UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento e validação de metodologia para análise simultânea de aminoácidos como possíveis marcadores neurobiológicos da esquizofrenia utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência

Greyce Kelly Steinhorst Alcantara

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento e validação de metodologia para análise simultânea de aminoácidos como possíveis marcadores neurobiológicos da esquizofrenia utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para a obtenção do título de
Mestre em Ciências

Área de concentração: Toxicologia.

Orientada: Greyce Kelly Steinhorst Alcantara

Orientadora: Prof^a Dr^a Regina Helena Costa Queiroz

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.

Alcantara, Greyce Kelly Steinhorst

Desenvolvimento e validação de metodologia para análise simultânea de aminoácidos como possíveis marcadores neurobiológicos da esquizofrenia utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. Ribeirão Preto, 2012. 73 p.:il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto / USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Queiroz, Regina Helena Costa.

1. Aminoácidos
2. Plasma
3. Cromatografia líquida de alta eficiência
4. Esquizofrenia

Folha de Aprovação

Greyce Kelly Steinhorst Alcantara

Desenvolvimento e validação de metodologia para análise simultânea de aminoácidos como possíveis marcadores neurobiológicos da esquizofrenia utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação para a obtenção
do Título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Regina Helena Costa
Queiroz

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Tempo para tudo

(ECCLESIASTES 3, 1-8)

Debaixo do céu, há momento para tudo, e tempo certo para cada coisa :

Tempo de nascer, e tempo de morrer;

Tempo de plantar, e tempo de colher a planta.

Tempo de matar, e tempo de sarar;

Tempo de destruir, e tempo de construir.

Tempo de chorar, e tempo de rir;

Tempo de gemer, e tempo de dançar.

Tempo de atirar pedras, e tempo de ajuntá-las;

Tempo de abraçar, e tempo de se separar.

Tempo de buscar, e tempo de perder;

Tempo de guardar, e tempo de jogar fora.

Tempo de rasgar, e tempo de costurar;

Tempo de calar, e tempo de falar.

Tempo de amar, e tempo de odiar;

Tempo de guerra, e tempo de paz.

A Deus

... por esta oportunidade de conhecimento profissional e crescimento pessoal...

...por providenciar forças divinas quando as minhas já não eram suficientes...

... pela amizade de pessoas maravilhosas nesta jornada...

*Em especial, à minha família, Milda, Erna e Michael,
Pelo carinho, apoio e compreensão em todos os momentos da minha vida.
Agradeço as inúmeras vezes que dobraram o joelho e,
elevaram sua mente à Deus, pedindo para que Ele pudesse
estar comigo amparando-me e protegendo-me...
Agradeço-os também, pela educação e
por todos os princípios que hoje regem minha vida...*

*Em especial, aos meus amigos: Caroline Marroni, Carolina Vaccari,
Reinaldo, Marcela, Juliana, Rute, Céli, Vitor, Cris,
André, Fernanda, Lucas e Fernando Postalli;
pessoas maravilhosas que me acolheram e fizeram
meus dias tornarem-se mais alegres...*

*À minha orientadora Profª Drª Regina Helena,
Por acreditar, apoiar e confiar no meu trabalho,
Pela sabedoria, bondade e paciência
durante todos os momentos...*

*Ao Leandro, pelo seu amor, companheirismo, amizade e paciência
Por acrescentar muito a cada dia em minha vida...
Por simplesmente estar presente...*

À Prof^{ta} Dra. Pierina Sueli Bonato pela colaboração durante a pesquisa... obrigada!!

Aos amigos: Marina, Samuel, Flávia, Mateus, Luiz Carlos, Soninha, Cidinha e Gilda, pela ajuda constante, paciência, competência e amizade...

Às funcionárias: Rosemary, Rosana, Rossana e Ana Lúcia pelo acolhimento, apoio e amizade...

À todos os professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pelo conhecimento, amizade, acolhimento, confiança transmitida...

A todos que não foram citados e que de alguma maneira direta ou indireta contribuíram para que este trabalho fosse realizado

A CAPES pelo apoio financeiro prestado para a execução desta pesquisa

RESUMO

Alcantara, G.K.S. **Desenvolvimento e validação de metodologia para análise simultânea de aminoácidos como possíveis marcadores neurobiológicos da esquizofrenia utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência.** 2012. 73p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

As teorias neurobiológicas defendem que a esquizofrenia é essencialmente causada por alterações bioquímicas e estruturais do cérebro. A importância que os aminoácidos tem com a fisiopatologia da esquizofrenia e, por este envolvimento encontrar-se pouco esclarecido é que esta pesquisa teve como propósito desenvolver e validar uma metodologia analítica para a análise simultânea dos aminoácidos: glutamato, aspartato, serina, glicina, arginina e lisina em plasma de pacientes com diagnóstico de esquizofrenia, utilizando para isto a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. Os analitos foram inicialmente extraídos através do processo de precipitação protéica, com o solvente orgânico acetonitrila. Para que pudessem ser detectados por fluorescência os aminoácidos foram derivatizados empregando orto-ftalaldeído na presença de B-mercaptoetanol. O tempo total de separação foi de 18 minutos em coluna analítica LiChroCART® RP-18 (Merck, 125mm, 4mm d.i., 5µm) no modo de eluição gradiente com tampão acetato de sódio 0,1 mol/L (pH 7,0, A) e acetonitrila e água (B), na proporção 70:30, respectivamente, para posterior detecção por fluorescência (excitação 340 nm, emissão 450 nm). O método foi validado segundo os critérios estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A resposta do detector encontrou-se linear na faixa de 9,6 a 192 pmol/mL para todos os aminoácidos. O limite de detecção estabelecido foi de 7,68 pmol/mL e o limite de quantificação foi de 9,6 pmol/mL. A recuperação foi superior a 70%. A precisão e exatidão intra-ensaio variou de 3,6% a 5,3% e 3,1% a 8,3%, respectivamente. A precisão e exatidão interensaio variou de 3,6% a 7,1% e 3,1% a 11,4%, respectivamente. A especificidade foi determinada para os seguintes interferentes: lorazepam, diazepam, clonazepam, alprazolam, haloperidol, levomepromazina, propranolol, ranitidina, fluoxetina, olanzapina, carbamazepina, diclofenaco, amiodarona, sulfametoxazol e, ainda, plasma hemolisado, normal e lipêmico. O método desenvolvido e validado mostrou ser eficiente na determinação simultânea de aminoácidos podendo ser aplicado em amostras de pacientes esquizofrênicos a fim de investigar seu envolvimento com esta desordem psiquiátrica tão intrigante.

Palavras-chave: aminoácidos; plasma; cromatografia líquida de alta eficiência; esquizofrenia.

ABSTRACT

Alcantara, G.K.S. **Development and validation of methodology for simultaneous analysis of amino acids as potential neurobiological markers of schizophrenia using high performance liquid chromatography with fluorescence detection.** 2012. 73p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Schizophrenia is primarily caused by structural and biochemical changes in the brain according to the main neurobiological theory, including the amino acids concentrations in the human plasma. The relation between these amino acids concentrations and the schizophrenia needs more clarification. Therefore, an analytical tool is necessary to provide which of these amino acids are related with this mental disease. The aim of this research was to develop and to validate an analytical methodology using High Performance Liquid Chromatography with fluorescence detection for simultaneous analysis of the main human amino acids, which are: glutamate, aspartate, serine, glycine, arginine and lysine in plasma of schizophrenic patients. Protein precipitation was the extraction technique chosen for the amino acids determination using acetonitrile as organic solvent. The derivatization was conducted by the reaction between the amino acids and ortho-phthalaldehyde in the presence of B-mercaptoethanol. The separation was achieved using the analytical column LiChroCART® RP-18 (Merck, 125mm, 4mm ID, 5mm) by gradient elution in 18 minutes. The mobile phase was composed by sodium acetate buffer 0.1 mol / L (pH 7.0; A) and acetonitrile: water (B) (70:30, v/v). The detection was performed by fluorescence (excitation 340 nm, emission 450 nm). The method was validated according to criteria established by the regulatory agency (ANVISA). The detector response was found linear in the range 9.6 to 192 pmol / mL for all amino acids. The detection limit was set at 7.68 pmol / mL and the limit of quantification was 9.6 pmol / mL. The recovery was above 70%. The precision and accuracy intra-assay ranged from 3.6% to 5.3% and 3.1% to 8.3%, respectively. The precision and accuracy inter-assay ranged from 3.6% to 7.1% and 3.1% to 11.4%, respectively. The specificity was determined for the following possible interferents: lorazepam, diazepam, clonazepam, alprazolam, haloperidol, levomepromazine, propranolol, ranitidine, fluoxetine, olanzapine, carbamazepine, diclofenac, amiodarone, trimethoprim. Plasma hemolyzed, lipemic and normal were evaluated. This method was adequate to simultaneous determination of amino acids, therefore it can be applied to samples of schizophrenic patients and consequently, providing information of the main amino acids involvement with this psychiatric disorder.

Keywords: amino acids, plasma, high performance liquid chromatography; schizophrenia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura geral dos aminoácidos	4
Figura 2. Reação de derivatização	10
Figura 3. Estrutura da norvalina, utilizada como padrão interno	18
Figura 4. Extração das amostras por precipitação proteica	20
Figura 5. Cromatograma referente à análise do branco de plasma humano. Condições cromatográficas: coluna LiChroCART (5 µm) (125 mm x 4,6 mm I.D.); eluente, tampão acetato de sódio 0,1 mol/L (pH 7,0, A) e acetonitrila e água (B), na proporção 70:30, respectivamente; vazão da fase móvel, 1ml/minuto; temperatura, 26 °C; detecção fluorimétrica (excitação 340 nm, emissão 450 nm); volume de injeção, 20 µL. O modo gradiente (2) encontra-se na Tabela 4.	31
Figura 6. Cromatograma referente à análise de amostra de plasma fortificado com padrão de Ser, Gly, Arg, Lys, Glu e Asp na concentração de 192 pmol/mL e norvalina (padrão interno) na concentração de 200 pmol/mL. Condições cromatográficas: coluna LiChroCART (5 µm) (125 mm x 4,6 mm I.D.); eluente, tampão acetato de sódio 0,1 mol/L (pH 7,0, A) e acetonitrila e água (B), na proporção 70:30, respectivamente; vazão da fase móvel, 1ml/minuto; temperatura, 26 °C; detecção fluorimétrica (excitação 340 nm, emissão 450 nm); volume de injeção, 20 µL. O modo gradiente (2) encontra-se na Tabela 4.	32
Figura 7. Aminoácido: (A) forma catiônica; (B) forma neutra; (C) forma aniônica.	34
Figura 8. Curva de linearidade da serina	35
Figura 9. Curva de linearidade da glicina	36
Figura 10. Curva de linearidade da arginina	36
Figura 11. Curva de linearidade da lisina	37
Figura 12. Curva de linearidade do aspartato	37
Figura 13. Curva de linearidade do glutamato.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estrutura dos aminoácidos	5
Tabela 2. Resumo de métodos analíticos na determinação de aminoácidos e outros compostos em matrizes biológicas.....	12
Tabela 3. Otimização das condições analíticas para detector UV-Vis	28
Tabela 4. Otimização das condições analíticas para detector de fluorescência	30
Tabela 5. Tempo de retenção dos aminoácidos e padrão interno da análise	33
Tabela 6. Propriedades dos aminoácidos conforme grupamento R.....	33
Tabela 7. Valores do ponto isoelétrico dos aminoácidos.	34
Tabela 8. Recuperação	39
Tabela 9. Limite de quantificação.....	39
Tabela 10. Precisão e exatidão	41
Tabela 11. Especificidade	42

