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

“Desenvolvimento de fase monolítica com grupos amino e nano partículas para a determinação de carbidopa, levodopa, benserazida, dopamina e 3-O-metildopa em amostras de plasma de pacientes com a doença de Parkinson por HILIC-MS/MS no modo *column switching*”.

CAROLINE FERNANDES GRECCO

Dissertação 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 Mestre em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Caroline Fernandes Grecco

Desenvolvimento de fase monolítica com grupos amino e nano partículas para a determinação de carbidopa, levodopa, benserazida, dopamina e 3-O-metildopa em amostras de plasma de pacientes com a doença de Parkinson por HILIC-MS/MS no modo *column switching*

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências, obtido no Programa de Pós-Graduação em Química

Orientadora: Profa Dra Maria Eugênia Queiroz Nassur

VERSÃO CORRIGIDA

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Grecco, Caroline Fernandes

Desenvolvimento de fase monolítica com grupos amino e nanopartículas para a determinação de carbidopa, levodopa, benserazida, dopamina e 3-O-metildopa em amostras de plasma de pacientes com a doença de Parkinson por HILIC-MS/MS no modo *column switching*. Ribeirão Preto, 2019

95 p. il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientador: Nassur, Maria Eugênia Queiroz

1. Capilar com fase monolítica de sílica híbrida com grupos amino e nano partículas. 2. HILIC-MS/MS no modo *column switching*. 3. Doença de Parkinson. 4. Carbidopa. 5. Levodopa. 6. Benserazida, 7. Dopamina. 8. 3-O-metildopa.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: Caroline Fernandes Grecco

Título: **Desenvolvimento de fase monolítica com grupos amino e com adição de nano partículas para a determinação de carbidopa, levodopa, benserazida, dopamina e 3-O-metildopa em amostras de plasma de pacientes com a doença de Parkinson por HILIC-MS/MS no modo *column switching***

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

Aprovado em: __/__/__

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico este trabalho à todas as pessoas que
contribuíram para a sua realização.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora **Profa Dra Maria Eugênia Queiroz Nassur** pela excelente orientação, paciência e pela confiança em mim depositada ao longo destes anos de trabalho.

Ao **Prof Dr Vitor Tumas** pelo auxílio com as amostras biológicas e pela parceria ao longo deste trabalho.

À minha banca de qualificação: **Profa Dra Rogéria Rocha Gonçalves** e **Profa Dra Yassuko Iamamoto** pelas sugestões e críticas que enriqueceram este trabalho.

À **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**, à **Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto** e a todos os funcionários do **Departamento de Química** desta faculdade pelo apoio institucional e instalações necessárias para a realização deste trabalho.

Aos **pacientes e familiares** que aceitaram contribuir com este estudo.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP - processo nº 2017/03726-3 e 2017/02147-0) pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES - código de financiamento 001) e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (CNPQ - processo 26/2014, 466805/2014-4).

Aos técnicos de laboratório **Mércia** e **Rodrigo** pela ajuda durante as aulas práticas do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) e pela ajuda com as imagens de micrografia.

Aos amigos de laboratório **Luis Felipe, Israel, Lídia, Igor, Jonas e Luiz Gabriel** pelo companheirismo e auxílio nas atividades de laboratório.

Aos queridos amigos **Camila, Thiago, Ekeveliny, Bruno, Nathai, Brenda e Lucas** pela amizade e por tornarem os dias mais agradáveis.

Aos meus pais **Cibele e Junior** pelo apoio e amor incondicional, se fazendo presente em todos os momentos e me incentivando na busca de todos os meus objetivos.

Ao meu noivo **Mateus** pelos incentivos, paciência, companheirismo e por estar presente nos momentos importantes desta minha caminhada.

À **Deus**, acima de tudo, por me dar forças para seguir em frente superando as dificuldades.

“Que todos os nossos esforços estejam sempre focados no desafio à impossibilidade. Todas as grandes conquistas humanas vieram daquilo que parecia impossível”.

(Charles Chaplin)

RESUMO

GRECCO, C.F. **Desenvolvimento de fase monolítica com grupos amino e com adição de nano partículas para a determinação de carbidopa, levodopa, benserazida, dopamina e 3-O-metildopa em amostras de plasma de pacientes com a doença de Parkinson por HILIC-MS/MS no modo *column switching***. 2019, 95f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A Doença de Parkinson (DP) é caracterizada como uma doença neurodegenerativa e idiopática, que afeta cerca de 1% da população mundial com mais de 65 anos, podendo manifestar-se também em indivíduos com menos de 40 anos (Parkinsonismo Precoce). A DP é causada pela deficiência do neurotransmissor dopamina na via nigroestriatal e cortical, interferindo principalmente no sistema motor. A levodopa (LD) é um eficiente pró-fármaco (descarboxilada pelo aminoácido aromático descarboxilase em dopamina) para o controle dos sintomas da DP. A levodopa tem sido associada aos inibidores da dopa-descarboxilase periférica, tais como a carbidopa ou benserazida, para aumentar a disponibilidade da LD no sistema nervoso central e diminuir os efeitos adversos da dopamina formada no sistema periférico. O tratamento prolongado da DP com a LD pode levar a flutuações do motoras e discinesias. Neste projeto, o capilar com fase monolítica de sílica híbrida com grupos amino e nano partículas SBA-15 foi desenvolvido e caracterizado para análises por cromatografia líquida com interação hidrofílica acoplada à espectrometria de massas em *tandem* (HILIC-MS/MS) no modo *column switching* para a determinação de carbidopa, levodopa, benserazida, dopamina e 3-O-metildopa em amostras de plasma de pacientes com a doença de Parkinson. A fase monolítica sintetizada foi caracterizada química e morfológicamente através das técnicas de Espectroscopia vibracional na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). A análise por FTIR indicou a incorporação dos grupos funcionais a estrutura da fase monolítica, enquanto as análises por MEV e MET indicaram, respectivamente, a polimerização *in situ* e a morfologia hexagonal ordenada das nano partículas. O método HILIC-MS/MS no modo *column switching* com coluna monolítica na primeira dimensão apresentou linearidade adequada com concentrações que variaram de LIQ até 2,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com coeficientes de determinação (R^2) maiores do que 0,9910. Os valores de exatidão (EPR) intra e interensaio variaram de -10,97% a 12,29% e -9,33% a 10,41%, respectivamente. Os valores de precisão (CV) intra e interensaio variaram de 3,45% a 13,35% e 7,65% a 17,61%, respectivamente. O método apresentou valores de LIQ de 33 ng mL^{-1} para carbidopa, 22 ng mL^{-1} para levodopa, 170 ng mL^{-1} para benserazida, 1,2 ng mL^{-1} para dopamina e 10 ng mL^{-1} para 3-O-metildopa. Segundo os parâmetros de validação analítica avaliados, o método HILIC-MS/MS no modo *column switching* é adequado para determinação de carbidopa, levodopa, benserazida, dopamina e 3-O-metildopa em amostras de plasma de pacientes com a Doença de Parkinson.

Palavras chave: Capilar com fase monolítica de sílica híbrida com grupos amino e nano partículas, HILIC-MS/MS no modo *column switching*, Doença de Parkinson, carbidopa, levodopa, benserazida, dopamina e 3-O-metildopa

ABSTRACT

GRECCO, C.F. **Development of a monolithic phase with amino groups and nanoparticles for the determination of carbidopa, levodopa, benserazide, dopamine and 3-O-methyldopa in plasma samples from patients with Parkinson's disease by HILIC-MS / MS in column switching mode.** 2019, 95f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Parkinson's disease (PD) is an idiopathic neurodegenerative disease that affects about 3% of the Brazilian population aged over 65 years. It can also be seen in individuals less than 40 years old (Parkinsonism). PD is caused by deficiency of the neurotransmitter dopamine in the nigrostriatal and cortical pathway, compromising mainly in the motor system. Levodopa is an efficient prodrug (decarboxylated by the aromatic amino acid decarboxylase in dopamine) to control PD symptoms. Levodopa (LD) has been associated with peripheral dopa decarboxylase inhibitors, such as carbidopa or benserazide, to increase the availability of LD in the central nervous system and to reduce the adverse effects of dopamine formed in the peripheral system. Prolonged PD treatment with LD can lead to fluctuations in motor performance and dyskinesia. We have developed and characterized a hybrid organic-inorganic monolithic column containing amino groups and mesoporous nanoparticles and used it in the first dimension in the column-switching mode to determine carbidopa, levodopa, benserazide, dopamine, and 3-O-methyldopa in plasma samples from PD patients by employing hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HILIC-MS/MS). We chemically and morphologically characterized the hybrid organic-inorganic monolithic column containing amino groups and mesoporous nanoparticles by Fourier-transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Scanning Electron Microscopy (SEM), and Transmission Electron Microscopy (TEM). FTIR analysis indicated that the functional groups were incorporated into the monolithic phase structure, whereas the SEM and TEM analyses respectively confirmed the in-situ polymerization (the monolithic phase is chemically bound to the capillary inner surface) and the hexagonal morphology of the synthesized nanoparticles. The HILIC-MS/MS method in the column-switching mode based on the hybrid monolithic column containing amino groups and mesoporous nanoparticles in the first dimension showed adequate linearity with concentrations ranging from LOQ to 2.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and coefficients of determination (R^2) greater than 0.9910. The intra and interassay accuracy values (EPR) ranged from -10.97% to 12.29% and -9.33% to 10.41%, respectively. The intra and interassay precision values (CV) ranged from 3.45% to 13.35% and 7.65% to 17.61%, respectively. The method presented LOQ values of 33 ng mL^{-1} for carbidopa, 22 ng mL^{-1} for levodopa, 170 ng mL^{-1} for benserazide, 1.2 ng mL^{-1} for dopamine, and 10 ng mL^{-1} for 3-O-methyldopa. According to the evaluated analytical validation parameters, the HILIC-MS/MS method in the column-switching mode can adequately determine carbidopa, levodopa, benserazide, dopamine, and 3-O-methyldopa in plasma samples from PD patients.

Key words: Parkinson's disease, carbidopa, levodopa, dopamine, 3-O-methyldopa, benserazide, hybrid capillary, hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC), tandem mass spectrometry (MS / MS)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismo de conversão e absorção da levodopa.....	21
Figura 2 – Estrutura química dos fármacos e neurotransmissores relacionados com a doença de Parkinson.....	24
Figura 3 – Relação entre HILIC e as demais modalidades principais de cromatografia líquida.....	28
Figura 4 – Esquema representando o mecanismo de separação em um sistema HILIC.....	30
Figura 5 – Sistema <i>column switching</i> em modo <i>foreflush</i> e <i>backflush</i>	32
Figura 6 – Precursores comumente utilizados no processo sol-gel.....	37
Figura 7 – Representação da síntese de SBA-15.....	40
Figura 8 – Reações de hidrólise e condensação que ocorrem no processo sol-gel.....	58
Figura 9 – Capacidade de sorção das diferentes fases monolíticas de sílica híbrida com grupos amino incorporados e adição de SBA-15 em diferentes condições ácidas: (a) 2,5 mol L ⁻¹ , (b) 2,0 mol L ⁻¹ , (c) 1,0 mol L ⁻¹ e (d) ampliação da imagem (c).....	61
Figura 10 – Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). (a1) SBA-15_A (Mag = 10.00 kX); (a2) SBA-15_A (Mag = 30.00 kX); (b1) SBA-15_B (Mag = 10.00 kX); (b2) SBA-15_B (Mag = 30.00 kX); (c1) SBA-15_C (Mag = 10.00 kX); (c2) SBA-15_C (Mag = 30.00 kX);.....	63
Figura 11 – Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da seção transversal da fase monolítica de sílica híbrida com grupos amino e adição de SBA-15. (a1) fase monolítica sem adição de nano partículas SBA-15 (Mag = 200 X); (a2) fase monolítica sem adição de nano partículas SBA-15 (Mag = 5.00 kX); (b1) fase monolítica com adição de nano partículas SBA-15 (Mag = 100 X); (b1) fase monolítica com adição de nano partículas SBA-15 (Mag = 5.00 kX).....	64
Figura 12 – Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) da fase monolítica de sílica híbrida com grupos amino e com adição de SBA-15. (a1) Mag = 20 kX; (a2) Mag = 50 kX; (a3) Mag = 50 kX; (a4) Mag = 100 kX; (a5) Mag = 100 kX; (a6) Mag = 200 kX;.....	66
Figura 13 – Espectro de infravermelho da fase monolítica contendo grupos amino incorporados e adição de SBA-15.....	67
Figura 14 – Avaliação de diferentes volumes de injeção no sistema UHPLC-MS/MS.....	70

Figura 15 – Avaliação de diferentes volumes de amostra biológica.....	71
Figura 16 – Avaliação de diferentes volumes da solução de infusão pós-coluna.....	71
Figura 17 – Avaliação de diferentes comprimentos (cm) da coluna capilar monolítica....	72
Figura 18 – Cromatograma de íons totais (TIC) das soluções padrão dos analitos (500 ng mL ⁻¹) nas condições otimizadas.....	74
Figura 19 – Cromatograma de infusão pós-coluna da carbidopa, levodopa, benserazida, dopamina e 3-O-metildopa para o método HILIC-MS/MS no modo column switching.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diferentes métodos para a determinação de carbidopa, levodopa, benserazida, dopamina e 3-O-metildopa em amostras biológicas.....	25
Tabela 2 –Diferentes fases seletivas na primeira dimensão do sistema LC no modo <i>column switching</i> para análise de diferentes analitos em amostras biológicas.....	34
Tabela 3 – Otimização da síntese das nano partículas de mesoporos SBA-15.....	45
Tabela 4 – Otimização da síntese da fase monolítica de sílica híbrida funcionalizada com grupos amino e com adição de SBA-15.....	46
Tabela 5 – Condições UHPLC-MS/MS no modo <i>column switching</i>	50
Tabela 6 – Transições MS/MS (MRM), voltagem do cone (DP), energia de colisão (CE) e o tempo de retenção (t_R) dos analitos.....	51
Tabela 7 – Intervalo linear, equação de regressão linear, coeficiente de determinação e LIQ.....	75
Tabela 8 – Parâmetros de validação analítica para o método HILIC-MS/MS no modo <i>column switching</i>	76

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3-OMD	3-O-metildopa
AADC	Aminoácido aromático descarboxilase
ACN	Acetonitrila
ADS	Alquil Diol Silica
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> (Ionização Química a Pressão Atmosférica)
APPI	<i>Atmospheric Pressure Photoionization</i> (Fotoionização por Pressão Atmosférica)
APTES	(3-aminopropil) trietoxisilano
BPA	<i>Phebyl Boronic Acid</i> (Ácido fenilborônico)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina Sérica Bovina)
BHE	Barreira hematoencefálica
BSM	<i>Binary Solvent Manager</i> (Bomba Binária)
CE	<i>Collision Energy</i> (Energia de colisão)
COMT	Catecol-O-metil-transferase
CQA	Controle de Qualidade Alto
CQB	Controle de Qualidade Baixo
CQM	Controle de Qualidade Médio
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
CV	Coeficiente de Variação
DF	Detector de Fluorescência
DP	Doença de Parkinson
EPR	Erro Padrão Relativo
ESI	<i>Electrosray Source Ionization</i> (Fonte de ionização por eletrospray)
FE	Fase Estacionária
FM	Fase Móvel
FTIR	Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier
HCl	Ácido clorídrico

HILIC	<i>Hydrophilic Interaction Chromatography</i> (Cromatografia líquida por interação hidrofílica)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia líquida de alta performance)
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography coupled to tandem mass spectrometer</i> (Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas em <i>tandem</i>)
LIQ	Limite Inferior de Quantificação
LLE	<i>Liquid-Liquid Extaction</i> (Extração Líquido-Líquido)
LSQ	Limite Superior de Quantificação
LTC	<i>Liquid Cristal Template</i> (Direcionamento por Cristal Líquido)
LV	Levodopa
MCM	<i>Mobil Composition of Matter</i>
MD01	1,1-dimetil-3-carboxi-6,7-dihidroxi-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MIP	<i>Molecularly Imprinted Polymer</i> (Polímero Molecularmente Impresso)
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas
MS/MS	Espectrometria de Massas em <i>tandem</i>
NaOH	Hidróxido de sódio
NPLC	<i>Normal Phase Liquid Chroatography</i> (Cromatografia Líquida em Fase Normal)
P123	Poli(etileno glicol)-B-Poli(propileno glicol)-B-Poli(etileno glicol)
PFP	<i>Pentafluorophenyl</i> (Penta fluorofenil)
PI	Padrão Interno
PP	Precipitação de Proteínas
PSG	Processo sol-gel
QSM	<i>Quaternary Solvent Manager</i> (Bomba Quaternária)
RAM	<i>Restricted Acess Material</i> (Material de Acesso Restrito)
RP	<i>Reversed-Phase</i> (Fase Reversa)

RPLC	<i>Reversed Phase Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida em Fase Reversa)
SBA-15	<i>Santa Barbara Amorphous-15</i>
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Extração em Fase Sólida)
TEOS	Tetraetoxissilano
TIC	Cromatograma de Íons Totais
TMOS	Tetrametoxissilano
tR	Tempo de retenção
UHPLC-MS/MS	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography coupled to tandem mass spectrometer</i> (Cromatografia Líquida de Ultra Performance Acoplada à Espectrometria de Massas em <i>tandem</i>)
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

