encontradas em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos (Domingues, Crevelin, De Moraes, *et al.*, 2015). Para a avaliação da linearidade do método, amostras (200  $\mu\text{L}$ ) de plasma (proveniente de um pool de plasma) foram enriquecidas com soluções padrão dos analitos nas faixas de concentrações de 45 – 300  $\text{nmol mL}^{-1}$  para alanina, 15-300  $\text{nmol mL}^{-1}$  para soma de leucina e isoleucina, de 10 – 102  $\text{nmol mL}^{-1}$  para metionina e tirosina, de 9 – 96  $\text{nmol mL}^{-1}$  para o triptofano, de 12-210  $\text{nmol mL}^{-1}$  para serina, de 12-90  $\text{nmol mL}^{-1}$  para glutamato, de 12-102  $\text{nmol mL}^{-1}$  para lisina, e de 6-36  $\text{nmol mL}^{-1}$  para aspartato. Inicialmente soluções estoque contendo metionina d3 (300  $\text{nmol mL}^{-1}$ ) e glutamato d5 (1000 nmolar) foram preparadas para padronização interna. No entanto, glutamato d5 não apresentou boa precisão durante as análises e precisou ser substituído pelo isótopo alanina  $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}$ .

Para a avaliação da linearidade, curvas analíticas foram plotadas por adição de padrão utilizando a razão (relação entre a área do analito pela área do padrão interno). Esta razão foi plotada em função da concentração do analito no plasma enriquecido em pelo menos 6 concentrações diferentes.

A precisão e a exatidão foram determinadas em uma mesmo dia (intraensaio) e em, três dias consecutivos (interensaios). Em cada ensaio foram realizadas cinco replicatas em concentrações correspondentes aos limites inferior e superior de quantificação (LIQ e LSQ respectivamente) e nos controles de qualidade baixo médio e alto (CQB, CQM e CQA respectivamente). A precisão foi avaliada pelo coeficiente de variação (CV, %) e a exatidão pelo erro padrão relativo (EPR, %). Valores menores que 15% foram aceitos tanto para o

CV, quanto para o EPR, com exceção do LIQ que foram aceitos valores de até 20%.

O efeito residual foi avaliado injetando uma amostra de plasma sintético antes e duas depois da análise da amostra de plasma enriquecida com a concentração do LSQ. O efeito residual foi considerado não significativo para as respostas de picos interferentes nos tempos de retenção dos analitos inferiores a 20% (vinte por cento) das respostas dos analitos nas amostras correspondentes ao LIQ.

Seis amostras de plasma de voluntários foram utilizadas para avaliação do efeito matriz. O efeito de matriz foi avaliado por comparação (teste t, com valor de p em um nível de significância de 95%) dos coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas com amostras de plasma enriquecidas com os analitos com às curvas analíticas obtidas com soluções aquosas nas mesmas concentrações.

# Resultados e discussão

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Síntese do capilar monolítico híbrido com grupos cianopropil e aminopropil incorporados.

O capilar monolítico de sílica híbrida com os grupos ciano e amino incorporados foi sintetizado pelo processo sol-gel, o qual se baseia na hidrólise e condensação dos precursores tetraalcoxissilano e alquiltrialcoxissilano. Em geral as reações sol-gel ocorrem em três etapas: a) hidrólise do precursor alcoxissilano; (b) condensação entre a sílica hidratada (grupos Si-OH) e o alcoxissilano não hidrolisado para formar ligações siloxano (Si-O-Si) e (c) policondensação de grupos silanóis adicionais para formar oligômeros lineares ou cíclicos e, eventualmente, uma rede de silicatos (Hench e West, 1990; Li *et al.*, 2004).

APTES é um precursor básico que pode catalisar rapidamente a hidrólise e condensação do TEOS (Yan *et al.*, 2004; Brothier e Pichon, 2013). Por outro lado a reação entre TEOS e CN-TEOS é lenta em meio básico (meio reacional, com a adição do APTES fica com o pH próximo a 10). Neste contexto, o principal desafio desta síntese foi aumentar a velocidade de hidrólise e condensação entre TEOS e CN-TEOS em meio básico para obtenção de um monólito híbrido com os grupos funcionais amino e ciano. Para atingir este objetivo nós utilizamos fluoreto de amônio como catalizador. O íon  $F^-$  presente em ppm no meio reacional pode aumentar drasticamente a velocidade desta reação sol-gel, devido ao seu menor raio iônico em comparação com os íons  $OH^-$  (Iler, R. K., 1979; Russo e Hunt, 1986; Rodríguez *et al.*, 1992). Desta forma o íon fluoreto aumentou a velocidade de hidrólise e condensação do CN-TEOS no meio reacional, proporcionando a incorporação de ambos precursores (CN-TEOS e APTES) na estrutura monolítica.

A fase monolítica desenvolvida apresentou encolhimento quando sintetizada em coluna de aço inox. O encolhimento do monólito resultou em uma via alternativa para a passagem da fase móvel e da amostra de plasma, diminuindo a interação dos analitos com a fase estacionária. Trabalhos anteriormente publicados na literatura (Mitsyuk *et al.*, 1964; Kirkbir *et al.*, 1998) demonstraram que a secagem em diferentes solventes podem proporcionar

diferentes encolhimentos em fases monolíticas a base de sílica híbrida. Metanol, etanol, isopropanol e butanol foram percolados após a etapa de limpeza dos resíduos de síntese. No entanto nenhuma diferença significativa no encolhimento do monólito pôde ser observada com a mudança dos solventes. Portanto, não foi possível sintetizar o monólito na coluna de aço inox. Os procedimentos posteriores foram realizados em capilares de sílica fundida (polimerização *in situ*). A superfície interna dos capilares de sílica fundida possuem grupos silanóis residuais que são capazes de ancorar covalentemente o monólito, impedindo assim o encolhimento (Li *et al.*, 2004). O capilar de sílica fundida foi inserido em um tubo poli éter éter cetona (PEEK, do inglês poly ethyl ethyl ketone) para ser acoplado ao equipamento.

Malik e colaboradores demonstraram que os grupos cyanopropil em revestimentos de polidimetilsiloxano extraíram efetivamente analitos de alta e média polaridade em meio aquoso (Kulkarni *et al.*, 2006). Yan e colaboradores descreveram que os grupos amino (em monólitos de sílica híbrida) apresentaram interação com analitos ácidos (Yan *et al.*, 2004). Os precursores CN-TEOS e APTES podem realizar interações do tipo ligação de hidrogênio, interação eletrostática, dipolo-dipolo, dipolo-induzido e transferência de carga (Kulkarni *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2010).

A otimização de surfactante e quantidade de água podem ajudar no controle do tamanho do poro e conseqüentemente na permeabilidade (Yan *et al.*, 2004). O surfactante CTAB age como molde supramolecular durante a formação do monólito e pôde ser facilmente removido por uma simples extração com solvente. Neste trabalho avaliamos a síntese utilizando 5 e 7 mg de CTAB, não observando mudanças significativas na sorção dos analitos. Diferentes razões molares de TEOS, CN-TEOS e APTES (tabela 3 procedimentos 1-4) foram investigadas na sorção dos analitos. De acordo com a figura 5a o procedimento número 1 apresentou maior detectabilidade para a maioria dos analitos demonstrando que a presença de ambos os grupos amino e ciano na estrutura monolítica aumentou a capacidade de sorção da fase monolítica. Além disso a proporção destes precursores em relação ao TEOS originou um monólito com maior estabilidade mecânica (resistente a maior quantidade de extrações) em relação ao material obtido no procedimento 2. Todos os procedimentos de síntese avaliados resultaram em uma fase monolítica com força mecânica e

adequada permeabilidade. A quantidade de água adicionada ao meio reacional determina o equilíbrio entre as reações de hidrólise e condensação, influenciando na transição sol-gel e no processo de separação de fases uma vez que a água participa diretamente das reações de hidrólise e condensação (Yan *et al.*, 2006). Desta forma, a quantidade de água presente no meio reacional foi avaliada comparando o sinal analítico obtido pelos monolitos sintetizados através dos procedimentos 5 e 1. O procedimento número 5 avaliou a síntese em condições mais diluídas (figura 5b) utilizando a proporção 1:1 (v/v) de água com etanol, enquanto que o procedimento 1 utilizou a proporção água/etanol de 5:1 (v/v). Em condições mais diluídas (maior proporção de metanol) a transição sol-gel e a separação de fases foi um pouco mais lenta e o monólito obtido apresentou maior pressão quando conectado ao sistema. Metanol também foi avaliado como solvente de síntese (figura 6a), mas não gerou mudanças significativas na capacidade de sorção da fase monolítica devido a sua natureza química que é semelhante à do etanol.

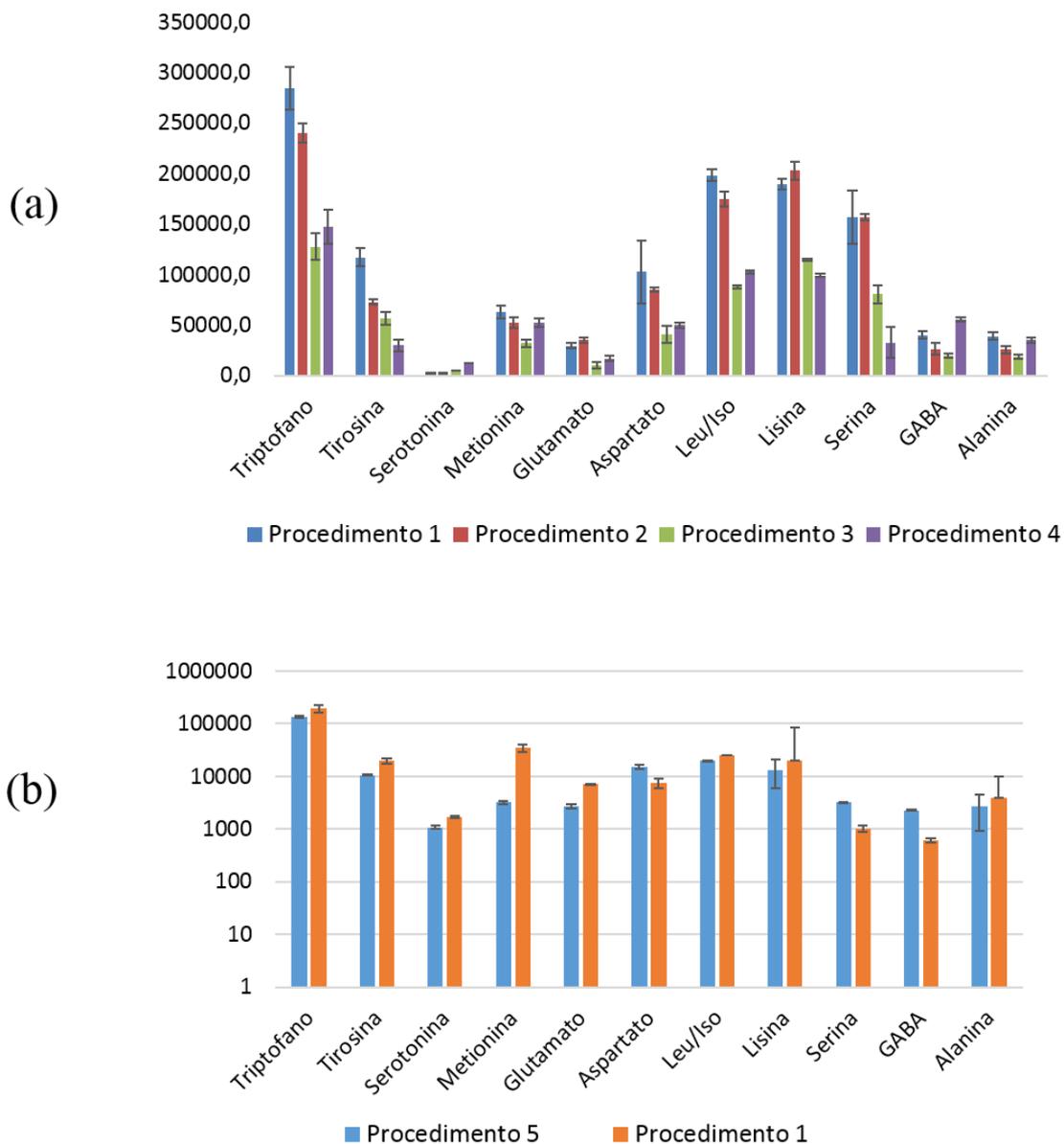


Figura 5. (a) Avaliação da sorção dos diferentes monolitos sintetizados a partir dos procedimentos de 1 a 4 (Tabela 3). O procedimento analítico está descrito no item 3.6.

O envelhecimento do monolito a 22°C diminuiu a eficiência de extração e originou um capilar monolítico de difícil repetitividade. De acordo com a Figura 7b, o monolito envelhecido a 60°C apresentou maior eficiência de extração para a maioria dos analitos. Neste trabalho a fase monolítica encontra-se covalentemente ligada à parede do capilar de sílica fundida. No entanto, o monólito ainda está sujeito a encolhimento ou rachadura dependendo das condições de secagem (Kirkbir *et al.*, 1998; Yan *et al.*, 2004). Uma vez que a síntese de ambos os monolitos foi realizada com os mesmos reagentes em

mesma proporção, este resultado sugere que a estrutura monolítica pode ter sofrido encolhimento ou até rachaduras durante a etapa de envelhecimento a 22°C, fato que pode ter prejudicado a eficiência de extração e repetitividade das análises. O coeficiente de variação das análises inter-síntese (testes intra e inter ensaio) realizadas com o capilar monolítico envelhecido a 22° foi maior do que 15%. Desta forma, e baseado em outros procedimentos reportados na literatura (Zheng *et al.*, 2010; De Souza *et al.*, 2015; Domingues, Souza, *et al.*, 2015) a temperatura de 60°C foi utilizada como temperatura de envelhecimento para os ensaios subsequentes. O teste de reprodutibilidade inter-síntese foi realizado utilizando três capilares sintetizados em dias diferentes. O procedimento de extração otimizado foi empregado para análise de solução aquosa dos analitos na concentração de 100 nmol mL<sup>-1</sup>. Os coeficientes de variação dos testes intra e inter ensaio foram menores que 15,0% demonstrando que o procedimento de síntese é reprodutível.