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Arg	Arginina
Asp	Aspartato
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-RP	Cromatografia líquida de alta eficiência com coluna de fase reversa
CV	Coeficiente de variação
CMD	Concentração média determinada
DP	Desvio padrão
Gly	Glicina
Glu	Glutamato
ICH	International Conference on Harmonisation
ISO	International Standard Organization
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LC-MS/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de massa
Lys	Lisina
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
NV	Norvalina
OPA	Orto-ftalaldeído
pKa	Constante de equilíbrio
RSD	Desvio padrão relativo
Ser	Serina
SNC	Sistema nervoso central
UV-Vis	Ultra-violeta visível
2-ME	2-mercaptoetanol
3-MPA	3-mercaptopropiônico

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Esquizofrenia.....	2
1.2 Aminoácidos.....	4
1.3 Aminoácidos e a Esquizofrenia	6
1.4 Análise cromatográfica para determinação de aminoácidos	7
2. OBJETIVOS.....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Materiais.....	16
3.1.1 Reagentes e Solventes	16
3.1.2 Sistema Cromatográfico	16
3.1.3 Outros equipamentos	17
3.1.4 Coluna cromatográfica	17
3.2 Preparação de soluções e reagentes	17
3.2.1 Preparação das soluções padrão	17
3.2.2 Preparação dos reagentes	18
3.2.2.1 Preparação do tampão acetato pH 7,0	18
3.2.2.2 Preparação do tampão borato pH 9,6	18
3.2.2.3 Preparação do derivatizante.....	18
3.3 Obtenção do <i>pool</i> de plasma.....	19
3.4 Metodologia.....	19
3.5 Parâmetros utilizados na validação da metodologia	21
3.5.1 Linearidade.....	21

3.5.2 Recuperação	22
3.5.3 Limite de Detecção.....	22
3.5.4 Limite de Quantificação	23
3.5.5 Precisão e Exatidão	23
3.5.6 Estabilidade.....	24
3.5.7 Especificidade	25
 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 Otimização da metodologia	27
4.1.2 Otimização da detecção dos analitos	27
4.2 Validação da metodologia desenvolvida	34
4.2.1 Linearidade.....	34
4.2.2 Recuperação	38
4.2.3 Limite de Detecção.....	39
4.2.4 Limite de Quantificação	39
4.2.5 Precisão e Exatidão	40
4.2.6 Estabilidade.....	41
4.2.7 Especificidade	42
 5. CONCLUSÃO	44
 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
 ANEXOS	55
Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética da FCFRP- USP	55

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Esquizofrenia

Considerada na literatura como o mais grave dos transtornos psiquiátricos, a esquizofrenia, é uma doença funcional do cérebro, caracterizada essencialmente por uma fragmentação da estrutura básica dos processos de pensamento, acompanhada pela dificuldade em estabelecer a distinção entre experiências internas e externas, afetando a qualidade de vida do paciente, assim como, de seus familiares, pois é uma doença responsável pelas perdas funcionais, relacionadas a habilidades de trabalho, afetivas e de relacionamento social (KAPLAN e SADOCK, 2007; SANTANA, CHIANCA e CARDOSO, 2009).

A esquizofrenia é uma doença que afeta primariamente os processos cognitivos, podendo ser identificados em 40-60% dos pacientes esquizofrênicos desde o início da doença. Atinge 1% da população adulta mundial (McGUFFIN, OWEN e FARMER, 1995; RAKHADE e LOEB, 2008) manifestando-se habitualmente entre os 15 e 25 anos, nos homens e nas mulheres, mas raramente casos novos ocorrem antes da puberdade e, acima dos 50 anos (KAPLAN e SADOCK, 2007).

Johann e Vaz (2006), para diagnosticar a doença, considera necessário haver a presença de pelo menos dois sintomas psicóticos, durante no mínimo um mês proeminentes por pelo menos seis meses. Os sintomas da esquizofrenia são caracterizados em três categorias:

- Sintomas positivos: estão presentes com maior visibilidade na fase aguda da doença e incluem os delírios: idéias delirantes ou pensamentos irrealis descritos como idéias individuais do doente que não são compartilhadas, isto é, um indivíduo que acredita estar sendo perseguido pela polícia secreta, e acha que é o responsável pelas guerras do mundo; as alucinações, percepções irrealis (AFONSO, 2002).
- Sintomas negativos: são resultados da perda ou diminuição das capacidades mentais. Acompanham a evolução da doença e refletem um estado deficitário da motivação, das emoções, do discurso, do pensamento e das relações interpessoais (AFONSO, 2002), como a falta de vontade ou de iniciativa; isolamento social; apatia;

indiferença emocional; pobreza do pensamento. Estes sinais não se manifestam em todos os indivíduos esquizofrênicos (FREITAS, LUIS e FERREIRA, 2000).

- Sintomas desorganizados: são características presentes em indivíduos normais e em pacientes esquizofrênicos, porém nestes pacientes aparecem de uma forma mais caótica correspondendo ao afeto inapropriado, desorganização do pensamento e comportamento. Ainda, alterações de memória, de atenção, de “funções executivas”, parecem se manifestar de forma diferenciada em pacientes esquizofrênicos. Além disto, alterações de linguagem expressiva e receptiva, de coordenação motora simples e complexa (ADAD, CASTRO e MATTOS, 2000).

As causas para esta desordem psiquiátrica ainda encontram-se desconhecidas. Porém, neste último século, estudos sobre a fisiopatologia da doença obteve grandes avanços, evoluindo de teorias etiológicas para modelos mais complexos que levam em consideração a interação de fatores culturais, psicológicos e biológicos (ARARIPE NETO, BRESSAN e BUSATTO FILHO, 2007), entre as quais se destacam as de natureza genética que, com mais de oito décadas de investigações, vieram a apresentar o envolvimento de um componente genético o qual representa 70 - 80% da susceptibilidade total dos indivíduos a vir desenvolver a doença (VALLADA FILHO e SAMAIA, 2000).

As teorias neurobiológicas defendem que a esquizofrenia é essencialmente causada por alterações bioquímicas e estruturais do cérebro, recebendo atenção especial à disfunção dopaminérgica, embora alterações em outros neurotransmissores estejam também envolvidas (ARARIPE NETO, BRESSAN e BUSATTO FILHO, 2007). Menegatti et al. (2004) observaram que a serotonina também recebe atenção na fisiopatologia da doença evidenciada através da observação de que agonistas de receptores de serotonina aumentam a liberação deste neurotransmissor levando a uma melhora dos sintomas negativos da doença.

Pesquisas recentes também têm demonstrado que receptores glutamatérgicos do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) estão envolvidos na fisiopatologia desta doença e podem ser alvos para um tratamento psicofarmacológico (LARA e SOUSA, 2001; BRESSAN e PILOWSKY, 2003). De uma maneira geral, pode-se afirmar que existam duas hipóteses opostas, mas não totalmente contraditórias, de como o glutamato estaria envolvido na esquizofrenia: (i) hipótese da hipofunção glutamatérgica e (ii) hipótese da hiperfunção glutamatérgica

(DURSUN e DEAKIN, 2001; BRESSAN e PILOWSKY, 2003). A infusão intravenosa de quetamina em indivíduos normais, fez com que este antagonismo aos receptores glutamatérgicos tipo NMDA levasse ao aparecimento de sintomas psicóticos encontrados na esquizofrenia.

Apesar de existirem todas estas hipóteses para a explicação da origem da esquizofrenia, nenhuma delas individualmente consegue dar uma resposta satisfatória às muitas dúvidas que existem em torno das causas da doença, reforçando assim a idéia de uma provável etiologia multifatorial (KAPLAN e SADOCK, 2007).

1.2 Aminoácidos

Os aminoácidos constituem as unidades fundamentais das proteínas. Eles estão ligados covalentemente entre si através de uma ligação peptídica. O que diferencia uma proteína da outra é a sequência com que estão dispostos os aminoácidos. Vale ressaltar que, essencialmente, apenas 20 aminoácidos são responsáveis por produzir todas as proteínas, seja qual for a forma de vida (JUNIOR e FRANCISCO, 2006).

A estrutura química geral dos aminoácidos (Figura 1) é formada por um carbono central (carbono α) ligado a um grupamento amino (-NH_2), um grupamento carboxila (-COOH) e, um átomo de hidrogênio, variando apenas a cadeia carbonada lateral, chamada genericamente de grupamento R, sendo a responsável pela diferenciação entre os 20 aminoácidos (JUNIOR E FRANCISCO, 2006).

Figura 1. Estrutura geral dos aminoácidos

A estrutura química dos aminoácidos pesquisados neste trabalho encontra-se a seguir:

Tabela 1. Estrutura dos aminoácidos

Aminoácido	Fórmula estrutural
Serina
Glicina
Arginina
Lisina
Glutamato
Aspartato

1.3 Aminoácidos e a Esquizofrenia

As atividades funcionais e o mecanismo de atuação dos aminoácidos receberam maior importância quando pesquisadores verificaram que níveis excessivos de glutamato, e também outros aminoácidos, estavam sendo responsáveis por algumas desordens (CARPES, 1996), como: esquizofrenia (BRESSAN e PILOWSKY, 2003), mal de Huntington, mal de Alzheimer, isquemia, transtornos da ansiedade (CARPES, 1996) e epilepsia (RAKHADE e LOEB, 2008).

Envolvidos em vários transtornos psiquiátricos, o glutamato e o aspartato são os responsáveis pela maior parte da neurotransmissão excitatória no sistema nervoso central (SNC) (KRUTER, RITTER e KAPCZINSKI, 2003). Em estudos pós-morte, pesquisadores encontraram anormalidades na densidade dos receptores glutamatérgicos encontrados nas regiões do córtex pré-frontal, tálamo e lobo temporal, áreas que demonstravam um comprometimento na ativação durante a realização de tarefas cognitivas na esquizofrenia (GOFF e COYLE, 2001).

Van der Heijden (2004) verificou a ação dos antipsicóticos atípicos sobre a quantidade de glutamato e encontrou uma elevação dos níveis glutamatérgicos em pacientes esquizofrênicos. Tortorella et al. (2001) observaram que os valores do glutamato estavam aumentados em pacientes livres de tratamento com antipsicóticos e após doze semanas de tratamento com clozapina houve significativa redução dos níveis glutamatérgicos, embora não restaurados até os valores encontrados em controles normais.