1D	Primeira dimensão
2D	Segunda dimensão
°C	grau Celsius
μm	micrômetro
μg mL ⁻¹	microgramas/mililitro
μL	microlitro
cm ⁻¹	centímetro ⁻¹
g	grama
Kv	quilovolt
L h ⁻¹	litro/hora
mg	miligrama
mg mL ⁻¹	miligrama/mililitro
min	minuto
mL min ⁻¹	mililitro/minuto
mm	milímetro
ng mL ⁻¹	nanogramas/mililitro
rpm	rotação por minuto
s	segundo
V	volts
v/v	volume/volume

SUMÁRIO

Universidade de São Paulo	1
1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Parkinson.....	20
1.2. Monitorização terapêutica	22
1.3. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em <i>tandem</i> na determinação de fármacos e neurotransmissores em amostras biológicas	23
1.3.1. Cromatografia líquida com interação hidrofílica (HILIC, do inglês <i>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i>)	27
1.4. Preparo de amostra	31
1.4.1. Cromatografia líquida no modo <i>column switching</i>	31
1.5. Fases monolíticas	36
1.5.1. Fases monolíticas de sílica híbrida	36
1.6. SBA-15.....	39
2. OBJETIVOS.....	42
2.1. Objetivo Geral	42
2.2. Objetivos Específicos	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1. Materiais e reagentes	44
3.2. Síntese das nano partículas de mesoporos SBA-15	44
3.3. Síntese do capilar monolítico de sílica híbrida com grupos amino incorporados e com adição de SBA-15 para análise HILIC-MS/MS no modo <i>column switching</i>	45
3.4. Caracterização morfológica e química da fase monolítica de sílica híbrida e das nano partículas de mesoporos SBA-15	47
3.5. Amostras de plasma	47
3.6. Preparo da amostra de plasma	48
3.7. Preparo dos calibradores	48
3.8. Análise HILIC-MS/MS no modo <i>column switching</i>	48

3.8.1.	Configuração do método HILIC-MS/MS no modo <i>column switching</i>	48
3.8.2.	Condições MS/MS	51
3.8.3.	Otimização das condições HILIC-MS/MS no modo <i>column switching</i>	52
3.9.	Validação analítica	52
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1.	SBA-15	56
4.2.	Fase monolítica de sílica híbrida com grupos amino incorporados	57
4.3.	Fase monolítica de sílica híbrida com grupos amino incorporados e adição de SBA-15	60
4.4.	Caracterização química e morfológica	62
4.4.1.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	62
4.4.2.	Análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	65
4.4.3.	Espectroscopia vibracional no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	67
4.5.	Otimização das condições HILIC-MS/MS	68
4.6.	Otimização das condições HILIC-MS/MS no modo <i>column switching</i>	69
4.7.	Validação analítica do método HILIC-MS/MS no modo <i>column switching</i>	74
4.7.1.	Linearidade e LIQ	75
4.7.2.	Exatidão e precisão	75
4.7.3.	Efeito residual e efeito matriz	76
5.	CONCLUSÃO	80
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurodegenerativa crônica e progressiva que afeta cerca de 1% da população mundial com mais de 65 anos de idade (BARBOSA et al., 2006; MARTINS et al., 2013). É considerada a segunda patologia neurodegenerativa mais frequente no mundo, atrás apenas da doença de Alzheimer (OLANOW; TATTON, 1999; MERRIT; ROWLAND, 2000; DE LAU; BRETELER, 2006).

A DP é caracterizada por sintomas motores clássicos como: rigidez, tremor, bradicinesia e instabilidade postural. Além das alterações motoras, os pacientes também podem apresentar sintomas não motores como: distúrbios do sono, perda de olfato, transtornos de humor e de ansiedade, alterações de personalidade, perda cognitiva, delírios e alucinações (SCHRAG, 2004). Os sintomas motores clássicos, especialmente a bradicinesia, estão associados à deficiência estriatal-do neurotransmissor dopamina. Esta deficiência é causada pela degeneração dos neurônios que formam a via nigroestriatal e cortical, interferindo no funcionamento geral dos gânglios da base que participam de maneira importante dos processos neurais envolvidos com o controle motor (SHULMAN; DE JAGER; FEANY, 2011; MARTINS et al., 2013).

Embora a DP atualmente não tenha cura, seus sintomas podem ser tratados com o auxílio de medicamentos e cirurgia (BJARKAM et al., 2001). Dentre os medicamentos utilizados, o pró-fármaco levodopa apresenta a maior eficácia no tratamento (MARTINS et al., 2013).

No organismo, a levodopa é descarboxilada em dopamina através da ação do aminoácido aromático descarboxilase (AADC), e metabolizada pela catecol-O-metil-transferase (COMT) em 3-O-metil-dopa (3-OMD), (Figura 1). A dopamina produzida no sistema periférico não atravessa a barreira hemato-encefálica, e por isso não pode agir como um neurotransmissor dentro sistema nervoso central, além de ocasionar efeitos colaterais indesejáveis como: náuseas, vômitos e arritmias cardíacas.

A levodopa que não é convertida periféricamente atravessa a barreira hemato-encefálica e atinge o sistema nervoso central. Ali, os neurônios dopaminérgicos sobreviventes do Parkinson (sabe-se que no início dos sintomas da DP, cerca de 50-60% dos neurônios já foram degenerados) captam a levodopa, que é descarboxilada pela AADC em dopamina, a qual é armazenada nas vesículas sinápticas e liberada pelos neurônios na fenda sináptica.

A levodopa tem sido administrada simultaneamente com a carbidopa ou benserazida, fármacos inibidores da dopa-descarboxilase periférica que reduzem o metabolismo periférico da levodopa em dopamina, aumentando a disponibilidade de levodopa no sistema nervoso central. Como esses fármacos inibidores não atravessam a barreira hemato-encefálica, o mecanismo de conversão da levodopa em dopamina no sistema nervoso central não é afetado. A utilização desses fármacos inibidores diminuiu em 4 a 5 vezes a dose de levodopa necessária e, conseqüentemente, diminuem a gravidade dos efeitos colaterais da dopamina formada no sistema periférico.

Figura 1. Mecanismo de conversão e absorção da levodopa. Adaptado da referência (NISHIJIMA; TOMIYAMA, 2016).

No decorrer da fase mais tardia da doença de Parkinson são necessários ajustes na dosagem da levodopa e dos fármacos inibidores, uma vez que o processo degenerativo das células nigroestriais segue seu ritmo (nessa fase, cerca de 95% dos neurônios dopaminérgicos já foram degenerados).

As flutuações motoras e as discinesias são as causas mais comuns de insucesso do tratamento nas fases avançadas da doença de Parkinson. Os tipos de flutuações motoras mais comuns são a deterioração de final de dose (*wearing-off*), caracterizada pelo encurtamento da duração do efeito da levodopa, e as flutuações aleatórias (fenômeno *on-off*), caracterizadas pela mudança brusca do estado de mobilidade do paciente sem que haja uma relação com a administração do fármaco (DAVID et al., 2012).

As flutuações motoras têm sido notadas após 5 a 6 meses do início do tratamento, principalmente com altas doses de levodopa (≥ 600 mg/d). No entanto, dos pacientes em terapia com a associação medicamentosa carbidopa/levodopa, 20% mantêm o controle dos sintomas após 02 anos de tratamento, e mais de 70% apresentam flutuações aleatórias e discinesias após 05 anos (DHALL; KREITZMAN, 2016).

Quando os sintomas da deterioração de final de dose (*wearing-off*) são mais frequentes, as doses de levodopa devem ser aumentadas repetidamente para obter a resposta clínica adequada. As flutuações na resposta farmacodinâmica para a levodopa entre a fase *wearing-off* e as discinesias leva a uma janela terapêutica muito estreita, aumentando a probabilidade de *overdose* ou doses não terapêuticas (DHALL; KREITZMAN, 2016).

1.2. Monitorização terapêutica

O intervalo terapêutico compreende a faixa entre a concentração mínima e máxima do fármaco na qual é observada a eficácia do tratamento. Concentrações acima do intervalo terapêutico resultam em efeitos tóxicos ao paciente (*overdose*), e, concentrações abaixo resultam na ineficiência do tratamento (doses não terapêuticas).

Assim, a monitorização terapêutica, é uma importante ferramenta clínica para auxiliar no ajuste das doses terapêuticas, minimizar os efeitos adversos, as interações farmacocinéticas e até mesmo verificar a baixa adesão do paciente ao tratamento (JUENKE et al., 2013; QUEIROZ; MELO, 2014; WIDMER et al., 2014).

Portanto, a análise de fármacos, neurotransmissores e seus metabólitos em amostras de plasma de pacientes tem como objetivo auxiliar na monitorização terapêutica e consequentemente no ajuste das doses e individualização da terapia farmacológica.

1.3. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em *tandem* na determinação de fármacos e neurotransmissores em amostras biológicas

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem* (LC-MS/MS) tem sido considerada a técnica analítica de referência para a determinação de neurotransmissores, fármacos e seus metabólitos em amostras biológicas.

Um espectrômetro massas é composto basicamente por um sistema de introdução da amostra, fonte de ionização, um ou mais analisadores de massa, um detector e um sistema para aquisição de dados.

As fontes de ionização são empregadas de acordo com a massa molar e a polaridade das moléculas, sendo as mais utilizadas para o acoplamento LC-MS: ionização por *electrospray* (ESI), ionização química à pressão atmosférica (APCI) e fotoionização a pressão atmosférica (APPI). Na ionização por *electrospray* (YAMASHITA; FENN, 1984), o analito dissolvido na fase móvel passa através de um capilar de aço inox, à pressão atmosférica, ao qual é aplicada uma voltagem de 3.000 a 5.000 V. Na saída do capilar são formadas pequenas gotas altamente carregadas (aerossol) que serão dessolvatadas. À medida que ocorre a dessolvatação, o tamanho das gotas é reduzido e a densidade de carga aumenta até um ponto em que a tensão superficial é rompida e as gotículas são liberadas em um processo conhecido como “explosão coulômbica”. Uma série de explosões passa então a ocorrer até que são produzidos íons do soluto a partir destas gotas, os quais são transferidos para o analisador de massas por uma série de dispositivos de focalização.

O analisador de massas é o responsável pela separação dos íons de acordo com a sua m/z (razão massa-carga). Os tipos de analisadores mais utilizados são: quadrupolo (Q), aprisionamento de íons (*ion-trap*), tempo de voo (TOF) e “orbitraps”. O analisador do tipo quadrupolo é composto por quatro barras paralelas, onde as barras opostas são conectadas ao mesmo potencial elétrico. O quadrupolo funciona como um filtro pois permite que os íons de diferentes valores de m/z cheguem com tempos diferentes ao detector, conferindo alta sensibilidade a esse tipo de analisador, o que explica sua ampla utilização em análises quantitativas (FERGUSON; MCCULLOH; ROSENSTOCK, 1965). O triplo quadrupolo é constituído de três quadrupolos em série, onde o primeiro e o terceiro quadrupolos (Q1 e Q3) funcionam como seletores de m/z e o segundo quadrupolo (Q2) funciona como câmara de colisão. Assim, os íons precursores podem

ser isolados em Q1, fragmentados em Q2 e terem seus fragmentos identificados e quantificados em Q3 (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). Este modo de monitoramento é chamado de MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) e permite a redução significativa do ruído de base da análise. Em estudos de quantificação, utiliza-se uma transição m/z para quantificar o analito e outra transição m/z para confirmar, aumentando assim a seletividade do método.

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

Diferentes métodos LC-MS/MS têm sido descritos na literatura para a determinação de benserazida, carbidopa, levodopa, dopamina e 3-O-metildopa (Tabela 1 e Figura 2).

Figura 2. Estrutura química dos fármacos e neurotransmissores relacionados com a Doença de Parkinson

Tabela 1. Diferentes métodos para a determinação de carbidopa, levodopa, benserazida, dopamina e 3-O-metildopa em amostras biológicas

Analito	Matriz biológica	Volume de amostra (µL)	Preparo de amostra	Análise	LIQ (ng mL ⁻¹)	Aplicação Clínica	Referências
Levodopa 3-O-metildopa	Plasma	250	PP (ácido perclórico)	HPLC-ESI-MS/MS	50 25	Estudo farmacocinético	(CÉSAR et al., 2011b)
Levodopa Carbidopa	Plasma	250	PP (ácido perclórico)	HPLC-ESI-MS/MS	50 3	Estudo farmacocinético	(CÉSAR et al., 2011a)
Levodopa Dopamina L-α-metildopa 3-O-metildopa	Plasma (rato)	50	PP (metanol contendo 1% de ácido fórmico)	RP-HPLC-ESI-MS/MS	30	Monitorização terapêutica e estudo farmacocinético	(CHO et al., 2012)
Levodopa Carbidopa	Plasma (rato e macaco)	50	PP (acetonitrila contendo reagente de derivatização)	UHPLC-MS/MS	5 3	Estudo farmacocinético	(JUNNOTULA; LICEA-PEREZ, 2013)
Levodopa	Plasma	200	PP (ácido perclórico)	HPLC-MS/MS	25	Estudo de bioequivalência	(MARTINS et al., 2013)
3-O-metildopa	Plasma	200	PP (ácido perclórico)	HPLC-MS/MS	50	Estudo de bioequivalência	(MARTINS et al., 2000)
Levodopa Carbidopa 3-O-metildopa Dopamina	Plasma	400	PP (acetonitrila, 0,05% ácido fórmico e formiato de amônio 3 mol L ⁻¹)	HPLC-MS/MS (HILIC)	75 65 65 20	Monitorização terapêutica	(VILHENA et al., 2014)
Levodopa Carbidopa Entacapona Tocalpone 3-O-metildopa Dopamina	Plasma	200	PP (acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico)	HPLC-MS/MS	20 30 10 10 10 5	Monitorização terapêutica	(RIBEIRO et al., 2015)

Continuação da Tabela 1

Analito	Matriz biológica	Volume de amostra (µL)	Preparo de amostra	Análise	LIQ (ng mL⁻¹)	Aplicação Clínica	Referências
Levodopa MD01	Plasma	50	PP (acetonitrila contendo 2% de ácido fórmico)	LC-MS/MS	20	Estudo farmacocinético	(YANG et al., 2016)
Levodopa Carbidopa	Plasma	200	SPE	LC-MS/MS	5 2	Estudo de bioequivalência e farmacocinética	(KAKARLA; KODALI; SERU, 2016)
Levodopa Carbidopa	Plasma (rato)	200	LLE	RP-LC-MS/MS	50 20	Estudo toxicocinético	(CHI et al., 2017)

1.3.1. Cromatografia líquida com interação hidrofílica (HILIC, do inglês *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*)

Descrita por Mikhai Tswett no início do século XX, a cromatografia líquida em fase normal foi a primeira modalidade da cromatografia a ser desenvolvida. Originalmente, esta técnica utilizava uma fase sólida constituída por um óxido inorgânico como a sílica ou alumina, a qual foi acondicionada no interior de um tubo servindo como meio de separação através da retenção relativa de cada composto nesta fase (denominada fase estacionária). Para remover os compostos retido na fase estacionária, um líquido (denominado fase móvel) foi percolado sobre esta fase, arrastando os compostos para fora do tubo, respeitando a maior ou menor interação de cada composto com a fase estacionária (HEMSTRÖM; IRGUM, 2006; LANÇAS, 2010; BUSZEWSKI; NOGA, 2012).

A grande variedade de compostos polares facilmente disponíveis para serem utilizados como fase estacionária, (em especial os óxidos de sílica, alumina, magnésia, titânia e zircônica) fez com que a modalidade de cromatografia líquida mais empregada durante décadas, fizesse uso de fases estacionárias mais polares que as fases móveis (SILVA; BOTTOLI; COLLINS, 2016). Esta modalidade ficou conhecida por Cromatografia Líquida em Fase Normal (NPLC).

Na década de 70 surgiram as denominadas fases quimicamente ligadas (*bonded phases*), as quais possibilitaram o uso de fases estacionárias mais hidrofóbicas e fases móveis baseadas em soluções aquosas contendo solventes orgânicos miscíveis com a água. Esse novo sistema, composto por fases estacionárias com grupos apolares ancorados na sílica (C18, C8, C6 e outros) e fases móveis (compostas por acetonitrila-água, metanol-água) mais polares que a fase estacionária, se tornou popular na análise de biomoléculas em alimentos e na análise de pesticidas. Nesse sentido, a ordem de eluição dos compostos era contrária, inversa ou reversa à da cromatografia líquida em fase normal. Assim, esse tipo de cromatografia ficou conhecido por Cromatografia Líquida em Fase Reversa (RPLC) (HEMSTRÖM; IRGUM, 2006; LANÇAS, 2010; BUSZEWSKI; NOGA, 2012).

Além da NPLC e RPLC, existe a cromatografia de troca iônica, baseada principalmente em interações eletrostáticas, importante na análise de compostos iônicos (HEMSTRÖM; IRGUM, 2006; LANÇAS, 2010; BUSZEWSKI; NOGA, 2012).