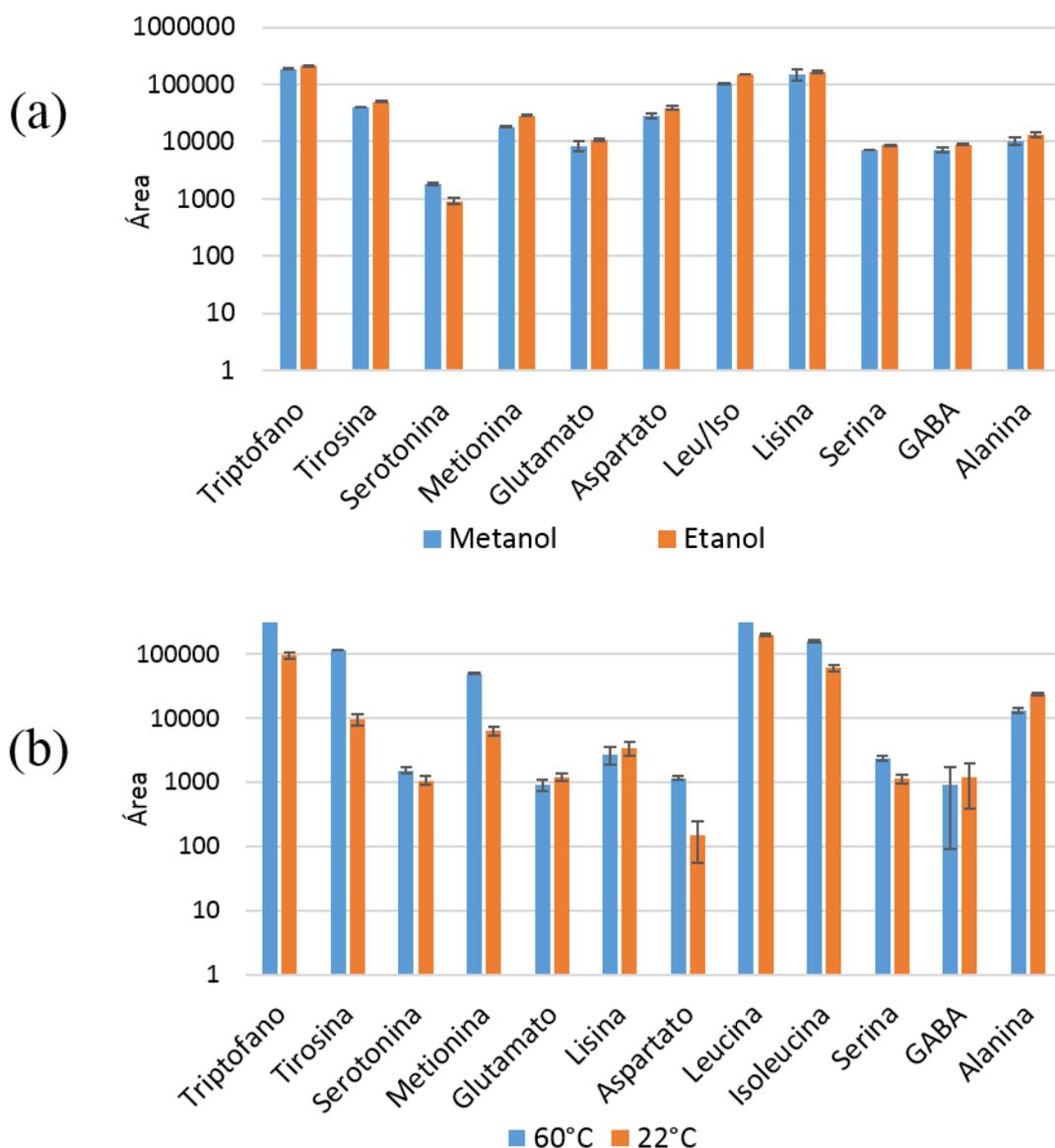


Figura 6. (a) Avaliação de metanol e etanol como solvente de síntese. (b) Áreas dos picos dos analitos obtidas após extração utilizando capilares obtidos pelos procedimentos 1 (60°C) e procedimento 6 (22°C). O procedimento é descrito no item 3.6.

#### 4.2 Caracterização do capilar monolítico de sílica híbrida

O capilar monolítico sintetizado foi caracterizado por MEV, FTIR, adsorção/dessorção de nitrogênio e DRX.

##### 4.2.1 Microscopia eletrônica de Varredura

A morfologia e o encolhimento após etapa de secagem foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura. O monolito apresentou estrutura homogênea e porosa formando uma rede contínua (Figura 7a). O precursor aminopropil tem caráter básico conferindo alcalinidade ao meio durante o processo sol-gel dos monolitos sintetizados. A cinética de condensação, via catálise alcalina, é mais rápida que a cinética de hidrólise dos precursores, prevalecendo a formação de partículas interconectadas, o que leva à formação de uma estrutura altamente compactada (Sarwar e Ahmad, 2000; Siouffi, 2003). O zoom dado no leito do capilar monolítico (figura 7b) ilustra a estrutura compacta formada no interior do capilar. É possível ainda observar a presença de cavidades e canais que evidenciam a porosidade da fase monolítica.

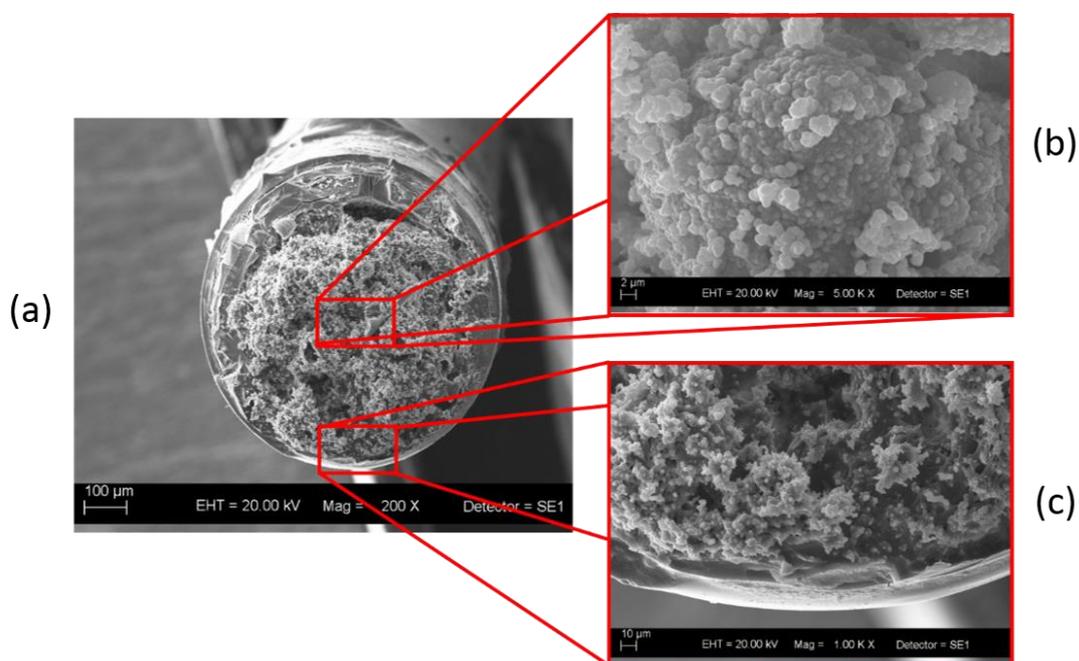


Figura 7. MEV em diferentes ampliações do monolito híbrido com cianopropil e aminopropil sintetizado. (a) capilar monolítico (200 x); (b) zoom demonstrando a morfologia do monolito híbrido (5000 x).; (c) zoom da parte inferior, demonstrando a ligação do monolito.

As imagens obtidas por MEV permitiram ainda observar a ausência de encolhimento após etapa de secagem na síntese dos monolitos. O zoom dado na parte inferior do capilar (Figura 7c) mostra que o monolito se ligou completamente à parede interna do capilar. O encolhimento da fase monolítica pode gerar uma via alternativa para passagem do solvente ou amostra, durante

o procedimento *in-tube* SPME-MS/MS, diminuindo a eficiência e reprodutibilidade do método.

#### 4.2.2 Espectroscopia vibracional no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A fase monolítica foi analisada por FTIR a fim de certificar a incorporação dos monômeros funcionais híbridos à estrutura do sorvente. A Figura 8 representa o espectro de FTIR obtidos para o monolito funcionalizado com cianopropil e aminopropil utilizado no procedimento *in tube* SPME-MS/MS. As bandas localizadas em 800 e 1100  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas aos estiramentos simétricos e assimétricos da ligação siloxano (Si-O-Si) da rede de sílica (Innocenzi, 2003). A banda que aparece em torno de 3500  $\text{cm}^{-1}$  é referente aos modos normais de vibração, mais especificamente movimentos de estiramento, O-H (Van Roosmalen e Mol, 1979). Além destes movimentos de estiramento esta banda alargada (extensão de 3250 a 3700  $\text{cm}^{-1}$ ) é formada por contribuições estiramentos das hidroxilas ligadas em ponte (3500 a 3660  $\text{cm}^{-1}$ ) da sílica propriamente dita e também de hidroxilas provenientes de moléculas de água adsorvidas (3300 a 3400  $\text{cm}^{-1}$ ) sobre o material (Hair, 1975). A banda que aparece em aproximadamente 980  $\text{cm}^{-1}$  está associada a estiramentos dos grupos silanóis livres na superfície da sílica (Innocenzi, 2003). Na região 2970  $\text{cm}^{-1}$  são observadas bandas de estiramento  $-\text{CH}_2-$ , provenientes da porção alifática do precursor híbrido (Matkó *et al.*, 2005). A banda que aparece em 2259  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento CN, comprovando a incorporação do grupo ciano ao monolito. Sua presença confirma a incorporação do monômero híbrido a estrutura do sorvente monolítico. Na banda atribuída a deformação das moléculas de água (1650  $\text{cm}^{-1}$ ) é possível perceber a presença de dois ombros: um em  $\sim 1570$  e outro em 1610  $\text{cm}^{-1}$  que provavelmente correspondem aos movimentos de deformação do grupo  $\text{NH}_2$  (Chiang *et al.*, 1980; Peña-Alonso *et al.*, 2007; Pasternack *et al.*, 2008). Estas duas bandas evidenciam a incorporação do grupo aminopropil na estrutura do monólito, uma vez que a banda referente ao estiramento da amina, que geralmente aparece em 3300  $\text{cm}^{-1}$  não pôde ser observada neste espectro, em razão da sua baixa intensidade e por ter sido sobreposta pela banda alargada de OH (Pasternack *et al.*, 2008).

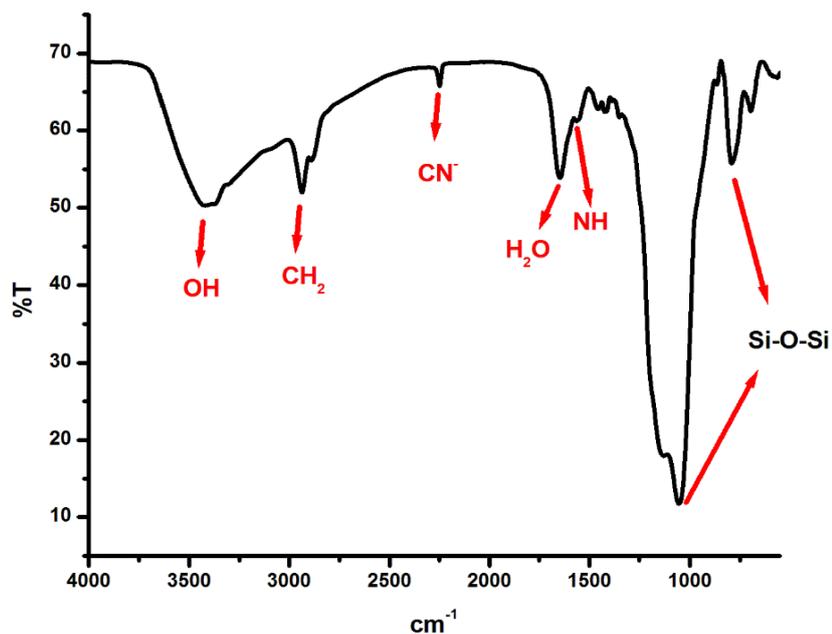


Figura 8. Espectro FTIR do monólito de sílica híbrida

#### 4.2.3 Adsorção/dessorção de nitrogênio

Os experimentos de adsorção/dessorção de nitrogênio forneceram informações valiosas acerca das características de porosidade. A área superficial específica e o volume total de poros foram calculados pelo método BET utilizando as isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio (Brunauer *et al.*, 1938). O diâmetro médio dos mesoporos ( $D_p$ ) foi estimado utilizando as mesmas isotermas de adsorção, mas pelo método BJH (Barrett *et al.*, 1951).

A área superficial específica e o volume total de poros obtidos para o capilar monolítico contendo ambos os grupos cianopropil e aminopropil incorporados foram de  $64.12 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  e  $0.064 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ , respectivamente. Em comparação aos monolitos híbridos a base de TEOS e CN-TEOS reportados por ZHENG (Zheng *et al.*, 2010) e Queiroz (De Souza *et al.*, 2015) o monólito sintetizado no presente trabalho apresentou maior área superficial específica e menor volume total de poros. O diâmetro médio dos mesoporos do monólito duplamente ligado foi maior que o diâmetro médio obtido na síntese realizada por Queiroz (De Souza *et al.*, 2015). A aplicação do método de BJH apontou diâmetro médio de aproximadamente 3,8 nm para o monólito funcionalizado

apenas com CN-TEOS e 6,9 nm para o monolito híbrido duplamente funcionalizado (CN-TEOS e APTES).

A sorção dos analitos no capilar monolítico se deve principalmente a interações intermoleculares (tais como ligação de hidrogênio e interação eletrostática) que ocorrem entre os grupos funcionais presentes nos compostos submetidos à sorção e os grupos funcionais incorporados à estrutura do monolito (neste caso, Si-O, -CN e -NH<sub>2</sub>). No entanto, características estruturais do capilar monolítico, tais como o diâmetro dos poros, área superficial específica e volume dos poros podem influenciar na sorção dos analitos. O volume e diâmetro dos poros estão relacionados à permeabilidade dos mesoporos do capilar monolítico. A área superficial representa a extensão disponível para a ocorrência das interações entre os analitos e a fase monolítica. Desta forma um aumento na área superficial pode aumentar a capacidade de sorção do monólito.

#### 4.2.4 Difração de Raios-x

A Figura 9 mostra o espectro de difração de raios-x do monólito híbrido sintetizado. O espectro indica que o monolito apresenta uma estrutura irregular uma vez que o pico entre 15° e 35° em 2θ com um máximo em 22° é característico de sílica amorfa. A ausência de picos em ângulos maiores que 30° confirma a característica amorfa da estrutura monolítica. Além disso o pico presente em aproximadamente 8,2° mostra que o monolito possui estrutura mesoporosa, resultante do uso do CTAB como agente porogênico e da incorporação dos monômeros CN-TEOS e APTES em sua estrutura tridimensional (Xue e Li, 2008).

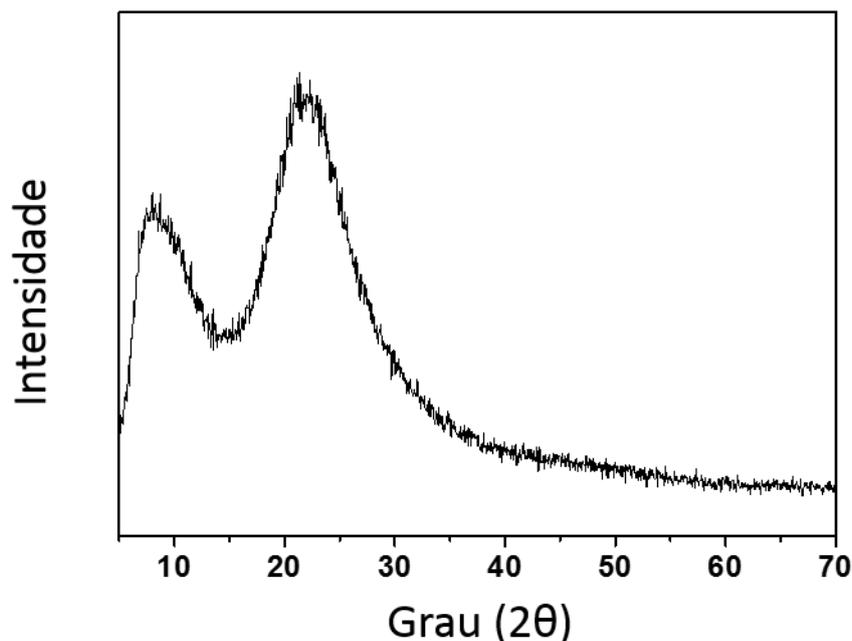


Figura 9. Espectro de difração de raios-x do monolito de sílica híbrida contendo os grupos cianopropil e aminopropil incorporados.

#### 4.3 Otimização do *in-tube* SPME-MS/MS

##### 4.3.1 Condições MS/MS

As transições mais intensas para alanina, alanina  $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}$ , serina, serotonina, GABA, glutamato leucina, isoleucina, aspartato, lisina, metionina, metionina d3, tirosina e triptofano foram determinados durante a otimização por infusão direta de soluções padrão dos analitos no espectrômetro de massas. A tabela 6 mostra o íon precursor, íons produtos potencial do cone e energia de colisão obtidas para cada analito.

Glutamato, metionina, tirosina, leucina, isoleucina, aspartato, lisina, serina e alanina sofrem uma perda neutra de 46 unidades de massa, atribuído como íons de produtos  $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O} - \text{CO}]^+$ . Essa perda de 46 unidades de massa é originária do analito protonado  $[\text{M} + \text{H}]$  (Figura 10, A e B) que perde uma molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  (18 Da), para formar o íon acílio como um intermediário (Figura 10, C). Em seguida, o íon acílio sofre uma perda neutra de 28 Da (CO), para dar origem ao íon estável imínio (Figura 10, D), como reportado na literatura (Choi *et al.*, 2013). GABA e triptofano sofrem perda de 17 Da correspondente a perda neutra de  $\text{NH}_3$  (Bourcier *et al.*, 2006).