O aminoácido glicina proveniente da serina é um co-agonista obrigatório dos receptores glutamatérgicos tipo NMDA envolvido na patofisiologia da esquizofrenia. Ambos aminoácidos levam a um aumento da transmissão glutamatérgica (LARA e SOUZA, 2001). Assim como a glicina, a serina age como neuromoduladora se ligando no receptor excitatório NMDA, o qual está envolvido com os processos de aprendizagem, memória, plasticidade neuronal e desenvolvimento do SNC. Uma disfunção neste receptor aparece em algumas condições patológicas: esquizofrenia, epilepsia e condições neurodegenerativas (FUCHS et al., 2008).

Macciardi et al. (2002) demonstraram em seu estudo níveis elevados de glutamato, glicina e serina em plasma de pacientes esquizofrênicos, visto que estes aminoácidos possuem um papel fundamental sobre a regulação do receptor NMDA.

A serina encontra-se alterada na esquizofrenia, na esclerose amiotrófica lateral e noicepção, portanto este aminoácido pode estar envolvido tanto com as situações fisiológicas quanto patológicas, sendo este o aminoácido mais investigado nas psicoses (FUCHS et al., 2008). Waziri, Baruah e Sherman (1993) observaram aumento de serina no sangue e no cérebro de pacientes esquizofrênicos. Estes autores também apontam que os níveis plasmáticos de serina estão aumentados na psicose ativa quando comparados com os níveis deste aminoácido em pacientes que tiveram melhora dos sintomas psicóticos.

Outros estudos revelam que os sintomas negativos melhoram quando a glicina é associada ao tratamento antipsicótico. Isto explica o que foi demonstrado entre a relação de níveis de glicina mais baixos que os normais com sintomas negativos da doença (SUMIYOSHI et al., 2004).

Frente a esses achados, fica claro que ocorre algum grau de disfunção na transmissão destes neurotransmissores em pacientes esquizofrênicos. Porém, a real natureza dessa disfunção e também o quanto a mesma pode ser identificada através da mensuração dos níveis destes aminoácidos e agonistas em nível periférico (valores plasmáticos) é o que ainda não pode ser esclarecido. Portanto, é evidente a importância em desenvolver uma metodologia analítica capaz de determinar simultaneamente aminoácidos para investigar o envolvimento destes com a esquizofrenia.

1.4 Análise cromatográfica para determinação de aminoácidos

A técnica para a determinação dos aminoácidos foi iniciada por Moore e Stein (1954), envolvendo a separação em uma resina de troca iônica usando uma série de tampões como eluente. A detecção dos aminoácidos era realizada por colorimetria via uma reação pós-coluna com ninidrina (ROWLEY, MARTIN e MARSDEN, 1995).

Recentemente, a cromatografia líquida de alta eficiência com coluna de fase reversa (CLAE-RP) tem sido a técnica de separação mais empregada (NUNES, 2007) para análise de moléculas biológicas, como os aminoácidos, peptídeos, ácidos nucleicos e proteínas. Esta técnica é capaz de fornecer uma separação com alta resolução, boa reprodutibilidade e eficiência (ABBOOD et al., 2009). Além destas razões, apresenta sensibilidade, adequação à separação de espécies não

voláteis ou termicamente frágeis, ampla aplicabilidade a espécies de grande interesse para a indústria, para o público e para os campos da ciência (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).

As fases estacionárias à base de sílica para a coluna analítica em CLAE constituem o material mais utilizado como suporte que fornece estabilidade térmica e mecânica, rigidez e grande eficiência na separação cromatográfica. Porém, apesar da sílica ser o melhor suporte cromatográfico para fases estacionárias, ela apresenta duas grandes limitações. A primeira restringe a sua utilização em uma faixa de pH de 2 até 8 para que não ocorra degradação; a segunda corresponde a presença de grupos silanóis residuais (SILVA et al., 2004).

As interações iônicas prejudiciais que ocorre entre os peptídeos e os grupos silanóis residuais da coluna levam a uma separação insuficiente além de uma assimetria de pico quando amostras básicas são analisadas (ABBOOD et al., 2009). Então, para se analisar diferentes compostos, incluindo os básicos, em uma ampla faixa de pH com considerável estabilidade química, alguns melhoramentos para as fases quimicamente ligadas do tipo C_8 e C_{18} fez-se através da reação de capeamento ou bloqueio dos grupos silanóis residuais, obtendo com isto, ganhos significativos na eficiência, estabilidade e reprodutibilidade da coluna (SILVA et al., 2004).

Os detectores utilizados na CLAE oferecem uma ampla faixa de aplicação. Dentre eles os mais empregados são: detector por absorbância no ultra-violeta visível (UV-Vis), por fluorescência, por índice de refração, por condutividade elétrica e eletroquímico (BISINOTI e JARDIM, 2004).

Um dos grandes problemas encontrados na técnica analítica para a determinação dos aminoácidos plasmáticos é a necessidade de adição de padrão, a fim de minimizar o efeito de matriz tornando possível e confiável a quantificação dos aminoácidos (BISINOTI e JARDIM, 2004). Este método é empregado quando se é difícil ou impossível preparar um branco da matriz sem a presença da substância de interesse. Então, quantidades conhecidas da substância são adicionadas em diferentes níveis numa matriz da amostra, antes do procedimento de preparo da amostra, que já contenha quantidades (desconhecidas) da substância. A amostra sem adição do padrão e cada uma das amostras com o padrão adicionado devem

ser analisadas e as quantidades medidas relacionadas com a quantidade adicionada (RIBANI et al., 2004).

Muitas áreas possuem interesse na análise de compostos encontrados em fluidos biológicos, principalmente no soro, plasma e urina. A análise cromatográfica destes compostos requer um pré-tratamento da amostra. As razões para isto são inúmeras devido à complexidade das matrizes biológicas, a existência de proteínas que são incompatíveis com a coluna cromatográfica e a concentração a ser analisada, no nível de traço (QUEIROZ, COLLINS e JARDIM, 2001).

As técnicas de extração e/ou pré-concentração das amostras são necessárias para que a análise das amostras de interesse se torne possível, sendo que, o objetivo final seja obter uma sub-fração das amostras final enriquecidas com as substâncias de interesse analítico, de forma que se obtenha uma separação cromatográfica livre de interferentes, com uma adequada detecção e um tempo razoável de análise. A eficiência de extração (recuperação) é avaliada conforme as características de cada analito, como seu pKa, coeficiente de partição e estabilidade no meio de extração (QUEIROZ, COLLINS e JARDIM, 2001).

Um procedimento importante nos processos de extração consiste na adição de concentração conhecida de padrão interno. Determinam-se a relação entre as áreas fornecidas pela amostra e padrão interno, eliminando deste modo, erros decorrentes da extração. O padrão interno deve possuir propriedades químicas similares ao composto de análise, apresentar tempo de retenção semelhante e não interferir na análise (CAUSON, 1997).

Os aminoácidos não são detectáveis por técnicas espectroscópicas (UV-Vis e fluorimetria); um procedimento químico para derivatização (figura 2) destes é necessário para então ser detectado por UV-Vis ou fluorescência. Os grupos amino e carboxílico pertencente aos aminoácidos são alvos para a reação de derivatização, mas a maioria dos métodos tem sido desenvolvido para a função amino (HUBER, ALMEIDA e FÁTIMA, 2008).

O reagente de derivatização orto-ftalaldeído (OPA) (figura 2A) reage em um curto período de tempo com os aminoácidos primários (figura 2C) para formar isoindoles (figura 2D) altamente fluorescentes, porém instáveis, sendo que o OPA não reage com aminoácidos secundários (SCHUSTER, 1988).

Juntamente com o OPA é recomendado o uso de substâncias que possuem em sua estrutura o componente sulfidril, como por exemplo, 2-mercaptoetanol (2-ME) (figura 2B), 3- ácido mercaptopropiônico (3-MPA) ou sulfito de sódio, os quais favorecerão a formação de adutos hidrofóbicos do OPA com os aminoácidos primários (KRASNOVA, KARTSOVA e CHERKAS, 2000).

Figura 2. Reação de derivatização

Após a formação de derivativos, a separação dos aminoácidos ocorre através de uma coluna de fase reversa (BIDLINGMEYER, COHEN e TARVIN, 1984). Meek, 1980 observou que a introdução de uma fase reversa na CLAE melhorava o tempo de retenção dos aminoácidos. Isto ocorria devido à interação entre a cadeia de hidrocarbonetos da fase estacionária e os peptídeos a serem separados, pois quanto maior for a hidrofobicidade da substância em análise mais fortemente retido o mesmo é pela coluna.

Dois grupos de pesquisadores demonstraram uma metodologia analítica para a determinação de aminoácidos e outros compostos endógenos através da CLAE-RP, utilizando modo de eluição isocrática, precipitação protéica com metanol, derivatização com OPA-2-ME ou sulfito de sódio (Tabela 2). Porém, o primeiro grupo utilizou detecção eletroquímica e o segundo grupo detecção por fluorescência (KRASNOVA, KARTSNOVA e CHERKAS, 2000; TCHERKAS e DENISENKO, 2001).

Bartolomeo e Maisano (2006) conseguiram determinar aminoácidos empregando norvalina como padrão interno, e OPA como reagente derivatizante. A determinação foi através da CLAE-RP, acoplado ao detector de UV-Vis. Através do modo gradiente utilizaram como fase móvel (A) 40 mM de fosfato de sódio ajustado para o pH de 7,8 com hidróxido de sódio, enquanto a fase móvel (B) foi acetonitrila, metanol e água (45:15:10, v/v/v).

Pi et al. (2000) desenvolveram uma metodologia analítica para a determinação de L-arginina e seus metabólitos metilados em plasma humano, urina

e tecidos de ratos. A extração destes compostos foi através de uma resina de troca-catiônica. Após extração da amostra, foi utilizado um derivatizante fluorescente, seguido de uma separação através do sistema de CLAE, no modo isocrático. Foi utilizado detector de fluorescência.

Fekkes et al. (1995) reproduziram um método automatizado para a determinação de 40 aminoácidos fisiológicos através da CLAE-RP com detector fluorescente. Para a precipitação das amostras utilizaram ácidos 5-sulfosalicílico e derivatização pré-coluna com OPA. Pode-se observar um resumo destes métodos analíticos na Tabela 2.

Para o desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou até mesmo implementação de método conhecido, é necessário todo um processo de avaliação que estime sua eficiência durante a rotina laboratorial. Esse processo é denominado de validação. Entretanto, determinado método é considerado validado se suas características encontrarem-se conforme pré-requisitos estabelecidos (BRITO et al., 2003).

Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso proposto. Assim, órgãos como International Conference on Harmonisation (ICH), International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), International Standard Organization (ISO), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) e outros, exigem a validação de métodos analíticos como um requisito fundamental no credenciamento para a qualidade assegurada e demonstração de competência técnica (RIBANI et al., 2004).

Tabela 2. Resumo de métodos analíticos na determinação de aminoácidos e outros compostos em matrizes biológicas

Analitos	Matriz	Método	Autores
Glutamato, asparagina, serina, glutamina, histidina, taurina, alanina, arginina, metionina, isoleucina, ornitina, leucina, fenilalanina, lisina e triptofano	Soro humano	CLAE/eletroquímico (+0,75) Coluna: Spherisorb ODS-2 Tempo de análise: 80 min	Krasnova, Kartsnova e Cherkas (2000)
homocisteína, cisteína, glutamato, aspartato, serina, glicina e asparagina	Plasma humano	CLAE/fluorescência (λ_{em} 450 nm e λ_{ex} 340 nm) Coluna : Spherisorb ODS-2 Tempo de análise: 30 min	Tcherkas e Denisenko (2001)
aspartato, asparagina, glutamato, glicina, arginina, alanina, leucina, lisina, fenilalanina	Proteínas bioanalíticas Fab recombinante e soro albumina bovina	CLAE/UV-Vis ($\lambda = 338$ nm) Coluna: Zorbax Eclipse AAA Tempo de análise: 26 min	Bartolomeo e Maisano (2006)
L-arginina e metabólitos metilados	Plasma humano, urina e tecidos de ratos	CLAE/fluorescência (λ_{em} 455 nm e λ_{ex} 340 nm) Coluna: ODS column Tempo de análise: 25 min	Pi et al. (2000)
40 aminoácidos fisiológicos	Plasma humano	CLAE/fluorescência (λ_{em} 452 nm e λ_{ex} 337nm) Coluna: Spherisorb ODS-2 Tempo de análise: 49 min	Fekkes et al. (1995)

λ_{em} : comprimento de emissão; λ_{exc} : comprimento de excitação;

Portanto, esta pesquisa teve como propósito desenvolver, otimizar e validar uma metodologia analítica que apresentasse confiabilidade, rapidez, sensibilidade e seletividade para a determinação dos aminoácidos: serina, glicina, arginina, lisina, glutamato e aspartato através da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de fluorescência, para que possa ser aplicada em pesquisas que avaliem níveis de aminoácidos em plasma de indivíduos portadores de transtornos mentais e outras patologias neurológicas.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

1. Desenvolver uma metodologia analítica através da cromatografia líquida de alta eficiência acoplado ao detector de fluorescência para a determinação simultânea dos aminoácidos: serina, glicina, arginina, lisina, glutamato e aspartato, em plasma.
2. Validação da metodologia analítica desenvolvida atendendo aos parâmetros exigidos pela Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes e Solventes

Os solventes utilizados como constituintes da fase móvel (acetonitrila), grau cromatográfico, obtidos da J.T. Baker[®] (New Jersey, USA).

O reagente utilizado na preparação da solução-tampão da fase móvel foi acetato de sódio obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha) e ácido acético glacial, empregado para o ajuste do pH da fase móvel.

Para o processo de precipitação protéica o solvente orgânico acetonitrila grau cromatográfico da Merck (Darmstadt, Alemanha) e o ácido 5-sulfosalicílico da Merck (Darmstadt, Alemanha).

Os constituintes da solução de derivatização foram o orto-ftalaldeído (OPA) e 2-mercaptoetanol (2-ME) obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Metanol, grau cromatografia da empresa J.T.Baker[®] (New Jersey,USA). Borato de sódio decahidratado, grau p.a., e cloreto de sódio para ajuste do pH desta solução foram empregados da empresa Synth (São Paulo, Brasil).

3.1.2 Sistema Cromatográfico

O sistema cromatográfico utilizado foi um cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Shimadzu – Modelo SCL - 10A vp (Kyoto, japão), composto por uma bomba de duplo pistão, modelo LC-10- AD-vp, um injetor Rheodyne (Cotati, EUA), modelo 7125, com amostrador de 20µL.

Os detectores utilizados durante a otimização do método foram um detector de fluorescência modelo RF-551 (Shimadzu, Columbia, EUA) operando em um comprimento de excitação/emissão de 340 nm e 450 nm, respectivamente. Um detector por absorbância no UV-Vis modelo SCL-10A vp (Shimadzu, Columbia, EUA) operando em 338 nm, com um detector de arranjo de diodo modelo SPD-M10A vp (Shimadzu, Columbia, EUA).

Os cromatogramas foram obtidos através do integrador modelo C-R8A (Shimadzu, Columbia, EUA).

3.1.3 Outros equipamentos

A desgaseificação da fase móvel foi em ultra-som T 50 (Thornton Inpec Eletrônica LTDA, Brasil) e bomba à vácuo (Marconi, Art Lab., Brasil) através de uma membrana 0,45 µm (Millipore®), acoplado em sistema de filtração Ultra-Ware (Millipore®). Também foi empregado um pHmetro VWR Scientific modelo 8005 (ATI Orion Research, EUA) para medição do pH das soluções-tampão.

A centrifugação das amostras foi na centrífuga Excelsa II (Fanem, São Paulo, Brasil), além do mixer Marconi (São Paulo, Brasil).

Um forno para a coluna foi utilizado modelo CTO-10AS vp (Shimadzu, Columbia, EUA).

3.1.4 Coluna cromatográfica

Para a resolução dos aminoácidos foi utilizada a coluna de fase reversa LiChrospher® 100 RP-18 em LiChroCART® (125 mm x 4 mm, *d.i*) obtida da Merck (Darmstadt, Alemanha).

A coluna é constituída por um material de enchimento não polar, recobrindo partículas de sílica de 5 µm de diâmetro.

Para análise de amostras de plasma utilizou-se coluna de guarda LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) em LiChroCART® (4 mm x 4 mm, *d.i*) da Merck (Darmstadt, Alemanha).

3.2 Preparação de soluções e reagentes

3.2.1 Preparação das soluções padrão

Uma única solução estoque contendo os aminoácidos: serina (Ser), glicina (Gly), arginina (Arg), lisina (Lys), glutamato (Glu) e aspartato (Asp), os quais foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St.Louis, USA), foi preparada na

concentração inicial de 480 $\mu\text{mol/L}$ em água milli-Q (Milford, MA, EUA). A partir desta solução foi preparada uma solução de trabalho na concentração de 480 nmol/L e, então, a partir desta última foi preparada soluções de uso por diluição no mesmo sistema, nas concentrações de 9,6; 16; 24; 48; 96; 192; 288 e 384 (pmol/mL) de plasma. Solução-padrão de norvalina (NV) também adquirida da Sigma-Aldrich (St.Louis, USA) e utilizada como padrão interno da análise (Figura 3), foi preparada na concentração de 400 pmol/L em água. Todas as soluções foram estocadas a -20°C e protegidas da luz durante todo o processo.

Figura 3. Estrutura da norvalina, utilizada como padrão interno

3.2.2 Preparação dos reagentes

3.2.2.1 Preparação do tampão acetato pH 7,0

Preparou-se uma solução 0,1 M de acetato de sódio (82,03 g CH_3COONa / litro água). Em seguida, o pH desta solução foi ajustado a 7,0 com ácido acético glacial (1,5 mL de ácido acético/ litro água).

3.2.2.2 Preparação do tampão borato pH 9,6

Preparou-se uma solução 0,1 M de borato de sódio decahidratado (0,0201g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ / mL água). Em seguida, o pH desta solução foi ajustado a 9,6 com uma solução 12 M de hidróxido de sódio (30 μL NaOH /mL água).

3.2.2.3 Preparação do derivatizante

Inicialmente foi preparado soluções destes componentes separadamente. Uma solução de 0,4 M de orto-ftalaldeído (0,054 g OPA/ mL metanol) e, em seguida, uma solução de 2-mercaptoetanol (20 µL 2-ME/ mL metanol). Ambas as soluções foram estocadas a -20 °C e protegidas da luz.

Então, a solução derivatizante OPA /2-ME foi preparada, de acordo com alguns métodos publicados anteriormente (Krasnova, Kartsova e Cherkas, 2000; Tcherkas e Denisenko, 2001; Tcherkas, Kartsova e Krasnova, 2001) com poucas modificações. Foi utilizado 20 µL de 0,4 M da solução estoque de OPA (estocado a -20 °C) e foi misturado com 30 µL de 2-ME e 150 µL de 0,1 M de tampão borato (pH 9,6). Esta solução derivatizante permanecia protegida da luz.

3.3 Obtenção do *pool* de plasma

Para a otimização da metodologia analítica foi utilizado *pool* de plasma de voluntários sadios, doado pelos alunos e funcionários do laboratório de análises toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e, armazenado a -20 °C até o momento em que foi utilizado.

3.4 METODOLOGIA

A metodologia desenvolvida para a extração dos aminoácidos a partir do plasma de voluntários sadios foi desenvolvida baseando-se nos métodos propostos por Krasnova, Kartsova e Cherkas (2000), Tcherkas e Denisenko (2001), Tcherkas, Kartsova e Krasnova (2001), com menores modificações.

Os aminoácidos foram extraídos pela técnica de precipitação protéica. Para isto, foi utilizado 100 µL de “pool” de plasma fortificado com 20 µL de padrão dos aminoácidos (pmol/mL), 20µL de norvalina e, 200 µL de acetonitrila. O eppendorf foi agitado em mixer por 1 minuto para homogeneização dos analitos com o plasma e após, a amostra foi centrifugada a 4 °C em 15 000g por 15 minutos.

Foi alíquotado 20 µL do sobrenadante o qual foi transferido para um eppendorf e então, acrescentado 30 µL da solução de OPA/2-ME e 150 µL de 0,1 M de tampão borato (pH 9,6) para a derivatização da amostra. Após ter sido mantido

em temperatura ambiente por 3 minutos foi injetado 20 μ L desta solução no cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector por fluorescência. O esquema encontra-se a seguir:

Figura 4. Extração das amostras por precipitação proteica

3.5 Parâmetros utilizados na validação da metodologia

A validação de um método analítico deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003). Para isto, assegura a confiabilidade dos resultados da análise, sendo um aspecto vital da garantia da qualidade analítica (BARROS, 2002).

Para isto, parâmetros analíticos são determinados com respeito à linearidade, especificidade, precisão intra e inter-ensaio, exatidão, limite de quantificação, estabilidade e recuperação, sendo que para determinar estes parâmetros de validação, estes devem ser realizados em equipamentos adequadamente calibrados e que estejam funcionando adequadamente (CHASIN et al., 1998).

Os parâmetros avaliados durante a validação da metodologia foram os recomendados pela resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que disponibiliza um guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.

3.5.1 Linearidade

É a capacidade que o método tem em demonstrar que os resultados analíticos obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (NUNES et al., 2007).

