UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Área de Análises Clínicas

**Nova estratégia bioanalítica baseada em cromatografia líquida e
espectrometria de massas em tandem para a quantificação de
aminoácidos em matrizes biológicas: uma ferramenta clínica e
experimental**

Jessica Silva Salgueiro

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE
Orientador: Prof. Dr. Valdemir Melechco
Carvalho

São Paulo
2015

JESSICA SILVA SALGUEIRO

**Nova estratégia bioanalítica baseada em cromatografia
líquida e espectrometria de massas em tandem para a
quantificação de aminoácidos em matrizes biológicas: uma
ferramenta clínica e experimental**

Versão original

Dissertação apresentada como requisito do
programa de pós-graduação em Análises
Clínicas da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Valdemir Melechco
Carvalho

São Paulo

2015

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

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

S164n	<p>Salgueiro, Jessica Silva</p> <p>Nova estratégia bioanalítica baseada em cromatografia líquida e espectrometria de massas em tandem para a quantificação de aminoácidos em matrizes biológicas: uma ferramenta clínica e experimental / Jessica Silva Salgueiro. -- São Paulo, 2015. 110p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.</p> <p>Orientador: Carvalho, Valdemir Melechco</p> <p>1. Método laboratorial : Medicina 2. Aminoácidos I. T. II. Carvalho, Valdemir Melechco, orientador.</p> <p>615.0756-9 CDD</p>
-------	---

JESSICA SILVA SALGUEIRO

Nova estratégia bioanalítica baseada em cromatografia líquida e espectrometria de massas em *tandem* para a quantificação de aminoácidos em matrizes biológicas: uma ferramenta clínica e experimental

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profº Dr. Valdemir Melechco Carvalho

Orientador/Presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2015

DEDICATÓRIA

Aos meus pais dedico esse trabalho, com amor e gratidão por tudo que me ensinaram.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos meus companheiros dessa caminhada.

À Dra. Karina Cardozo, seu papel nesse trabalho está presente do início ao fim, sua amizade, sua confiança no meu trabalho me fez continuar. Obrigada pela inspiração e pela ajuda. Esse trabalho com certeza não seria feito sem sua participação. Com certeza, a melhor parte do trabalho, foi ter a oportunidade de aprender e crescer com você.

Ao grupo do setor de cromatografia do Grupo Fleury, meu muito obrigada. Em especial a Odete, Marlene, Marisa, Andrea, Marcelo e Sandra, que me aguentaram ferozmente, sendo na disputa de equipamentos ou no desabafo cotidiano. Seria impossível sem vocês.

Ao grupo do setor de pesquisa e desenvolvimento do Grupo Fleury.

Ao Grupo Fleury, agradeço pela oportunidade de desenvolver esse trabalho. Em especial a Maria Emília, Edgar e Carol.

Ao Dr. Fernando Kok, que acompanhou o início desse projeto, acreditou no meu trabalho, sempre deu seu apoio e contribuição intelectual.

A Dra. Flávia Piazzon, que compartilhou sua experiência e seu conhecimento conosco.

Ao meu orientador e amigo Dr. Valdemir Melechco, que desde do início acreditou na minha capacidade, sempre me deu credibilidade e apoio para buscar meu desenvolvimento científico. Foi muito paciente em todos os momentos em que encontrei dificuldades para desenvolver meu trabalho. Você me apresentou um mundo novo. Muito obrigada Val.

À Gabriela Venturini, uma pessoa extraordinária que tive o prazer de conhecer nessa jornada. Sempre me apoiando e colocando meus pés no chão. Uma grande amiga e uma grande cientista, fonte de inspiração e motivação para o meu trabalho.

À Fabiana dos Anjos, meu muito obrigada. Sempre solícita aos meus pedidos de socorro.

Ao meu amado Wolverine. Que me alimentou, limpou a casa e deu banho nos cachorros enquanto eu derramava lágrimas sobre o teclado. Você é o cara.

Obrigada a todos que participaram da melhor coisa que eu já realizei até hoje.