A figura 11 (utilizando uma representação genérica dos íons) mostra as prováveis estruturas dos cátions envolvidos em uma das transições monitoradas para (a) GABA, (b) glutamato, (c) alanina (d) triptofano, (e) metionina, (f) tirosina, (g) leucina, (h) isoleucina, (i) lisina, (j) aspartato e (k) serina. Para ionização dos analitos foi utilizada a técnica ESI em modo positivo, onde a carga positiva pode ser encontrada em qualquer um dos heteroátomos presentes em cada analito.

Tabela 5. Transições MS/MS (modo SRM), energia do cone (PC), energia de colisão (CE) e transições selecionadas (Íon precursor e íons produtos) para cada um dos analitos em estudado. Íon produto 1 foi utilizado para quantificação enquanto o íon produto 2 foi utilizado para qualificação

Analito	Íon precursor (m/z)	Íon produto 1 (m/z)	Íon produto 2 (m/z)	PC (V)	EC (V) (Íon Produto 1)
GABA	104,1	87,0	45,0	30	15
Glutamato	148,1	84,0	102,1	25	15
Serotonina	177,1	115,0	104,9	20	36
Triptofano	205,2	146,0	188,1	20	12
Metionina	150,0	56,0	104,0	20	15
Tirosina	182,1	136,1	90,8	25	15
Leu/Iso	132,1	86,1	44,0	20	10
lisina	147,0	88,0	101,0	25	15
Aspartato	134,1	74,0	88,0	20	12
Serina	106,0	60,0	88,0	20	10
Alanina	90,0	44,0	62,0	20	10
Metionina d3	153,1	56,0	107,1	20	15
Alanina <sup>13</sup> C <sub>3</sub> <sup>15</sup> N	94,2	47,1	64,8	20	10

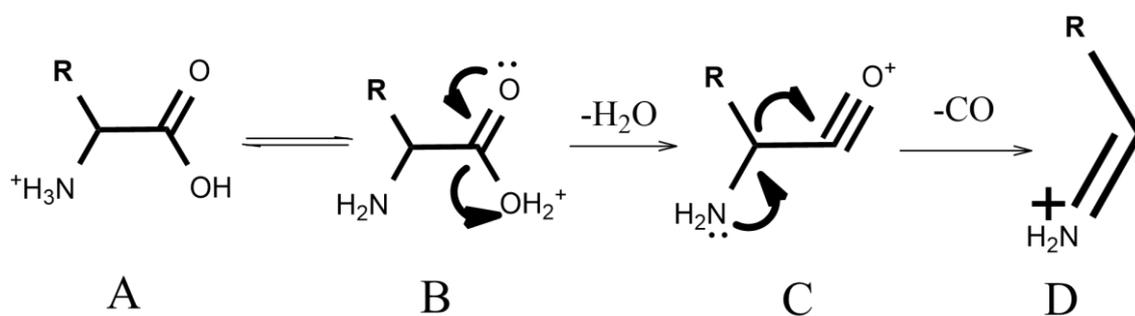


Figura 10. Rotas de fragmentação para a formação do íon  $[M + H - H_2O - CO]$ .  
 Fonte: próprio autor.

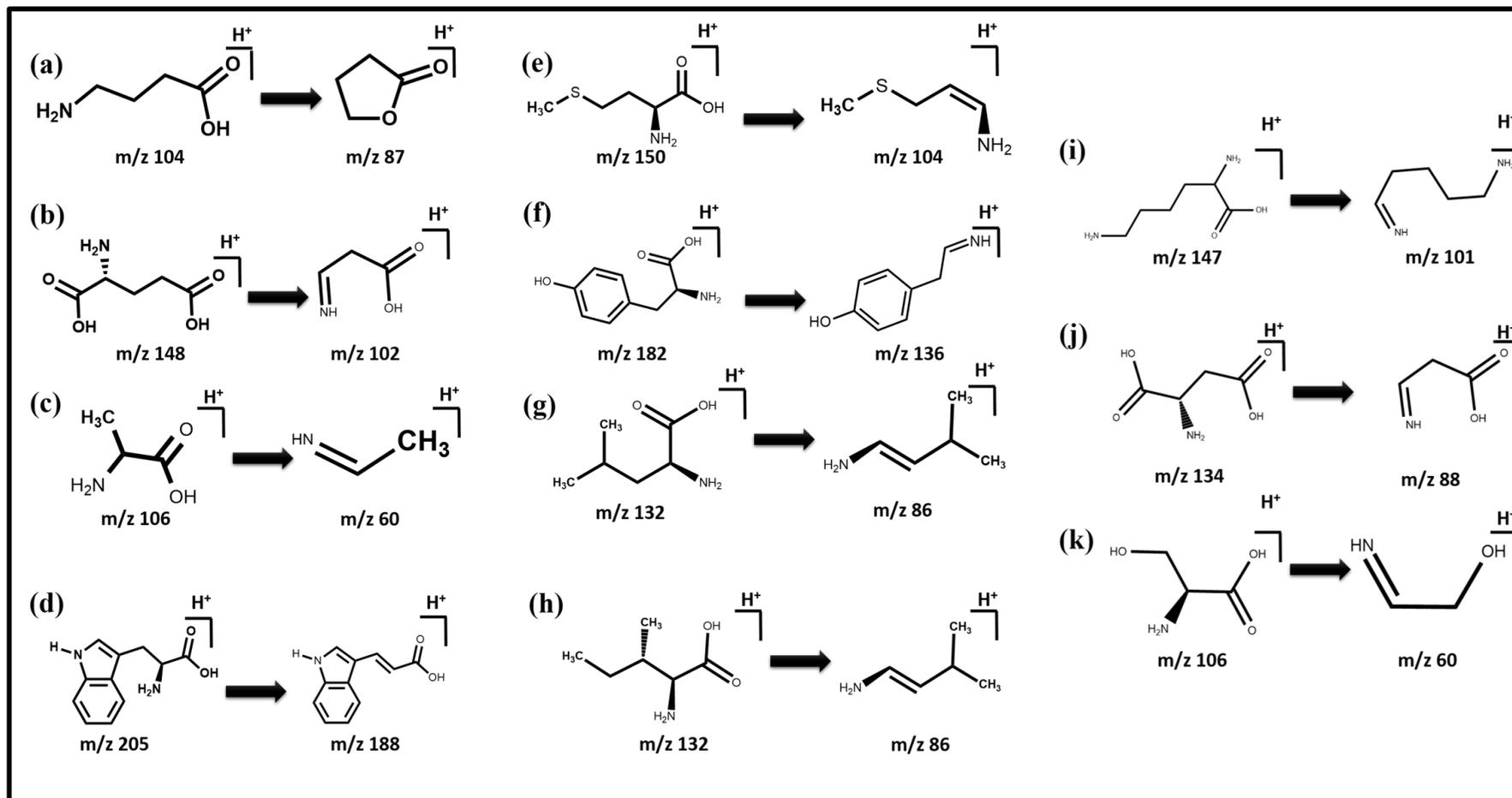


Figura 11. Representação da estrutura dos íons envolvidos nas transições MS/MS para: (a) GABA (Ácido  $\gamma$ -aminobutírico), (b) glutamato, (c) alanina e (d) triptofano, (e) metionina, (f) tirosina, (g) leucina, (h) isoleucina, (i) lisina, (j) aspartato e (k) serina. Fonte: próprio autor.

#### 4.3.2 Otimização da etapa de pré concentração dos analitos

Inicialmente a etapa de sorção dos analitos foi otimizada pela avaliação de diferentes soluções da amostra. As soluções avaliadas foram as seguintes: soluções aquosas de ácido fórmico pH 3 ou hidróxido de amônio pH 7 e 10; acetonitrila e acetonitrila com adição de hidróxido de amônio (0,1%) ou ácido fórmico (AF) (0,1% e 0,2%), Figura 12. Os analitos não apresentaram detectabilidade significativa quando soluções aquosas foram utilizadas como solvente da amostra. Isto se deve ao fato de que os aminoácidos são compostos de alta polaridade, ou seja, possuem grande afinidade por soluções aquosas. Desta forma a solvatação dos aminoácidos na fase aquosa dificultou a interação dos analitos com os grupos ciano e amino, diminuindo sua retenção junto a fase monolítica.

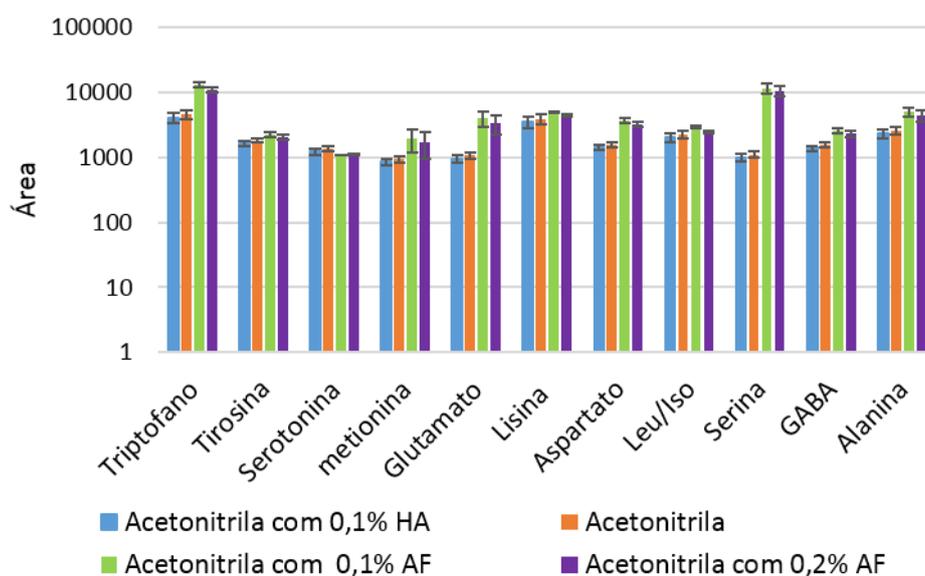


Figura 12. Áreas dos picos cromatográficos dos analitos das análises in-tube SPME-MS/MS de amostras de plasma (200  $\mu$ L) de plasma, utilizando diferentes solventes para reconstituir o extrato seco após a etapa de pré-preparo da amostra. Os solventes avaliados foram os seguintes: acetonitrila com 0,1 % de hidróxido de amônio, acetonitrila, acetonitrila com 0,1% (v/v) de ácido fórmico e acetonitrila com 0,2% (v/v) de ácido fórmico. HA = hidróxido de amônio; AF = Ácido fórmico.

De acordo com a figura 12, a reconstituição do extrato seco (após etapa de pré-preparo da amostra) com acetonitrila com 0,1% (v/v) de ácido fórmico apresentou os maiores valores de áreas, ou seja, maior capacidade de sorção dos analitos junto a fase monolítica. A acetonitrila com a adição de 0,2% (v/v) de

ácido fórmico também foi avaliada. No entanto, este aumento na concentração do ácido fórmico não aumentou a sorção dos analitos. Portanto, a solução de acetonitrila com a adição de 0,1% (v/v) de ácido fórmico foi selecionada como solvente da amostra.

Após a definição da solução da amostra, o segundo parâmetro avaliado foi o tempo necessário para a sorção dos analitos junto ao capilar e exclusão dos interferentes da amostra de plasma. Para este experimento, o capilar monolítico foi conectado ao detector de arranjo de diodos (DAD). Nestes ensaios, a acetonitrila foi utilizada como fase móvel para pré concentração dos aminoácidos e exclusão dos interferentes, e em seguida a composição da fase móvel foi alterada para 100% de água para eluição dos analitos. O intervalo de tempo necessário para a sorção dos analitos foi avaliado durante 2, 5 e 10 minutos (Figura 13a, 13b e 13c, respectivamente). A Figura 13a ilustra que o intervalo de tempo de 0 a 2 minutos foi suficiente para a sorção dos analitos e exclusão dos interferentes endógenos do capilar monolítico. Intervalos de tempos superiores a 2 minutos resultaram na diminuição do sinal analítico com alargamento da base dos picos. Após este tempo, a composição da fase móvel foi alterada para 100 % de água para a eluição dos analitos do capilar monolítico para o DAD.

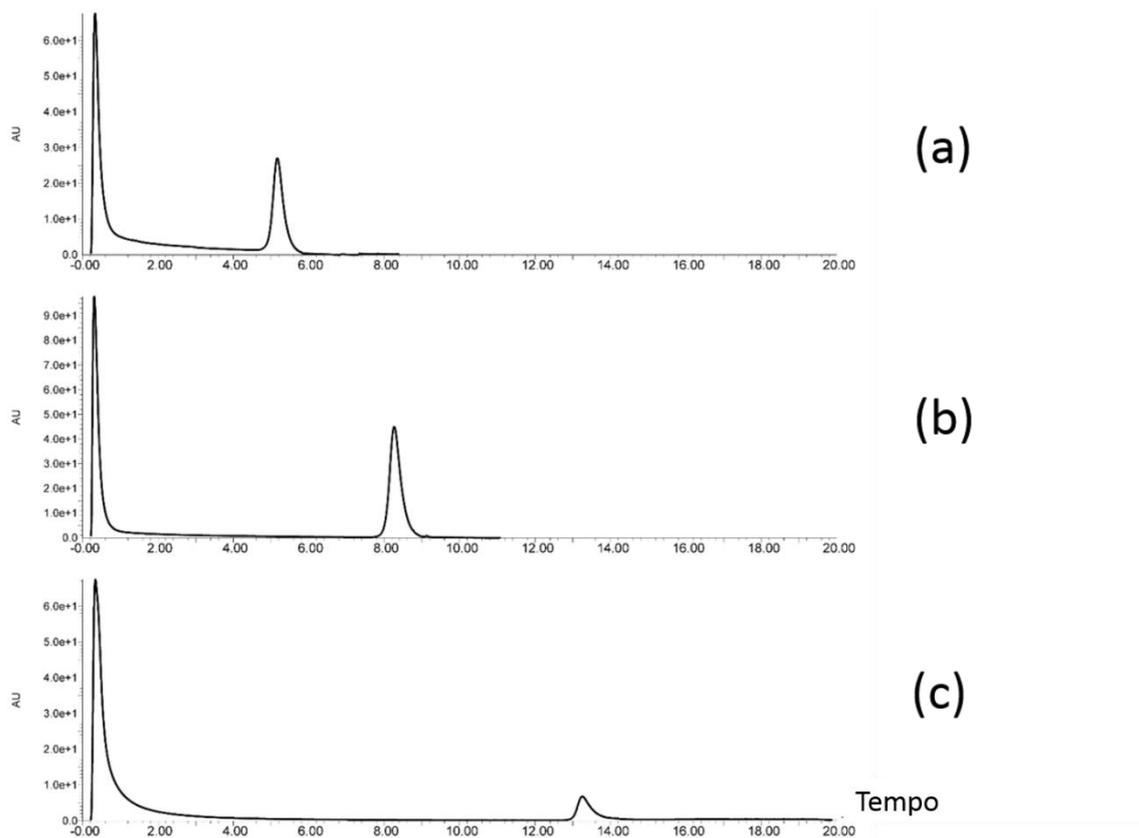


Figura 13. Cromatogramas das análises in-tube SPME-DAD para a otimização do tempo para a sorção dos analitos junto ao capilar e exclusão dos interferentes da amostra de plasma. O capilar monolítico foi conectado ao DAD e após a etapa do pré-preparo das amostras d de plasma (item 3.5), o extrato seco foi reconstituído em solução de acetonitrila com 0,1% (v/v) de ácido fórmico e 10  $\mu$ L foram injetados. Sorção dos analitos utilizando ACN como fase móvel durante (a) 2 min, (b) 5 min e (c) 10 min.