A relação matemática que explica esta relação pode ser expressa pela equação da reta (PENG e CHIOU, 1990):

$$y = ax + b,$$

Em que:

- (a) corresponde à inclinação da reta e,
- (b) à intersecção da curva no eixo (y)

De acordo com a Resolução 899/2003 da ANVISA, recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações e o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser igual a 0,99.

Para a determinação deste parâmetro foram determinadas em triplicata as concentrações de 9,6; 24; 48; 96; 192 (pmol/mL).

3.5.2 Recuperação

A recuperação reflete a quantidade do analito recuperado durante um processo de extração em relação à quantidade real presente na amostra (BRIGUENTI e BONATO, 2005). É o parâmetro de validação mais utilizado nos processos analíticos (BRITO et al., 2003).

Este parâmetro analítico deve ser avaliado na faixa de concentração esperada para o composto de interesse. Isto pode ser feito adicionando a substância em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo, próximo ao limite de quantificação, próximo à concentração máxima permitida pelo método em teste e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método (RIBANI et al., 2004).

Foi empregado o método de adição padrão pois não foi possível obter a matriz isenta do analito. Amostras de plasma fortificadas com padrão dos aminoácidos nas concentrações de 9,6, 24, 48 e 192 pmol/mL (n = 2 para cada concentração) foram submetidas sob o procedimento de extração.

Este parâmetro é expresso em porcentagem da quantidade medida da substância em relação à quantidade adicionada na matriz, multiplicando este valor por 100.

$$\% \text{ da recuperação} = \frac{\text{K curva extraída}}{\text{K curva seca}} \times 100$$

3.5.3 Limite de Detecção

O limite de detecção representa a menor concentração da substância em exame a qual pode ser detectada mas não necessariamente quantificada, utilizando para isto um determinado procedimento experimental (RIBANI et al., 2004). O limite

de detecção foi determinado através da análise da matriz biológica contendo concentrações decrescentes dos padrões de aminoácidos (192, 96, 24, 9,6, 7,68, 4,56, 3,84 e 1,92 pmol/mL) até o menor nível detectável e, calculado baseando-se em parâmetros da curva analítica.

3.5.4 Limite de Quantificação

O limite de quantificação é a menor concentração do analito de interesse (Barros, 2002) que possa ser quantitativamente determinado com valores de precisão e exatidão, menores que 20%, em condições experimentais definidas (POMMIER, SIOUFI e GODBILON, 1997; LEMOS, SANTOS e SANTOS, 2010).

O limite de quantificação foi determinado através da análise da matriz biológica contendo concentrações decrescentes dos padrões de aminoácidos (192, 96, 24, 9,6, 7,68, 4,56, 3,84 e 1,92 pmol/mL) até o menor nível quantificável, com coeficiente de variação e erro relativo menores que 20%

3.5.5 Precisão e Exatidão

A precisão representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea, sob condições analíticas definidas (ESTEBAN, RODRIGUES e NASCIMENTO, 2007). É expressa em porcentagem do coeficiente de variação ou desvio padrão relativo das medidas das replicatas (CAUSON, 1997).

A exatidão corresponde à proximidade dos resultados obtidos pela metodologia estudada em relação ao valor verdadeiro. É expressa em porcentagem de erro sistemático (BRASIL, 2003).

A precisão e a exatidão do método desenvolvido foram verificadas através de estudos intra e inter-ensaio. Foram avaliadas três níveis de concentração plasmática, alta, média e baixa (9,6, 96 e 192 pmol/mL).

Para a análise da precisão e exatidão interensaio foram considerados os resultados das análises de cinco alíquotas para cada concentração de 9,6, 96 e 192 pmol/mL (n=15), durante três dias consecutivos.

Para o estudo da precisão e exatidão intraensaio foram analisadas durante um mesmo dia, nas mesmas condições cromatográficas e pelo mesmo analista em quintuplicata para os três níveis de concentração (n=5).

O valor numérico usado para quantificar a precisão é o desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV):

$$CV = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

Em que:

DP= (desvio padrão)

CMD= (concentração média determinada)

Sendo que o valor máximo aceitável depende do tipo de metodologia empregada, da concentração do analito na amostra, o tipo de matriz, finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 15%, exceto para o limite de quantificação (BRASIL, 2003).

A exatidão intra e inter-ensaio também foram avaliados utilizando os resultados experimentais obtidos na precisão. As respostas obtidas foram expressas em porcentagem de erro sistemático:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

Os valores de exatidão aceitos não devem exceder 15%, exceto para o limite de quantificação, para o qual se admite valores iguais ou menores a 20% (BRASIL, 2003).

3.5.6 Estabilidade

A estabilidade é o parâmetro analítico que visa determinar se um analito mantém-se quimicamente inalterado, numa dada matriz sob condições específicas, em determinados intervalos de tempo (BRASIL, 2003). A estabilidade de

substâncias endógenas em fluidos biológicos depende de suas propriedades químicas, da matriz biológica e das condições de acondicionamento utilizadas (INMETRO, 2003). Neste estudo foi determinado a estabilidade de longa duração que avalia o tempo em que o analito permanece na matriz biológica, quando esta é submetida à -20 °C.

3.5.7 Especificidade

É a habilidade do método bioanalítico de medir e diferenciar o analito de componentes que possam estar presente na amostra. Os interferentes podem ser componentes da matriz biológica, metabólitos, produtos de decomposição e medicamentos utilizados concomitantemente ao estudo (BRASIL, 2003).

Este parâmetro é o primeiro a ser avaliado para o desenvolvimento e validação de um método analítico, devendo ser reavaliado continuamente durante o uso do método e validação, pois se a seletividade não estiver assegurada haverá comprometimento da linearidade, exatidão e precisão do método analítico (SILVA et al., 2010).

Então a seletividade foi verificada avaliando-se outros fármacos que poderiam estar presentes nas amostras dos pacientes, tais como: lorazepam, diazepam, clonazepam, alprazolam, haloperidol, levomepromazina, propranolol, ranitidina, fluoxetina, olanzapina, carbamazepina, diclofenaco, amiodarona e sulfametoxazol.

Para tanto, alíquotas de solução-padrão de cada fármaco foram submetidas ao mesmo procedimento de análise que as amostras de plasma, sendo após, injetadas individualmente e analisadas. A este mesmo procedimento foram avaliadas quatro amostras de indivíduos normais, uma amostra lipêmica e uma hemolisada, para observação de possíveis interferentes que pudessem comprometer a determinação dos aminoácidos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização da metodologia

4.1.1 Otimização do processo de precipitação proteica

Neste processo foram avaliados o uso do ácido 5-sulfossalicílico e do solvente orgânico, acetonitrila, para a desproteínização do plasma.

Porém, com o emprego do ácido 5-sulfossalicílico foi evidenciado uma baixa resolução cromatográfica entre os aminoácidos aspartato e glutamato. Além disto, o sobrenadante obtido como é uma solução ácida necessita ser neutralizado para não diminuir a precisão do método. Então, a fim de evitar este estágio adicional de neutralização e obter uma melhor resolução cromatográfica foi empregado o solvente orgânico acetonitrila para a precipitação proteica.

A precipitação proteica com acetonitrila foi realizada acrescentando 200 µL deste solvente orgânico em 100 µL de “pool” de plasma, 20 µL de padrão de aminoácidos e 20 µL de norvalina (padrão interno), submetido à centrifugação a 4 °C em 15000g por 15 minutos.

O uso de uma temperatura mais baixa (4 °C), assim como, uma maior rotação e um tempo maior de centrifugação contribuiu para a obtenção de um sobrenadante mais límpido quando comparado inicialmente com uma centrifugação a 25 °C a 6000g por 5 min, ratificando o relatado por Junior e Francisco (2006) os quais ressaltaram a importância de uma temperatura baixa quando se realiza precipitação protéica empregando solvente orgânico.

Assim, no presente trabalho, a precipitação protéica através do solvente orgânico acetonitrila à uma temperatura baixa foi o ideal para se obter uma boa resolução cromatográfica.

4.1.2 Otimização da detecção dos analitos

A detectabilidade do detector acoplado no cromatógrafo líquido de alta eficiência foi um importante parâmetro avaliado neste estudo, já que os aminoácidos

encontram-se em baixas concentrações nos extratos de tecidos e fluidos extracelulares do cérebro.

Pela razão dos aminoácidos não serem detectados se não sofrerem modificação em seu rearranjo molecular, os mesmos devem ser convertidos em derivativos através do emprego de reagentes derivatizantes. Desta forma, a cromatografia ofereceu seletividade na análise, enquanto a derivatização ofereceu a detectabilidade, seletividade, sensibilidade e um menor tempo de análise.

O estudo proposto empregou OPA, sendo este, o reagente de derivatização mais empregado na determinação de aminoácidos primários em plasma oferecendo alta sensibilidade, velocidade, simplicidade e confiabilidade (TCHERKAS, KRASNOVA e KARTSOVA, 2001).

A desvantagem deste reagente é a instabilidade dos derivativos isoindoles formados em temperatura ambiente sendo necessário limitar seu tempo de reação (RABOUAN et al., 2003). Neste contexto, para se conseguir uma reprodutibilidade alta o derivativo formado permaneceu exatamente por 3 minutos em temperatura ambiente.

Hess (2012) afirma que a detecção por UV-Vis ou fluorescência são métodos tradicionalmente estabelecidos, e que o grande sucesso da detecção por UV-Vis ou fluorescência é essencialmente a separação da linha de base de todos os aminoácidos.

Como os aminoácidos apresentam estruturas químicas muito semelhantes entre si, foi utilizado um sistema capaz de realizar eluições gradiente com elevada precisão a fim de obter uma resolução cromatográfica ideal.

Para a determinação simultânea dos aminoácidos foi seguido às condições analíticas, com menores modificações (Tabela 3):

Tabela 3. Otimização das condições analíticas para detector UV-Vis

Coluna	LiChroCART 100 RP-18 (125 mm x 4,6 mm, 5 µm)
Fase Móvel	(A) 10 mM tampão fosfato (pH7,0) e (B) Acetonitrila (80:20, v/v)
Eluição	Gradiente
Vazão	1 mL/minuto
Deteção	254 nm
Forno	26 °C
Volume	20 µL

O perfil cromatográfico obtido seguindo as condições analíticas da Tabela 3, não apresentou uma boa reprodutibilidade. O detector UV-Vis não determinou alguns dos aminoácidos quando na concentração de 24 $\mu\text{mol/L}$ de plasma.

Bidlingmeyer, Cohen e Tarvin (1984) quando utilizaram CLAE com detector UV-Vis em comprimento de onda de 254 nm, conseguiram sensibilidade na faixa de pmol/L. As condições analíticas utilizadas foram: coluna Pico-Tag, um sistema de solventes com (A) 0,14M tampão acetato de sódio com 0,5 mL/L trietanolamina (B) 60% acetonitrila em água. Temperatura da coluna controlada com $\pm 1^\circ\text{C}$, porém o reagente de derivatização continha fenilisotiocianato.