RESUMO

SALGUEIRO, J. S.. **Nova estratégia bioanalítica baseada em cromatografia líquida e espectrometria de massas em tandem para a quantificação de aminoácidos em matrizes biológicas: uma ferramenta clínica e experimental.** 2015. 110 f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Apesar da rápida expansão das aplicações da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em química clínica, a análise de metabólitos de baixo peso molecular e alta polaridade em matrizes biológicas ainda permanece como um grande desafio analítico. Dentre os compostos de grande importância no diagnóstico de doenças metabólicas que ainda carecem de melhores alternativas bioanalíticas destacam-se os aminoácidos. O presente estudo descreve o desenvolvimento e a validação de um novo método para a quantificação de 24 aminoácidos em plasma explorando a cromatografia líquida acoplada a espectrômetros de massas em tandem.

Foi construído um método de detecção baseado em SRM (múltiplas reações selecionadas) com duas transições de massas para cada um dos 24 aminoácidos e os 19 padrões internos marcados com isótopos estáveis. Foram avaliadas três estratégias de separação cromatográfica e o melhor desempenho foi obtido com fase reversa com octadecilsilano (C18) com pareamento iônico com o ácido perfluoropentanoico. O método cromatográfico final permitiu a separação dos 24 aminoácidos, com resolução completa dos isômeros: leucina, isoleucina e *allo*-isoleucina, em 11 minutos incluindo o tempo de re-estabilização da coluna cromatográfica. Os limites de quantificação variaram em 113 fmol a 6 pmol injetados na coluna cromatográfica. A imprecisão obtida nos níveis testados para todos os aminoácidos foi inferior a 14%. O método apresentou linearidade para os intervalos testados chegando a 1,5 mmol.L⁻¹ para vários compostos. Os ensaios de arraste mostraram que os limites máximos obtidos na linearidade não geram nenhuma interferência subsequente. A exatidão do método foi avaliada com amostras provenientes do programa de referência interlaboratorial *European Research Network for evaluation and improvement of screening, Diagnosis and treatment of Inherited disorders of Metabolism* (ERNDIM) e com o material de referência certificado do *National Institute of Standards and Technology* (NIST). Todos os analitos mostraram equivalência estatística com o método desenvolvido.

Palavras-chave: Aminoácidos; LC-MS/MS; HILIC; Pareamento iônico.

ABSTRACT

SALGUEIRO, J. S.. **New bioanalytical strategy based on liquid chromatography and tandem mass spectrometry for amino acids quantification in biological matrices: a clinical and experimental tool**. 2015. 110 f. Master Thesis – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Despite the widespread use of liquid chromatography coupled to mass spectrometry applications in clinical chemistry, the analysis of low molecular weight and high polar metabolites in biological matrices remains as a major analytical challenge. Notwithstanding the key role played by amino acids in the diagnosis of metabolic diseases, there is still need for improvements in bioanalytical process of these analytes. The present study describes the development and validation of a new method for quantification of 24 amino acids in plasma based on liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Detection and quantification were achieved building a selected reaction monitoring method two mass transitions for each 24 amino acids and 19 stable isotope internal standards. Three chromatographic strategies for separation were evaluated, and best performance was achieved using reversed-phase octadecylsilane with perfluoropentanoic acid as ion pairing agent. The separation method allowed separation of 24 amino acids with full resolution for isomers leucine, isoleucine and alloisoleucine in 11 minutes, including column equilibration time. The limits of quantification ranged from 113 fmol to 6 pmol (on column injection). Imprecisions for all evaluated levels and amino acids were less than 14%. The method is linear in all clinical intervals and extending up to 1.5 mmol.L⁻¹. Carryover evaluation demonstrated absence of interference in the following injection throughout the analytical interval. Method accuracy was evaluated analyzing reference samples from *European Research Network for evaluation and improvement of screening, Diagnosis and treatment of Inherited disorders of Metabolism* (ERNDIM) and *National Institute of Standards and Technology* (NIST). Statistical equivalence was demonstrated for all analytes using the present method.

Keywords: Amino acids; LC-MS/MS; HILIC, Ion pairing.

LISTA DE SIGLAS

MeOH – Metanol

ACN – Acetonitrila

RP – Fase Reversa

HILIC – Cromatografia de interação hidrofílica

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

UPLC – Cromatografia líquida de ultra eficiência

LC-MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

LC-MS/MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem*

CG-MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

SRM – Monitoramento de reação selecionada (*selected reaction monitoring*)