O terceiro parâmetro a ser avaliado foi o volume de solução da amostra a ser utilizado na reconstituição do extrato seco após a precipitação de proteínas (item 3.5). O volume de solução da amostra pode influenciar diretamente no sinal analítico devido a diluição dos analitos nesta etapa de pré preparo da amostra. Por outro lado, a diluição da amostra poderá aumentar o sinal analítico, pois poderá diminuir o efeito da matriz. De acordo com a Figura 15, a reconstituição do extrato seco com 50  $\mu$ L de ACN com 0,1% de AF gerou maior sinal analítico.

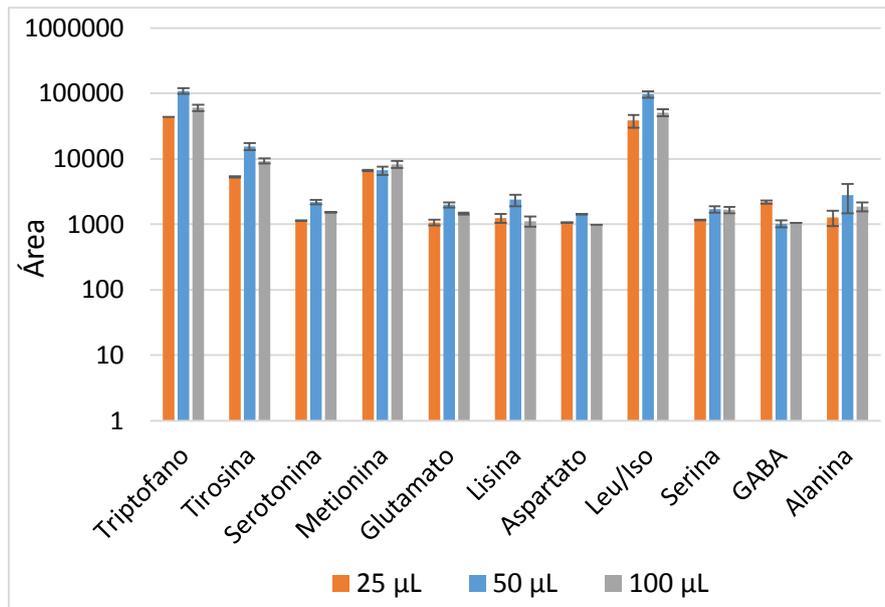


Figura 14. Otimização do volume de solução da amostra, após precipitação das proteínas de 200 µL plasma (item 3.5). O extrato seco foi reconstituído em 25, 50 e 100 µL de solução de acetonitrila com 0,1% (v/v) de ácido fórmico e 10 µL foram injetados.

O quarto parâmetro avaliado foi a fase móvel (acetonitrila e acetonitrila com 0,1 % (v/v) de ácido fórmico) para a pré concentração dos analitos junto ao capilar (bomba QSM). De acordo com a figura 15, a adição de ácido fórmico ao solvente orgânico (acetonitrila) não favoreceu o sinal analítico. Portanto, a acetonitrila foi selecionada como fase móvel para a etapa de pré concentração.

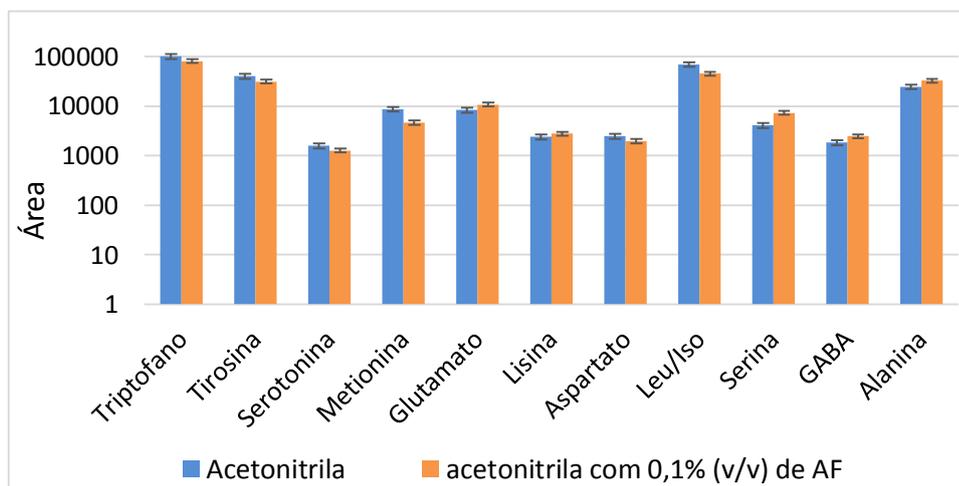


Figura 15. Otimização da fase móvel (acetonitrila e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico) para etapa de pré concentração dos analitos. Após a precipitação das proteínas (seção 3.5) o extrato seco foi reconstituído em 50 µL de acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico e 10 µL foram injetados. AF= ácido fórmico.

A supressão iônica está entre os efeitos de matriz mais comuns quando se utiliza a espectrometria de massas. A diminuição do sinal analítico ocorre

quando compostos interferentes da matriz se ionizam, suprimindo os íons provenientes dos analitos (Siuzdak, 1996). Os grupos ciano e amino da fase monolítica poderão apresentar interações não covalentes (ligação de hidrogênio, interação eletrostática, dipolo-dipolo, dipolo-induzido e transferência de carga) com os interferentes (Kulkarni *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2010). Neste contexto, a otimização de uma etapa de limpeza do capilar após a pré concentração dos analitos poderia remover os interferentes polares. Soluções de acetonitrila com 5, 10 e 20% (v/v) de água foram avaliadas como fase móvel para limpeza. No entanto, esta etapa de limpeza não favoreceu a detectabilidade do método.

#### 4.3.3 Otimização da etapa de eluição dos analitos

A fase móvel foi selecionada considerando sua afinidade pelos analitos (dessorção quantitativa), estabilidade do capilar monolítico (maior tempo de vida útil) e ionização no espectrômetro de massas (maior sinal analítico). Uma vez que os aminoácidos são compostos polares, água, solução aquosa com 10% de acetonitrila e água com 0,01% (v/v) de ácido fórmico foram avaliadas.

A adição de 10% de acetonitrila em água foi avaliada como fase móvel de eluição, pois poderá favorecer a dessolvatação das espécies ionizadas em solução para a fase gasosa. Neste contexto, pode-se dizer que a resposta analítica é proporcional à ionização e dessolvatação dos analitos (Stewart, 1999). Neste trabalho, os analitos foram dessolvatados com fluxo de nitrogênio a 350 °C após a ionização por eletrospray onde apenas os íons resultantes em fase gasosa foram atraídos para o analisador quadrupolar. A adição de acetonitrila na fase móvel também poderá diminuir a constante dielétrica da água, favorecendo a dessolvatação dos íons protonados.

Já a avaliação da solução de 0,01% (v/v) de ácido fórmico (pH aproximadamente 3) poderá influenciar a protonação dos analitos e consequentemente o sinal analítico (Stewart, 1999), pois as análises MS/MS foram realizadas no modo positivo (análise do íon protonado). A estabilidade da fase monolítica no intervalo de pH de 2 a 10,5, também foi considerada (Zheng *et al.*, 2009b). A Figura 16 ilustra a eficiência do procedimento *in-tube* SPME-MS/MS para cada fase móvel avaliada.

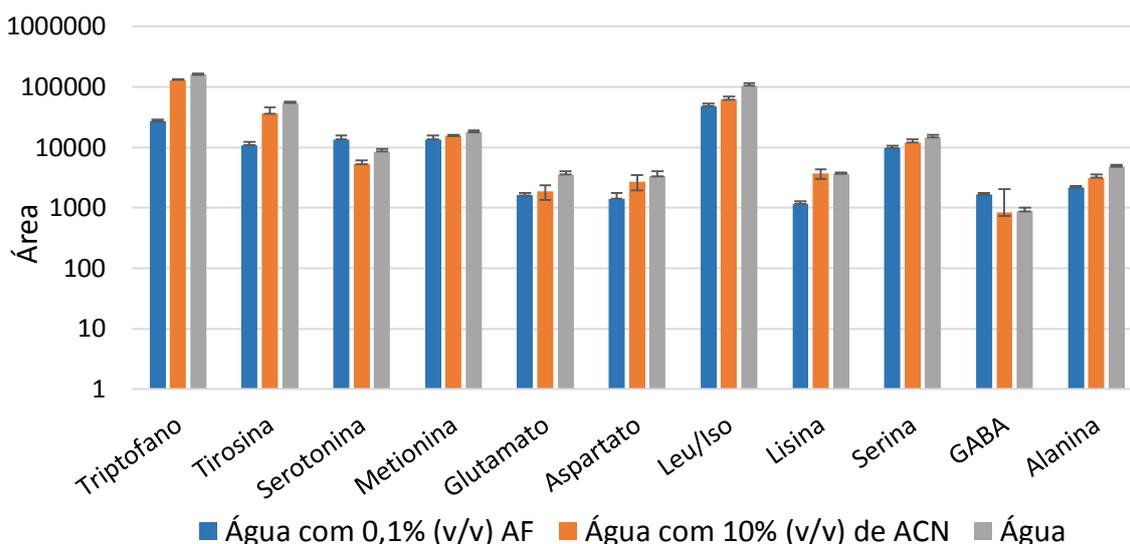


Figura 16. Avaliação da água, água com 0,01% (v/v) de ácido fórmico e água com 10% (v/v) de acetonitrila como fase móvel para a eluição dos analitos. Após a precipitação das proteínas (seção 3.5) da amostra de plasma, o extrato seco foi reconstituído em 50  $\mu$ L de acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico e 10  $\mu$ L foram injetados.

De acordo com a Figura 16, a água como fase móvel na etapa de eluição do procedimento *in-tube* SPME-MS/MS proporcionou maior detectabilidade para a maioria dos analitos, além de contribuir para maior tempo de vida útil do capilar monolítico (sem adição de aditivos).

A etapa de infusão combinada, pós coluna capilar, com a solução de acetonitrila com 2% (v/v) de ácido fórmico no espectrômetro de massas durante a eluição dos analitos da coluna monolítica também foi avaliada (seção 3.6). O objetivo desta infusão foi aumentar o sinal analítico, favorecendo a ionização dos aminoácidos sem alterar a composição da fase móvel de eluição. A Acetonitrila diminui a constante dielétrica da água favorecendo a dessolvatação das espécies ionizadas em solução para a fase gasosa enquanto o ácido fórmico favoreceu a ionização de todas as espécies. Apesar de diluir a amostra, a infusão combinada pós coluna capilar aumentou o sinal analítico demonstrando um aumento na eficiência da ionização por eletrospray, Figura 17a.

Na tentativa de se obter maior detectabilidade, capilares monolíticos com 10 cm de comprimento foram sintetizados. O aumento do comprimento do capilar aumentou a capacidade de sorção da fase monolítica. O uso de capilares maiores que 10 cm foi inviável devido ao aumento de pressão do sistema *in-tube* SPME. Este aumento de pressão poderá diminuir o tempo de vida útil do capilar

monolítico e causar quebra e compactação da fase na extremidade do capilar ou até a quebra do capilar. A Figura 17b ilustra os valores de área obtidos com os capilares de 6 e 10 cm.

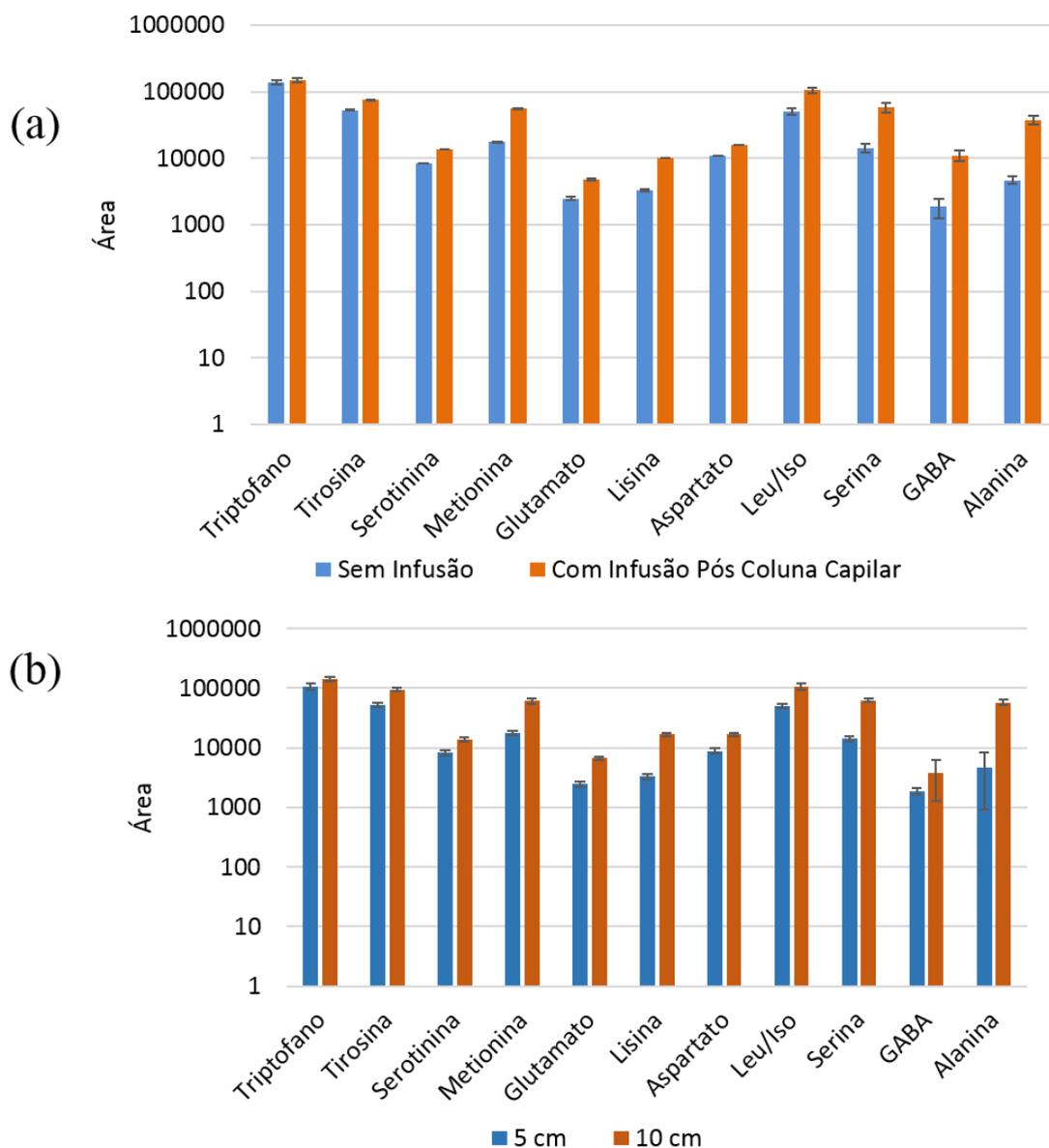


Figura 17. (a) Avaliação do efeito da infusão combinada pós coluna capilar na resposta analítica do método in-tube SPME-MS/MS; (b) Avaliação do comprimento do capilar na resposta analítica do método in tube SPME-MS/MS. Após a precipitação das proteínas (seção 3.5) o extrato seco foi reconstituído em 50  $\mu$ L de acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico e 10  $\mu$ L foram injetados.

#### 4.4 Capacidade de adsorção do capilar monolítico

Triptofano e leucina foram selecionados como analitos representativos por apresentarem estruturas diferentes, representando assim, diferentes classes estruturais (cíclica e acíclica) de amino ácidos. O objetivo dos experimentos de adsorção foi avaliar a capacidade de sorção do monolito para os aminoácidos ( $C_{ads}$ ). O  $V_m$  foi estimado com base no comprimento ( $L=10$  cm) e no diâmetro interno do capilar ( $d_i = 530$   $\mu$ m) do capilar utilizando a equação  $V_m = \pi r^2 L$ ; onde  $\pi = 3,14$ ,  $r = 265$   $\mu$ m,  $L = 10$  cm. A Figura 19 ilustra as curvas analíticas e equações de reta obtidas para triptofano (Figura 18a) e leucina (Figura 18b) quando injetadas diretamente no espectrômetro de massas (MS/MS). A resposta analítica da injeção de soluções padrão dos aminoácidos (CAA) no método *in-tube* SPME-MS/MS foram empregadas em cada uma dessas equações de reta para estimar  $Q$ .