Schuster (1988) determinou aminoácidos primários em amostras biológicas através da derivatização pré-coluna com OPA-2ME seguido pela detecção em UV-Vis com comprimento de onda de 338 nm, e obtiveram um limite de detecção na faixa de 2 – 5 pmol. Empregaram coluna Hypersil ODS, 5 μm (20 cm x 4,6 mm, I.D) e como sistema de fase móvel tampão acetato e acetonitrila, porém o tempo de separação dos aminoácidos foi de 60 minutos.

Neste mesmo trabalho, Schuster também utilizou detector de fluorescência com comprimento de excitação/emissão de 230 nm e 455 nm, respectivamente, para a determinação de aminoácidos primários e obteve uma melhor sensibilidade.

Neste contexto foi empregado detector de fluorescência, seguindo as condições analíticas e diferentes modos gradientes encontrados na Tabela 4:

Tabela 4. Otimização das condições analíticas para detector de fluorescência

Condições analíticas	
Coluna	LiChroCART 100 RP-18 (125 mm x 4,6 mm, 5µm)
Fase Móvel	(A) 10 mM tampão acetato (pH 7,0) (B) Acetonitrila e água (70:30, v/v)
Vazão	1 mL/minuto
Deteção	excitação 340 nm, emissão 450 nm
Forno	26 °C
Modo Gradiente	
Modo gradiente (1)	0 min - 18% B
	2 min - 25% B
	5 min - 57% B
	8 min - 75% B
	15 min - 100% B
	20 min - 85% B
Modo gradiente (2)	0 min - 40% B
	10 min - 55% B
	14 min - 75% B
	18 min - 100% B

O cromatograma obtido com as condições analíticas da Tabela 4 e o modo gradiente (1) não permitiu a separação dos aminoácidos os quais apresentavam uma estrutura química semelhante, como é o caso do aspartato e glutamato nem a eluição do padrão interno da análise após 45 minutos de corrida de separação. Acredita-se que seria necessário aumentar a força da fase móvel, ou seja, aumentar a porcentagem de solvente orgânico (acetonitrila) em água, no início da corrida, a fim de promover a separação dos analitos e posteriormente a eluição do padrão interno.

Mantiveram-se as condições analíticas da Tabela 4 utilizando o modo gradiente (2). A Figura 5 representa o branco de plasma sem a presença do padrão interno, enquanto a Figura 6 representa o cromatograma referente a análise de plasma adicionado de padrão interno.

Figura 5. Cromatograma referente à análise do branco de plasma humano. Condições cromatográficas: coluna LiChroCART (5 μ m) (125 mm x 4,6 mm I.D.); eluente, tampão acetato de sódio 0,1 mol/L (pH 7,0, A) e acetonitrila e água (B), na proporção 70:30, respectivamente; vazão da fase móvel, 1ml/minuto; temperatura, 26 °C; detecção fluorimétrica (excitação 340 nm, emissão 450 nm); volume de injeção, 20 μ L. O modo gradiente (2) encontra-se na Tabela 4.

Figura 6. Cromatograma referente à análise de amostra de plasma fortificado com padrão de Ser, Gly, Arg, Lys, Glu e Asp na concentração de 192 pmol/mL e norvalina (padrão interno) na concentração de 200 pmol/mL. Condições cromatográficas: coluna LiChroCART (5 μ m) (125 mm x 4,6 mm I.D.); eluente, tampão acetato de sódio 0,1 mol/L (pH 7,0, A) e acetonitrila e água (B), na proporção 70:30, respectivamente; vazão da fase móvel, 1ml/minuto; temperatura, 26 °C; detecção fluorimétrica (excitação 340 nm, emissão 450 nm); volume de injeção, 20 μ L. O modo gradiente (2) encontra-se na Tabela 4.

Pode-se observar uma boa resolução cromatográfica entre os aminoácidos e o padrão interno. O tempo de retenção dos aminoácidos assim como da norvalina encontra-se na Tabela 5.

Tabela 5. Tempo de retenção dos aminoácidos e padrão interno da análise

Aminoácidos	Tempo de retenção (minutos)
Glutamato	2,9
Aspartato	3,7
Serina	8,2
Glicina	9,3
Arginina	10,5
Lisina	17,3
Norvalina	14,5

Este comportamento cromatográfico dos aminoácidos deve-se às propriedades de seus grupos R, em particular, suas polaridades ou tendências em interagir com a água em pH biológico (próximo ao pH 7,0), sendo que a polaridade dos grupos R varia amplamente, desde apolares e hidrofóbicos (insolúveis em água) a altamente polares e hidrofílicos (solúveis em água) (Nelson e Cox, 2011).

Tabela 6. Propriedades dos aminoácidos conforme grupamento R.

Propriedade do grupamento R	Aminoácidos
apolar, alifático	Glicina
polar, não carregado	Serina
carregado positivamente (básicos)	Lisina e arginina
carregado negativamente (ácidos)	Aspartato e glutamato
aromático	Triptofano

Conforme Nelson e Cox (2011) relataram, cada grupamento R dos aminoácidos possui um valor correspondente à constante de equilíbrio (pK) o qual é fornecido pela curva de titulação, sendo o mesmo significativamente afetado pelo ambiente químico, ou seja, a carga do aminoácido varia conforme o pH da solução (Tabela 7). Neste estudo, o pH da fase móvel adequado para a determinação dos aminoácidos foi pH 7,0.

Tabela 7. Valores do ponto isoelétrico dos aminoácidos.

Aminoácido	pK1	pK2	pK3 (pKR)	pHi
Glutamato	2,19	4,25	9,67	3,22
Aspartato	1,88	3,65	9,60	2,77
Serina	2,21	9,15	-	5,68
Glicina	2,34	9,60	-	5,97
Arginina	2,17	9,04	12,48	10,76
Lisina	2,18	8,95	10,53	9,74

Este fato se explica porque quando em soluções com pH baixo, ocorre protonação do grupo amina originando um cátion (figura 7A). Em soluções com pH elevado, apenas o grupo ácido se encontra desprotonado, ficando assim o aminoácido com carga negativa (figura 7C). Em soluções em que a extensão da protonação é igual à extensão da desprotonação é designando ponto isoelétrico. O ponto isoelétrico corresponde à situação em que o grupo amino está protonado e o grupo carboxila não, tornando a molécula eletricamente neutra (figura 7B).

Figura 7. Aminoácido: (A) forma catiônica; (B) forma neutra; (C) forma aniônica.

Os aminoácidos com grupo R ionizável possuem curvas de titulação mais complexas, ou seja, envolvem três estágios de ionização, portanto, possuem três valores de pKs, neste caso para determinar o ponto isoelétrico do aminoácido é necessário fazer uma média aritmética dos pKs adjacentes (Nelson e Cox, 2011).

4.2 Validação da metodologia desenvolvida

4.2.1 Linearidade

A linearidade do método para todos os aminoácidos compreendeu a faixa de 9,6 pmol/mL a 192 pmol/mL de plasma e os valores do coeficiente de correlação (r) deste método, acima de 0,992.

Tcherkas, Kartsova e Krasnova (2001) determinaram aminoácidos em soro humano através da CLAE acoplado a um detector eletroquímico (+0,75) e obtiveram uma faixa linear de 5 a 300 mM de plasma.

As figuras de 8 a 13 representam as curvas de linearidade de cada aminoácido. O eixo X corresponde à concentração do analito expressa em pmol por mililitros de amostra de plasma e o eixo Y representa a razão área do padrão pela área do padrão interno.

Figura 8. Curva de linearidade da serina

Figura 9. Curva de linearidade da glicina

Figura 10. Curva de linearidade da arginina

Figura 11. Curva de linearidade da lisina

Figura 12. Curva de linearidade do aspartato

Figura 13. Curva de linearidade do glutamato

4.2.2 Recuperação

A recuperação dos aminoácidos individualmente foi obtida através da construção de uma curva não extraída (curva seca) e uma curva extraída.

A curva extraída foi obtida através do processo de precipitação proteica o qual representa ser simples, rápido e extremamente eficaz.

Os valores de recuperação encontrados no método desenvolvido mantiveram-se entre 70% a 82%, conforme podemos observar na Tabela 8.

Conforme a RE 899/2003, porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximo a 100% são desejáveis, porém, admitem-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata.

Chasin e pesquisadores (1998) comentam que podem ser aceito valores de recuperação na ordem de 50-60%, porém a recuperação deve ser exata, precisa e reprodutível.

Tabela 8. Recuperação

Aminoácidos	Recuperação (%)	RSD (%)
Serina	71,5	2,9
Glicina	82,0	3,7
Arginina	77,5	4,0
Lisina	75,5	7,9
Glutamato	70,5	5,9
Aspartato	70,0	4,0

análises em duplicata; RSD, desvio-padrão relativo.

Este parâmetro avalia a eficiência do método de tratamento das amostras, extração, sendo expressa como porcentagem da quantidade conhecida de um analito (LEMOS, SANTOS e SANTOS, 2010).

É importante considerar como a eficiência do método varia em função da concentração da substância. Na maioria dos casos, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações (RIBANI et al., 2004).

4.2.3 Limite de Detecção

O limite de detecção estabelecido foi a concentração de 7,68 pmol/mL de plasma para todos os aminoácidos.

4.2.4 Limite de Quantificação

A menor concentração de aminoácidos na matriz biológica que o método quantificou e que correspondeu a valores de precisão e exatidão menores que 20% correspondeu à concentração de 9,6 pmol/mL para todos os aminoácidos determinados.

Tabela 9. Limite de quantificação

Concentração plasmática (pmol/mL)	Concentração obtida (pmol/mL)	Precisão CV, (%)	Exatidão (%)
9,6	9,1	4,2	5,2

4.2.5 Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão intraensaio variou de 3,6% a 5,3% e 3,1% a 8,3%, respectivamente, enquanto a precisão e exatidão inter-ensaio, variou de 3,6% a 7,1% e 3,1% a 11,4%, respectivamente. Os valores destes parâmetros estão condizentes com pesquisas anteriores (TCHERKAS e DENISENKO, 2001; FEKKES et al., 1995).

A precisão e exatidão determinam o erro de uma análise e são os critérios mais importantes para o julgamento do desempenho de um método analítico. A precisão reflete a variação dos resultados quando repetidas análises são feitas em uma mesma amostra, enquanto a exatidão é a concordância entre o valor real da substância na amostra e o estimado pelo processo analítico (BRIGUENTI e BONATO, 2005).

A Tabela 10 apresenta valores de precisão e exatidão, intra e inter-ensaio do método desenvolvido. Os valores de precisão e exatidão para todos os aminoácidos deste método encontram-se dentro dos limites aceitáveis, ou seja, abaixo de 15% conforme a literatura (BRASIL, 2003).