Uma das limitações do uso da cromatografia líquida em fase reversa é a baixa retenção de compostos polares ou iônicos. O uso da cromatografia líquida em fase normal, na qual se emprega fase estacionária mais polares que a fase móvel, pode solucionar essa limitação. No entanto, a solubilidade de moléculas polares em FM apolares não aquosas é limitada, restringindo a sua aplicação. E, em alguns casos, a cromatografia de troca iônica não pode ser aplicada devido à ausência de carga dos solutos.

Nesse contexto, a cromatografia líquida com interação hidrofílica (HILIC) se destaca por ser uma modalidade de separação de substância polares ou iônicas na qual é empregada uma fase estacionária (FE) polar similar a aquelas utilizadas em cromatografia líquida em fase normal e uma fase móvel (FM) similar à aquelas utilizadas em cromatografia líquida em fase reversa (SILVA; BOTTOLI; COLLINS, 2016) (Figura 3).

Figura 3. Relação entre HILIC e as demais modalidades principais de cromatografia líquida. Adaptado da referência (BUSZEWSKI; NOGA, 2012).

Em 1951, Gregor et al (LI; FRIES; MALIK, 2004) descreveram as interações envolvendo a camada de água presente em uma fase estacionária a base de resina trocadora de íons. Em 1975, Linden e Lawhead (LINDEN; LAWHEAD, 1975) utilizaram colunas polares com fase estacionária trocadora de ânions na separação de sacarídeos com uma fase móvel com elevada concentração de solvente orgânico. No mesmo ano, Palmer

(PALMER, 1975) utilizou uma coluna à base de carboidrato para separar açúcares com uma fase móvel composta por alta concentração de acetonitrila. Nos anos de 1982 e 1985, Verhaar e Kuster (VERHAAR; KUSTER, 1982) e Nikolov e Reilly (NIKOLOV; REILLY, 1985), respectivamente, separam misturas de açúcares utilizando colunas polares com grupos amino baseadas em suporte de sílica utilizando uma mistura de água-acetonitrila como fase móvel.

No entanto, o termo HILIC foi sugerido pela primeira vez por Alpert (ALPERT, 1990) em 1990 na separação de peptídeos, ácidos nucleicos e outros compostos polares. Alpert propôs o termo como uma variação da cromatografia em fase normal quando utilizou fase móvel com alta concentração de solvente orgânico e mecanismo de retenção baseado na interação hidrofílica entre os analitos polares e a camada de água superficialmente imobilizada na fase estacionária polar.

As colunas HILIC são recheadas com fases estacionárias (FE) convencionais polares, como sílica pura, sílica modificada com grupos triazóis, cianos, aminos, amidas, ácidos sulfônicos, carboxilatos, diols, poliidroxiethylaspartamida ou polímeros, além de novos materiais como compostos zwitteriônicos.

Já a fase móvel (FM) é semelhante à utilizada em cromatografia em fase reversa, composta por uma mistura de uma solução aquosa (baixa concentração) com um solvente orgânico (OYLER et al., 1996; GARBIS et al., 2001; OLSEN, 2001; NGUYEN; SCHUG, 2008; BUSZEWSKI; NOGA, 2012; YANG et al., 2016). A fase móvel clássica consiste em uma solução contendo um solvente aprótico como a acetonitrila e um solvente prótico como a água (com proporção de acetonitrila > 70%, geralmente entre 70-95%). A ordem de força cromatográfica dos solventes em HILIC é dada por: acetona < isopropanol < acetonitrila < etanol < metanol < água.

As separações em HILIC podem ser realizadas em modo isocrático ou utilizando eluição por gradiente. Na eluição por gradiente, a fase móvel inicial possui pouca quantidade de água e elevada quantidade do solvente orgânico, diminuindo-se ao longo da análise a quantidade do solvente orgânico e aumentando a de água (LANÇAS, 2010).

De acordo com a literatura, existem três maneiras possíveis para modelar o mecanismo de separação que ocorre em HILIC (Figura 4). O principal mecanismo é o equilíbrio de partição dos analitos polares entre a camada de água superficialmente imobilizada ou adsorvida junto aos grupos silanóis da sílica e a fase móvel. O segundo mecanismo trata-se de interações hidrofílicas (ligações de hidrogênio ou dipolo-dipolo) entre os analitos com a superfície da fase estacionária. E o terceiro assume as interações

eletrostáticas entre os grupos ionizados dos analitos com grupos iônicos ancorados na fase estacionária ou com os grupos silanóis residuais da superfície da sílica (HEMSTRÖM; IRGUM, 2006; BUSZEWSKI; NOGA, 2012; LIANG et al., 2015).

Figura 4. Esquema representando o mecanismo de separação em um sistema HILIC. Adaptado de (HECKENDORF; RATHORE; KRULL, 2013)

A separação HILIC apresenta algumas vantagens quando comparada a outros modos de separação como a fase normal ou a fase reversa (WANG; HE, ; NAIDONG, 2003; IKEGAMI et al., 2008), são elas: (a) compatibilidade com técnicas de extração que utilizam altas concentrações de solvente orgânico, permitindo que os extratos sejam injetados diretamente no sistema cromatográfico; (b) quando comparada a RP-HPLC, apresenta maior eficiência na retenção de compostos polares; (c) diminuição na pressão do sistema visto que a viscosidade da fase móvel também diminui com a alta concentração de solvente orgânico; (d) quando acoplada a espectrometria de massas, proporciona um aumento da sensibilidade analítica, da ionização por *eletrospray* e da capacidade de dessolvatação, devido à alta proporção de solvente orgânico utilizada na fase móvel (MCCALLEY, 2007; BUSZEWSKI; NOGA, 2012; YANG et al., 2016).

1.4. Preparo de amostra

As amostras biológicas possuem vários componentes interferentes que podem suprimir a ionização dos analitos nas análises LC-MS/MS, coeluir com os analitos durante a separação cromatográfica ou adsorver de forma irreversível junto à coluna analítica, diminuindo o tempo de vida útil da coluna e modificando a retenção dos analitos (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). Dessa maneira, o preparo de amostra é uma etapa importante no desenvolvimento de métodos cromatográficos, pois elimina grande parte dos componentes interferentes da matriz biológica e pré-concentra os fármacos quase sempre presentes em níveis de traços (QUEIROZ; MELO, 2014). As técnicas de precipitação de proteínas (PP) e extração em fase sólida (SPE) têm sido as técnicas de preparo de amostras mais utilizadas na determinação desses fármacos em amostras biológicas (Tabela 1). As técnicas de separação têm sido direcionadas para a miniaturização e automação dos sistemas analíticos. Neste contexto, podemos destacar a cromatografia líquida no modo *column switching*.

1.4.1. Cromatografia líquida no modo *column switching*

A cromatografia líquida no modo *column switching* permite a automação das análises através da hifenação da etapa de preparo de amostras biológicas com o sistema cromatográfico. Quando comparada à cromatografia líquida convencional, a cromatografia líquida no modo *column switching* apresenta algumas vantagens como: (a) mínimo risco de contaminação da amostra; (b) menor volume de amostra biológica; (c) maior exatidão e repetitividade dos resultados; (d) maior seletividade e detectabilidade analítica. No entanto, o sistema online apresenta também algumas desvantagens como: (a) aumento da pressão do sistema analítico oriundo da sorção de componentes endógenos interferentes da matriz biológica no sorvente; (b) incompatibilidade entre as fases móveis das colunas da primeira (1D) e segunda dimensão (2D).

O sistema analítico no modo *column switching* pode ser montando com diferentes configurações, sendo a configuração mais usual constituída por duas colunas com diferentes fases estacionárias (1D e 2D) e dimensões, válvulas com múltiplos pórticos e uma ou mais bombas de alta pressão (CAMPÍNS-FALCÓ; HERRÁEZ-HERNÁNDEZ;

SEVILLANO-CABEZA, 1993; KATAOKA; SAITO, 2012). Após simples pré-tratamento, a amostra biológica é percolada na coluna 1D para a pré-concentração (sorção) seletiva dos analitos e remoção dos interferentes. Direcionando a válvula de seis pórticos para a posição injetar, a fase móvel percola a coluna 1D e os analitos sorvidos são eluídos para a coluna 2D. Por último, há o desacoplamento das colunas, seguido da separação cromatográfica na coluna 2D (coluna analítica) e o acondicionamento da coluna 1D (preparo de amostra) (CAMPÍNS-FALCÓ; HERRÁEZ-HERNÁNDEZ; SEVILLANO-CABEZA, 1993; KATAOKA; SAITO, 2012).

As etapas de pré-concentração e eluição dos analitos podem ser realizadas no modo *foreflush* (direto) ou *backflush* (reverso) (KATAOKA; SAITO, 2012) como mostra a Figura 5. No modo *foreflush*, os analitos são eluídos da coluna 1D para a coluna 2D na mesma direção da percolação (pré-concentração) da amostra (SADÍLEK; ŠATÍNSKÝ; SOLICH, 2007). Já no modo *backflush*, a eluição dos analitos da coluna 1D para a coluna 2D é realizada no sentido oposto ao sentido empregado na pré-concentração dos analitos. Desta forma, os analitos retidos no início da coluna 1D são transferidos diretamente para a coluna 2D, sem o alargamento da banda.

Figura 5. Sistema *column switching* em modo *foreflush* e *backflush*. Adaptado de (MARCHIONI et al., 2017).

Diferentes fases seletivas têm sido utilizadas como coluna 1D no sistema *column switching*, dentre elas podemos destacar as fases monolíticas (DOMINGUES; SOUZA; QUEIROZ, 2015; MIZUNO; KATAOKA, 2015; LUO; LI; HU, 2017), polímeros molecularmente impressos – MIP – (XU et al., 2010a), materiais de acesso restrito – RAM – (ECKERT; GÖEN, 2014; FAGUNDES et al., 2014; ZHOU et al., 2014; ZHANG et al., 2015; CAGLAR ANDAC, 2016), colunas de fluxo turbulento (CRUTCHFIELD; MARZINKE; CLARKE, 2016; HERVIOU et al., 2016; SHIN et al., 2016), imunosorventes (CHAVES; QUEIROZ, 2013), nanotubos de carbono (DE FARIA et al., 2017) e suportes de sílica –C18 – (PARK et al., 2014; PURSLEY et al., 2014; SABAREDZOVIC et al., 2015; XIONG et al., 2015; HÄDENER et al., 2016; ZHONG et al., 2016)

A Tabela 2 ilustra algumas aplicações de diferentes fases seletivas na primeira dimensão do sistema LC no modo *column switching*.

Tabela 2. Diferentes fases seletivas na primeira dimensão do sistema LC no modo *column switching* para análise de diferentes analitos em amostras biológicas

Analito	Amostra	Coluna 1D	Coluna 2D	Análise	Referência
Sulfonamidas	Leite bovino	RAM-MIP-SG	C18 (250 x 4,6 mm x 5 µm)	UV	(XU et al., 2010a)
Interferon α ₂	Plasma	Capilar imunsorvente (60 cm x 0,25 mm)	C18 (125 x 4 mm x 5 µm)	DF	(CHAVES; QUEIROZ, 2013)
Ácidos alquil mercatúricos	Urina	C18-RAM-ODS (25 x 4,0 mm x 25 µm)	C18 (150 x 4,6 mm x 3 µm)	MS/MS	(ECKERT; GÖEN, 2014)
Estatinas	Plasma	C18-RAM-BSA (30 x 4,6 mm x 15 µm)	C18 (125 x 4,0 mm x 5 µm)	UV	(FAGUNDES et al., 2014)
Bisfenol	Urina	C18-RAM-ODS (25 x 4 mm x 25 µm)	C18 monolítica (100 x 4,6 mm)	MS/MS	(ZHOU et al., 2014)
Apixaban	Plasma	C18 (30 x 2,1 mm x 10 µm)	C18 monolítica (50 x 4,6 mm)	MS/MS	(PURSLEY et al., 2014)
11-nor-9-carboxi-tetra-hidrocanabinol	Cabelo	C18 (50 x 3,0 mm x 2,6 µm)	C18 (75 x 2,1 mm x 2,7 µm)	MS ³	(PARK et al., 2014)
Antidepressivos Anticonvulsiantes Ansiolíticos Antipsicóticos	Plasma	Coluna capilar monolítica de sílica híbrida com grupos cianopropil (4,5 cm x 530 µm)	C18 (100 x 2,1 mm x 2,5 µm)	MS/MS	(DOMINGUES; SOUZA; QUEIROZ, 2015)
8-Isoprostano	Urina	Capilar carboxen 1006 (60 cm x 0,32 mm x 17 µm)	C18 (250 x 2 mm x 4 µm)	MS/MS	(MIZUNO; KATAOKA, 2015)
Opióides Benzodiazepínicos	Urina	C18 (20 x 2,1 mm x 25 µm)	C18 (150 x 2,1 mm x 3,5 µm)	MS/MS	(XIONG et al., 2015)
Metabólitos de ftalatos	Urina	C18 (10 x 3,0 mm x 5 µm)	C18 (100 x 2,1 mm x 2,6 µm)	MS/MS	(SABAREDZOVIC et al., 2015)
Biomarcadores para o 1,3-butadieno	Urina	C8-RAM-ADS (25 x 4,0 mm x 25 µm)	C18 (75 x 3,0 mm x 3 µm)	MS/MS	(ZHANG et al., 2015)

Continuação da Tabela 2

Analito	Amostra	Coluna 1D	Coluna 2D	Análise	Referência
Doxazosina Clenbuterol	Plasma	C4-RAM-ADS (20 x 2,0 mm x 25 µm)	C18 (150 x 4,6 mm x 3,5 µm)	UV	(CAGLAR ANDAC, 2016)
Antipsicóticos	Plasma	C18 (10 x 4,6 mm x 25 µm)	C18 (50 x 2,0 mm x 1,6 µm)	MS/MS	(ZHONG et al., 2016)
11-nor-9-carboxi-tetra- hidrocanabinol	Sangue	C18 (10 x 2,0 mm x 4 µm)	PFP (30 x 2,1 mm x 2,6 µm)	MS/MS	(HÄDENER et al., 2016)
Docetaxel	Soro	Ciclone-P (50 x 0,5 mm x 60 µm)	C18 (50 x 2,1 mm x 3,0 µm)	MS/MS	(CRUTCHFIELD; MARZINKE; CLARKE, 2016)
Irinotecano e metabolito	Plasma	Ciclone-P (50 x 0,5 mm x 60 µm)	C18 (50 x 2,1 mm x 3,0 µm)	MS/MS	(HERVIOU et al., 2016)
Prostaglandinas (E2 e D2)	Plasma	Ciclone-P (50 x 0,5 mm x 60 µm)	C18 (50 x 2,1 mm x 1,9 µm)	MS/MS	(SHIN et al., 2016)
Benzodiazepinos	Plasma	Cartucho Oasis HLB (20 mm x 2,1 µm x 25µm)	Supimax ODS (30 x 3,0 mm x 2 µm)	UHPLC- MS/MS	(LEE et al., 2017)
Tetraciclinas	Leite bovino	Nanotubo de carbono (10 mm x 4 mm)	C18 (150 x 4,6 mm x 5 µm)	LC-UV	(DE FARIA et al., 2017)
Estrogênio	Urina	Capilar monolítico (12,7 x 530 µm)	C18 (250 x 4,6 mm x 5 µm)	HPLC-UV	(LUO; LI; HU, 2017)
Bisfenol A	Água	Nanofibra de poliamida (5mm x 4,6 mm)	C18 (10 x 4,6 mm x 5 µm)	HPLC-FD	(HÁKOVÁ et al., 2018)

1.5. Fases monolíticas

O termo “monolito tem origem na palavra grega “*monolithos*” em que “*mono*” significa “único” e “*lithos*” significa “rocha”. Na área da ciência das separações, uma fase monolítica é um meio contínuo de separação/sorção que possui uma estrutura altamente porosa constituída de macroporos (> 50 nm), mesoporos (entre 2 e 50 nm) e microporos (< 2 nm). Os macroporos são responsáveis por fornecer alta permeabilidade à estrutura monolítica permitindo análises a altas vazões e baixa pressão (FARIA et al., 2006), enquanto que a superfície dos mesoporos promove as interações entre os analitos e a fase extratora (NEMA; CHAN; HO, 2014). Em alguns casos, pode ocorrer a presença de microporos, sendo mais comum em fases monolíticas à base de polímeros orgânicos, mas podendo aparecer em menor quantidade nas fases monolíticas de sílica (NORDBORG; HILDER; HADDAD, 2011).

Dependendo da natureza dos precursores de síntese, a estrutura monolítica resultante pode ser classificada em: orgânica, inorgânica ou de sílica híbrida (ZHU; ROW, 2012). As fases monolíticas a base de polímeros orgânicos são mais eficientes para a separação de macromoléculas, ao passo que as fases monolíticas inorgânicas e de sílica híbrida apresentam melhor desempenho para separar moléculas menores (SVEC, 2006). As fases monolíticas orgânicas são estáveis em ampla faixa de pH, entretanto, podem apresentar estabilidade mecânica comprometida pelo seu intumescimento na presença de solventes orgânicos. Já as fases monolíticas inorgânicas possuem alta estabilidade mecânica e são resistentes à solventes orgânicos, no entanto, seu procedimento de síntese apresenta muitas etapas e baixa reprodutibilidade. Dessa forma, as fases monolíticas de sílica híbrida destacam-se por conciliarem as vantagens das fases orgânicas e inorgânicas, ou seja, apresentam alta estabilidade química e mecânica, além de apresentarem procedimento de síntese menos oneroso e com adequada reprodutibilidade.