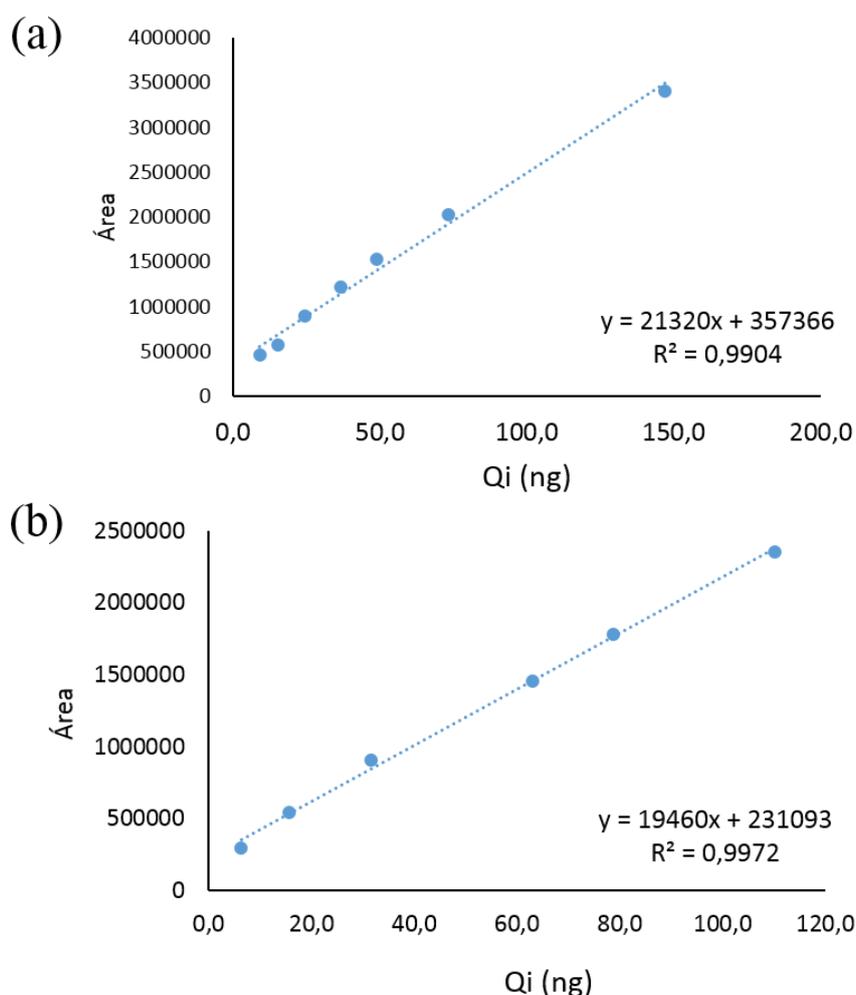
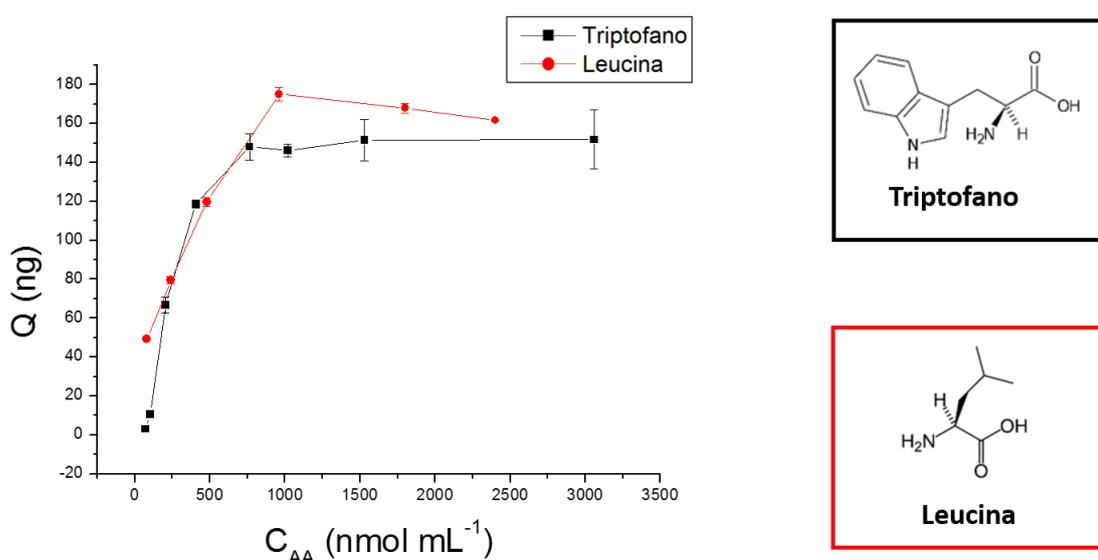


Figura 18. Curvas analíticas referentes a resposta analítica de soluções padrão (CAA, de 0.150 a 4.5  $\mu$ Mol mL<sup>-1</sup>) injetadas diretamente no espectrômetro de massas (MS/MS) em função da massa de analito injetada ( $Q_i$ ).  $Q_i = V_i \times CAA$ ,

onde  $V_i$  corresponde ao volume injetado). (a) soluções padrão de triptofano; (b) soluções padrão de leucina.

De acordo com a Figura 19, a saturação da fase ( $Q_{max}$ ) com triptofano e Leucina foi em um  $Q_{max}$  de 147 e 172 ng respectivamente. Utilizando o valor de  $Q_{max}$  para cada um foi possível estimar a  $C_{ads}$ .

O capilar monolítico apresentou  $C_{ads}$  de 6,53 e 7,52  $\mu\text{g cm}^{-3}$  para triptofano e leucina respectivamente. Os valores das capacidades de sorção para ambos os aminoácidos são próximos uma vez que os grupos funcionais responsáveis pela interação desses compostos junto à fase monolítica são os mesmos (amino e ácido carboxílico). Desta forma, capacidade de sorção similar foi encontrada para os demais aminoácidos (alanina, serina, glutamato, isoleucina, metionina, lisina, e aspartato foram 5.73  $\mu\text{g cm}^{-3}$ , 7.44  $\mu\text{g cm}^{-3}$ , 2.86  $\mu\text{g cm}^{-3}$ , 5.35  $\mu\text{g cm}^{-3}$ , 2.56  $\mu\text{g cm}^{-3}$ , 5.54  $\mu\text{g cm}^{-3}$ , and 3.13  $\mu\text{g cm}^{-3}$ , respectivamente). A Figura 20 ilustra a isoterma de adsorção e as estruturas do triptofano e leucina.



Para avaliar a repetitividade do procedimento de síntese, três capilares monolíticos foram preparados com sintetizes realizadas em diferentes períodos. As análises *in-tube* SPME-MS/MS) de amostras aquosas enriquecidas com os

analitos na concentração de 100 nmol mL<sup>-1</sup>, apresentaram coeficientes de variação menores que 10%. Estas análises foram realizadas em triplicada para cada capilar monolítico.

#### 4.5 Validação analítica

Leucina e isoleucina possuem estruturas muito semelhantes, apresentando as mesmas transições MS/MS (Figura 1) (Guo *et al.*, 2013). Desta forma a validação foi realizada considerando a soma das duas concentrações. Serotonina e GABA não foram quantificados por não apresentaram linearidade e exatidão de acordo com a RDC N° 27 da ANVISA de 17 de maio de 2012.

##### 4.5.1 Linearidade

O método desenvolvido apresentou resposta linear nos intervalos de concentração de 45 – 300 nmol mL<sup>-1</sup> para alanina, 15-300 nmol mL<sup>-1</sup> para soma de leucina e isoleucina, de 10 – 102 nmol mL<sup>-1</sup> para metionina e tirosina, de 9 – 96 nmol mL<sup>-1</sup> para o triptofano, de 12-210 nmol mL<sup>-1</sup> para serina, de 12-90 nmol mL<sup>-1</sup> para glutamato, de 12-102 nmol mL<sup>-1</sup> para lisina, e de 6-36 nmol mL<sup>-1</sup> para aspartato. As curvas analíticas geradas apresentaram coeficientes de determinação adequados ( $R^2 > 0,99$ ) e teste de falta de ajuste ao nível de 5% ( $p > 0,05$ ), indicando que as curvas analíticas apresentaram ajuste confiável para todos os analitos e a equação matemática obtida em cada curva pode ser utilizada para quantificação (Otto, 2016; Zhang *et al.*, 2018). A tabela 7 ilustra alguns parâmetros de linearidade do método *in-tube* SPME/MS-MS.

Tabela 6. Parâmetros de linearidade para método *in tube* SPME-MS/MS em amostras de plasma

Parâmetros de validação analítica	Ala	Leu/Iso	Met	Tir	Tri	Ser	Glu	Lis	Asp
Linearidade R <sup>2</sup>	0,991	0,993	0,996	0,995	0,997	0,990	0,996	0,991	0,993
Coeficiente angular	0,0015	0,0110	0,0688	0,0058	0,0251	0,0024	0,0022	0,0046	0,0057
Coeficiente linear	0,4543	2,4736	0,6748	0,2087	0,6792	0,3963	0,0746	0,0859	0,0092
Falta de ajuste (LOF)	0,997	0,803	0,489	0,251	0,876	0,892	0,972	0,251	0,865
Faixa linear (nmol mL <sup>-1</sup> )	45-360	15-300	12-102	10-102	9-96	12-210	12-90	12-102	6-36

LOF = Lack of fit a nível de 5% ( $p > 0,05$ ); Ala = alanina; Leu = Leucina; Iso = Isoleucina; Met = Metionina; Ti = Tirosina; Tri = Triptofano; Ser = Serina; Glu = Glutamato; Lis = Lisina e Asp = Aspartato.

#### 4.5.2 Efeito de matriz

O efeito matriz foi avaliado pela comparação das médias dos coeficientes angulares (b) de curvas analíticas de plasma sintético e de amostras de plasma enriquecidas com os analitos, utilizando o teste estatístico t *Student's*, Tabela 8. A avaliação do efeito matriz por comparação entre as inclinações de reta é feita quando a matriz isenta dos analitos não está disponível. A Figura 22 ilustra curvas analíticas representativas obtidas pela análise *in-tube* SPME-MS/MS em amostras de plasma (Figura 20a) e amostras de plasma sintético enriquecidas (Figura 20b) para alanina (290  $\mu\text{mol mL}^{-1}$ ), soma de leucina e isoleucina (218  $\mu\text{mol mL}^{-1}$ ), metionina (19  $\mu\text{mol mL}^{-1}$ ) e tirosina (40  $\mu\text{mol mL}^{-1}$ ). De acordo com a Tabela 8 as inclinações das curvas analíticas plotadas utilizando plasma ou plasma sintético foram reprodutíveis apresentando coeficiente de variação menor do que 15% para todos os analitos. Além disso o teste t de Student ( $p > 0,05$ ) demonstrou que as inclinações das curvas plotadas em plasma sintético e em plasma não foram significativamente diferentes.

Tabela 7. Média dos coeficientes angulares (b) das curvas analíticas (n = 4) obtidas pela análise de amostras de plasma e aquosas enriquecidas com os analitos

Analito	Média de b em plasma CV (%)	Média de b plasma sintético CV (%)	Teste t (p)
Triptofano	0,0254 6,7	0,0281 8,1	0,0784
Tirosina	0,0057 8,4	0,0056 9,7	0,9075
Metionina	0,0689 3,5	0,0707 3,6	0,1253
Glutamato	0,0021 14,5	0,0026 13,7	0,2190
Aspartato	0,0052 11,6	0,0057 6,7	0,2446
Leu/Iso	0,0115 6,5	0,0139 7,9	0,0866
Lisina	0,0052 12,8	0,0058 6,9	0,2803
Serina	0,0027 10,9	0,002475 12,1	0,0779
Alanina	0,0016 6,4	0,0014 10,1	0,5195

b = inclinação da reta da curva analítica; teste t a nível de significância de 5% (p>0,05)

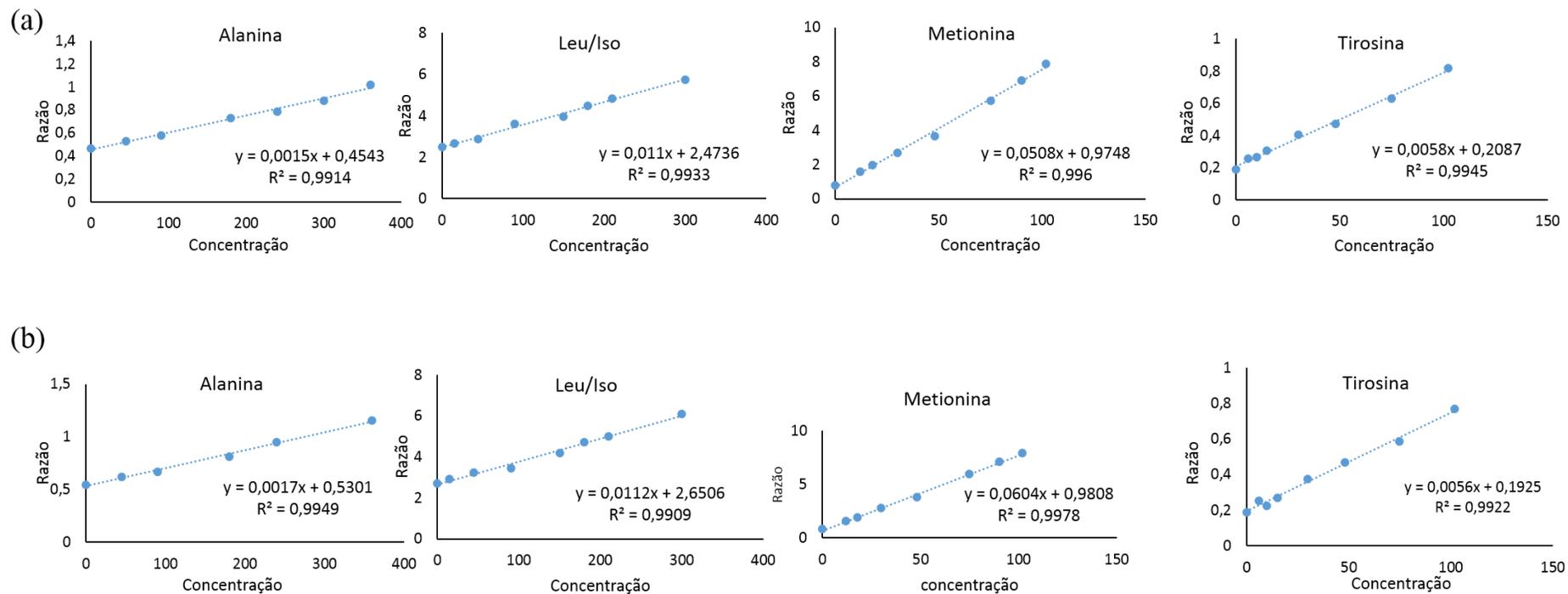


Figura 20. Curvas analíticas realizadas por adição de padrão do método *in-tube* SPME-MS/MS. (a) realizadas a partir do pré tratamento de 200 µL de plasma (seção 3.5); (b) realizadas em plasma sintético enriquecida com alanina (290 µmol mL<sup>-1</sup>), leucina somado com isoleucina (218 µmol mL<sup>-1</sup>), metionina (10 µmol mL<sup>-1</sup>) e tirocina (40 µmol mL<sup>-1</sup>) pré tratada de forma análoga ao plasma (seção 3.5).

#### *4.5.3 Efeito residual, precisão e exatidão*

O efeito residual foi avaliado injetando uma amostra de plasma sintético antes e duas depois da análise da amostra de plasma enriquecida com a concentração do LSQ. O efeito residual foi considerado não significativo, pois os picos interferentes nos tempos de retenção dos analitos foram inferiores a 20% (vinte por cento) das respostas dos analitos nas amostras correspondentes ao LIQ. A Tabela 8 ilustra os dados obtidos para precisão e exatidão (intra e interensaios).