C18 – Octadecilsilano

PFP – Pentafluorofenil propil

TIC – Corrente iônica total (*Total Ion Current*)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Aminoácidos, suas características e correlações biológicas.....	25
Tabela 2 – Desenho das soluções estoque para os aminoácidos isotopicamente marcados utilizados como padrões internos.	35
Tabela 3 - Desenho da solução de uso para os aminoácidos isotopicamente marcados utilizados como padrões internos.	36
Tabela 4 – Desenho das soluções estoque de aminoácidos utilizadas para confecção da curva de calibração denominada 2.....	37
Tabela 5 – Desenho das soluções estoque utilizadas no preparo das soluções empregadas na validação analítica.	38
Tabela 6 – Desenho da curva do grupo de aminoácidos denominado grupo 1.	39
Tabela 7 – Desenho da elaboração da solução do ponto mais concentrado (CC 5) da curva de calibração do grupo de aminoácidos denominado grupo 2.	39
Tabela 8 – Desenho da construção da curva de calibração do grupo de aminoácidos 2 a partir da solução do ponto de calibração CC5.....	39
Tabela 9 – Concentrações finais para cada aminoácido da curva de calibração do grupo 2.	40
Tabela 10 – Elaboração da solução mix de aminoácidos do grupo 1 com plasma dialisado a partir da solução estoque a 100 mmol.L^{-1} de cada aminoácido. O volume final foi de 10 mL (2143 μL das soluções em 7857 μL de plasma dialisado).	41
Tabela 11 - Elaboração da solução mix de aminoácidos do grupo 2 com plasma dialisado a partir da solução estoque a 100 mmol.L^{-1} de cada aminoácido, com exceção da <i>allo</i> -isoleucina (10 mmol.L^{-1}). O volume final foi de 10 mL (1360 μL das soluções em 8640 μL de plasma dialisado).....	41
Tabela 12 – Esquema de diluição das amostras de linearidade utilizando a solução de plasma com aminoácidos e plasma dialisado com adição de água.	42

Tabela 13 – Concentrações obtidas ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) para cada aminoácido nos 11 níveis de linearidade elaborados para o grupo 1 e 2.	42
Tabela 14 - Esquema de diluição das amostras de precisão utilizando a solução de plasma com adição dos aminoácidos e plasma dialisado com adição de água.	43
Tabela 15 - Concentrações obtidas ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) para cada aminoácido nos 3 níveis de precisão elaborados para o grupo 1 e 2.	44
Tabela 16 - Esquema de diluição das amostras de limite de quantificação (LOQ) utilizando a solução de plasma com aminoácidos e plasma dialisado com adição de água.	45
Tabela 17 - Concentrações obtidas ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) para cada aminoácido nos níveis de limite de quantificação elaborados para o grupo 1 e 2.	45
Tabela 18 - Tabela de erros totais adaptada de Ricos e colaboradores (2014). I é imprecisão, B é bias e TE é erro total. CVi= coeficiente de variação biológica intra-indivíduos e CVg= coeficiente de variação inter-indivíduos ou intra-grupos.	49
Tabela 19 - Propriedades físico-químicas dos aminoácidos de interesse.	54
Tabela 20 - Intensidade de sinal na monitoração dos fragmentos do aminoácido Glicina em diferentes coordenadas X.	61
Tabela 21 - Intensidade de sinal na monitoração dos fragmentos do aminoácido glicina em diferentes coordenadas Z.	61
Tabela 22 - Condições de aquisição e transições selecionadas para cada um dos 26 aminoácidos analisados.	63
Tabela 23 - Aminoácidos marcados isotopicamente analisados por ionização em <i>eletrospray</i> no modo positivo. Fragmentos obtidos por dissociação induzido por colisão (CID) com parâmetros de energias configurados com base na otimização de aminoácidos não marcados.	65
Tabela 24 - Parâmetro cromatográficos obtidos na separação dos isômeros <i>allo</i> -isoleucina, isoleucina e leucina. Tempo de retenção (TR) em minutos, fator de retenção (k), seletividade (α) e resolução (R). Detalhes metodológicos, vide texto. .	78