1.5.1. Fases monolíticas de sílica híbrida

As fases monolíticas de sílica híbrida são sintetizadas através do processo sol-gel (PSG) via reações de hidrólise e poli condensação dos precursores, as quais são

dependentes do pH reacional. À medida que estas reações ocorrem, a viscosidade da solução aumenta e o fluxo do sol (suspensão de partículas coloidais com dimensões entre 1 e 1000 nm) cessa para formar um gel (estrutura rígida de partículas coloidais que imobilizam a fase líquida nos seus interstícios) (KABIR; FURTON; MALIK, 2013)

Diversos parâmetros influenciam as reações de hidrólise e condensação e determinam as características finais do material resultante, são eles: natureza dos precursores e dos solventes, tipo de catálise, quantidade de água e de solvente e agente porogênico (YAN et al., 2004).

A primeira síntese de fase monolítica de sílica híbrida foi reportada por Hayes e Malik no ano de 2000 (HAYES; MALIK, 2000). Na síntese realizada *in situ* em capilares de sílica fundida, a adição do precursor cloreto de N-octadecilmetil[3-(trimetoxissilil)propil]amônio (C₁₈-TMS) à solução de síntese contendo o monômero inorgânico tetrametoxissilano (TMOS), conferiu a incorporação de grupos octadecil à estrutura do monolito de sílica, o que propiciou interações relevantes da fase com os analitos durante o processo cromatográfico.

Os precursores utilizados no PSG para formação das redes poliméricas podem ser de dois tipos: tetralcoxissilanos e alquiltrialcoxissilanos. O primeiro possui quatro funções alcóxido ligadas ao centro de silício, enquanto o segundo possui três funções alcóxido e um grupo funcional orgânico (Figura 6).

Figura 6. Precursores comumente utilizados no processo sol-gel

Atualmente, os precursores do tipo tetralcoxissilanos mais utilizados são o tetraetoxissilano (TEOS) e o tetrametoxissilano (TMOS) (ULRICH, 1988; SCHUBERT; HÜSING; LORENZ, 1995). Já os precursores do tipo alquitrialcoxissilanos disponíveis no mercado, possuem os mais diversos tipos de grupos orgânicos (C2, C8, C18, alil, amino, cianoetil (ZHENG et al., 2010), cianopropil (DOMINGUES; SOUZA; QUEIROZ, 2015), octil (ZHENG; LIN; FENG, 2007), tiol (XU; LEE, 2008), etc). Além dos grupos funcionais citados anteriormente, C3, fenil e vinil já foram utilizados com sucesso para colunas capilares para métodos de separação (OU et al., 2013).

As fases monolíticas de sílica híbrida apresentam uma ligação covalente entre o precursor inorgânico e o precursor orgânico, resultando em uma matriz de sílica híbrida com grupos orgânicos covalentemente incorporados.

No processo sol-gel, quando o precursor é misturado com água na presença de um co-solvente alcoólico, inicia-se a hidrólise dos precursores. Neste processo, o centro metálico do alcóxido sofre ataque nucleofílico da água (em casos de catálise ácida), ou da hidroxila (em casos de catálise básica). Como resultado desse processo, os grupos alcóxidos são substituídos por grupos hidroxilas via substituição nucleofílica bimolecular (SN_2). Na condensação, ocorre o ataque nucleofílico do grupo silanol do alcoxissilano hidrolisado ao átomo de silício do alcoxissilano produzindo álcool ou o ataque do grupo silanol ao átomo de silício de outro grupo silanol produzindo água. Reações sucessivas de condensação resultam na formação da estrutura tridimensional de sílica, em que cada centro de silício é conectado entre si por ligações do tipo siloxano (Si-OS-Si).

As reações de hidrólise e condensação podem ser catalisadas por ácido ou base e podem ocorrer em uma ou duas etapas, dependendo das propriedades dos precursores utilizados na síntese. Quando catalisadas por um ácido, a reação de hidrólise ocorre de maneira significativamente mais rápida do que a reação de condensação, favorecendo a formação de polímeros lineares. Já quando são catalisadas por uma base, a reação de condensação ocorre de maneira mais rápida do que a reação de hidrólise, favorecendo a formação de partículas uniformes.

A quantidade de água presente no meio reacional é de grande importância no processo de síntese de fases monolíticas de sílica híbrida pois atua como reagente na etapa de hidrólise, auxiliando no controle da formação de poros.

O solvente de síntese, outro parâmetro importante no PSG, tem como função solvatar as espécies em solução para evitar que a separação líquido-líquido da solução de

síntese ocorra, pois, a incorporação do precursor orgânico na estrutura monolítica de sílica depende da homogeneidade desta solução.

A permeabilidade das fases monolíticas de sílica híbrida está relacionada com a presença de poros em sua estrutura, o que por sua vez, está diretamente relacionada com a quantidade e o tipo de agente porogênico adicionados à solução de síntese. Os agentes direcionadores de estrutura, ou tensoativos, são os responsáveis pela formação de poros na estrutura monolítica, sendo CTAB e N-dodecilamina os mais comumente utilizados,

O processo sol-gel apresenta vantagens como a obtenção de materiais com elevada pureza, homogeneidade e grandes áreas superficiais. As fases monolíticas de sílica híbrida não necessitam de filtros nas extremidades, e, durante o procedimento de síntese é possível obtermos bom controle da porosidade e incorporação de diferentes grupos orgânicos à sua estrutura.

1.6. SBA-15

Um material é considerado poroso quando contém cavidades, canais ou interstícios de domínios diferentes. Os materiais porosos podem ser divididos em relação ao tamanho dos poros: (a) materiais microporosos; (b) materiais mesoporosos e (c) materiais macroporosos.

No início da década de 90, pesquisadores da companhia Mobil® anunciaram a descoberta de materiais mesoporosos, constituídos de silicatos ou aluminosilicatos, os quais foram chamados de M41S. Estes materiais foram obtidos durante um tratamento hidrotérmico que utilizou longas cadeias de surfactantes como agentes direcionadores/formadores de poros e apresentaram características específicas como diâmetro de poros bem definidos, elevada área superficial e poros ordenados. Dependendo da matéria-prima inicial e variando as condições de síntese, diferentes óxidos de sílica mesoporosa com estruturas ordenadas na forma hexagonal (MCM-41), cúbica (MCM-48) e lamelar (MCM-50) foram obtidos (BEHRENS, 1993).

Dentre essas estruturas de sílicas, a fase hexagonal (MCM-41) têm sido a mais estudada devido à facilidade de síntese quando comparada às demais (BECK et al., 1992; KRESGE et al., 1992; VARTULI et al., 1994; ZHAO et al., 1998a, 1998c). No entanto, a grande limitação da sílica MCM-41 é a sua baixa estabilidade térmica e mecânica

devido à espessura das paredes dos poros serem pequenas e à ausência de canais de microporos entre os mesoporos (WAN; ZHAO, 2007). Desta forma, a procura por sílicas mesoporosas com paredes de poros mais espessas e maior diâmetro de poros resultou na síntese de SBA_n, com destaque para a SBA-15 (Santa Barbara Amorphous).

O SBA-15, material mesoporoso à base de sílica, possui estrutura hexagonal bidimensional, poros ordenados, área superficial elevada, diâmetro e volume médio de poros elevados e grande estabilidade mecânica e hidrotérmica (ZHAO et al., 1998b, 1998c; BUI et al., 2013; JIN et al., 2013; D. FERNANDES et al., 2016). Os mesoporos são interligados por microporos e possibilitam a difusão de grandes moléculas, o que torna este material aplicável a diversas áreas como catálise e adsorção (HIYOSHI; YOGO; YASHIMA, 2005; LI; CHEN; WANG, 2008; MESA; SIERRA; GUTH, 2008; HUIRACHE-ACUÑA et al., 2013; D. FERNANDES et al., 2016).

A síntese do SBA-15 ocorre em meio ácido utilizando um surfactante direcionador de estrutura, o copolímero tribloco Pluronic ® P-123 formado por um bloco central hidrofóbico de Poli (propileno glicol)- PPO - e blocos laterais hidrofílicos de Poli (etileno glicol) – PEO -, representado por PEO₂₀PPO₇₀PEO₂₀, tetraetoxissilano (TEOS) como fonte de sílica e um álcool como co-direcionador e co-solvente.

Segundo Soller-Illia *et al.* (SOLLER-ILLIA et al., 2002), os processos de síntese do SBA-15 se iniciam com a organização das moléculas do copolímero para formar micelas esféricas. Posteriormente, as micelas se agrupam formando tubos cilíndricos. Após a adição de TEOS, observa-se a formação de diferentes camadas de silicatos ao redor da interface da micela. Posteriormente ocorre uma série de reações de condensação e polimerização das espécies de silício sobre a interface dos tubos, dando lugar à formação de uma rede inorgânica com estrutural hexagonal de íons silicato-polímero. Por último, ocorre a extração do copolímero por calcinação (Figura 7).

Figura 7. Representação da síntese de SBA-15. Adaptado da referência Hoffman *et al* (HOFFMANN et al., 2006).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Padronização e validação analítica do método HILIC-MS/MS no modo *column switching* para análise de carbidopa, levodopa, benserazida, dopamina e 3-O-metildopa em amostras de plasma de pacientes com a doença de Parkinson.

2.2. Objetivos Específicos

- Otimização das condições HILIC-MS/MS no modo *column switching* para a determinação de carbidopa, levodopa, benserazida, dopamina e 3-O-metildopa.
- Desenvolvimento e caracterização do capilar monolítico de sílica híbrida com grupos amino incorporados e com adição de SBA-15. Este capilar será utilizado como coluna 1D no sistema HILIC-MS/MS no modo *column switching*.
- Validação analítica do método HILIC-MS/MS no modo *column switching* para a determinação de carbidopa, levodopa, benserazida, dopamina e 3-O-metildopa, segundo as normas da ANVISA RDC Nº 166 de 4 de julho de 2017.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais e reagentes

Os padrões cromatográficos carbidopa, levodopa, dopamina, benserazida e o padrão interno deuterado levodopa-d3 foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, USA). 3-O-metildopa foi adquirido da Toronto Research Chemicals (North York, Canada). Tetraetoxissilano (TEOS) (98%), (3-aminopropil)triethoxissilano (APTES), brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e Poli(etileno glicol)-B-poli(propileno glicol)-B-poli(etileno glicol) (P123) foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Acetonitrila (ACN) grau HPLC, etanol, metanol, ácido fórmico e ácido clorídrico foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Glicerina foi obtida da Synth (Diadema, Brasil). A água utilizada foi purificada em sistema Milli-Q (Millipore, São Paulo, Brasil). As soluções padrões diluídas dos analitos, foram preparadas em metanol a partir da diluição das soluções estoque (1 mg mL⁻¹).

3.2. Síntese das nano partículas de mesoporos SBA-15

As nano partículas de mesoporos SBA-15 foram sintetizadas segundo o procedimento descrito por Wang et. al. (WANG et al., 2009) (Tabela 3). O procedimento otimizado de síntese consistiu na mistura de 1,8 g de polímero P123 (EO₂₀PO₇₀EO₂₀) e 1,8 g de glicerol dissolvidos em 69 g de HCl 1,0 mol L⁻¹. A mistura foi agitada a 35°C por 7 horas. Em seguida, à esta solução, foi adicionado 3,87 g de TEOS sob forte agitação. Após 5 minutos de agitação, a mistura foi mantida em condições estáticas à 35°C por 24 horas, seguida de envelhecimento à 100°C por 24 horas. O produto obtido foi coletado por filtração, lavado com água, e seco à 80°C por 12 horas seguido de posterior calcinação à 550 °C por 5 horas para remoção dos surfactantes.

Tabela 3. Otimização da síntese das nano partículas de mesoporos SBA-15

SBA-15	P123 (g)	Glicerol (g)	HCL (mol L ⁻¹)	TEOS (g)
SBA-15_A	1,8	1,8	2,5	3,87
SBA-15_B	1,8	1,8	2,0	3,87
SBA-15_C	1,8	1,8	1,0	3,87

3.3. Síntese do capilar monolítico de sílica híbrida com grupos amino incorporados e com adição de SBA-15 para análise HILIC-MS/MS no modo *column switching*

Inicialmente, o capilar de sílica fundida de 530 µm de diâmetro interno foi lavado com uma solução de HCl (0,2 mol L⁻¹) por 30 min e depois lavado com água até que o eluato apresentasse valor de pH 7,0. Em seguida o capilar foi lavado com uma solução de NaOH (1 mol L⁻¹) por 2 horas, seguido de água e metanol por mais 30 min. Por último, o capilar foi purgado com nitrogênio e seco a 160 °C por 3 horas.

A síntese do capilar monolítico de sílica híbrida com grupos amino incorporados e adição de SBA-15 foi baseado em trabalhos da literatura (WANG et al., 2009; WAN et al., 2012) com modificações e otimização das condições de síntese (Tabela 4).

Em um tubo Eppendorf ® de 2,0 mL foram adicionados 10 mg de CTAB, 3,76 mg de SBA-15_C, 20 µL de etanol e 100 µL de água. Após agitação em vortex por 30 s, banho ultrassônico por 120 s e banho de gelo por 60 s, foram adicionados ao meio reacional 56 µL de TEOS e 59 µL de APTES. A mistura foi agitada por 30 s e colocada em banho de gelo por 60 s. Com o auxílio de uma microseringa, o capilar de sílica fundida previamente-tratado foi preenchido com a mistura reacional e ambas as extremidades deste capilar foram vedadas com septos de silicone. O capilar foi mantido a 40°C por 15 horas para polimerização. Posteriormente, este capilar foi lavado com 2 mL de etanol para remoção dos surfactantes e dos subprodutos da reação. Em seguida, o capilar foi envelhecido a 60°C por 48 horas para extração do solvente.

Para a avaliação da capacidade de sorção dos capilares monolíticos de sílica híbrida com grupos amino incorporados com adição de SBA-15, o capilar monolítico sintetizado foi acoplado online como coluna na primeira dimensão (1D) no sistema HILIC-MS/MS no modo *column switching*.

Tabela 4. Otimização da síntese da fase monolítica de sílica híbrida funcionalizada com grupos amino e com adição de SBA-15

Fase monolítica	TEOS (μL)	SBA-15_A (mg)	SBA-15_B (mg)	SBA-15_C (mg)	APTES (μL)	CTAB (mg)	H ₂ O (μL)	Etanol (μL)	Tempo de reação (horas)	Temperatura (°C)
AM_1A	56	3,76	-	-	59	10	30	110	15 48	40 60
AM_1B	56	-	3,76	-	59	10	30	110	15 48	40 60
AM_1C	56	-	-	3,76	59	10	30	110	15 48	40 60
AM_2A	112	3,76	-	-	118	10	32	215	15 48	40 60
AM_2B	112	-	3,76	-	118	10	32	215	15 48	40 60
AM_2C	112	-	-	3,76	118	10	32	215	15 48	40 60
AM_3A	56	3,76	-	-	59	10	100	20	15 48	40 60
AM_3B	56	-	3,76	-	59	10	100	20	15 48	40 60
AM_3C	56	-	-	3,76	59	10	100	20	15 48	40 60
AM_4A	56	3,76	-	-	59	5	100	20	15 48	40 60
AM_4B	56	-	3,76	-	59	5	100	20	15 48	40 60
AM_4C	56	-	-	3,76	59	5	100	20	15 48	40 60

3.4. Caracterização morfológica e química da fase monolítica de sílica híbrida e das nano partículas de mesoporos SBA-15

A caracterização morfológica foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

Para as análises de Microscopia Eletrônica de Varredura, aproximadamente 0,5 cm do capilar monolítico foi cortado, recoberto com ouro por 150 s em equipamento Bal-Tec SCD050 Sputter e posteriormente analisado por MEV em aparelho Zeiss EVO 5° (Cambridge, -UK) do Departamento de Química da FFCLRP-USP, com potencial de aceleração de 20.00 kV e diferentes magnitudes entre 100 X e 30.00 kX.

As análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão (Jeol JEM – 100 CXII equipado com câmera digital Hamamatsu ORCA-HR) do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da FMRP-USP, com potencial de aceleração de 100.00 kV e diferentes magnitudes entre 20 e 200 kX.

A caracterização química foi realizada por espectroscopia vibracional na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). As análises foram realizadas em equipamento Shimadzu-IRPrestige-21- na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} utilizando pastilha de KBr onde foram coletados pontos a cada 2 cm^{-1} e 32 varreduras.

3.5. Amostras de plasma

As amostras de plasma branco de referência, com sorologia negativa para hepatite B e C, chagas, HTLV I/II TGP e sífilis, foram cedidas pelo Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP). As amostras de plasma branco de referência foram enriquecidas com os analitos para otimização e validação do método HILIC-MS/MS no modo *column switching*.