Tabela 8. Precisão e exatidão intra e interensaios do método in-tube SPME-MS/MS para a determinação de alanina, serina, isoleucina, leucina, aspartato, glutamato, lisina, metionina, tirosina e triptofano em amostra de plasma

	Concentração (nmol mL <sup>-1</sup> )	Precisão Intra (CV/%)	Precisão Inter (CV/%)	Exatidão intra (EPR/%)	Exatidão inter (EPR/%)
Trip	9 <sup>a</sup>	3,5	8,4	9,1	16,4
	15 <sup>b</sup>	2,9	6,7	-10,6	-8,3
	48 <sup>c</sup>	4,6	4,6	-4,9	10,4
	72 <sup>d</sup>	5,35	7,71	-6,8	8,2
	96 <sup>e</sup>	4,62	5,39	2,7	9,7
Tir	6 <sup>a</sup>	9,9	7,1	-12,3	-15,6
	10 <sup>b</sup>	11,4	9,3	10,3	-11,5
	48 <sup>c</sup>	2,6	2,7	-8,0	9,8
	75 <sup>d</sup>	7,1	3,9	9,7	8,7
	102 <sup>e</sup>	10,5	7,4	-10,6	-11,9
Met	12 <sup>a</sup>	5,9	2,6	3,8	11,1
	18 <sup>b</sup>	9,6	6,8	-2,7	-4,8
	48 <sup>c</sup>	5,0	7,8	-5,6	-8,3
	75 <sup>d</sup>	7,2	6,3	4,38	-7,7
	102 <sup>e</sup>	2,8	2,6	0,14	0,32
Glu	12 <sup>a</sup>	10,8	8,8	-16,0	-14,7
	18 <sup>b</sup>	5,9	2,9	11,3	10,1
	48 <sup>c</sup>	5,3	1,5	-6,0	-8,2
	75 <sup>d</sup>	2,5	1,8	4,7	3,1
	90 <sup>e</sup>	4,6	2,3	0,63	2,0
Lis	12 <sup>a</sup>	18,1	19,0	17,9	19,6
	24 <sup>b</sup>	10,3	13,2	-8,0	-9,4
	42 <sup>c</sup>	9,6	8,2	-6,1	-7,5
	81 <sup>d</sup>	10,0	11,7	1,3	2,33
	102 <sup>e</sup>	8,4	7,8	6,1	5,0
Asp	6 <sup>a</sup>	8,1	10,8	-11,1	15,2
	9 <sup>b</sup>	5,5	7,9	6,01	-9,5
	18 <sup>c</sup>	4,5	7,3	-6,11	-7,0
	30 <sup>d</sup>	10,1	12,5	0,2	2,3
	36 <sup>e</sup>	14,3	12,6	1,4	7,3
Leu/Iso	15 <sup>a</sup>	3,1	3,4	18,3	19,6
	45 <sup>b</sup>	6,0	7,6	12,6	10,3
	180 <sup>c</sup>	1,4	3,2	8,7	11,7
	210 <sup>d</sup>	3,7	12,4	10,0	9,6
	300 <sup>3</sup>	1,1	4,4	9,2	8,0
Ser	12 <sup>a</sup>	17,4	18,8	18,7	19,3
	30 <sup>b</sup>	10,8	9,1	-14,4	-13,7
	120 <sup>c</sup>	11,6	10,0	-12,0	-13,9
	150 <sup>d</sup>	8,8	5,2	14,1	12,9
	210 <sup>e</sup>	7,1	9,0	13,5	14,2
Ala	45 <sup>a</sup>	6,5	11,5	6,9	8,0
	90 <sup>b</sup>	8,8	12,6	5,2	2,8
	180 <sup>c</sup>	12,1	14,0	8,6	4,9
	300 <sup>d</sup>	8,6	14,9	7,9	7,7
	360 <sup>e</sup>	5,16	8,8	7,0	3,1

Trip = Triptofano; Tir = Tirosina; Met = Metionina; Glu = Glutamato; Lis = Lisina; Asp = Aspartato; Leu/Iso = Soma de leucina e isoleucina; Ser = Serina; Ala = Alanina. <sup>a</sup> = Concentração do LIQ; <sup>b</sup> = Concentração do CQB; <sup>c</sup> = Concentração do CQM; <sup>d</sup> = Concentração do CQA; <sup>e</sup> = Concentração do LSQ.

#### 4.5.4 Estabilidade

De acordo com trabalhos publicados na literatura, os aminoácidos foram estáveis em amostras de plasma pelo menos: por 24 horas quando armazenados a temperatura ambiente, por 3 ciclos de congelamento e descongelamento e por 6 meses quando armazenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Schaefer et al., 1987; González et al., 2014). A estabilidade dos aminoácidos neste trabalho também foi avaliada. Os analitos se mostraram estáveis por pelo menos 24 horas após o pré tratamento (seção 3.5) sem perda significativa na área obtida quando armazenados no injetor do equipamento a  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.5.5 Determinação dos aminoácidos em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos

As análises dos AA e NTs em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos em terapia com antipsicóticos comprovaram a aplicabilidade do método desenvolvido. A Figura 23 ilustra cromatogramas obtidos no método *in-tube* SPME-MS/MS de análise de amostra de plasma de pacientes esquizofrênicos.

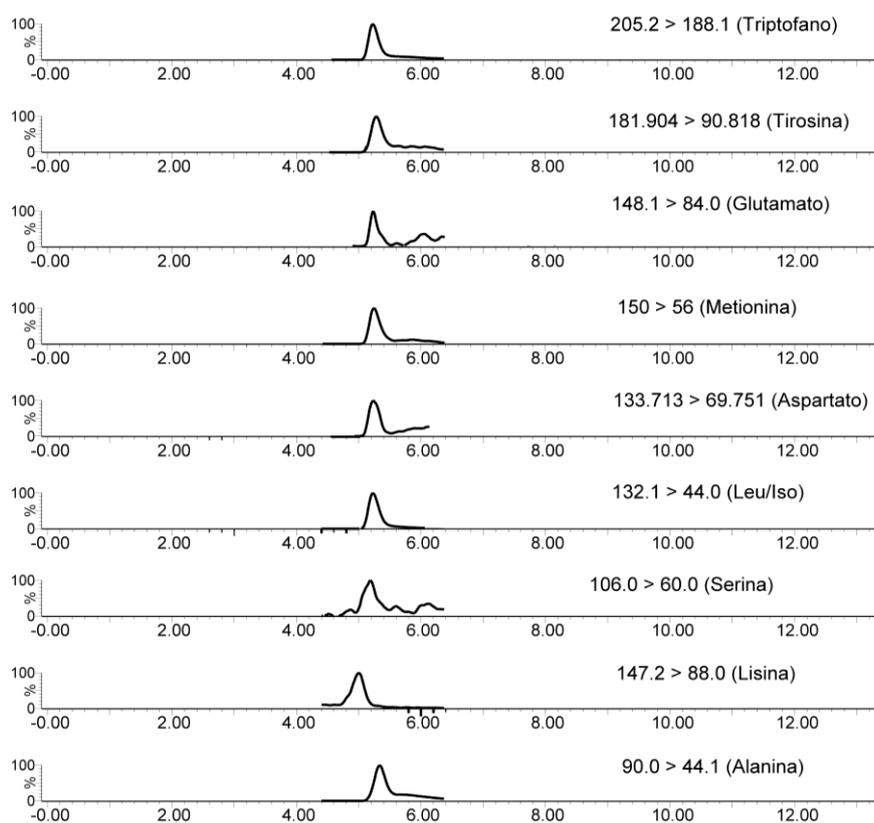


Figura 21. Cromatogramas representativos da análise *In-tube* SPME-MS/MS de amostra de plasma de paciente esquizofrênico.

A Tabela 9 mostra as concentrações médias encontradas nas amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos ( $n = 6$ ), as quais foram próximos a concentrações previamente reportadas na literatura (Li *et al.*, 2012; Domingues, Crevelin, Moraes, *et al.*, 2015).

Tabela 9. Concentrações ( $\text{nmol mL}^{-1}$ ) médias de alanina, leu/iso, metionina, tirosina, triptofano, serina, glutamato, lisina e aspartato determinadas em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos,  $n= 6$

	Ala	Leu/Iso	Met	Tir	Trip	Ser	Glu	Lis	Asp
Concentração Média ( $\text{nmol mL}^{-1}$ )	270,8	246,1	18,3	40,5	37,1	143,0	31,8	20,6	11,2
	$\pm 60,1$	$\pm 28,0$	$\pm 5,1$	$\pm 10,4$	$\pm 9,7$	$\pm 48,6$	$\pm 11,2$	$\pm 4,0$	$\pm 7,5$

Ala = Alanina; Leu = Leucina; Iso = Isoleucina; Met = Metionina; Tir = Tirosina; Tri = Triptofano; Ser = Serina; Glu = Glutamato; Lis = Lisina e Asp = Aspartato.

#### 4.6 Comparação do método proposto com os descritos na literatura

Tabela 10. Comparação do método *in-tube* SPME-MS/MS proposto com os descritos na literatura

Analitos	Preparo de amostra	Volume de amostra ( $\mu\text{L}$ )	Método analítico	Eluição dos analitos (min)	LLOQ $\text{nmol mL}^{-1}$	Ref.
10 AA	Precipitação de proteínas	Plasma 50	UHPLC–MS/MS-Ascentis® Express HILIC column (4.6 $\times$ 100 mm, 2.7 $\mu\text{m}$ ). MP: A = Acetato de amônio 10 mM; B = acetonitrile with 0.1% FA. Fluxo = 500 $\mu\text{L min}^{-1}$	3,2	9,7-13,3	(Domingues, Crevelin, Moraes, <i>et al.</i> , 2015)
33 AA	Precipitação de proteínas	Plasma	Duas colunas: 1 - PGC column (Thermo Fisher Scientific, 3 $\mu\text{m}$ Hypercarb, 4.6 mm i.d. $\times$ 50 mm), and 2- fused-core column (Advanced Materials Technology, 2,7 $\mu\text{m}$ Halo C18, 2,1 mm i.d. $\times$ 100 mm) Fluxo = 300 $\mu\text{L min}^{-1}$	9,4	0,01-10	(Le <i>et al.</i> , 2014)
21 AA	Precipitação de proteínas	Plasma 100	HPLC-FLD Fluxo = 1200 $\mu\text{L min}^{-1}$	35,0	0,01-0,07	(Han <i>et al.</i> , 2013)
10 AA	<i>In-tube</i> SPME	Plasma 200	<i>In-tube</i> SPME–MS/MS com infusão pós coluna capilar	5,2	6-45	Presente trabalho (Miranda <i>et al.</i> , 2019)

AA = Aminoácidos;

O método *in-tube* SPME-MS/MS quando comparado aos da literatura apresentou as seguintes vantagens: menor volume de fase móvel empregada no procedimento analítico (fluxo de 100  $\mu\text{L min}^{-1}$  durante 15 minutos), menor tempo de análise, preparo de amostra em linha com o sistema de detecção (MS-MS) e a não utilização de sais ou aditivos na fase móvel. As colunas cromatográficas, o uso de aditivos na fase móvel e a derivatização dos aminoácidos elevam o custo dos métodos bioanalíticos. As principais desvantagens do método

proposto são o menor número de aminoácidos analisados simultaneamente e maiores valores de LIQ. No entanto, o método proposto apresentou faixa linear adequada para determinação dos analitos em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos. Em razão da seletividade tanto do capilar monolítico desenvolvido quanto do sistema de espectrometria de massas em tandem no modo SEM, foi possível o acoplamento direto da técnica *in-tube* SPME à espectrometria de massas em tandem.

# Conclusão

## 5. Conclusão

Durante a síntese da fase monolítica de sílica híbrida, a utilização do catalizador fluoreto de amônio possibilitou a incorporação simultânea dos precursores funcionalizados (ciano e amino), em razão do aumento da velocidade das reações de hidrólise e condensação, originando um capilar monolítico inovador bifuncional. Com a otimização do procedimento de síntese (proporção dos precursores, a quantidade de água e a temperatura de envelhecimento) foi possível obter um capilar monolítico bifuncional com permeabilidade, estabilidade (química e física) e características texturais adequadas para a sorção dos aminoácidos em amostras de plasma. A robustez deste capilar foi comprovada por sua reutilização em cerca de 40 extrações sem perda significativa da eficiência.

A caracterização do capilar monolítico bifuncional pelas técnicas MEV, FTIR, adsorção/dessorção de nitrogênio e DRX demonstrou que não houve encolhimento do monolito durante a etapa de secagem e ainda comprovaram a incorporação dos grupos aminopropil e cianopropil em uma estrutura monolítica amorfa. Além disso a MEV e os experimentos de adsorção/dessorção de N<sub>2</sub> demonstraram uma estrutura homogênea, porosa e com alta área superficial, formada por uma rede contínua de partículas interconectadas.

Em razão da detectabilidade e seletividade da técnica MS/MS (modo SEM) e do capilar monolítico bifuncional foi possível o direto acoplamento da técnica *in-tube* SPME com o sistema MS/MS. A etapa de infusão pós-capilar também favoreceu detectabilidade analítica do método *in-tube* SPME-MS/MS.

Segundo os parâmetros de validação analítica avaliados, principalmente a faixa de linearidade, o método *in-tube* SPME-MS/MS mostrou-se adequado para a determinação dos aminoácidos em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos.

# Referências

## 6. Referencias

A., G. P. et al. Molecular mechanisms underlying glutamatergic dysfunction in schizophrenia: therapeutic implications. **Journal of Neurochemistry**, v. 111, n. 4, p. 891-900, 2009.

AFONSO, P. **Esquizofrenia: Conhecer a Doença**. 2 ed. Lisboa: Climepsi Editores 2002. 136 p. ISBN 9727960588.

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.

AL-OWEINI, R.; EL-RASSY, H. Synthesis and characterization by FTIR spectroscopy of silica aerogels prepared using several Si(OR)<sub>4</sub> and R<sup>n</sup>Si(OR')<sub>3</sub> precursors. **Journal of Molecular Structure**, v. 919, n. 1, p. 140-145, 2009/02/17/ 2009.

ALEMÁN, J. V. et al. Definitions of terms relating to the structure and processing of sols, gels, networks, and inorganic-organic hybrid materials (IUPAC Recommendations 2007). **Pure and Applied Chemistry**. 79: 1801 p. 2007.

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 2145-2148, 1990/10/01 1990.

BAI, L. et al. Preparation of a novel hybrid organic–inorganic monolith for the separation of lysozyme by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 1, p. 100-106, 2011.

BALU, D. T.; COYLE, J. T. The NMDA receptor 'glycine modulatory site' in schizophrenia: d-serine, glycine, and beyond. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 20, p. 109-115, 2015.

BARRETT, E. P.; JOYNER, L. G.; HALENDA, P. P. The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms. **Journal of the American Chemical Society**, v. 73, n. 1, p. 373-380, 1951.

BAUMEISTER, A. A.; HAWKINS, M. F. The Serotonin Hypothesis of Schizophrenia: A Historical Case Study on the Heuristic Value of Theory in Clinical Neuroscience. **Journal of the History of the Neurosciences**, v. 13, n. 3, p. 277-291, 2004.

BELOTI, L. G. M.; MIRANDA, L. F. C.; QUEIROZ, M. E. C. Butyl Methacrylate-Co-Ethylene Glycol Dimethacrylate Monolith for Online in-Tube SPME-UHPLC-MS/MS to Determine Chlopromazine, Clozapine, Quetiapine, Olanzapine, and Their Metabolites in Plasma Samples. **Molecules**, v. 24, n. 2, p. 310, 2019.

BERGER, A. J.; DIEUDONNÉ, S.; ASCHER, P. Glycine Uptake Governs Glycine Site Occupancy at NMDA Receptors of Excitatory Synapses. **Journal of Neurophysiology**, v. 80, n. 6, p. 3336-3340, 1998.

BLEICH, A. et al. The Role of Serotonin in Schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin**, v. 14, n. 2, p. 297-315, 1988. ISSN 0586-7614.

BOURCIER, S. et al. 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.

BRESSAN, R. A.; PILOWSKY, L. S. Hipotese glutamatergica da esquizofrenia. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, n. 3, p. 177-183, 2003.