Tabela 25 - Parâmetros cromatográficos obtidos na separação dos isômeros <i>allo</i> -isoleucina, isoleucina e leucina por pareamento iônico com NFPA 5 mmol.L ⁻¹ em coluna BEH C18 1,7 µm. Tempo de retenção (TR) em minutos, fator de retenção (k), seletividade (α) e resolução (R). Detalhes metodológicos, vide texto.	80
Tabela 26 - Parâmetros cromatográficos obtidos na separação dos isômeros <i>allo</i> -isoleucina, isoleucina e leucina por pareamento iônico com NFPA 10 mmol.L ⁻¹ em coluna BEH C18 1,7 µm. Tempo de retenção (TR) em minutos, fator de retenção (k), seletividade (α) e resolução (R). Detalhes metodológicos, vide texto.	81
Tabela 27 – Tempos de retenção obtidos no método cromatográfico final.	84
Tabela 28 - Cálculo da somatória do Erro Relativo percentual (%RE) para avaliação do fator de ponderação mais adequado a ser aplicado nas curvas de calibração para cada aminoácido.	86
Tabela 29 - Valores estabelecidos pelo MCA Lab para os dois níveis de controles comercializados após a análise em 20 laboratórios de bom desempenho no programa ERNDIM.	88
Tabela 30 - Valores calculados médios obtidos durante a validação analítica.	89
Tabela 31 – Valores de não linearidade obtidos no ensaio de linearidade e seus respectivos intervalos para cada aminoácido.	90
Tabela 32 – Limites de quantificação observados para cada aminoácido, destacando aminoácidos que não atingiram o limite de quantificação desejado.	91
Tabela 33 – Dados obtidos na análise do ensaio de arraste, onde os valores destacados mostram que os desvios padrões estão abaixo do limite máximo permitido.	93
Tabela 34 – Valores de coeficiente de variação (CV%) observados no ensaio preliminar de precisão intradia.	94
Tabela 35 – Valores de coeficiente de variação total para o ensaio de precisão realizado durante 20 dias. As concentrações em três níveis de precisão (PREC 1, 2 e 3) foram avaliadas e comparadas aos valores desejáveis ou mínimos obtidos na tabela	

Ricos e colaboradores (2014). Os destaques em vermelho mostram os aminoácidos que não estavam de acordo com os parâmetros estabelecidos na literatura.....95

Tabela 36- Valores finais obtidos nos experimentos comparação de métodos para determinação da exatidão. As colunas determinadas como desejável e mínimo indicam dos erros estabelecidos para cada aminoácido. Valores em verde: dentro dos erros desejáveis ou mínimos. Valores em vermelho: fora dos erros estabelecidos. .97

Tabela 37 – Valores reportados pelo NIST para o material de referência certificado – Metabólitos em plasma humano (SRM 1950) correlacionados aos valores obtidos pela quantificação por meio do método desenvolvido.....99

Tabela 38 – Levantamento de dados analíticos de métodos quantitativos desenvolvidos para análise em matrizes biológicas publicados na literatura. A última linha (destacada em azul) se refere ao método desenvolvido nesse trabalho. 101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Reação da ninidrina com aminoácido (amina primária) e a formação da púrpura de Ruhemann.	20
Figura 2 Exemplo de reação de derivação de um aminoácido com o reagente iTRAQ™ e a formação da porção “repórter” que será dissociado do aminoácido em um processo de fragmentação induzida por colisão.	22
Figura 3 – Esquema representativo do protocolo de precipitação proteica.	33
Figura 4 - Representação esquemática do desenho da validação analítica do método desenvolvido.	48
Figura 5 – Esquema de funcionamento da fonte de ionização em pressão atmosférica ZSpray (WATERS, 2015).	62
Figura 6 - Espectros de massas do aminoácido alanina isotopicamente marcado (Alanina- <i>d4</i> $m/z=94$) em modo ScanWave DS (a), não apresenta fragmentação. Espectro de massas em modo <i>Daughters Scan</i> (b), mostrando fragmentação.	66
Figura 7 - Espectros de massas do aminoácido glicina isotopicamente marcada ($m/z=78$) em modo <i>ScanWave</i> (a), não apresenta fragmentação. Espectro de massas em modo <i>Daughters</i> (b), mostrando fragmentação.	67
Figura 8 - Espectros de massas de íons produto do aminoácido fenilalanina isotopicamente marcado (íon precursor $m/z = 172$) em diferentes energias de colisão: (a) 30 eV; (b) 26 eV; (c) 22 eV; (d) 19 eV; (e) 16 eV.	68
Figura 9 – Monitoramento por SRM (transição 90>62) da alanina. Energia de colisão de 4 eV a 11 eV. Melhor resposta obtida na energia de colisão em 6 eV marcada em vermelho.	69
Figura 10 – Efeito da concentração de formiato de amônio na resposta de alguns aminoácidos medido em função da área integrada.	71
Figura 11 - Perfil cromatográfico da separação de leucina (TR=5,65 min), isoleucina (TR=5,99 min) e <i>allo</i> -isoleucina (TR=6,17 min), respectivamente, obtido utilizando a	