3.6. Preparo da amostra de plasma

Em um frasco de Eppendorf® de 2,0 mL contendo 200 µL de plasma foram adicionados 40 µL de padrão interno (PI) e 40 µL de metanol. As proteínas da amostra de plasma foram precipitadas com acetonitrila na proporção 2:1 (v/v). Após agitação em vortex por 1 min, o extrator foi centrifugado à 10°C por 15 min e 9.000 rpm. O sobrenadante (400µL) foi filtrado à 10°C por 30 min e 7.000 rpm em dispositivo de ultra filtração Amicon Ultra-4 (Millipore, Bedford, MA, EUA). Cinco alíquotas (10 µL) do sobrenadante foram injetadas no sistema cromatográfico.

3.7. Preparo dos calibradores

As soluções padrão estoque dos analitos e a solução do padrão interno (PI) foram preparadas, individualmente, em metanol com concentração inicial de 1 mg mL⁻¹.

Para a otimização e validação do método desenvolvido, as amostras de plasma branco de referência foram enriquecidas com as soluções padrão do PI e dos analitos, resultando em concentrações plasmáticas que contemplam o intervalo terapêutico. As soluções padrão diluídas dos analitos, utilizadas na curva analítica, foram preparadas em metanol a partir da diluição das soluções estoque (1 mg mL⁻¹).

3.8. Análise HILIC-MS/MS no modo *column switching*

3.8.1. Configuração do método HILIC-MS/MS no modo *column switching*

O sistema cromatográfico Waters® UHPLC-MS/MS bidimensional (Waters Corporation, Milford, MA, USA) foi utilizado no desenvolvimento do método HILIC-MS/MS no modo *column switching*. A separação cromatográfica dos analitos foi realizada por cromatografia líquida com interação hidrofílica e eluição no modo gradiente. Dentre as diversas fases móveis avaliadas, a fase móvel que resultou em maior

detectabilidade (sinal analítico) e menor tempo de análise foi: (A) água+0,1% ácido fórmico e (B) acetonitrila, na vazão de 0,3 mL min⁻¹. Ao avaliar o modo isocrático e gradiente, foi obtido melhores resolução dos picos no modo gradiente (20%A e 80% no tempo inicial e finalizando com 50%A e 50%B). Para a determinação quantitativa UHPLC-MS/MS foi utilizada padronização interna, empregando padrão isotópico (levodopa d3).

A configuração final do sistema HILIC-MS/MS no modo *column switching* foi estabelecida da seguinte maneira: a coluna monolítica de sílica híbrida com grupos amino incorporados e adição de SBA-15 (1D) e a coluna analítica Acquity UPLC BEH Amida (2D) foram conectadas na válvula de injeção de 6 canais do equipamento. A coluna monolítica foi conectada nos canais 1 e 4 da válvula, a bomba quaternária (QSM) no canal 2, a bomba binária (BSM) no canal 5 e a entrada da coluna analítica no canal 6. A bomba quaternária (QSM) foi conectada à coluna monolítica (1D) e a bomba binária (BSM) foi conectada à coluna analítica (2D).

Com a válvula na Posição 1, ambas as colunas (1D e 2D) são condicionadas com a composição inicial de fase móvel. Em seguida, cinco alíquotas de 10 µL de amostra foram injetados e a fase móvel composta por 100% de acetonitrila foi percolada pela coluna monolítica com vazão 0,100 mL min⁻¹, para a sorção dos analitos e remoção dos compostos interferentes da matriz biológica.

Após 2,0 minutos a válvula do injetor é mudada para a Posição 2. Neste arranjo, a fase móvel composta por água + 0,1% de ácido fórmico:acetonitrila (20:80 v/v) foi percolada pela coluna monolítica (1D) com vazão de 0,100 mL min⁻¹ para eluição dos analitos para a coluna 2D.

No tempo de 3,5 min, a válvula do injetor retorna à Posição 1. No período de 3,51 a 7,5 min foi realizada a separação cromatográfica dos analitos na coluna analítica (2D) ao mesmo tempo que ocorre o início da limpeza e condicionamento da coluna monolítica (1D). Após este período, a composição da fase móvel retorna à composição inicial para recondicionamento da coluna analítica (2D) para injeção da próxima amostra.

Diferentes tempos de acoplamento/desacoplamento e condições de sorção/dessorção foram avaliados até obtenção das condições ótimas descritas anteriormente.

As composições das fases móveis utilizadas na QSM (coluna 1D) e na BSM (coluna 2D), são ilustradas na Tabela 5.

Tabela 5. Condições UHPLC-MS/MS no modo *column switching*

t (min)	Bomba	Vazão (mL min ⁻¹)	%A	%B	Posição da válvula	Observações
0,00	BSM	0,300	20	80	1	Condicionamento da coluna analítica (2D)
	QSM	0,100	0	100	1	Pré concentração dos fármacos (1D)
2,0	BSM	0,100	20	80	2	Eluição dos fármacos da coluna monolítica (1D) para a coluna analítica (2D)
	QSM	0,100	100	0		Fluxo direcionado para o descarte
3,5	BSM	0,300	20	80	1	Início da separação cromatográfica na coluna analítica (2D)
	QSM	0,100	100	0		Início da limpeza da coluna monolítica (1D)
7,5	BSM	0,300	50	50	1	Fim da separação cromatográfica na coluna analítica (2D) e início do condicionamento
	QSM	0,100	100	0		Limpeza da coluna monolítica (1D)
12,5	BSM	0,100	20	80	1	Recondicionamento da coluna analítica (2D) para injeção seguinte
	QSM	0,100	0	100		Fim da limpeza e início do recondicionamento da coluna monolítica (1D)
14,5	BSM	0,100	20	80	1	Final da corrida
	QSM	0,100	0	100		

QSM: Bomba Quaternária; BSM: Bomba Binária; A: água + 0,1% de ácido fórmico; B: acetonitrila

3.8.2. Condições MS/MS

As análises MS/MS foram realizadas em sistema de espectrometria de massas em tandem – triplo quadrupolo Xevo® TQ-D (Waters, Milford, MA, USA), equipado com fonte de ionização por electrospray (ESI) operando em modo positivo. A otimização da detecção MS/MS foi feita através de infusão direta de soluções-padrão dos analitos preparados na fase móvel.

As análises foram realizadas no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM), em razão da alta seletividade e detectabilidade. As transições específicas utilizadas para cada analito estão apresentadas na Tabela 6. A primeira transição foi utilizada para fins quantitativos e a segunda transição foi utilizada para confirmação dos respectivos analitos.

Tabela 6. Transições MS/MS (MRM), voltagem do cone (DP), energia de colisão (CE) e o tempo de retenção (t_R) dos analitos

Analito	Íon precursor (m/z)	Íon de quantificação (m/z)	Íon de confirmação (m/z)	DP (V)	CE (V)	t_R (min)
Benserazida	257,8	119,8	103,1	15	15	6,63
3-O-Metildopa	211,9	152,8	92,8	25	15	5,41
Dopamina	154,0	90,8	118,8	20	20	5,22
Carbidopa	227,1	70,8	122,8	26	15	5,74
Levodopa	197,8	106,7	138,8	23	15	5,96
Levodopa-D3 (PI)	201,0	108,5	140,9	23	15	5,96-

O sistema MS/MS foi operado nas seguintes condições: voltagem do capilar: 3.20 Kv; temperatura da fonte de ionização: 500°C; fluxo do gás de cone: 150 L.h⁻¹ (N₂, pureza de 99,9%); gás de dessolvatação: N₂ a 400°C e 1000 L.h⁻¹; gás de colisão: argônio (pureza de 99,9999%) .O *Dwell time* foi de 0,015. Os dados foram adquiridos utilizando o software MassLynx V4.1.

3.8.3. Otimização das condições HILIC-MS/MS no modo *column switching*

Para a otimização das variáveis do *column switching*, a amostra de plasma branco de referência foi enriquecida com 40 μL da solução padrão dos analitos ($2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), resultando na concentração final de 500 ng mL^{-1} . Em seguida, as proteínas da amostra de plasma foram precipitadas com acetonitrila.

Diferentes volumes de amostra biológica (100, 200 e 300 μL), diferentes volumes de injeção de amostra (10, 30 e 50 μL) no sistema cromatográfico e diferentes comprimentos da coluna monolítica (6 e 10 cm) foram avaliados.

Os modos *foreflush* (pré-concentração e eluição dos analitos acontecem no mesmo sentido) e *backflush* (pré-concentração e eluição dos analitos ocorrem em fluxo inverso) também foram avaliados.

A infusão pós coluna de uma solução de acetonitrila contendo 3% de ácido fórmico (v/v) nas vazões de 10 e 20 $\mu\text{L min}^{-1}$ também foi avaliada com o intuito de aumentar a detectabilidade do método. Neste caso, a solução infundida diretamente no espectrômetro de massas é diluída na fase móvel contendo os analitos antes de ser direcionada para a ionização (ESI).

Dentre as variáveis otimizadas, o procedimento a seguir apresentou maior sinal analítico. Inicialmente, 200 μL de amostra de plasma foram precipitadas com 400 μL acetonitrila, agitadas em vortex por 1 min e centrifugadas à 10°C por 15 min e 9.000 rpm. O sobrenadante (400 μL) foi filtrado à 10°C por 30 min e 7.000 rpm em dispositivo de ultra filtração Amicon Ultra-4. Cinco alíquotas de 10 μL foram injetadas no sistema cromatográfico. A eluição no modo *backflush* utilizando um capilar monolítico de 6 cm na primeira dimensão e a infusão pós-coluna de uma solução de acetonitrila contendo 3% de ácido fórmico ($10 \mu\text{L min}^{-1}$) favoreceram a detectabilidade do método.

3.9. Validação analítica

A validação analítica do método HILIC-MS/MS no modo *column switching* foi realizada em amostras de plasma branco de referência enriquecidas com os analitos, segundo normas descritas pela ANVISA (RESOLUÇÃO RDC Nº 166, DE 4 DE JULHO DE 2017)(“Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA”, 2017). Os parâmetros

de validação analítica (linearidade, exatidão, precisão inter e intraensaio, limite de quantificação, efeito residual e efeito de matriz) foram avaliados.

As curvas analíticas, sendo uma para cada analito, foram plotadas em diferentes intervalos de concentração de LIQ - 2,0 ug mL⁻¹ para todos os analitos. Tais curvas foram geradas em quintuplicata plotando a razão entre as áreas (analito/PI) em função da concentração plasmática de cada analito.

As curvas analíticas foram aprovadas para as análises quantitativas quando o coeficiente de variação (CV), equação 1, do calibrador correspondente à concentração nominal no limite inferior de quantificação (LIQ) apresentou valor menor ou iguais a 20% e quando o CV foi menor que 15% em relação à concentração nominal para os outros calibradores, incluindo o limite superior de quantificação (LSQ).

$$CV = \left[\frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Concentração média experimental}} \right] \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

A precisão foi determinada em ensaios conduzidos no mesmo dia (precisão intraensaio) e em ensaios conduzidos em três dias consecutivos (precisão interensaio). Cada experimento foi realizado em quintuplicata em cinco concentrações diferentes. A ANVISA preconiza que os valores de CV não devem exceder em 15% para os controles de qualidade, exceto para o LIQ que não deve exceder em 20%.

A exatidão foi determinada em ensaios conduzidos no mesmo dia (exatidão intraensaio) e em ensaios conduzidos em três dias consecutivos (exatidão interensaio). A exatidão, expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR), equação 2, foi avaliada em quintuplicata em cinco concentrações diferentes, sendo que não foram admitidos valores superiores a 15% do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual não se admitiu valores superiores a 20% do valor nominal.

$$EPR = \left[\frac{\text{Conc. média experimental} - \text{Valor nominal}}{\text{Valor nominal}} \right] \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

A avaliação do efeito residual foi feita com três injeções da mesma amostra branco de referência, sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma ou mais amostras processadas no LSQ. Segundo as normas da ANVISA, os picos interferentes, nos tempos

de retenção dos analitos, devem possuir valores de área inferiores a 20% das áreas correspondentes ao LIQ e inferior a 5% das áreas apresentadas pelo PI.

O efeito matriz foi avaliado pelo método de infusão pós-coluna. Nessa análise, foi introduzido, via UHPLC-MS/MS no modo *column switching*, a amostra de plasma após processamento e, ao mesmo tempo, via infusão direta, foram introduzidas as soluções padrão dos analitos preparadas em fase móvel. No cromatograma obtido, é possível avaliar a influência dos interferentes da matriz no tempo de retenção dos analitos (SOUVERAIN; RUDAZ; VEUTHEY, 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. SBA-15

Materiais mesoporos como o SBA-15 têm sido bastante empregados em diversas áreas como catálise, adsorção e troca iônica pois possuem grande estabilidade mecânica e hidrotérmica, alto diâmetro de poros e estrutura hexagonal e bidirecional (TANG et al., 2011; SELVAKANNAN et al., 2013).

Uma rota alternativa à síntese sol-gel clássica seria a obtenção de materiais mesoporosos estruturalmente ordenados, que envolve o uso de surfactantes ou copolímeros bloco, que servem como direcionadores de estrutura, cujo tamanho e concentração controlam as dimensões estruturais do material final (SOLER-ILLIA; AZZARONI, 2011). Atualmente, a combinação do processo sol-gel como a auto-organização cooperativa é um dos métodos mais simples para desenvolver materiais nanoestruturados complexos, mas bem definidos, com propriedades inovadoras (YANG; LU; YANG, 2009).

A síntese desses materiais ocorre em meio fortemente ácido, utilizando o copolímero tribloco P123 como direcionador de estrutura, tetraetoxissilano (TEOS) como fonte de sílica e glicerol como co-solvente auxiliando no crescimento da SBA-15 (WANG et al., 2009). Como desvantagem desta síntese podemos citar que o tempo gasto na síntese geralmente ultrapassa 48 horas (ZHAO et al., 1998a, 1998c).

Os mecanismos de formação de sílica mesoporosa mais aceitos atualmente são: (1) auto-organização cooperativa (*cooperative self-assembly*) e (2) direcionamento por cristal líquido (LCT- *Liquid Crystal Template*). De acordo com o primeiro mecanismo, inicialmente ocorre a formação de micelas, seguido de retenção de silicatos às micelas, associação das micelas polimerizadas, precipitação e extração do surfactante (WAN; ZHAO, 2007). Já no segundo mecanismo, o surfactante está presente no meio reacional antes do início da síntese na forma de um fluido complexo organizado (WAN; ZHAO, 2007). No caso do SBA-15, devido à baixa concentração do surfactante na mistura de síntese, o primeiro mecanismo é o mais aceito.

A formação da sílica mesoporosa é conduzida pelo processo sol-gel e pode ocorrer através de rota básica ou ácida. Inicialmente, micelas são formadas após o copolímero

tribloco P123 ser dissolvido em HCl na presença de glicerol. Quando a fonte de sílica (TEOS) é adicionada, ocorre a hidrólise formando um sol de monômeros de sílica. As interações entre os monômeros e as micelas resultam na formação de um gel que gera o óxido de silício mesoporoso. Ao final, o surfactante é removido por calcinação, obtendo-se então a sílica mesoporosa.

Sob diferentes condições de acidez, o mecanismo de crescimento das partículas é alterado resultando em partículas com diferentes tamanhos e comprimentos. O processo de formação do SBA-15 em condições menos ácidas ($2,5 \text{ mol L}^{-1}$) levou à formação de partículas com formato hexagonal e comprimento curto, enquanto que as partículas obtidas em condições mais ácidas (1 mol L^{-1}), apresentaram morfologia semelhantes à de hastes longas (WANG et al., 2009).

4.2. Fase monolítica de sílica híbrida com grupos amino incorporados

As sínteses das fases monolíticas de sílica híbrida contendo grupos amino e incorporados e com adição de SBA-15 basearam-se no processo sol-gel (PSG), o qual envolve reações de hidrólise e condensação dos precursores.

Quando são colocados em água na presença de um co-solvente alcoólico, os precursores sofrem reações de hidrólise, consequentemente os íons hidroxilas ligam-se ao átomo metálico substituindo os grupos alcóxidos. Em seguida, ocorrem reações de condensação, onde duas moléculas hidrolisadas se unem formando a ligação siloxano e gerando moléculas de água ou álcool. Sucessivas reações de condensação dão origem à estrutura tridimensional de sílica, onde cada centro de silício é conectado entre si através de ligações do tipo siloxano (Si-O-Si) (BRINKER; SCHERER, 1990) (Figura 8)

Dependendo da natureza da superfície de suporte em que a síntese é realizada, ligações covalentes podem ser estabelecidas entre a estrutura do monolito e a superfície de suporte. Dessa maneira, a síntese realizada neste trabalho, bem como a de outros trabalhos reportados na literatura (WU et al., 2011; ZHU; ROW, 2012; OU et al., 2015) ocorre *in-situ*, ou seja, os grupos silanóis presentes na superfície do capilar de sílica previamente ativado, podem ser incorporados nas reações de poli condensação, ancorando assim o material sintetizado nas paredes do capilar de sílica fundida.