Tabela 10. Precisão e exatidão

	Intraensaio ^a			Interensaio ^b		
	Concentração (pmol/mL)	RSD ^c (%)	E ^d (%)	Concentração (pmol/mL)	RSD ^c (%)	E ^d (%)
9,6 pmol/mL						
Serina	9,0	5,1	-6,2	9,1	4,5	-5,2
Glicina	9,9	5,0	3,1	8,7	4,2	-9,3
Arginina	9,2	3,8	-4,1	10,1	3,9	5,2
Lisina	9,0	4,2	-6,2	8,9	7,1	-7,2
Glutamato	9,2	3,8	-4,1	8,9	7,1	-7,2
Aspartato	10,3	3,6	7,2	8,5	4,2	-11,4
96 pmol/mL						
Serina	92	3,8	-4,2	93	3,6	-3,1
Glicina	90	4,9	-6,2	91	4,0	-5,2
Arginina	91	4,2	-5,2	90	4,0	-6,2
Lisina	102	3,6	6,2	101	4,2	5,2
Glutamato	91	4,2	-5,2	89	4,8	-7,3
Aspartato	88	3,8	-8,3	90	4,8	-6,2
192 pmol/mL						
Serina	200	4,8	4,1	204	4,8	6,2
Glicina	180	3,7	-6,2	200	3,6	4,1
Arginina	202	5,3	5,2	179	7,1	-6,8
Lisina	207	3,9	7,8	201	7,1	4,7
Glutamato	184	4,2	-4,1	182	4,8	-5,2
Aspartato	181	3,7	-5,7	180	3,8	6,2

^aquintuplicata para cada concentração; ^banálises em três dias consecutivos; ^cdesvio-padrão relativo; ^derro relativo;

4.2.6 Estabilidade

Foi possível evidenciar através do estudo de estabilidade de longa duração que a estabilidade das amostras as quais foram conservadas a – 20 °C foi de 4 meses, o que é bastante desejável.

A estabilidade de congelamento e descongelamento também foi avaliada mensalmente por um período de 4 meses, apresentando igualmente resultados aceitáveis.

4.2.7 Especificidade

A seletividade foi avaliada a comparação do tempo cromatográfico do analito e das outras substâncias. Havendo a presença de algum interferente na amostra, este deve corresponder a 1/5 do valor do limite de quantificação da análise. Em caso de coincidir os tempos de retenção, é necessário submeter o interferente ao procedimento de extração para ser novamente analisado (CAUSON, 1997).

Este método instrumental de separação foi capaz de avaliar, de forma inequívoca, os aminoácidos em exame na presença de fármacos que pudessem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa como o plasma, não identificando possíveis interferentes durante os 18 minutos de corrida analítica, conforme a Tabela 11. Ainda, as amostras de pacientes normais, as amostras lipêmicas e hemolisadas, foram determinadas e nenhuma destas demonstrou possíveis interferentes que comprometeriam a análise simultânea dos aminoácidos no método.

Tabela 11. Especificidade

Fármaco	Concentração (mg/mL)	T_R (min)
Alprazolam	25	ND
Amiodarona	2500	ND
Carbamazepina	100	ND
Clonazepam	25	ND
Diazepam	100	ND
Diclofenaco	100	ND
Levomepromazina	250	ND
Lorazepam	250	ND
Fluoxetina	50	ND
Haloperidol	0,001	ND
Olanzapina	0,17	ND
Propanolol	100	ND
Ranitidina	100	ND
Sulfametoxazol	0,05	ND

ND = não detectado em um tempo de 20 minutos; T_R = tempo de retenção.

A determinação de aminoácidos em fluidos biológicos é um importante desafio para a bioquímica clínica e para a química analítica. A Cromatografia líquida de alta eficiência com coluna de fase reversa tem sido a técnica de separação mais empregada para análise de moléculas biológicas. Entretanto, poucos métodos analíticos tem descrito a determinação simultânea de aminoácidos.

Estudos relatam que para um número de diferentes doenças cerebrais, como a esquizofrenia, epilepsia, doença de Alzheimer e Parkinson ocorre uma pequena mudança na concentração dos aminoácidos encontrados nos fluidos biológicos, como o soro, plasma humano, urina, líquido amniótico e fluido espinhal, sendo necessário um método de alta sensibilidade para fornecer a determinação destes analitos (KRASNOVA, KARTSOVA e CHERKAS, 2000).

Neste contexto, é de extrema importância para a clínica o desenvolvimento de uma metodologia analítica confiável, eficiente, rápida, sensível e seletiva que determine simultaneamente aminoácidos como: serina, glicina, arginina, lisina, glutamato e aspartato através da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de fluorescência, para ser aplicada na rotina clínica e em futuras pesquisas na avaliação dos níveis de aminoácidos em plasma de pacientes com esquizofrenia, a fim de investigar até que ponto alguns aminoácidos encontram-se envolvidos com esta desordem psiquiátrica tão intrigante.

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

- A preparação da amostra foi simples e o método apresenta um curto tempo de análise o que torna o método particularmente adequado para análise de rotina em grande quantidade de amostras;
- A metodologia desenvolvida mostrou ser eficiente e sensível o suficiente para conseguir determinar concentrações significativas de aminoácidos, na faixa de picomols por mililitros em plasma;
- O método apresentou seletividade na determinação dos aminoácidos não sendo capaz de detectar possíveis interferentes oriundos de amostras plasmáticas nem mesmo de possíveis fármacos utilizados por pacientes com esquizofrenia;
- O método atende às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados pois os parâmetros analíticos encontram-se conforme o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos da RE nº 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA.

Neste contexto, é de extrema importância para a clínica o desenvolvimento de uma metodologia analítica confiável, eficiente, rápida, sensível e seletiva que determine simultaneamente aminoácidos como: serina, glicina, arginina, lisina, glutamato e aspartato através da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de fluorescência, para ser aplicada na rotina clínica e em futuras pesquisas na avaliação dos níveis de aminoácidos em plasma de pacientes com esquizofrenia, a fim de investigar até que ponto alguns aminoácidos encontram-se envolvidos com esta desordem psiquiátrica tão intrigante.

Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOOD, A.; SMADJA,C.; HERRENKNECHT,C.; ALAHMAD,Y.; TCHAPLA, A., TAVERNA, M. Retention mechanism of peptides on a stationary phase embedded with a quaternary ammonium group: a liquid chromatography study. **Journal Chromatography A**. 1216, p. 3244-3251, 2009.

ADAD, M.A.; CASTRO, R.; MATTOS, P. Aspectos neuropsicológicos da esquizofrenia. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. 22, supl (I), p. 31-34, 2000.

AFONSO, P. *Esquizofrenia: Conhecer a Doença*. Climepsi Editores, Lisboa, 2002.

ARARIPE NETO, A.G.A.A.; BRESSAN, R.A.; BUSATTO FILHO, G. Fisiopatologia da esquizofrenia: aspectos atuais. **Revista de Psiquiatria Clínica**, vol. 34, supl 2; pp. 198-203, 2007.

BARROS, C.B. Validação de Métodos Analíticos. **Biológico**. São Paulo, v.64, n.2, p.175-177, 2002.

BARTOLOMEU, M.P.; MAISANO, F. Validation of a reversed-HPLC method for quantitative amino acids analysis. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 17, p. 131- 137, 2006.

BIDLINGMEYER, B.A.; COHEN,S.A.; TARVIN,T.L. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. **Journal of Chromatography**, 336, pp. 93-104, 1984.

BISINOTI, M.C.; JARDIM, W.F. O emprego de técnicas analíticas na especiação de metais pesados e a sua importância para o estudo do ambiente. Caderno temático: volume 02, UNICAMP, 2004.

BRASIL, Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003, Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Diário Oficial União, ANVISA - Agência Nacional Agência Nacional de Vigilância Sanitária, on line, disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. Acesso em: 19.09.2011.

BRESSAN, R.A.; PILOWSKY, L.S. Hipótese glutamatérgica da esquizofrenia. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. São Paulo, v. 25, n.3, p. 5-7, 2003.

BRIGUENTI, A. C. C.; BONATO, P. S. Análise simultânea da mirtazapina e *N*-desmetilmirtazapina em plasma empregando a cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.4, pp. 429-435, 2005.

BRITO, N.M.; JUNIOR, O.P.M.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. Pesticidas: **Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

CARPES, M.J.S. *Síntese de análogos conformacionalmente restringidos do ácido aspártico e glutâmico*. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química. São Paulo: Universidade Estadual de Campinas, 1996.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: Viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 689, p. 175-180, 1997.

CHASIN, A.A.M.; NASCIMENTO, E.S.; RIBEIRO-NETO, L.M.; SIQUEIRA, M.E.P.B.; ANDRAUS, M.H.; SALVADORI, M.C.; FERNÍCOLA, N.A.G.; GORNI, R.; SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 11, p. 1-6, 1998.

DURSUN, S.M.; DEAKIN, J.F.W. Augmenting antipsychotic treatment with lamotrigine or topiramate in patients with treatment-resistant schizophrenia: a naturalistic caseseries outcome study. **Journal of Psychopharmacology**, v. 15, n.4, pp. 297 -301, 2001.

FEKKES, D.; DALEN, A.V.; EDELMAN, M.; VOSKUILEN, A. Validation of the determination of amino acids in plasma by high-performance liquid chromatography using automated pre-column derivatization with o-phthalaldehyde. **Journal of Chromatography B**, 669, p. 177-186, 1995.

ESTEBAN, C.; RODRIGUES, C.A.; NASCIMENTO, E.S. Determinação de tetraciclina em líquido sinovial de vacas com doença podal. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, 2007.

FUCHS, S.A.; SAIN-VAN der VELDEN, M.G.M.; BARSE, M.M.J.; ROELEVELD, M.W.; HENDRIKS, M.; DORLAND, L.; KLOMP, L.W.J.; BERGER, R.; KONING, T.J. Two mass spectrometric techniques for quantifying serine enantiomers and glycine in cerebrospinal fluid : potential confounders and age-dependent ranges. **Clinical Chemistry**, v. 54, n. 9, p. 1443-1450, 2008.

FREITAS, C.; LUIS, H.; FERREIRA, L. *Vivências dos pais enquanto cuidadores de um filho com esquizofrenia*. 2000. Dissertação (Especialização em Enfermagem de Saúde Mental e Psiquiátrica). Escola Superior de Enfermagem Maria Fernanda Resende, Lisboa, 2000.

GOFF, D.C.; COYLE, J.T. The emerging role of glutamate in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. **American Journal of Psychiatry**, v. 158, p.1367–1377, 2001.

GOMES, S.V.F. *Desenvolvimento de método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para diferenciação de genótipos de Lippia gracilis Schauer*. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2009.

HESS, S. A Universal HPLC-MS Method to Determine the Stereochemistry of Common and Unusual Amino Acids. **Biomedical and Life Sciences**, v. 828, p. 63-75, 2012.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, N. 5, 1170-1179, 2008.