coluna Kinetex HILIC 1,7 μm . Transição de massa 132.1>30 específico para leucina e transição de massa 132.1>69 presente na isoleucina e <i>allo</i> -isoleucina.	72
Figura 12 – Perfil cromatográfico dos isômeros leucina (1), isoleucina (2) e <i>allo</i> -isoleucina (3) obtido utilizando a coluna HILIC Diol Cross-linked Luna. Detalhes metodológicos, vide texto.	73
Figura 13 – Perfil cromatográfico final obtido pela análise com coluna Luna HILIC Diol 3 μm em 15 minutos contendo 26 aminoácidos. Solução de aminoácidos 50 nmol.mL^{-1} em HCl 0,1 mol.L^{-1} . Detalhes metodológicos, vide texto.	75
Figura 14 – Cromatograma obtido pelo canal de SRM da leucina (TIC) mostrando os isômeros <i>allo</i> -isoleucina (1), isoleucina (2) e leucina (3). Detalhes metodológicos, vide texto.	77
Figura 15 – Cromatograma do canal de SRM da leucina (tempo de retenção (TR)=7,28 min), apresentando baixa resolução em relação a isoleucina (TR=7,33 min) e <i>allo</i> -isoleucina (TR=7,33 min) que coeluem. Detalhes metodológicos, vide texto.	79
Figura 16 - Cromatograma do canal de SRM da leucina (TIC): (1) <i>allo</i> -isoleucina; (2) isoleucina; (3) leucina. Detalhes metodológicos, vide texto.	80
Figura 17 - Cromatograma do canal de SRM da leucina (TIC): (1) <i>allo</i> -isoleucina; (2) isoleucina; (3) leucina. Otimização cromatográfica com NFPA 10 mmol.L^{-1} . Detalhes metodológicos, vide texto.	81
Figura 18 – Cromatogramas dos aminoácidos histidina, metionina e valina, respectivamente utilizando gradiente com NFPA 10 mmol.L^{-1} e acetonitrila (0-70% acetonitrila em 8 minutos). Detalhes metodológicos, vide texto.	82
Figura 19 - Cromatograma do canal de SRM da leucina (TIC): (1) <i>allo</i> -isoleucina ; (2) isoleucina e (3) leucina utilizando gradiente com NFPA 2 mmol.L^{-1} e acetonitrila (0-50% acetonitrila em 10 minutos). Detalhes metodológicos, vide texto.	83
Figura 20 – Perfil cromatográfico final obtido pela análise com coluna C18 BEH 1,7 μm em 11 minutos contendo 26 aminoácidos. Solução de aminoácidos 50 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ em água ultrapura. Detalhes metodológicos, vide texto.	84

SUMÁRIO

1 Introdução	18
Metodologias utilizadas para quantificação de aminoácidos	18
Aplicabilidade da dosagem de aminoácidos	24
2 Objetivos	29
3 Materiais e métodos	30
Reagentes	30
Padrões	30
Padrões de referência	31
Controles de qualidade	31
Colunas cromatográficas.....	31
Fases móveis	31
Instrumentação.....	32
Desenvolvimento de método para precipitação proteica	32
Análise das características físico-químicas dos analitos de interesse	33
Parâmetros cromatográficos	33
Preparo das soluções.....	33
Análises estatísticas.....	34
Otimização da detecção	34
Soluções-estoque dos padrões internos – aminoácidos marcados isotopicamente..	35
Solução de uso dos padrões internos	36
Ácido clorídrico à 0,1 mol.L ⁻¹ em água	36
Soluções estoque de aminoácidos para a curva de calibração 2.....	37

Soluções de limpeza forte e fraca do sistema de injeção	37
Soluções estoque de aminoácidos para preparo das soluções de validação	37
Curva de calibração – grupo 1	38
Curva de calibração – grupo 2	39
Preparo de amostras para a validação analítica	40
Diálise de plasma	40
Preparo das amostras em plasma dialisado	40
Linearidade	42
Efeito matriz	43
Arraste	43
Precisão	43
Limite de quantificação	44
Exatidão	46
Avaliação da regressão linear para a calibração	46
Validação	47
Critérios de aceitação da validação	48
Avaliação da linearidade	49
Avaliação do limite de quantificação	50
Avaliação de arraste	51
Avaliação de precisão	51
Avaliação da exatidão	51
Avaliação do efeito matriz	52
4 Resultados e discussão	54
Propriedades dos analitos de interesse	54
Eletrospray (ESI)	61