Figura 8. Reações de hidrólise e condensação que ocorrem no processo sol-gel

A otimização da síntese das fases monolíticas de sílica híbrida com grupos amino incorporados iniciou-se pela escolha do solvente, o qual deve ser capaz de solvatar e solubilizar os reagentes de partida favorecendo a formação de uma solução homogênea para que as reações de hidrólise e condensação dos precursores ocorram uniformemente em toda a extensão da solução de síntese, além de garantir que o precursor orgânico contendo o grupo funcional seja uniformemente incorporado à estrutura do monolito evitando regiões de saturação. Nesse contexto, os álcoois (solventes próticos) são considerados uma boa opção, pois apresentam boa capacidade de estabelecer ligações de hidrogênio com os grupos alcóxidos dos precursores utilizados no processo sol-gel, evitando assim a separação líquido-líquido da solução de síntese durante o estágio primário da etapa de hidrólise. Assim como reportado nos trabalhos publicados na literatura (YAN et al., 2004; WAN et al., 2012; DE SOUZA; DOMINGUES; QUEIROZ, 2015), o etanol foi selecionado como solvente de síntese pois possui alto poder de solvatação dos precursores utilizados na síntese das fases monolíticas de sílica híbrida (ARTAKI; ZERDA; JONAS, 1986).

O segundo parâmetro avaliado foi a otimização da proporção dos reagentes de partida. Materiais monolíticos de sílica híbrida são geralmente produzidos pela mistura de dois precursores: tetralcoxissilano (inorgânico) e alquiltrialcoxissilano (orgânico). As soluções de síntese foram preparadas utilizando uma mistura de tetraetoxissilano (TEOS) e (3-aminopropil)triethoxissilano (APTES) na proporção molar estequiométrica

de 1:1 (DE SOUZA; DOMINGUES; QUEIROZ, 2015), que resultou em monolitos mais resistentes mecanicamente em termos de permeação de solvente e resistência mecânica (YAN et al., 2004; DE SOUZA, 2015).

No que se refere ao tipo de catálise, reações do tipo sol-gel podem ser catalisadas por ácido ou base e podem acontecer em uma ou mais etapas. Considerando os reagentes utilizados na síntese, a reação sol-gel descrita neste trabalho acontece em uma etapa única devido às características físico-químicas do precursor orgânico (APTES), e, é auto catalisada pelo grupos aminos provenientes do próprio monômero orgânico, processo similar ao que acontece nas reações catalisadas por bases (YAN et al., 2004; DA FONSECA et al., 2013). Na catálise de etapa única, como a que ocorre neste trabalho, os próprios monômeros são suficientes para alcalinizar o meio reacional, não sendo necessária a adição de catalisador.

A permeabilidade da fase monolítica também é uma característica importante a ser considerada durante o processo de extração visto que as etapas envolvidas neste processo são realizadas em pressões limitadas. No caso de fases monolíticas, esta permeabilidade está relacionada com a presença de poros na sua estrutura, que por sua vez está relacionada com a quantidade e o tipo de agente porogênico adicionados à solução de síntese. Quanto maior a porcentagem de agentes porogênicos na mistura de polimerização, maior a porosidade e permeabilidade da fase monolítica. Assim, a formação de mesoporos é o resultado do balanço entre a organização das moléculas do agente porogênico (CTAB) e a poli condensação dos precursores hidrolisados (TEOS e APTES) (SOLER-ILLIA et al., 2002), além disso, a presença de mesoporos também é importante para garantir interações adequadas entre os grupos orgânicos presentes na superfície da fase extratora e os analitos. Dessa forma, observou-se que os capilares AM_4, os quais utilizaram 5 mg de CTAB, apresentaram maior pressão quando conectado ao sistema analítico.

O brometo de cetrimônio (CTAB), utilizado como agente porogênio e tensoativo, estabelece interações eletrostáticas fracas com os precursores orgânico-inorgânico quando em condições básicas, e por isso a etapa de lavagem do capilar com etanol é necessária para remoção do tensoativo presente nos mesoporos e também para remoção dos resíduos de síntese e o excesso dos monômeros que não foram incorporados à rede de sílica (DE SOUZA, 2015).

Além do tensoativo, a quantidade de água adicionado no meio reacional é outro fator que auxilia no controle da formação de poros, além de determinar também, o

equilíbrio entre as reações de hidrólise e condensação e consequentemente, influenciar na transição sol-gel e no processo de separação de fases (YAN et al., 2006). Assim, pode-se observar que os capilares AM_3, os quais apresentavam maior quantidade de água e agente porogênico no procedimento de síntese, apresentou melhor capacidade de sorção quando comparado com o capilar AM_1.

4.3. Fase monolítica de sílica híbrida com grupos amino incorporados e adição de SBA-15

A hifenação de monolitos híbridos e nano partículas pode combinar as vantagens destes dois materiais e aperfeiçoar a sorção dos analitos (WAN et al., 2012). A funcionalização da superfície dos poros da fase monolítica com nano partículas poliméricas é a mais nova contribuição que leva a formação de monolitos com propriedades químicas específicas (XU et al., 2010b).

A dispersão das partículas mesoporosas na matriz monolítica pode afetar a estrutura dos poros e a eficiência de separação. Por isso, durante a etapa de síntese é de grande importância a distribuição homogênea das nano partículas na mistura reacional de forma a promover a formação de uma fase extratora uniforme no interior do capilar de sílica fundida. As capacidades de sorção das fases monolíticas de sílica híbrida com grupos amino incorporados e adição de 3,76mg de SBA-15 em diferentes concentrações de HCl foram avaliadas (Figura 9).

As fases monolíticas sintetizadas utilizando SBA-15_A ($\text{HCl} = 2,5 \text{ mol L}^{-1}$) e SBA-15_B ($\text{HCl} = 2,0 \text{ mol L}^{-1}$) não apresentam sorção para benserazida e dopamina, respectivamente. As fases monolíticas sintetizadas utilizando SBA-15_C ($\text{HCl} = 1,0 \text{ mol L}^{-1}$), denominadas AM_2C e AM_4C, não apresentaram sorção para a benserazida e dopamina enquanto que a fase AM_1C não apresentou sorção para a benserazida e levodopa. Já a fase AM_3C apresentou a sorção adequada para todos os analitos e elevada sorção para a dopamina. Dessa forma, a fase monolítica que apresentou melhor desempenho e foi escolhida para dar prosseguimento ao trabalho foi a fase denominada AM_3C. Etapas seguintes consistiram na caracterização química e morfológica e validação analítica.

Figura 9. Capacidade de sorção das diferentes fases monolíticas de sílica híbrida com grupos amino incorporados e adição de SBA-15 em diferentes condições ácidas: (a) 2,5 mol L⁻¹, (b) 2,0 mol L⁻¹, (c) 1,0 mol L⁻¹ e (d) ampliação da imagem (c).

4.4. Caracterização química e morfológica

O SBA-15 fora caracterizado morfolologicamente através da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura.

A fase monolítica sintetizada com grupos amino incorporados e com adição de SBA-15, denominado AM_3C, foi caracterizada pelas técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura, Microscopia Eletrônica de Transmissão e Espectroscopia vibracional no infravermelho por transformada de Fourier.

4.4.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As nano partículas de mesoporos SBA-15 foram caracterizadas através da análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), com o objetivo de observar as diferentes morfologias das partículas sintetizadas em diferentes condições ácidas (Figura 10). As imagens MEV da SBA-15_A ($\text{HCl} = 2,5 \text{ mol L}^{-1}$) mostram partículas pequenas (aproximadamente $0,7 \mu\text{m}$ de diâmetro) com morfologia uniforme (Figura 10a). A ampliação (Figura 10a₂) mostram que cada partícula pequena é uma plaqueta hexagonal de comprimento curto na direção longitudinal. Quando a concentração de HCl foi reduzida para $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 10b), as partículas SBA-15_B obtidas mostraram morfologia semelhante à de hastes curtas com comprimento médio de $0,8 \mu\text{m}$ e largura de $0,4 \mu\text{m}$. Já quando a concentração de HCl foi reduzida para $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 10c), as partículas SBA-15_C obtidas mostraram morfologia semelhantes à de hastes longas com comprimento médio de $1,0 \mu\text{m}$.

A caracterização das nano partículas de SBA-15 sintetizadas em diferentes condições ácidas mostram-se de acordo com o reportado por Wang et al. (WANG et al., 2009).

Figura 10. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). (a₁) SBA-15_A (Mag = 10.00 kX); (a₂) SBA-15_A (Mag = 30.00 kX); (b₁) SBA-15_B (Mag = 10.00 kX); (b₂) SBA-15_B (Mag = 30.00 kX); (c₁) SBA-15_C (Mag = 10.00 kX); (c₂) SBA-15_C (Mag = 30.00 kX);

O pré-tratamento do capilar de sílica fundida é uma etapa importante a ser realizada, a fim de aumentar a concentração de grupos silanóis na superfície interior do capilar, uma vez que estes grupos são sítios ativos durante a síntese pelo processo sol-gel (LI; FRIES; MALIK, 2004). A Figura 11 ilustra as imagens MEV da seção transversal da síntese otimizada do capilar monolítico com grupos amino incorporados sem e com adição de SBA-15 com ampliação entre 100 X a 5,00 kX. É possível perceber que em ambas as condições (com e sem adição de nano partículas) ocorreu a polimerização *in-*

situ, ou seja, a estrutura do monolito permaneceu confinada no interior do capilar, quimicamente ligada à superfície interna do capilar de sílica fundida por meio de ligações siloxano. Os monolitos sintetizados apresentaram estrutura homogênea e com partículas conectadas entre si formando uma rede contínua. No entanto, as imagens MEV mostram a diferença morfológica das partículas obtidas com e sem adição de nano partículas. Enquanto a síntese sem adição de nano partículas resultou em partículas mais esféricas e aglomeradas, a síntese com adição de nano partículas resultou em partículas com morfologia mais ordenada estruturalmente.

Figura 11. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da seção transversal da fase monolítica de sílica híbrida com grupos amino e adição de SBA-15. (a₁) fase monolítica sem adição de nano partículas SBA-15 (Mag = 200 X); (a₂) fase monolítica sem adição de nano partículas SBA-15 (Mag = 5.00 kX); (b₁) fase monolítica com adição de nano partículas SBA-15 (Mag = 100 X); (b₂) fase monolítica com adição de nano partículas SBA-15 (Mag = 5.00 kX)

4.4.2. Análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foi utilizada para obter informações complementares sobre as características morfológicas da fase monolítica sintetizada. A Figura 12 mostra as imagens MET da seção transversal da síntese otimizada do capilar monolítico com grupos amino e adição de SBA-15, denominado AM_3C, com ampliação entre 20 kX e 200 kX.

As imagens MET evidenciam o caráter poroso do material sintetizado e a estrutura altamente organizada. A homogeneidade da formação dos canais na amostra significa que as condições de síntese foram aplicadas uniformemente durante o processo. Os canais unidirecionais são formados longitudinalmente com a direção de maior comprimento da partícula, evidenciando seu comprimento longo.

É importante ressaltar que apenas os mesoporos podem ser visualizados nas imagens MET, uma vez que os microporos estão no interior do material, conectando os canais.

Figura 12. Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) da fase monolítica de sílica híbrida com grupos amino e com adição de SBA-15. (a₁) Mag = 20 kX; (a₂) Mag = 50 kX; (a₃) Mag = 50 kX; (a₄) Mag = 100 kX; (a₅) Mag = 100 kX; (a₆) Mag = 200 kX;

4.4.3. Espectroscopia vibracional no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A fase monolítica de sílica híbrida com grupos amino incorporados e adição de SBA-15 foi analisada por espectroscopia vibracional na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) com o objetivo de verificar a incorporação dos monômeros funcionais à estrutura do monolito (Figura 13).

Figura 13. Espectro de infravermelho da fase monolítica contendo grupos amino incorporados e adição de SBA-15

As bandas localizadas em 800 e 1.100 cm^{-1} são atribuídas, respectivamente, aos estiramentos simétrico e assimétrico da ligação siloxano (Si-O-Si) da rede de sílica (INNOCENZI, 2003; MATKÓ et al., 2005). A banda que aparece na região de 3.200 cm^{-1} é referente aos modos normais de vibração, mais especificamente aos movimentos de estiramento O-H (VAN ROOSMALEN; MOL, 1979). A banda de baixa intensidade que aparece em 1650 cm^{-1} evidencia a presença de água adsorvida sobre o material, atribuída às vibrações de deformação da molécula de água (INNOCENZI, 2003). A banda que aparece em 960 cm^{-1} está associada a estiramento dos grupos silanóis livres na superfície

da sílica (INNOCENZI, 2003). Na região de 2.960 cm^{-1} são observadas bandas de estiramento $\text{-CH}_2\text{-}$ provenientes da porção alifática do precursor híbrido (MATKÓ et al., 2005; AL-OWEINI; EL-RASSY, 2009). Esses mesmo grupos também são responsáveis pelas bandas de deformação que aparecem em 1.341 cm^{-1} (MATKÓ et al., 2005; AL-OWEINI; EL-RASSY, 2009). A banda referente ao estiramento da amina, que geralmente aparece em 3.300 cm^{-1} pôde ser observada neste espectro (PASTERNAK; RIVILLON AMY; CHABAL, 2008). Na banda atribuída à deformação das moléculas de água em 1.650 cm^{-1} é possível perceber a presença de dois ombros: um em aproximadamente em 1.570 cm^{-1} e outro em 1.610 cm^{-1} , que provavelmente correspondem aos movimentos de deformação do grupo NH_2 (CHIANG; ISHIDA; KOENIG, 1980; PASTERNAK; RIVILLON AMY; CHABAL, 2008). Essas duas bandas, embora não sejam conclusivas, são potencias evidências da presença do grupo amino na estrutura da fase monolítica de sílica híbrida.

4.5. Otimização das condições HILIC-MS/MS

As condições cromatográficas foram otimizadas para a obtenção de uma resolução adequada, picos simétricos e análise em curto espaço de tempo. Duas colunas analíticas foram avaliadas para a separação dos analitos: ACQUITY UPLC BEH Amida ($1,7\text{ }\mu\text{m}$, $100\text{ mm} \times 2,1\text{ mm}$) e HYPERSIL GOLD HILIC (sílica) – Thermo Scientific ($1,9\text{ }\mu\text{m}$, $100\text{ mm} \times 2,1\text{ mm}$). Diferentes composições de fase móvel, no modo isocrático e no modo gradiente também foram avaliadas.

A maioria dos analitos não apresentou retenção satisfatória na coluna e HYPERSIL GOLD HILIC, os quais foram eluídos próximos ao volume morto da coluna. A melhor resolução cromatográfica e maior retenção foi obtida utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH Amida ($1,7\text{ }\mu\text{m}$, $100\text{ mm} \times 2,1\text{ mm}$) mantida a temperatura de 35°C . A fase móvel que apresentou separação cromatográfica mais satisfatória é constituída por água +0,1% ácido fórmico: acetonitrila na proporção inicial de 20:80 v/v e modo de eluição por gradiente.

Grupos polares como amida podem ser quimicamente ligados à estrutura da fase estacionária, sendo inseridos na cadeia alquila (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010). Uma fase estacionária com grupo amida quimicamente ligado à sua estrutura é

capaz de estabelecer ligação de hidrogênio deixando a fase estacionária com um caráter mais “básico”. As fases estacionárias HILIC contendo grupos polares são compatíveis com o uso de FM com altas porcentagens de solvente aquoso (podendo chegar até 100% de água) sem que ocorra o colapso da fase estacionária, ou seja, sem a perda da sustentação das cadeias da fase ligada. Isso ocorre porque esse tipo de fase estacionária possui maior solvatação da sua superfície, proveniente das interações, por ligação de hidrogênio. Esta característica é importante na retenção de compostos polares e promove uma melhora no desempenho cromatográfico (retenção reprodutível e estável) e um rápido reequilíbrio da fase estacionária após a eluição por gradiente (KIRKLAND, 2004; SILVA et al., 2004; SNYDER; DOLAN; CARR, 2004; RIMMER; SANDER, 2009).

Os solventes orgânicos normalmente utilizados em Cromatografia Líquida de Fase Reversa (RPLC) como metanol e acetonitrila, também têm sido utilizados em HILIC. Embora estes dois solventes apresentem retenções semelhantes, a acetonitrila, solvente orgânico aprótico, é mais utilizada em aplicações envolvendo HILIC (BERNAL et al., 2011). Além disso, em HILIC a porção aquosa na fase móvel atua como solvente forte, de forma oposta ao que ocorre na cromatografia líquida em fase reversa (HEMSTRÖM; IRGUM, 2006).

A HILIC apresenta vantagens, quando comparada à Cromatografia Líquida em Fase Normal (NPLC) e Cromatografia Líquida em Fase Reversa (RPLC). Por exemplo, analisa adequadamente substâncias polares em amostras complexas que geralmente, eluem próximo ao volume morto em colunas de fase reversa. Os analitos polares apresentam alta solubilidade na porção aquosa da fase móvel usada em HILIC, superando os problemas de fraca solubilidade nas fases móveis da NPLC (HEMSTRÖM; IRGUM, 2006).

4.6. Otimização das condições HILIC-MS/MS no modo *column switching*

- ***Volume de injeção***

O volume de injeção no sistema UHPLC-MS/MS foi o primeiro parâmetro otimizado (Figura 14). Diferentes volumes de injeção foram avaliados (10, 30 e 50 µL). Observou-se que o aumento no volume de injeção da amostra levou à maiores áreas.

Dessa forma, o volume de injeção de 50 μL de amostra foi selecionada para dar prosseguimento ao trabalho.