BRINKER, C. J. Hydrolysis and condensation of silicates: Effects on structure. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 100, n. 1, p. 31-50, 1988.

BRINKER, C. J.; SCHERER, G. W. **Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing**. Academic press, 2013.

BROTHIER, F.; PICHON, V. Immobilized antibody on a hybrid organic–inorganic monolith: Capillary immunoextraction coupled on-line to nanoLC-UV for the analysis of microcystin-LR. **Analytica Chimica Acta**, v. 792, p. 52-58, 2013.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 60, n. 2, p. 309-319, 1938.

CAMPÍNS-FALCÓ, P.; HERRÁEZ-HERNÁNDEZ, R.; SEVILLANO-CABEZA, A. Column-switching techniques for high-performance liquid chromatography of drugs in biological samples. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 619, n. 2, p. 177-190, 1993.

CAO, B. et al. Characterizing amino-acid biosignatures amongst individuals with schizophrenia: a case–control study. **Amino Acids**, v. 50, n. 8, p. 1013-1023, 2018.

CASEY, F. X. M. et al. Leaching of Free and Conjugate Natural Estrogens in Soil Monoliths. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 230, n. 2, p. 49, 2019.

CHARLSON, F. J. et al. Global Epidemiology and Burden of Schizophrenia: Findings From the Global Burden of Disease Study 2016. **Schizophrenia Bulletin**, v. 44, n. 6, p. 1195-1203, 2018.

CHEN, M.-L.; ZHENG, M.-M.; FENG, Y.-Q. Preparation of organic–inorganic hybrid silica monolith with octyl and sulfonic acid groups for capillary electrochromatography and application in determination of theophylline and caffeine in beverage. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 21, p. 3547-3556, 2010.

CHEN, X. et al. 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.

CHEN, Y. et al. Synthesis of sulfo/vinyl biphasic silica hybrid monolithic capillary column and its application to on-column preconcentration for capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1233, p. 91-99, 2012/04/13/ 2012.

CHIANG, C.-H.; ISHIDA, H.; KOENIG, J. L. The structure of  $\gamma$ -aminopropyltriethoxysilane on glass surfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 74, n. 2, p. 396-404, 1980.

CHIAPPELLI, J. et al. Tryptophan Metabolism and White Matter Integrity in Schizophrenia. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, p. 2587, 2016.

CHOI, S.-S. et al. 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.

CHULLASAT, K. et al. Hybrid monolith sorbent of polypyrrole-coated graphene oxide incorporated into a polyvinyl alcohol cryogel for extraction and enrichment of sulfonamides from water samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 961, p. 59-66, 2017.

CIRIMINNA, R. et al. The Sol–Gel Route to Advanced Silica-Based Materials and Recent Applications. **Chemical Reviews**, v. 113, n. 8, p. 6592-6620, 2013.

COSTA QUEIROZ, M. E.; DONIZETI DE SOUZA, I.; MARCHIONI, C. Current advances and applications of in-tube solid-phase microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 111, p. 261-278, 2019.

COYLE, J. T. Glutamate and Schizophrenia: Beyond the Dopamine Hypothesis. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 26, n. 4, p. 363-382, July 01 2006.

CREESE, I.; BURT, D.; SNYDER, S. Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. **Science**, v. 192, n. 4238, p. 481-483, 1976.

DĄBROWSKI, A. Adsorption — from theory to practice. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 93, n. 1, p. 135-224, 2001.

DE GISI, S. et al. Characteristics and adsorption capacities of low-cost sorbents for wastewater treatment: a review. **Sustainable Materials and Technologies**, v. 9, p. 10-40, 2016.

DE LUCA, V. et al. Peripheral amino Acid levels in schizophrenia and antipsychotic treatment. **Psychiatry investigation**, v. 5, n. 4, p. 203-208, 2008.

DE 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**, v. 140, p. 166-175, 2015/08/01/ 2015.

DEAKIN, J. F. W.; SIMPSON, M. D. C. A two-process theory of schizophrenia: Evidence from studies in post-mortem brain. **Journal of Psychiatric Research**, v. 31, n. 2, p. 277-295, 1997/03/01/ 1997.

DOMINGUES, D. S. et al. 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.

DOMINGUES, D. S.; SOUZA, I. D. 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**, v. 993-994, p. 26-35, 2015/07/01/ 2015.

DONALD C. GOFF, M.D. , AND; JOSEPH T. COYLE, M.D. The Emerging Role of Glutamate in the Pathophysiology and Treatment of Schizophrenia. **American Journal of Psychiatry**, v. 158, n. 9, p. 1367-1377, 2001

DRISKO, G. L.; WANG, X.; CARUSO, R. A. Strong Silica Monoliths with Large Mesopores Prepared Using Agarose Gel Templates. **Langmuir**, v. 27, n. 6, p. 2124-2127, 2011.

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.

DURSUN, S. M. et al. 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 : JPN**, v. 24, n. 5, p. 453-455, 1999.

EGGERS, A. E. A serotonin hypothesis of schizophrenia. **Medical Hypotheses**, v. 80, n. 6, p. 791-794, 2013/06/01/ 2013.

EISERT, R.; PAWLISZYN, J. Automated In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled to High-Performance Liquid Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 16, p. 3140-3147, 1997.

EVINS, A. E. et al. Clozapine treatment increases serum glutamate and aspartate compared to conventional neuroleptics. **Journal of Neural Transmission**, v. 104, n. 6, p. 761-766, June 01 1997.

FAN, J. et al. Interaction of Postsynaptic Density Protein-95 with NMDA Receptors Influences Excitotoxicity in the Yeast Artificial Chromosome Mouse Model of Huntington's Disease. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 35, p. 10928-10938, 2009.

FANG, L. et al. Germania-Based, Sol-Gel Hybrid Organic-Inorganic Coatings for Capillary Microextraction and Gas Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 24, p. 9441-9451, 2007.

FENG, J. et al. Polydopamine-coated cotton fibers as the adsorbent for in-tube solid-phase microextraction. **Journal of Separation Science**, v. 1, p. 1-8, 2019

FERNÁNDEZ-AMADO, M. et al. Strengths and weaknesses of in-tube solid-phase microextraction: A scoping review. **Analytica Chimica Acta**, v. 906, p. 41-57, 2016.

G. SABA et al. Lamotrigine-Clozapine Combination in Refractory Schizophrenia: Three Cases. **The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 14, n. 1, p. 86-86, 2002.

GAMA, M. R.; ROCHA, F. R. P.; BOTTOLI, C. B. G. Monoliths: Synthetic routes, functionalization and innovative analytical applications. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 115, p. 39-51, 2019.

GASPAR, P. A. et al. Molecular mechanisms underlying glutamatergic dysfunction in schizophrenia: therapeutic implications. **J Neurochem**, v. 111, n. 4, p. 891-900, Nov 2009.

GONZÁLEZ, O. et al. 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.

GOTTESMAN, I. I.; ERLLENMEYER-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, 2001/08/01/ 2001.

GUO, S. et al. Rapid Determination of Amino Acids in Fruits of Ziziphus jujubaby Hydrophilic Interaction Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Triple-Quadrupole Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 11, p. 2709-2719, 2013.

HÄFNER, H.; AN DER HEIDEN, W. Epidemiology of schizophrenia. **The Canadian Journal of Psychiatry**, v. 42, n. 2, p. 139-151, 1997.

HAIR, M. L. Hydroxyl groups on silica surface. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 19, p. 299-309, 1975/12/01/ 1975.

HAN, X. et al. Determination of Plasma Amino Acid Biomarkers by High Performance Liquid Chromatography for Diagnosis of Type 2 Diabetes Mellitus. **Analytical Letters**, v. 46, n. 18, p. 2813-2827, 2013.

HAYES, J. D.; MALIK, A. Sol-Gel Monolithic Columns with Reversed Electroosmotic Flow for Capillary Electrochromatography. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 17, p. 4090-4099, 2000.

HE, Y. et al. Schizophrenia shows a unique metabolomics signature in plasma. **Translational Psychiatry**, v. 2, p.149, 2012.

HENCH, L. L.; WEST, J. K. The sol-gel process. **Chemical reviews**, v. 90, n. 1, p. 33-72, 1990.

HOFFMANN, F. et al. Silica-Based Mesoporous Organic-Inorganic Hybrid Materials. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, n. 20, p. 3216-3251, 2006.

HOLME, S.; HEATON, W. A. **Synthetic, plasma-free, transfusable storage medium for red blood cells and platelets**. U.S. Patent n. 5,248,506, 28 set. 1993.

HOWES, O.; MCCUTCHEON, R.; STONE, J. Glutamate and dopamine in schizophrenia: An update for the 21st century. **Journal of Psychopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 97-115, 2015.

HOWES, O. D.; KAPUR, S. The Dopamine Hypothesis of Schizophrenia: Version III-025E The Final Common Pathway. **Schizophrenia Bulletin**, v. 35, n. 3, p. 549-562, 5 2009.

Iler, R.K. Chemistry of Silica: Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties, and Biochemistry; **John Wiley & Sons**: New York, NY, USA, 1979.

INNOCENZI, P. Infrared spectroscopy of sol-gel derived silica-based films: a spectra-microstructure overview. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 316, n. 2, p. 309-319, 2003.

ISHIZUKA, N. et al. Chromatographic characterization of macroporous monolithic silica prepared via sol-gel process. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 187-188, p. 273-279, 2001.

ISHIZUKA, N. et al. Performance of a Monolithic Silica Column in a Capillary under Pressure-Driven and Electrodriven Conditions. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 6, p. 1275-1280, 2000.

JANEČKOVÁ, H. et al. Targeted metabolomic analysis of plasma samples for the diagnosis of inherited metabolic disorders. **Journal of Chromatography A**, v. 1226, p. 11-17, 2012.

JANOUTOVA, J. et al. Epidemiology and risk factors of schizophrenia. **Neuro Endocrinol Lett**, v. 37, n. 1, p. 1-8, 2016.

JAVITT, D. C. Excitatory Amino Acids in Schizophrenia: Both What You Have, and What You Do With Them. **Biological Psychiatry**, v. 83, n. 6, p. 470-472, 2018.

JIANG, N. et al. Silver nanoparticles-coated monolithic column for in-tube solid-phase microextraction of monounsaturated fatty acid methyl esters. **Journal of Chromatography A**, v. 1585, p. 19-26, 2019.

JOHNSON, J. W.; ASCHER, P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. **Nature**, v. 325, p. 529, 1987

JOSIĆ, D.; BUCHACHER, A. Application of monoliths as supports for affinity chromatography and fast enzymatic conversion. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 49, n. 1, p. 153-174, 2001.

KABIR, A.; FURTON, K. G.; MALIK, A. Innovations in sol-gel microextraction phases for solvent-free sample preparation in analytical chemistry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 45, p. 197-218, 2013.

KATAOKA, H. Current Developments and Future Trends in Solid-phase Microextraction Techniques for Pharmaceutical and Biomedical Analyses. **Analytical Sciences**, v. 27, n. 9, p. 893-893, 2011.

KATAOKA, H. et al. Developments and applications of capillary microextraction techniques: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 655, n. 1, p. 8-29, 2009.

KATAOKA, H.; SAITO, K. Recent advances in column switching sample preparation in bioanalysis. **Bioanalysis**, v. 4, n. 7, p. 809-832, 2012.

KENG, P. Y. et al. **Polymer monoliths for solvent exchange in continuous flow microfluidic device**: U.S. Patent n. 9,321,866, 26 abr. 2016.

KESSLER, F. Cannabis e saúde mental: uma revisão sobre a droga de abuso e o medicamento. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 31, p. 82-82, 2009.

KIRKBIR, F. et al. Drying of aerogels in different solvents between atmospheric and supercritical pressures. **Journal of non-crystalline solids**, v. 225, p. 14-18, 1998.

KONISHI, J. et al. Sol-gel synthesis of macro-mesoporous titania monoliths and their applications to chromatographic separation media for organophosphate compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 44, p. 7375-7383, 2009.

KŘENKOVÁ, J.; FORET, F. Immobilized microfluidic enzymatic reactors. **ELECTROPHORESIS**, v. 25, n. 21-22, p. 3550-3563, 2004.

KULKARNI, S. et al. Sol-gel immobilized cyano-polydimethylsiloxane coating for capillary microextraction of aqueous trace analytes ranging from polycyclic aromatic hydrocarbons to free fatty acids. **Journal of Chromatography A**, v. 1124, n. 1, p. 205-216, 2006.

LARUELLE, M. et al. Increased dopamine transmission in schizophrenia: relationship to illness phases. **Biological Psychiatry**, v. 46, n. 1, p. 56-72, 1999.

LE, A. et al. 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.

LEHMAN, A. F. et al. Practice guideline for the treatment of patients with schizophrenia, second edition. **Am J Psychiatry**, v. 161, n. 2 Suppl, p. 1-56, Feb 2004.

LI, Q. Z. et al. Simultaneous determination of glutamate, glycine, and alanine in human plasma using precolumn derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate and high-performance liquid chromatography. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, v. 16, n. 5, p. 355-360, 2012.

LI, W.; FRIES, D. P.; MALIK, A. Sol–gel stationary phases for capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1044, n. 1, p. 23-52, 2004.

LIN, Z. et al. One-pot preparation of a molecularly imprinted hybrid monolithic capillary column for selective recognition and capture of lysozyme. **Journal of Chromatography A**, v. 1284, p. 8-16, 2013/04/05/ 2013.

LISMAN, J. E. et al. Circuit-based framework for understanding neurotransmitter and risk gene interactions in schizophrenia. **Trends Neurosci**, v. 31, n. 5, p. 234-42, 2008.

LIU, B. et al. Porous polydimethylsiloxane monolith for protein digestion. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 6, n. 5, p. 824-829, 2018.

LIU, S. et al. Preparation of organic-silica hybrid monolithic columns via crosslinking of functionalized mesoporous carbon nanoparticles for capillary liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1498, p. 64-71, 2017.

LUO, X.; LI, G.; HU, Y. In-tube solid-phase microextraction based on NH<sub>2</sub>-MIL-53(Al)-polymer monolithic column for online coupling with high-performance

liquid chromatography for directly sensitive analysis of estrogens in human urine. **Talanta**, v. 165, p. 377-383, 2017.

MACKAY, M.-A. B. et al. D-Serine: Potential Therapeutic Agent and/or Biomarker in Schizophrenia and Depression? **Frontiers in psychiatry**, v. 10, p. 25-25, 2019.

MATKÓ, S. et al. Flame retardancy of biodegradable polymers and biocomposites. **Polymer Degradation and Stability**, v. 88, n. 1, p. 138-145, 2005.

MELTZER, H. Y. Clinical studies on the mechanism of action of clozapine: the dopamine-serotonin hypothesis of schizophrenia. **Psychopharmacology**, v. 99, n. 1, p. S18-S27, 1989.

MELTZER, H. Y. et al. Serotonin receptors : their key role in drugs to treat schizophrenia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 27, n. 7, p. 1159-1172, 2003

MERRITT, K. et al. Nature of Glutamate Alterations in Schizophrenia: A Meta-analysis of Proton Magnetic Resonance Spectroscopy Studies Nature of Glutamate Alterations in Schizophrenia Nature of Glutamate Alterations in Schizophrenia. **JAMA Psychiatry**, v. 73, n. 7, p. 665-674, 2016.

MIRANDA, L. F. C.; GONÇALVES, R. R.; C. QUEIROZ, M. E. A Dual Ligand Sol-Gel Organic-Silica Hybrid Monolithic Capillary for In-Tube SPME-MS/MS to Determine Amino Acids in Plasma Samples. **Molecules**, v. 24, n. 9, p. 1658, 2019.

MITSYUK, B.; VYSOTSKII, Z.; POLYAKOV, M. The part played by the polarity of the intermicellar liquid and the intensity of its interaction with the surface of silicic acid hydrogel particles in the formation of silica gel textures. Dokl. Akad. Nauk SSSR, 1964. p.416-18.

MIYAMOTO, S. et al. Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. **Molecular Psychiatry**, v. 10, p. 79, 2004.

MOL, H. G. J. et al. Use of an open-tubular trapping column as phase-switching interface in on-line coupled reversed-phase liquid chromatography—capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 630, n. 1, p. 201-212, 1993.