Otimização da detecção por espectrometria de massas em <i>tandem</i>	62
Cromatografia líquida (LC)	70
Cromatografia em fase reversa baseada na fase pentafluorofenil	70
Interação hidrofílica	71
Pareamento iônico	76
Ácido heptafluorobutírico (HFBA)	77
Ácido tridecafluoroheptanóico (TDFHA)	78
Ácido Perfluoropentanóico NFPA	79
Ponderação curva de calibração	85
Validação.....	87
Controle de qualidade.....	87
Linearidade	89
Limite de quantificação	91
Arraste	92
Precisão.....	93
Exatidão.....	96
Efeito matriz.....	99
Comparação com métodos descritos na literatura	100
5 Conclusão	103

1 INTRODUÇÃO

A utilização da espectrometria de massas em *tandem* nos laboratórios clínicos tem se expandido rapidamente nos últimos anos. Essa expansão é em grande parte devida ao desenvolvimento de novas técnicas de ionização como o *eletrospray* (ESI) (FENN et al., 1989) e a ionização por laser assistida por matriz (MALDI) (TANAKA et al., 1988) no final dos anos 80. Por possuir características como alta sensibilidade e seletividade, essa técnica está se transformando no padrão-ouro em várias aplicações bioanalíticas (MAGERA et al., 1999; STREIT; ARMSTRONG; OELLERICH, 2002; KUSHNIR et al., 2003; BECKER et al., 2012; LEINENBACH et al., 2014; VOLMER; MENDES; STOKES, 2015; ZHANG et al., 2015).

Apesar do número crescente de aplicações clínicas da espectrometria de massas em *tandem*, a análise de metabólitos de baixo peso molecular e alta polaridade em matrizes biológicas ainda permanece como grande desafio analítico (BECKER et al., 2012). As dificuldades na análise desses compostos são decorrentes de interferências promovidas por compostos estruturalmente relacionados e por suas baixas concentrações endógenas.

Dentre os metabólitos de baixo peso molecular de grande importância no diagnóstico de doenças metabólicas, e que ainda carecem de melhores alternativas bioanalíticas, destacam-se os aminoácidos. Além dos 20 aminoácidos constitutivos das proteínas, muitos outros são conhecidos, correspondendo a precursores ou catabólitos destes aminoácidos ou outros metabólitos intermediários.

Metodologias utilizadas para quantificação de aminoácidos

Para a detecção de aminoácidos por espectrofotometria no ultravioleta/visível é necessária a derivação dos aminoácidos com formação de grupos cromóforos. Essa técnica permite a separação e quantificação de dezenas de aminoácidos ou metabólitos relacionados e até hoje, a cromatografia de troca iônica com derivação pós-coluna com ninidrina ou o-ftaldialdeído permanece como padrão ouro para a quantificação de aminoácidos (ROSEN, 1957; SPACKMAN; STEIN; MOORE, 1958).

Nos métodos baseados em derivação pós-coluna, os aminoácidos são separados por cromatografia de troca catiônica por eluição com gradientes de lítio e pH. Geralmente, há um aumento na temperatura da coluna. O efluente da coluna é misturado com o reagente e os derivados são determinados por espectrofotometria.

A ninidrina age como um agente oxidante seletivo promovendo uma descarboxilação oxidativa do aminoácido, liberando CO₂, NH₃ e um aldeído com um átomo de carbono a menos (RIGAS, 2013). A formação da púrpura de Ruhemann é observada nas reações com os grupos amino (Figura 1) e uma coloração amarela é observada nos iminoácidos (prolina e hidroxiprolina). A reação de derivação acontece mantendo a célula de reação a 100-135°C e a detecção é obtida monitorando os comprimentos de onda 570 e 440 nm (BLAU; DURAN; GIBSON, 2008; RIGAS, 2013). Essa abordagem foi introduzida em 1951 por Moore e Stein (1951) e posteriormente automatizada pela Beckman em 1958 (SPACKMAN; STEIN; MOORE, 1958) revolucionando a análise de proteínas e tendo um peso considerável no prêmio Nobel em Química atribuído ao trabalho da dupla no estudo da ribonuclease (MOORE; STEIN, 1951). Desde então essa tecnologia lastreou o estudo dos aminoácidos.