Figura 14. Avaliação de diferentes volumes de injeção no sistema UHPLC-MS/MS

- ***Volume de amostra***

O volume de amostra biológica utilizada foi o segundo parâmetro otimizado (Figura 15). Diferentes volumes de amostra (100, 200 e 300 μL) foram avaliados. Observou-se que: (a) quando 100 μL de plasma foram utilizados, não houve resposta analítica para a benserazida. (b) a resposta analítica aumentou para todos os outros analitos, quando utilizado 200 μL de amostra em vez de 100 μL ; (c) o aumento da área com o aumento do volume de amostra utilizada não foi observado quando o volume de amostra é aumentado para 300 μL (com exceção da levodopa). Dessa forma, o volume de amostra escolhido para dar prosseguimento ao trabalho foi de 200 μL .

Figura 15. Avaliação de diferentes volumes de amostra biológica

- *Vazão da solução de infusão pós coluna*

A infusão pós coluna de uma solução de acetonitrila contendo 3% de ácido fórmico (v/v) nas vazões de 10 e 20 $\mu\text{L min}^{-1}$ também foi avaliada com o intuito de aumentar a detectabilidade do método (Figura 16). Observou-se que o aumento no volume de infusão pós coluna de 10 $\mu\text{L min}^{-1}$ para 20 $\mu\text{L min}^{-1}$ não resultou em aumento da resposta analítica. Dessa forma, optou-se por trabalhar com a vazão de 10 $\mu\text{L min}^{-1}$ da solução infusão pós coluna de acetonitrila contendo 3% de ácido fórmico.

Figura 16. Avaliação de diferentes vazões da solução de infusão pós coluna

- ***Comprimento da coluna capilar***

O quarto e último parâmetro avaliado foi o comprimento (cm) da coluna capilar monolítica sintetizada (Figura 17). O aumento no comprimento da coluna capilar monolítica de 6cm para 10 cm não resultou em maior resposta analítica para nenhum dos analitos. Dessa forma, o comprimento da coluna capilar monolítica ficou estabelecida em 6 cm.

Figura 17. Avaliação de diferentes comprimentos (cm) da coluna capilar monolítica

- ***Pré-concentração dos analitos***

Os modos *foreflush* e *backflush*, foram avaliados para a pré-concentração dos analitos. No modo *backflush*, os analitos foram eluídos mais rapidamente, gerando menor dispersão, e o pico é mais estreito e simétrico. Já no modo *foreflush*, os analitos foram eluídos com maior tempo de retenção e o pico gerado é alargado, mostrando a dispersão. Dessa forma, o modo *backflush*, foi selecionado. O resultado observado está de acordo com o que era esperado pois os analitos possuem caráter polar assim como os grupos funcionais (amino) incorporados à estrutura da fase monolítica de sílica híbrida. Logo, o analito apresenta maior afinidade com a fase extratora, ficando retido logo no início. Portanto, se o fluxo é invertido, o analito é eluído em menor tempo de retenção e com menor dispersão. Além disso, o modo *backflush* também remove os interferentes fortemente ligados à fase extratora (1D) após a eluição da fração de interesse. O modo

backflush apresenta vantagens como: menor tempo de análise cromatográfica, preservação da coluna 1D, menor uso de reagentes e a coluna 2D é protegida da contaminação dos componentes interferentes da matriz que são eluídos após a dessorção dos analitos (SADÍLEK; ŠATÍNSKÝ; SOLICH, 2007).

A Figura 18 representa o cromatograma de íons totais (TIC) da solução padrão dos analitos (500 ng mL^{-1}) na condição otimizada de extração. Nessa condição, as proteínas da amostra de plasma ($200 \text{ }\mu\text{L}$) foram precipitadas com acetonitrila ($400 \text{ }\mu\text{L}$), seguido de agitação em vortex por 1 min e centrifugação à 10°C por 15 min e 9.000 rpm. O sobrenadante ($400 \text{ }\mu\text{L}$) foi filtrado à 10°C por 30 min e 7.000 rpm em dispositivo de ultra filtração Amicon Ultra-4. Uma alíquota de $50 \text{ }\mu\text{L}$ foi injetada no sistema cromatográfico. A eluição no modo *backflush* utilizando um capilar monolítico de 6 cm na primeira dimensão e solução de infusão pós-coluna de uma solução de acetonitrila contendo 3% de ácido fórmico ($10 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$).

De acordo com a literatura, os analitos podem interagir com a fase monolítica de sílica híbrida com grupos amino incorporados e com adição de SBA-15, através de interações do tipo ligação de hidrogênio, interações eletrostáticas, dipolo-dipolo e transferência de cargas (KULKARNI et al., 2006; ZHENG et al., 2010). Nesse caso, a sorção dos analitos no capilar monolítico se deve principalmente às interações intermoleculares como ligações de hidrogênio e interações eletrostática que ocorrem entre os grupos funcionais incorporados à estrutura do monólito e os analitos.

Figura 18. Cromatograma de íons totais (TIC) das soluções padrão dos analitos (500 ng mL⁻¹) nas condições otimizadas

4.7. Validação analítica do método HILIC-MS/MS no modo *column switching*

O método HILIC-MS/MS no modo *column switching* foi validado segundo as normas da ANVISA para a determinação simultânea de carbidopa, levodopa, benserazida, dopamina e 3-O-metildopa em amostras de plasma.

4.7.1. Linearidade e LIQ

O método HILIC-MS/MS no modo *column switching* apresentou intervalos lineares que variaram de LIQ – 2,00 µg mL⁻¹ e coeficientes de determinação maiores que 0,9910 (Tabela 7). O limite inferior de quantificação foi definido como a menor concentração determinada quantitativamente com exatidão e precisão aceitáveis.

Tabela 7. Intervalo linear, equação de regressão linear, coeficiente de determinação e LIQ

Analito	Intervalo linear (µg mL ⁻¹)	Equação de regressão	R ²	LIQ (ng mL ⁻¹)
Benserazida	0,17 – 2,00	y = 1,5912x – 0,0789	0,999	170
Levodopa	0,022 – 2,00	y = 6,5481x – 0,1737	0,9928	22
Carbidopa	0,033 – 2,00	y = 3,5595x – 0,5045	0,9910	33
Dopamina	0,0012 – 2,00	y = 0,9501x – 0,1099	0,9936	1,2
3-O-metildopa	0,01 – 2,00	y = 5,6854x – 0,5089	0,9919	10

4.7.2. Exatidão e precisão

A Tabela 8 apresenta os valores de exatidão e precisão intra e interensaio do método desenvolvido. Os valores de EPR variaram de -10,97% a 12,29% (exatidão intraensaio) e -9,33% a 10,41% (exatidão interensaio). A precisão do método apresentou valores de CV que variaram de -3,45% a 13,35% (precisão intraensaio) e -7,65% a 17,61% (precisão interensaio). Todos esses valores estão em concordância com os limites estabelecidos pela ANVISA.

Tabela 8. Parâmetros de validação analítica para o método HILIC-MS/MS no modo *column switching*

Analito	Concentração adicionada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Exatidão		Precisão	
		Intra- ensaio	Inter- ensaio	Intra- ensaio	Inter- ensaio
		(%EPR) n=5		(%CV) n=5	
Benserazida	0,17	7,41	2,49	6,68	17,61
	0,250	3,64	1,70	8,00	5,76
	0,50	0,08	0,06	13,35	11,54
	1,00	-7,93	-2,67	2,21	11,47
	1,60	3,96	2,15	4,20	8,21
	2,00	0,18	-0,81	1,40	4,87
Levodopa	0,022	8,9	7,60	8,63	5,74
	0,250	-4,55	6,91	2,34	1,45
	0,50	11,96	3,73	4,38	8,26
	1,00	-0,37	-9,33	4,96	6,35
	1,60	-8,33	-3,97	2,94	4,87
	2,00	6,51	3,55	6,21	5,36
Carbidopa	0,033	8,10	10,41	13,64	14,79
	0,25	4,35	2,20	2,9	0,9
	0,50	6,00	6,11	0,16	0,46
	1,00	-6,25	-6,94	0,91	0,85
	1,60	-10,97	-4,64	8,54	7,00
	2,00	6,13	4,43	2,52	8,13
Dopamina	0,0012	12,29	10,03	10,17	11,76
	0,250	3,78	2,76	3,45	7,65
	0,50	-4,15	-3,89	0,35	1,02
	1,00	1,65	3,99	2,46	2,36
	1,60	11,31	7,56	0,92	0,79
	2,00	6,18	3,74	3,58	7,27
3-O-metildopa	0,010	-5,30	-3,41	6,58	8,54
	0,250	7,10	8,00	2,30	1,70
	0,50	-4,52	-0,59	8,28	13,06
	1,00	-8,00	-2,61	7,44	13,99
	1,60	7,29	6,29	3,60	13,18
	2,00	-3,75	-1,87	4,05	9,15

4.7.3. Efeito residual e efeito matriz

O efeito residual foi avaliado com injeções de amostras plasma branco de referência antes e após a análise de amostra plasma branco de referência enriquecidas na

concentração correspondente ao limite superior de quantificação (LSQ). Nestas amostras plasma branco de referência, os sinais analíticos nos tempos de retenção dos analitos e do PI corresponderam a menos que 5% dos sinais analíticos correspondentes às amostras no limite inferior de quantificação (LIQ). Estes valores obtidos encontram-se em concordância com os limites preconizados pela ANVISA.

A ausência do efeito matriz foi confirmada pela infusão pós-coluna. De acordo com a Figura 19, no tempo de retenção dos analitos não foi observado variações na linha de base, ou seja, interferentes capazes de causar supressão ou incremento de sina.

Figura 19. Cromatograma de infusão pós-coluna da carbidopa, levodopa, benserazida, dopamina e 3-O-metildopa para o método HILIC-MS/MS no modo *column switching*

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

A otimização do procedimento de síntese da fase monolítica de sílica híbrida com grupos amino incorporados e adição de SBA-15 (proporção dos precursores de síntese, quantidade de água, solvente e tensoativo no meio reacional) favoreceu a capacidade de sorção do capilar.

A fase monolítica sintetizada apresentou estabilidade mecânica e química adequada. A robustez da fase pode ser comprovada por sua reutilização em mais de 50 extrações, sem perda significativa na eficiência de sorção.

A caracterização química dos materiais sintetizados permitiu observar a presença de bandas características que indicaram a incorporação dos grupos amino à estrutura do monolito. As caracterizações morfológicas pelas técnicas MEV e MET mostraram a ordenação e porosidade dos materiais sintetizados. Os macroporos permitiram a fácil percolação da amostra biológica sem aumento significativo na pressão do sistema de análise.

A separação cromatográfica na coluna HILIC com adequada retenção dos analitos favoreceu a detectabilidade do método.

A pré concentração dos analitos na coluna monolítica e a remoção dos compostos interferentes da amostra biológica, antes da separação cromatográfica, favoreceram a seletividade e detectabilidade do método HILIC-MS/MS no modo *column switching*.

O método online HILIC-MS/MS no modo *column switching* para a determinação de levodopa, carbidopa, benserazida, dopamina e 3-O-metildopa em amostras de plasma possibilitou o acoplamento da etapa de preparo de amostra com a análise cromatográfica, diminuindo as fontes de erro e o tempo de análise, além de apresentar vantagens como a diminuição do consumo de solvente orgânico e da exposição às amostras biológicas.

A validação analítica do método HILIC-MS/MS no modo *column switching* mostrou ser adequada na faixa linear para a determinação dos analitos em amostra biológica, com satisfatória precisão e exatidão.

REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. . In: RDC nº 166 , de 24 de julho de 2017, **Anais...**2017.

AL-OWEINI, R.; EL-RASSY, H. Synthesis and characterization by FTIR spectroscopy of silica aerogels prepared using several $\text{Si}(\text{OR})_4$ and $\text{R}''\text{Si}(\text{OR}')_3$ precursors. **Journal of Molecular Structure**, v. 919, n. 1–3, p. 140–145, fev. 2009.

ALPERT, A. J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. **Journal of chromatography**, v. 499, p. 177–96, 19 jan. 1990.

ARTAKI, I.; ZERDA, T. W.; JONAS, J. Solvent effects on the condensation stage of the sol-gel process. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 81, n. 3, p. 381–395, maio 1986.

BARBOSA, M. T. et al. Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: A community-based survey in Brazil (the Bambuí study). **Movement Disorders**, v. 21, n. 6, p. 800–808, 6 jun. 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/mds.20806>>.

BECK, J. S. et al. A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, n. 27, p. 10834–10843, dez. 1992.

BEHRENS, P. Mesoporous inorganic solids. **Advanced Materials**, v. 5, n. 2, p. 127–132, fev. 1993.

BERNAL, J. et al. Hydrophilic interaction liquid chromatography in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 42, p. 7438–7452, out. 2011.

BJARKAM, C. R. et al. New strategies for the treatment of Parkinson's disease hold considerable promise for the future management of neurodegenerative disorders. **Biogerontology**, v. 2, n. 3, p. 193–207, 2001.

BRINKER, C. J.; SCHERER, G. W. **Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing**. [s.l: s.n.]

BUI, T. X. et al. Adsorption of pharmaceuticals onto trimethylsilylated mesoporous SBA-15. **Journal of Hazardous Materials**, v. 254–255, p. 345–353, jun. 2013.

BUSZEWSKI, B.; NOGA, S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 1, p. 231–247, 31 jan. 2012.

CAGLAR ANDAC, S. Determination of Drugs by Online Column-Switching Liquid Chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v. 54, n. 9, p. 1641–1647, out. 2016.

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**, v. 619, n. 2, p. 177–90, 22 set. 1993.

CÉSAR, I. C. et al. Development and validation of a high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-MS/MS method for the simultaneous quantitation of levodopa and carbidopa in human plasma. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 46, n. 9, p. 943–948, set. 2011a.

CÉSAR, I. da C. et al. Simultaneous quantitation of levodopa and 3-O-methyldopa in human plasma by HPLC–ESI-MS/MS: Application for a pharmacokinetic study with a levodopa/benserazide formulation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, n. 5, p. 1094–1100, dez. 2011b.

CHAVES, A. R.; QUEIROZ, M. E. C. Immunoaffinity in-tube solid phase microextraction coupled with liquid chromatography with fluorescence detection for determination of interferon α in plasma samples. **Journal of Chromatography B**, v. 928, p. 37–43, jun. 2013.

CHI, J. et al. Quantitation of levodopa and carbidopa in rat plasma by LC–MS/MS: The key role of ion-pairing reversed-phase chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 1054, p. 1–9, jun. 2017.

CHIANG, C.-H.; ISHIDA, H.; KOENIG, J. L. The Structure of γ -Aminopropyltriethoxysilane on Glass Surfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 74, n. 2, p. 396–404, 1980.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623–636,

2008.

CHO, Y. A. et al. Development and validation of an LC–ESI–MS/MS method for simultaneous determination of levodopa, dopamine, L- α -methyldopa and 3-O-methyldopa in rat plasma. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 42, n. 6, p. 361–368, 4 dez. 2012.

CRUTCHFIELD, C. A.; MARZINKE, M. A.; CLARKE, W. A. Quantification of Docetaxel in Serum Using Turbulent Flow Liquid Chromatography Electrospray Tandem Mass Spectrometry (TFC-HPLC-ESI-MS/MS). In: [s.l: s.n.]p. 121–124.

D. FERNANDES, F. R. et al. Synthesis and Characterization of Mesoporous Materials SBA-15 Obtained with Different Synthesis Conditions. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 1855–1864, 2016.

DA FONSECA, B. M. et al. Determination of seven selected antipsychotic drugs in human plasma using microextraction in packed sorbent and gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 12, p. 3953–3963, 12 maio 2013.

DAVID, F. J. et al. Progressive Resistance Exercise and Parkinson’s Disease: A Review of Potential Mechanisms. **Parkinson’s Disease**, v. 2012, p. 1–10, 2012.

DE FARIA, H. D. et al. Direct extraction of tetracyclines from bovine milk using restricted access carbon nanotubes in a column switching liquid chromatography system. **Food Chemistry**, v. 225, p. 98–106, jun. 2017.

DE LAU, L. M.; BRETELER, M. M. Epidemiology of Parkinson’s disease. **The Lancet Neurology**, v. 5, n. 6, p. 525–535, jun. 2006.

DE SOUZA, I. D. **Desenvolvimento de fases monolíticas de sílica híbrida para microextração em sorvente empacotado (MEPS) de fármacos em amostras de plasma e análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS)**. 2015. University of São Paulo, 2015.

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, ago. 2015.

DHALL, R.; KREITZMAN, D. L. Advances in levodopa therapy for Parkinson disease. **Neurology**, v. 86, n. 14 Supplement 1, p. S13–S24, 5 abr. 2016.

DOMINGUES, D. S.; SOUZA, I. D. de; 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, jul. 2015.

ECKERT, E.; GÖEN, T. Rapid determination of four short-chain alkyl mercapturic acids in human urine by column-switching liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 965, p. 54–60, ago. 2014.

FAGUNDES, V. F. et al. Rapid and direct analysis of statins in human plasma by column-switching liquid chromatography with restricted-access material. **Journal of Chromatography B**, v. 947–948, p. 8–16, fev. 2014.

FARIA, A. M. et al. Fases estacionárias monolíticas para separações cromatográficas. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 300–309, abr. 2006.