INMETRO. *Guia para a Expressão da Incerteza da Medição*, 3ªed. Brasileira em Língua Portuguesa. Rio de Janeiro, p. 120, 2003.

JOHANN, R.V.O.; VAZ, C.E. Condições afetivas e de relacionamento interpessoal em homens portadores de esquizofrenia em tratamento com haloperidol ou clozapina. **Interação em Psicologia**, v.10, n. 1, p. 151-156, 2006.

JUNIOR FRANCISCO, W.E.; FRANCISCO, W. Proteínas: hidrólise, precipitação e um tema para o ensino de química. **Química Nova na Escola**, n. 24, novembro, 2006.

KAPLAN, H. I.; SADOCK, B. J. *Compêndio de Psiquiatria*. 9ª edição. Artes Médicas. Porto Alegre, 2007.

KRASNOVA, I.N.; KARTSNOVA, L.A.; CHERKAS, Y.V. Determination of amino acids in human blood serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography in the isocratic elution mode. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 55, p. 58-65, 2000.

KRUTER,B.; RITTER, F.; KAPCZINSKI, F. Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos. In: NETO, A.C.; GAUER, G.J.C.; FURTADO,N.R. **Psiquiatria para estudantes de medicina**. Porto Alegre. EDIPUCRS, p. 54-57, 2003.

LARA, D.R.; SOUZA, D.O. Modelo de hipofunção adenossinérgica para a esquizofrenia: interação entre os sistemas purinérgico, glutamatérgico e dopaminérgico. **Revista Psiquiatria Clínica**, v. 28, n. 3, p.160-169, 2001.

LEMOS, G.S.; SANTOS, J.S.; SANTOS, M.L.P. Validação de método para a determinação de 5-hidroximetilfurfural em mel por cromatografia líquida e sua influência na qualidade do produto. **Química Nova**, v. 33, n. 8, p-1682-1685, 2010.

MACCIARDI, F.; LUCCA, A.; CATALANO,M.; MARINO,C.; ZANARDI,R.; SMERALDI,E. Amino acid patterns in schizophrenia: Some new findings. **Psychiatry Research**, v. 32, p. 63-70, 2002.

McGUFFIN, P.; OWEN, M.J.; FARMER, A.E., Genetic basis of schizophrenia. **The Lancet**, v.346, p.678-682,1995.

MENEGATTI, R.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J.; LIMA, V.L.E.; RATES, S.M.K.; COSTA, T.D.; Esquizofrenia: quarenta anos da hipótese dopaminérgica sob a ótica da Química Medicinal. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 3, p. 447-455, 2004.

MEEK, J.L. Prediction of peptide retention time in high- pressure liquid chromatography on the basis of amino acids composition. **Medical Sciences**, v. 77, n. 3, p. 1632-1636,1980.

MOORE, S; STEIN, W. Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. **Analytical Chemistry**, p. 893-95, 1954.

NELSON, D.L., COX, M.M. *Princípios de Bioquímica do Lehninger*. 5ª Edição. Editora Artmed. p. 71-112, 2011.

NUNES, L.C. *Métodos quimiométricos aplicados na determinação espectrofotométrica de misturas de aminoácidos*. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2007.

PI J.; KUMAGAI, Y.; SUN, G.; SHIMOJO, N.; Improved method for simultaneous determination of L-arginine and its mono- and dimethylated metabolites in biological samples by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, 742, p.199–203, 2000.

PENG, G.W.; CHIOU, W.L. Analysis of drugs and other toxic substances in biological samples for pharmacokinetic studies. **Journal Chromatography**, 531, p. 12-18, 1990.

POMMIER, F.; SIOUFI, A.; GODBILLON, J. Simultaneous determination of imipramine and its metabolite desimipramine in human plasma by capillary gas chromatography with mass-selective detection. **Journal of Chromatography B**, v. 703, p. 147-158, 1997.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, p. 68; 2001.

RABOUAN, S.; OLIVIER, J.C.; GUILLEMIN, H.; BARTHES, D. Validation of HPLC analysis of aspartate and glutamate neurotransmitters following o-phthalaldehyde-mercaptoethanol derivatization. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. v. 26, n. 11, p. 1797- 1808, 2003.

RAKHADE, S.N.; LOEB, J.A. Focal reduction of neuronal glutamate transporters in human neocortical epilepsy. **Epilepsia**, v. 49, n. 2, p.226–236, 2008.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p. 771-780, 2004

ROWLEY, L.H.; MARTIN, K.F.; MARSDEN, C.A. Determination of in vivo amino acid neurotransmitters by high-performance liquid chromatography with o-phthalaldehyde-sulphite derivatisation. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 57, p. 93-99, 1995.

SANTANA, A. F. F. A.; CHIANCA, T. C. M.; CARDOSO, C. S. Qualidade de vida de pacientes com esquizofrenia internados em hospital de custódia. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 58, n. 3, p. 187-194, 2009.

SCHUSTER, R. Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, 431,p. 271-284, 1988.

SILVA, C.R.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C.H.; AIROLDI, C. Novas fases estacionárias à base de sílica para cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v.27, n.2, p. 270-276, 2004.

SILVA, J.A.; BEDOR, D.C.G.; SOUSA, C.E.M.; SANTANA, D.P.; EGITO, E.S.T. Desenvolvimento e validação de método analítico para a quantificação de diclofenaco de dietilamônio em pele humana por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 31, n.1, pp. 41-46, 2010.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. *Princípios de análise instrumental*. 5ª. ed. Bookman. Porto Alegre: p. 641-661, 2002.

SUMIYOSHI, T.A; ANIL,E.; JIN,D.; JAYATHINLAKE,K.; LEE, M.; HERBERT,Y.M. Plasma glycine and serine levels in schizophrenia compared to normal controls and major depression: relation to negative symptoms. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 7, p. 1–8, 2004.

TCHERKAS,Y.V.; KARTSNOVA,L.A.; KRASNOVA,I.N. Analysis of amino acids in human serum by isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of chromatography A**, 913, pp. 303-308, 2001.

TCHERKAS, Y.V.; DENISENKO, A.D. Simultaneous determination of several amino acids, including homocysteine, cysteine and glutamic acid, in human plasma by isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. **Journal chromatography A**, 913, p. 309-311, 2001.

TORTORELLA, A.; MONTELEONE,P.; FABRAZZO,M.; VIGGIANO,A.; DE LUCA, B., MAJ,M. Plasma Concentrations of Amino Acids in Chronic Schizophrenics Treated with Clozapine. **Neuropsychobiology**, v. 44, p. 167-171, 2001.

VALLADA FILHO, H.P.; SAMAIA, H. Esquizofrenia: aspectos genéticos e estudos de fatores de risco. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. Supl I, v. 22, p. 2-4, 2000.

VAN DER HEIJDEN, F.F.M.A.; TUINIER,S.; FEKKES,D.; SIBJEN,A.E.S.; KAHN,R.S.; VERHOEVEN, W.M.A. Atypical antipsychotics and the relevance of glutamate and serotonin. **European Neuropsychopharmacology**, v. 14, p. 259 – 265, 2004.

WAZIRI, R.; BARUAH, S.; SHERMAN, A.D. Abnormal serine-glycine metabolism in the brains of schizophrenics. **Schizophrenia Research**, v. 8, n. 3, p. 233-243, 1993.

Anexos

ANEXOS

Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética da FCFRP- USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Of. CEP/FCFRP nº. 106/2011
kms

Ribeirão Preto, 21 de novembro de 2011.

À
PROFª. DRª. REGINA HELENA COSTA QUEIROZ
Pós-graduanda: Marina Salviato Balbão Santiago Fonseca
DACTB / FCFRP / USP

Prezada Professora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP aprovou, em sua 97ª Sessão Ordinária, realizada em 16/11/2011, o projeto de pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO DE NEUROPEPTÍDEOS E AMINOÁCIDOS PARA ELUCIDAÇÃO DA NEUROBIOLOGIA DAS DOENÇAS PSQUIÁTRICAS", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP nº. 227**.

Informamos que conforme Carta Circular 003/2011 da CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso e também o pesquisador responsável deverão rubricar todas as páginas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE, apondo sua assinatura na última página do referido Termo. Ainda, de acordo com a Resolução 196/96, item IV.2, letra d, "*o TCLE deverá ser elaborado em duas vias, sendo uma retida pelo sujeito da pesquisa ou por seu representante legal e uma arquivada pelo pesquisador*".

Em atendimento à Resolução 196/96, lembramos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seu resultado, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo.

Atenciosamente,

PROFª. DRª. MARIA REGINA TORQUETI
Coordenadora do CEP/FCFRP

Anexo 2 – Justificativa

Ilma. Sra.

Prof.^a Dr.^a MARIA REGINA TORQUETI

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP

Ribeirão Preto, 01 de junho de 2011

Senhora Coordenadora,

Encaminhamos em anexo o projeto de pesquisa intitulado “**Avaliação de neuropeptídeos e aminoácidos para elucidação da neurobiologia dos transtornos psiquiátricos**”, da aluna Marina Salviato Balbão Santiago Fonseca, orientada pela Profa. Dra. Regina Helena Costa Queiroz da FCFRP-USP e co-orientada pelo Prof. Dr. Jaime Eduardo Cecílio Hallak, docente e clínico responsável pela Enfermaria de Psiquiatria do HCFMRP-USP, para ser submetido à avaliação do Comitê de Ética da FCFRP-USP.

O projeto de pesquisa acima mencionado será desenvolvido em colaboração com o Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento do HCFMRP-USP.

A aluna de mestrado em toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Greyce Kelly Steinhorst Alcantara, responsável pelo projeto “Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação simultânea de aminoácidos como biomarcadores”, será pesquisadora participante deste projeto, pois sua dissertação será de extrema importância para realização e conclusão das análises dos aminoácidos.

Declaramos também que a aluna Marina S.B.S. Fonseca está autorizada a usar as dependências do hospital para recrutar os voluntários e coletar o material necessário para a pesquisa.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Jaime Eduardo Cecílio Hallak – Co-orientador

De acordo:

Prof. Dr. Wilson Marques Jr.

Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento do HCFMRP – USP

Anexo 3 – Justificativa da orientação

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo - USP

Via do Café, s/n - Telefone: (016) 633.3036

Fax: (016) 633-1092

14.040-903 - Ribeirão Preto - S.P. - Brasil

Ribeirão Preto, 25 de janeiro de 2012.

Justifico que o trabalho desenvolvido pela pós-graduanda Greyce Kelly Steinhorst Alcantara, intitulado: “Desenvolvimento e validação de metodologia para análise simultânea de aminoácidos como possíveis marcadores neurobiológicos da esquizofrenia utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência” está relacionado com a parte analítica do trabalho intitulado: “Avaliação de neuropeptídeos e aminoácidos para elucidação da neurobiologia dos transtornos psiquiátricos”, o qual já se encontra aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP, sob protocolo nº 227.

Prof. Dr. Regina Helena Costa Queiroz