No entanto, a abordagem apresenta várias dificuldades como corrida cromatográfica extensa (aproximadamente uma hora por amostra), a instabilidade da ninidrina e a alta taxa de falsos positivos por reações inespecíficas com componentes da matriz. Os fabricantes desse tipo de analisador descontinuaram gradativamente os sistemas em função do alto investimento na aquisição do equipamento e dos custos de funcionamento. Esses aspectos de fato limitaram uma aplicação generalizada desta técnica. No entanto, muitos autores ainda o consideram como o método definitivo para o diagnóstico de distúrbios do metabolismo dos aminoácidos (BLAU; DURAN; GIBSON, 2008; MEESTERS, 2013).

Frente as dificuldades encontradas na análise de aminoácidos por cromatografia de troca catiônica com derivação pós coluna com ninidrina foram desenvolvidos novos protocolos de derivação pré e pós coluna cromatográfica utilizando reagentes diversos como oftaldialdeído, fenilisotiocianato, 4-(dimetilamino)azobenzeno-4'-sulfonil, cloreto de 5-(dimetilamino)naftaleno-1-sulfonilo, cloreto ou carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxi-succinimidilo, com detecção em

ultravioleta ou FLR (KRUMPOCHOVA et al., 2015). Entretanto as técnicas desenvolvidas com os reagentes citados normalmente necessitam de análises de cerca de 2 horas por amostra, de equipamentos dedicados e possuem alto custo de reagentes (KRUMPOCHOVA et al., 2015). Portanto, apresentando dificuldades similares as encontradas anteriormente com o método de referência.

Figura 1 Reação da ninidrina com aminoácido (amina primária) e a formação da púrpura de Ruhemann.

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS) continua sendo o método mais usado para a identificação e quantificação simultânea de diversos metabólitos de baixo peso molecular. Apesar do bom desempenho dessa técnica, normalmente ela requer procedimentos muito complexos para o preparo da amostra. Metabólitos polares de baixo peso molecular necessitam de derivação para a conversão em compostos mais voláteis e termoestáveis para se tornarem passíveis de serem analisados pela CG. Os procedimentos de derivação são realizados mais comumente em condições anidras, portanto várias etapas para a extração dos analitos do meio aquoso são necessárias. Além dos procedimentos trabalhosos de preparação

de amostra e derivação, a análise por CG-MS ainda requer longas separações cromatográficas para resolver os compostos estruturalmente relacionados. Porém a maior limitação para análises abrangentes de aminoácidos por essa metodologia é a instabilidade térmica dos derivados de certos aminoácidos tais como a arginina, cisteína, citrulina e taurina, não passíveis de análise por CG (KASPAR et al., 2008).

Petr Husek e colaboradores (1995) descreveram várias aplicações para análises de aminoácidos por cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (GC-FID). Estas técnicas estavam baseadas em derivação por cloroformatos que consiste na conversão dos ácidos carboxílicos em ésteres e os grupos amina em carbamatos (HUŠEK, 1995, 1998; HUŠEK et al., 2003). A alquilação por cloroformatos pode produzir derivados com boas características não apenas para o CG-FID, mas também para CG-MS e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS). Essa estratégia já foi explorada em kits comerciais como o EZ-FAAST™ da empresa Phenomenex. Esse composto é muito versátil e permite a derivação mesmo na presença de água o que torna a estratégia muito interessante para a análise de biomoléculas (BADAWY; MORGAN; TURNER, 2008; BADAWY, 2012). Entretanto, a síntese ou até mesmo a obtenção de cloroformatos é complicada, pois esses compostos são explosivos e muito tóxicos, consequentemente submetidos a uma complexa regulamentação pelos agentes governamentais, dificultando e até mesmo impossibilitando sua aquisição e manutenção no laboratório.

Com o advento da LC-MS esperava-se o desenvolvimento de métodos que simplificassem esse tipo de análise. Em teoria, a LC-MS com ionização por *eletrospray* poderia analisar metabólitos de baixo peso molecular diretamente em soluções, visto que tais compostos são polares e facilmente ionizáveis. No entanto, na prática isso é extremamente difícil na faixa de massa molecular abaixo de 150 Da devido à interferência de outros compostos e até mesmo da fase móvel. A separação cromatográfica de aminoácidos não derivados foi outra dificuldade encontrada, já que o acoplamento de cromatografia de troca iônica com espectrometria de massas não é possível, pois as fases móveis utilizadas não são compatíveis com a técnica de detecção.