FERGUSON, R. E.; MCCULLOH, K. E.; ROSENSTOCK, H. M. Observation of the Products of Ionic Collision Processes and Ion Decomposition in a Linear, Pulsed Time-of-Flight Mass Spectrometer. **The Journal of Chemical Physics**, v. 42, n. 1, p. 100–106, jan. 1965.

GARBIS, S. D. et al. Determination of Folates in Human Plasma Using Hydrophilic Interaction Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 22, p. 5358–5364, nov. 2001.

HÄDENER, M. et al. Development of a rapid column-switching LC-MS/MS method for the quantification of THCCOOH and THCCOOH-glucuronide in whole blood for assessing cannabis consumption frequency. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 7, p. 1953–1962, 18 mar. 2016.

HÁKOVÁ, M. et al. An on-line coupling of nanofibrous extraction with column-switching high performance liquid chromatography – A case study on the determination of bisphenol A in environmental water samples. **Talanta**, v. 178, p. 141–146, fev. 2018.

HAYES; MALIK. Sol-gel monolithic columns with reversed electroosmotic flow for

capillary electrochromatography. **Analytical chemistry**, v. 72, n. 17, p. 4090–9, 1 set. 2000.

HECKENDORF, A.; RATHORE, A.; KRULL, I. S. HILIC and Its Applications for Biotechnology, Part I. **LCGC North America**, v. 31, n. 12, p. 998–1007, 2013.

HEMSTRÖM, P.; IRGUM, K. Hydrophilic interaction chromatography. **Journal of separation science**, v. 29, n. 12, p. 1784–821, ago. 2006.

HERVIOU, P. et al. Determination of irinotecan and SN38 in human plasma by TurboFlowTM liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 118, p. 284–291, jan. 2016.

HIYOSHI, N.; YOGO, K.; YASHIMA, T. Adsorption characteristics of carbon dioxide on organically functionalized SBA-15. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 84, n. 1–3, p. 357–365, set. 2005.

HOFFMANN, F. et al. Mesoporöse organisch-anorganische Hybridmaterialien auf Silicabasis. **Angewandte Chemie**, v. 118, n. 20, p. 3290–3328, 12 maio 2006.

HUIRACHE-ACUÑA, R. et al. SBA-15 Mesoporous Silica as Catalytic Support for Hydrodesulfurization Catalysts—Review. **Materials**, v. 6, n. 9, p. 4139–4167, 17 set. 2013.

IKEGAMI, T. et al. Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, n. 1–2, p. 474–503, mar. 2008.

INNOCENZI, P. Infrared spectroscopy of sol–gel derived silica-based films: a spectro-microstructure overview. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 316, n. 2–3, p. 309–319, fev. 2003.

JIN, M. et al. Benzene oxidation with ozone over MnOx/SBA-15 catalysts. **Catalysis Today**, v. 204, p. 108–113, abr. 2013.

JUENKE, J. M. et al. Simultaneous UPLC–MS/MS assay for the detection of the traditional antipsychotics haloperidol, fluphenazine, perphenazine, and thiothixene in serum and plasma. **Clinica Chimica Acta**, v. 423, p. 32–34, ago. 2013.

JUNNOTULA, V.; LICEA-PEREZ, H. Development and validation of a simple and

sensitive method for quantification of levodopa and carbidopa in rat and monkey plasma using derivatization and UPLC–MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 926, p. 47–53, maio 2013.

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, abr. 2013.

KAKARLA, S.; KODALI, G.; SERU, G. SELECTIVE AND RAPID LC-MS/MS METHOD FOR THE SIMULTANEOUS QUANTITATION OF LEVODOPA AND CARBIDOPA IN HUMAN PLASMA USING ALUMINA SPE CARTRIDGES. **Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 8, p. 905–915, 2016.

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

KIRKLAND, J. J. Development of some stationary phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatography. A**, v. 1060, n. 1–2, p. 9–21, 10 dez. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15628149>>.

KRESGE, C. T. et al. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. **Nature**, v. 359, n. 6397, p. 710–712, out. 1992.

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. 1–2, p. 205–216, ago. 2006.

LANÇAS, F. M. Cromatografia Líquida com Interação Hidrofílica (HILIC). **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 49–57, 2010.

LEE, X.-P. et al. Rapid and highly sensitive analysis of benzodiazepines and tandospirone in human plasma by automated on-line column-switching UFLC-MS/MS. **Legal Medicine**, v. 24, p. 36–55, jan. 2017.

LI, D.; CHEN, G.; WANG, X. Incorporation of lanthanum into SBA-15 and its catalytic activity in trichloroethylene combustion. **Journal of Rare Earths**, v. 26, n. 5, p. 717–721, out. 2008.

LI, W.; FRIES, D. P.; MALIK, A. Sol-gel stationary phases for capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1044, n. 1-2, p. 23-52, jul. 2004.

LIANG, T. et al. Preparation and chromatographic evaluation of a newly designed steviol glycoside modified-silica stationary phase in hydrophilic interaction liquid chromatography and reversed phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1388, p. 110-118, abr. 2015.

LINDEN, J. C.; LAWHEAD, C. L. Liquid chromatography of saccharides. **Journal of Chromatography A**, v. 105, n. 1, p. 125-133, fev. 1975.

LUO, X.; LI, G.; HU, Y. In-tube solid-phase microextraction based on NH₂-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, abr. 2017.

MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1559-1568, 2010.

MARCHIONI, C. et al. A column switching ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method to determine anandamide and 2-arachidonoylglycerol in plasma samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 14, p. 3587-3596, 23 maio 2017.

MARTINS, H. F. et al. Development of a HPLC/MS/MS methodology for determining 3-O-methyldopa in human plasma and its application in a bioequivalence study. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 2000.

MARTINS, H. F. et al. Determination of levodopa in human plasma by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS): application to a bioequivalence study. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 171-176, 2013.

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

MCCALLEY, D. V. Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a

viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds? **Journal of Chromatography A**, v. 1171, n. 1–2, p. 46–55, nov. 2007.

MERRIT, H. H.; ROWLAND, L. P. **Merritt's neurology**. [s.l.: s.n.]

MESA, M.; SIERRA, L.; GUTH, J.-L. Contribution to the study of the formation mechanism of mesoporous SBA-15 and SBA-16 type silica particles in aqueous acid solutions. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 112, n. 1–3, p. 338–350, jul. 2008.

MIZUNO, K.; KATAOKA, H. Analysis of urinary 8-isoprostane as an oxidative stress biomarker by stable isotope dilution using automated online in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 112, p. 36–42, ago. 2015.

NAIDONG, W. Bioanalytical liquid chromatography tandem mass spectrometry methods on underivatized silica columns with aqueous/organic mobile phases. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 796, n. 2, p. 209–24, 5 nov. 2003.

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, jan. 2014.

NGUYEN, H. P.; SCHUG, K. A. The advantages of ESI-MS detection in conjunction with HILIC mode separations: Fundamentals and applications. **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 9, p. 1465–1480, maio 2008.

NIKOLOV, Z. L.; REILLY, P. J. Retention of carbohydrates on silica and amine-bonded silica stationary phases: application of the hydration model. **Journal of Chromatography A**, v. 325, p. 287–293, jan. 1985.

NISHIJIMA, H.; TOMIYAMA, M. What Mechanisms Are Responsible for the Reuptake of Levodopa-Derived Dopamine in Parkinsonian Striatum? **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, 15 dez. 2016.

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, 19

jul. 2011.

OLANOW, C. W.; TATTON, W. G. ETIOLOGY AND PATHOGENESIS OF PARKINSON'S DISEASE. **Annual Review of Neuroscience**, v. 22, n. 1, p. 123–144, mar. 1999.

OLSEN, B. A. Hydrophilic interaction chromatography using amino and silica columns for the determination of polar pharmaceuticals and impurities. **Journal of Chromatography A**, v. 913, n. 1–2, p. 113–122, abr. 2001.

OU, J. et al. Recent advances in preparation and application of hybrid organic-silica monolithic capillary columns. **ELECTROPHORESIS**, v. 34, n. 1, p. 126–140, jan. 2013.

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, jan. 2015.

OYLER, A. R. et al. Hydrophilic interaction chromatography on amino-silica phases complements reversed-phase high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for peptide analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 724, n. 1–2, p. 378–383, fev. 1996.

PALMER, J. K. A Versatile System for Sugar Analysis via Liquid Chromatography. **Analytical Letters**, v. 8, n. 3, p. 215–224, 6 mar. 1975.

PARK, M. et al. Quantitative determination of 11-nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol in hair by column switching LC–ESI-MS3. **Journal of Chromatography B**, v. 947–948, p. 179–185, fev. 2014.

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, 18 nov. 2008.

PURSLEY, J. et al. LC–MS/MS determination of apixaban (BMS-562247) and its major metabolite in human plasma: an application of polarity switching and monolithic HPLC column. **Bioanalysis**, v. 6, n. 15, p. 2071–2082, ago. 2014.

QUEIROZ, M. E. C.; MELO, L. P. Selective capillary coating materials for in-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography to determine drugs and

biomarkers in biological samples: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 826, p. 1–11, maio 2014.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, fev. 2001.

RIBEIRO, R. P. et al. Simultaneous determination of levodopa, carbidopa, entacapone, tolcapone, 3- O -methyldopa and dopamine in human plasma by an HPLC–MS/MS method. **Bioanalysis**, v. 7, n. 2, p. 207–220, jan. 2015.

RIMMER, C. A.; SANDER, L. C. Shape selectivity in embedded polar group stationary phases for liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 394, n. 1, p. 285–291, 17 maio 2009.

SABAREDZOVIC, A. et al. Determination of 12 urinary phthalate metabolites in Norwegian pregnant women by core–shell high performance liquid chromatography with on-line solid-phase extraction, column switching and tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 1002, p. 343–352, out. 2015.

SADÍLEK, P.; ŠATÍNSKÝ, D.; SOLICH, P. Using restricted-access materials and column switching in high-performance liquid chromatography for direct analysis of biologically-active compounds in complex matrices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 5, p. 375–384, maio 2007.

SCHRAG, A. Psychiatric aspects of Parkinson's disease. **Journal of Neurology**, v. 251, n. 7, jul. 2004.

SCHUBERT, U.; HÜSING, N.; LORENZ, A. Hybrid inorganic-organic materials by sol-gel processing of organofunctional metal alkoxides. **Chemistry of materials**, v. 7, n. 11, p. 2010–2027, 1995.

SELVAKANNAN, P. et al. High surface area Au–SBA-15 and Au–MCM-41 materials synthesis: Tryptophan amino acid mediated confinement of gold nanostructures within the mesoporous silica pore walls. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 394, p. 475–484, mar. 2013.

SHIN, J.-S. et al. Direct analysis of prostaglandin-E2 and -D2 produced in an

inflammatory cell reaction and its application for activity screening and potency evaluation using turbulent flow chromatography liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1463, p. 128–135, set. 2016.

SHULMAN, J. M.; DE JAGER, P. L.; FEANY, M. B. Parkinson's Disease: Genetics and Pathogenesis. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 6, n. 1, p. 193–222, 28 fev. 2011. D

SILVA, C. R. et al. Novas fases estacionárias à base de sílica para cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 270–276, abr. 2004.

SILVA, C. G. A. da; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H. HYDROPHILIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY (HILIC): STATE OF THE ART AND APPLICATIONS. **Química Nova**, 2016.

SNYDER, L. R.; DOLAN, J. W.; CARR, P. W. The hydrophobic-subtraction model of reversed-phase column selectivity. **Journal of chromatography. A**, v. 1060, n. 1–2, p. 77–116, 10 dez. 2004.

SOLER-ILLIA, G. J. A. A.; AZZARONI, O. Multifunctional hybrids by combining ordered mesoporous materials and macromolecular building blocks. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 2, p. 1107, 2011.

SOLER-ILLIA, G. J. de A. A. et al. Chemical Strategies To Design Textured Materials: from Microporous and Mesoporous Oxides to Nanonetworks and Hierarchical Structures. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 11, p. 4093–4138, nov. 2002.

SOUVERAIN, S.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.-L. Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures. **Journal of Chromatography A**, v. 1058, n. 1–2, p. 61–66, nov. 2004.

SVEC, F. Less common applications of monoliths: Preconcentration and solid-phase extraction. **Journal of Chromatography B**, v. 841, n. 1–2, p. 52–64, set. 2006.

TANG, T. et al. Functionalized SBA-15 materials for bilirubin adsorption. **Applied Surface Science**, v. 257, n. 14, p. 6004–6009, maio 2011.

ULRICH, D. R. Prospects of sol-gel processes. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 100, n. 1–3, p. 174–193, mar. 1988.

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

VARTULI, J. C. et al. Effect of Surfactant/Silica Molar Ratios on the Formation of Mesoporous Molecular Sieves: Inorganic Mimicry of Surfactant Liquid-Crystal Phases and Mechanistic Implications. **Chemistry of Materials**, v. 6, n. 12, p. 2317–2326, dez. 1994.

VERHAAR, L. A. T.; KUSTER, B. F. M. Contribution to the elucidation of the mechanism of sugar retention on amine-modified silica in liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 234, n. 1, p. 57–64, jan. 1982.

VILHENA, R. de O. et al. A new HILIC-MS/MS method for the simultaneous analysis of carbidopa, levodopa, and its metabolites in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 967, p. 41–49, set. 2014.

WAN, L. et al. Novel hybrid organic–inorganic monolithic column containing mesoporous nanoparticles for capillary electrochromatography. **Talanta**, v. 98, p. 277–281, ago. 2012.

WAN, Y.; ZHAO. On the Controllable Soft-Templating Approach to Mesoporous Silicates. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 7, p. 2821–2860, jul. 2007.

WANG, P. G.; HE, W. **Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) and advanced applications**. [s.l: s.n.]

WANG, Y. et al. Synthesis of length controllable mesoporous SBA-15 rods. **Materials Chemistry and Physics**, v. 115, n. 2–3, p. 649–655, jun. 2009.

WIDMER, N. et al. Review of therapeutic drug monitoring of anticancer drugs part two – Targeted therapies. **European Journal of Cancer**, v. 50, n. 12, p. 2020–2036, ago. 2014.

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

XIONG, L. et al. Determination of co-administrated opioids and benzodiazepines in urine using column-switching solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass

spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1395, p. 99–108, maio 2015.

XU, L.; LEE, H. K. Preparation, characterization and analytical application of a hybrid organic–inorganic silica-based monolith. **Journal of Chromatography A**, v. 1195, n. 1–2, p. 78–84, jun. 2008.

XU, W. et al. Determination of sulfonamides in bovine milk with column-switching high performance liquid chromatography using surface imprinted silica with hydrophilic external layer as restricted access and selective extraction material. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 46, p. 7198–7207, nov. 2010a.

XU, Y. et al. Porous Polymer Monolithic Column with Surface-Bound Gold Nanoparticles for the Capture and Separation of Cysteine-Containing Peptides. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 8, p. 3352–3358, 15 abr. 2010b.

YAMASHITA, M.; FENN, J. B. Negative ion production with the electrospray ion source. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 88, n. 20, p. 4671–4675, set. 1984.

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, jul. 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. 1–2, p. 255–261, ago. 2004.

YANG, G. et al. Development and validation of an LC-MS/MS method for simultaneous quantification of levodopa and MD01 in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study of mucuna pruriens extract. **Biomedical Chromatography**, v. 30, n. 9, p. 1506–1514, set. 2016.

YANG, Z.; LU, Y.; YANG, Z. Mesoporous materials: tunable structure, morphology and composition. **Chemical Communications**, n. 17, p. 2270, 2009.

ZHANG, X. et al. A column-switching LC–MS/MS method for simultaneous quantification of biomarkers for 1,3-butadiene exposure and oxidative damage in human urine. **Journal of Chromatography B**, v. 1002, p. 123–129, out. 2015.

ZHAO et al. Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300

angstrom pores. **Science (New York, N.Y.)**, v. 279, n. 5350, p. 548–52, 23 jan. 1998a.

ZHAO, D. et al. Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores. **Science**, v. 279, n. 5350, p. 548–552, 23 jan. 1998b.

ZHAO, D. et al. Nonionic Triblock and Star Diblock Copolymer and Oligomeric Surfactant Syntheses of Highly Ordered, Hydrothermally Stable, Mesoporous Silica Structures. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 24, p. 6024–6036, jun. 1998c.

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, nov. 2010.

ZHENG, M.-M.; LIN, B.; FENG, Y.-Q. Hybrid organic–inorganic octyl monolithic column for in-tube solid-phase microextraction coupled to capillary high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1164, n. 1–2, p. 48–55, set. 2007..

ZHONG, Q. et al. Automatic on-line solid-phase extraction with ultra-high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry for the determination of ten antipsychotics in human plasma. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 11, p. 2129–2137, jun. 2016.

ZHOU, X. et al. Automated on-line column-switching high performance liquid chromatography isotope dilution tandem mass spectrometry method for the quantification of bisphenol A, bisphenol F, bisphenol S, and 11 other phenols in urine. **Journal of Chromatography B**, v. 944, p. 152–156, jan. 2014.

ZHU, T.; ROW, K. H. Preparation and applications of hybrid organic-inorganic monoliths: A review. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 10–11, p. 1294–1302, jun. 2012.