MOLINER-MARTINEZ, Y. et al. Recent advances of in-tube solid-phase microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 205-213, 2015.

MONAGHAN, D. T.; BRIDGES, R. J.; COTMAN, C. W. The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 29, p. 365-402, 1989.

MOULD, D. L.; SYNGE, R. L. Separations of polysaccharides related to starch by electrokinetic ultrafiltration in collodion membranes. **The Biochemical journal**, v. 58, n. 4, p. 571-585, 1954. 1470-8728.

MOULD, D. L.; SYNGE, R. L. M. Electrokinetic ultrafiltration analysis of polysaccharides. A new approach to the chromatography of large molecules. **Analyst**, v. 77, n. 921, p. 964-969, 1952.

MURRAY, R. M.; FRANGO, S. Imaging as a tool in exploring the neurodevelopment and genetics of schizophrenia. **British Medical Bulletin**, v. 52, n. 3, p. 587-596, 1996.

NAKANISHI, S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. **Science**, v. 258, n. 5082, p. 597-603, 1992.

NARCISO MEIRELLES, L. et al. "Single-pot" approach towards the preparation of alkyl and polyfluoroalkyl organo-silica monolithic capillaries for reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 41, n. 19, p. 3669-3676, 2018.

NEMA, T.; CHAN, E. C. Y.; HO, P. C. Applications of monolithic materials for sample preparation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 130-141, 2014.

NORDBORG, A.; HILDER, E. F.; HADDAD, P. R. Monolithic Phases for Ion Chromatography. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 197-226, 2011.

OTTO, M. **Chemometrics: statistics and computer application in analytical chemistry**. John Wiley & Sons, 2016. ISBN 3527340971.

OU, J. et al. Recent development of hybrid organic-silica monolithic columns in CEC and capillary LC. **ELECTROPHORESIS**, v. 36, n. 1, p. 62-75, 2015.

PAN, J. et al. Review of online coupling of sample preparation techniques with liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 815, p. 1-15, 2014.

PANG, J. et al. Metal-organic framework-monolith composite-based in-tube solid phase microextraction on-line coupled to high-performance liquid chromatography-fluorescence detection for the highly sensitive monitoring of fluoroquinolones in water and food samples. **Talanta**, v. 199, p. 499-506, 2019.

PANG, J. et al. Development of on-line monolith-based in-tube solid phase microextraction for the sensitive determination of triazoles in environmental waters. **Talanta**, v. 184, p. 411-417, 2018.

PANIZZUTTI, R. et al. Association between increased serum d-serine and cognitive gains induced by intensive cognitive training in schizophrenia. **Schizophrenia Research**, 2018

PASTERNAK, R. M.; RIVILLON AMY, S.; CHABAL, Y. J. Attachment of 3-(Aminopropyl)triethoxysilane on Silicon Oxide Surfaces: Dependence on Solution Temperature. **Langmuir**, v. 24, n. 22, p. 12963-12971, 2008.

PEÑA-ALONSO, R. et al. Study of the hydrolysis and condensation of  $\gamma$ -Aminopropyltriethoxysilane by FT-IR spectroscopy. **Journal of Materials Science**, v. 42, n. 2, p. 595-603, 2007.

PREGELJ, P. Psychosis and depression—a neurobiological view. **Psychiatria Danubina**, v. 21, n. 1, p. 102-105, 2009.

QUEIROZ, M. E. C.; MELO, L. P. Recentes avanços da in-tube SPME-LC para bioanálises. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 3, p. 167-179, 2013.

RANDON, J. et al. Zirconia based monoliths used in hydrophilic-interaction chromatography for original selectivity of xanthenes. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 9, p. 1496-1500, 2010.

RAO, M. L. et al. 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.

REVELEY, M. A. et al. Increased CSF amino acids and ventricular enlargement in schizophrenia: A preliminary study. **Biological Psychiatry**, v. 22, n. 4, p. 413-420, 1987.

RODRÍGUEZ, R. et al. Master behaviour for gelation in fluoride-catalyzed gels. **Materials Letters**, v. 15, n. 4, p. 242-247, 1992.

RUSSO, R. E.; HUNT, A. J. Comparison of ethyl versus methyl sol-gels for silica aerogels using polar nephelometry. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 86, n. 1, p. 219-230, 1986.

SAHAI, S.; UHLHAAS, S. Stability of amino acids in human plasma. **Clinica Chimica Acta**, v. 148, n. 3, p. 255-259, 1985.

SAITO, K. et al. Determination of anabolic steroids in human urine by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, n. 5, p. 727-733, 2010.

SALEEM, S. et al. Potential role of amino acids in pathogenesis of schizophrenia. **International journal of health sciences**, v. 11, n. 3, p. 63-68, 2017.

SANTOS, M. G. et al. Analysis of tricyclic antidepressants in human plasma using online-restricted access molecularly imprinted solid phase extraction followed by direct mass spectrometry identification/quantification. **Talanta**, v. 163, p. 8-16, 2017.

SARWAR, M. I.; AHMAD, Z. Interphase bonding in organic–inorganic hybrid materials using aminophenyltrimethoxysilane. **European Polymer Journal**, v. 36, n. 1, p. 89-94, 2000.

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.

SEEMAN, P.; LEE, T. Antipsychotic drugs: Direct correlation between clinical potency and presynaptic action on dopamine neurons. **Science**, US, v. 188, n. 4194, p. 1217-1219, 1975.

SHITIJ KAPUR, M.D., PH.D., F.R.C.P.C. , AND; PHILIP SEEMAN, M.D., PH.D., F.R.S. Does Fast Dissociation From the Dopamine D2 Receptor Explain the Action of Atypical Antipsychotics?: A New Hypothesis. **American Journal of Psychiatry**, v. 158, n. 3, p. 360-369, 2001

SIMPSON, M. D. C.; SLATER, P.; DEAKIN, J. F. W. 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.

SING, K. S. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity (Recommendations 1984). **Pure and applied chemistry**, v. 57, n. 4, p. 603-619, 1985.

SIOUFFI, A. M. Silica gel-based monoliths prepared by the sol–gel method: facts and figures. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1, p. 801-818, 2003.

SIRIS, S. G. Suicide and schizophrenia. **Journal of Psychopharmacology**, v. 15, n. 2, p. 127-135, 2001.

SIUZDAK, G. Ion Sources and Sample Introduction. In: (Ed.). *Mass Spectrometry for Biotechnology*. San Diego: Academic Press, 1996. cap. 1, p.4-31. ISBN 9780080535845.

SAKKA, Sumio; KOZUKA, Hiromitsu (Ed.). *Handbook of sol-gel science and technology*. 1. **Sol-gel processing**. Springer Science & Business Media, 2005.

SOUZA, I. D.; HANTAO, L. W.; QUEIROZ, M. E. C. Polymeric ionic liquid open tubular capillary column for on-line in-tube SPME coupled with UHPLC-MS/MS to determine endocannabinoids in plasma samples. **Analytica chimica acta**, v. 1045, p. 108-116, 2019.

STAAL, W. G. et al. Neuropsychological dysfunctions in siblings discordant for schizophrenia. **Psychiatry Research**, v. 95, n. 3, p. 227-235, 2000.

STAHL, S. M. Beyond the dopamine hypothesis of schizophrenia to three neural networks of psychosis: dopamine, serotonin, and glutamate. **CNS Spectr**, v. 23, n. 3, p. 187-191, 2018.

STEWART, I. I. Electrospray mass spectrometry: a tool for elemental speciation. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 54, n. 12, p. 1649-1695, 1999.

SVEC, F. Less common applications of monoliths: I. Microscale protein mapping with proteolytic enzymes immobilized on monolithic supports. **ELECTROPHORESIS**, v. 27, n. 5-6, p. 947-961, 2006.

SVEC, F. Less common applications of monoliths: Preconcentration and solid-phase extraction. **Journal of Chromatography B**, v. 841, n. 1, p. 52-64, 2006b.

TANAKA, N. et al. Monolithic silica columns for high-efficiency chromatographic separations. **Journal of Chromatography A**, v. 965, n. 1, p. 35-49, 2002.

TANAKA, N. et al. Monolithic Silica Columns for HPLC, Micro-HPLC, and CEC. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 23, n. 1, p. 111-116, 2000.

TANDON, R.; NASRALLAH, H. A.; KESHAVAN, M. S. Schizophrenia, &#x201c;just the facts&#x201d; 4. Clinical features and conceptualization. **Schizophrenia Research**, v. 110, n. 1, p. 1-23, 2009.

TIIHONEN, J. et al. Lamotrigine in treatment-resistant schizophrenia: a randomized placebo-controlled crossover trial. **Biological Psychiatry**, v. 54, n. 11, p. 1241-1248, 2003.

TORTORELLA, A. et al. Plasma Concentrations of Amino Acids in Chronic Schizophrenics Treated with Clozapine. **Neuropsychobiology**, v. 44, n. 4, p. 167-171, 2001.

TRIPP, J. A.; SVEC, F.; FRÉCHET, J. M. J. Solid-Phase Acylating Reagents in New Format: Macroporous Polymer Disks. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 3, n. 6, p. 604-611, 2001.

TSAI, G. E. et al. D-Alanine Added to Antipsychotics for the Treatment of Schizophrenia. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 3, p. 230-234, 2006. ISSN 0006-3223.

VAN DER HEIJDEN, F. M. M. A. et al. 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.

VAN DER HEIJDEN, F. M. M. A. et al. Atypical antipsychotics and the relevance of glutamate and serotonin. **European Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 3, p. 259-265, 2004.

VAN ROOSMALEN, A.; MOL, J. An infrared study of the silica gel surface. 2. Hydration and dehydration. **Journal of Physical Chemistry**, v. 83, n. 19, p. 2485-2488, 1979.

VLAKH, E. et al. Solid phase peptide synthesis on epoxy-bearing methacrylate monoliths. **Journal of Peptide Science**, v. 10, n. 12, p. 719-730, 2004.

WAGH, P. B.; RAO, A. V.; HARANATH, D. Influence of molar ratios of precursor, solvent and water on physical properties of citric acid catalyzed TEOS silica aerogels. **Materials Chemistry and Physics**, v. 53, n. 1, p. 41-47, 1998.

WANG, R.; CHEN, Z. Boronate affinity monolithic column incorporated with graphene oxide for the in-tube solid-phase microextraction of glycoproteins. **Journal of Separation Science**, v. 41, n. 13, p. 2767-2773, 2018.

WANG, R.; LI, W.; CHEN, Z. Solid phase microextraction with poly(deep eutectic solvent) monolithic column online coupled to HPLC for determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Analytica Chimica Acta**, v. 1018, p. 111-118, 2018.

WANG, X. et al. Melamine-formaldehyde aerogel functionalized with polydopamine as in-tube solid-phase microextraction coating for the determination of phthalate esters. **Talanta**, v. 199, p. 317-323, 2019.

WANG, X. et al. Co-Al bimetallic hydroxide nanocomposites coating for online in-tube solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1550, p. 1-7, 2018.

WASS, C. et al. L-lysine as adjunctive treatment in patients with schizophrenia: a single-blinded, randomized, cross-over pilot study. **BMC medicine**, v. 9, p. 40-40, 2011.

WAZIRI, R. et al. Serine metabolism and psychosis. **Psychiatry Research**, v. 12, n. 2, p. 121-136, 1984.

WELHAM, J. et al. Schizophrenia: A Concise Overview of Incidence, Prevalence, and Mortality. **Epidemiologic Reviews**, v. 30, n. 1, p. 67-76, 2008.

WOLOSKER, H.; BLACKSHAW, S.; SNYDER, S. H. Serine racemase: a glial enzyme synthesizing D-serine to regulate glutamate-N-methyl-D-aspartate neurotransmission. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 23, p. 13409-14, 1999.

WU, C. et al. Ethane-bridged hybrid monoliths with well-defined mesoporosity and great stability for high-performance peptide separation. **Analytica Chimica Acta**, v. 1019, p. 128-134,

WU, F. et al. Poly (methacrylic acid-co-diethenyl-benzene) monolithic microextraction column and its application to simultaneous enrichment and analysis of mycotoxins. **Talanta**, v. 178, p. 1-8, 2018.

WU, M. et al. Preparation and application of organic-silica hybrid monolithic capillary columns. **ELECTROPHORESIS**, v. 32, n. 1, p. 105-115, 2011.

XU, D. et al. Preparation of an O-[2-(methacryloyloxy)-ethylcarbamoyl]-10,11-dihydroquinidine-silica hybrid monolithic column for the enantioseparation of amino acids by nano-liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1593, p. 63-72, 2019.

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.

XUE, X.; LI, F. Removal of Cu(II) from aqueous solution by adsorption onto functionalized SBA-16 mesoporous silica. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 116, n. 1, p. 116-122, 2008.

YAN, L.-J. et al. Octyl-functionalized hybrid silica monolithic column for reversed-phase capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1121, n. 1, p. 92-98, 2006.

YAN, L. et al. Hybrid organic–inorganic monolithic stationary phase for acidic compounds separation by capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1046, n. 1, p. 255-261, 2004.

YANG, H. et al. Synthesis and characterization of hierarchical titania-silica monolith. **Catalysis Today**, v. 216, p. 90-94, 2013.

YI, Z. et al. Discrete silver nanoparticle infusion across silica aerogels towards versatile catalytic coatings for 4-nitrophenol reduction. **Materials Chemistry and Physics**, v. 223, p. 404-409, 2019.

YOLDAS, B. E. Hydrolysis of titanium alkoxide and effects of hydrolytic polycondensation parameters. **Journal of Materials Science**, v. 21, n. 3, p. 1087-1092, 1986.

ZAJICKOVA, Z.; RUBI, E.; SVEC, F. In situ sol–gel preparation of porous alumina monoliths for chromatographic separations of adenosine phosphates. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 22, p. 3555-3558, 2011.

ZEINODDINI, A. et al. L-lysine as an adjunct to risperidone in patients with chronic schizophrenia: A double-blind, placebo-controlled, randomized trial. **Journal of Psychiatric Research**, v. 59, p. 125-131, 2014.

ZHANG, H. et al. Sol-gel preparation of titanium (IV)-immobilized hierarchically porous organosilica hybrid monoliths. **Analytica Chimica Acta**, v. 1046, p. 199-207, 2019.

ZHANG, L. et al. Direct Immersion Solid-Phase Microextraction Analysis of Multi-class Contaminants in Edible Seaweeds by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 2018.

ZHANG, Z. et al. One-pot preparation of a mixed-mode organic-silica hybrid monolithic capillary column and its application in determination of endogenous gibberellins in plant tissues. **Journal of Chromatography A**, v. 1416, p. 64-73, 2015.

ZHANG, Z. et al. Preparation of linear polyacrylamide coating and strong cationic exchange hybrid monolith in a single capillary, and its application as an automated platform for bottom-up proteomics by capillary electrophoresis-mass spectrometry. **Microchimica Acta**, v. 184, n. 3, p. 921-925, 2017.

ZHAO, L.-Y. et al. Preparation of thiol- and amine-bifunctionalized hybrid monolithic column via “one-pot” and applications in speciation of inorganic arsenic. **Talanta**, v. 192, p. 339-346, 2019.

ZHAO, L.Y. et al. Preparation and analytical application of novel thiol-functionalized solid extraction matrices: From mesoporous silica to hybrid monolithic capillary column. **Talanta**, v. 189, p. 517-526, 2018.

ZHENG, H. et al. Preparation of a Boronate-Functionalized Affinity Silica Hybrid Monolith Column for the Specific Capture of Nucleosides. **ChemistrySelect**, v. 4, n. 2, p. 623-628, 2019.

ZHENG, M.-M.; RUAN, G.-D.; FENG, Y.-Q. Evaluating polymer monolith in-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry for reliable quantification and confirmation of quinolone antibacterials in edible animal food. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 44, p. 7510-7519, 2009.

Zheng, M. M. *et al.* Hybrid organic–inorganic silica monolith with hydrophobic/strong cation-exchange functional groups as a sorbent for micro-solid phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 45, p. 7739-7746, 2009.

ZHENG, M.-M. et al. 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.