Inicialmente várias aplicações baseadas em espectrometria de massas em *tandem* foram desenvolvidas para o diagnóstico de erros inatos de metabolismo de aminoácidos. A triagem neonatal ampliada, que consiste na análise semiquantitativa de aminoácidos extraídos de sangue em papel de filtro, é uma das aplicações mais conhecidas da espectrometria de massas em *tandem* (RASHED et al., 1995; CHACE et al., 1998; SCHULZE; KOHLMUELLER; MAYATEPEK, 1999; HARDY et al., 2002). A maior parte dos trabalhos dedicados a análises quantitativas de aminoácidos é inspirada em modificações da triagem neonatal ampliada que é baseada na formação de ésteres butílicos por meio da reação com uma solução butanólica de ácido clorídrico (CASSETTA et al., 2000; ROLINSKI et al., 2000; STADLER et al., 2001; PITT; EGGINGTON; KAHLER, 2002). A butilação reduz a polaridade dos aminoácidos facilitando a aplicação da cromatografia em fase reversa. Contudo, o pH baixo desse reagente hidrolisa alguns dos aminoácidos como a glutamina e a asparagina.

Foi descrita uma metodologia para quantificação de aminoácidos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem* (LC-MS/MS) adaptando o reagente iTRAQ™ como derivatizante (LACEY et al., 2007). O iTRAQ™ inicialmente foi desenvolvido especificamente para estudos proteômicos quantitativos. O procedimento de derivação obtido foi relativamente simples e permitiu a análise de 42 aminoácidos em aproximadamente 25 minutos. O uso do iTRAQ™ entretanto resulta em uma análise “pseudo-MS/MS”, visto que o fragmento (MS2) portador da carga será sempre a porção “reporter” do marcador isobárico, ou seja $m/z = 115$ ou 114 dependendo do reagente utilizado.

Figura 2 Exemplo de reação de derivação de um aminoácido com o reagente iTRAQ™ e a formação da porção “repórter” que será dissociado do aminoácido em um processo de fragmentação induzida por colisão.

Consequentemente a seleção do aminoácido será feita apenas pela massa do derivado correspondente (MS1). A geração de fragmentos de m/z idênticos resulta na perda da segunda dimensão de seletividade da técnica. Além disso, esse reagente tem um custo muito elevado devido à marcação isotópica incorporada à porção “reporter” do reagente.

Trabalhos mostram que novas alternativas cromatográficas podem auxiliar no desenvolvimento de uma metodologia completa e aplicável para detecção desses compostos. Langrock e colaboradores (2006) descreveram uma metodologia para separação analítica de 16 aminoácidos utilizando cromatografia de interação hidrofílica (HILIC) em 25 minutos, utilizando uma coluna cromatográfica com partículas de 5 μm . A HILIC emprega uma fase estacionária polar, tal como sílica, amida, hidroxilo, ciano, amino, e as colunas de troca iônica, em combinação com solventes empregados comumente na fase reversa (RP) para a separação de analitos polares sem necessidade de derivação. O gradiente de eluição é iniciado com uma elevada percentagem de solvente orgânico, tipicamente acetonitrila, e os compostos retidos são eluídos com o aumento do teor de água da fase móvel (KASPAR et al., 2009). Madeleine e colaboradores (2010) desenvolveram um método utilizando HILIC acoplada à espectrometria de massas para quantificar 16 aminoácidos em extratos de rizosfera.

Com o aumento de sensibilidade dos equipamentos de detecção, o pareamento iônico tornou-se uma alternativa interessante. Há relatos na literatura de métodos desenvolvidos por LC-MS/MS utilizando ácidos perfluorocarboxílicos como agentes pareantes em fase reversa, possibilitando a análise de aminoácidos sem derivação. Há diversos métodos descritos na literatura com aplicações em diversas áreas e matrizes (CHAIMBAULT et al., 1999; PETRITIS et al., 2000, 2002; KWON; MOINI, 2001; QU et al., 2002; PIRAUD et al., 2005a, 2005b, 2003; ARMSTRONG; JONSCHER; REISDORPH, 2007; DE PERSON; CHAIMBAULT; ELFAKIR, 2008; LIU; BEEGLE; KANIK, 2008; WATERVAL et al., 2009; HARDER; KOLETZKO; PEISSNER, 2011; LE et al., 2014). O emprego de diversos ácidos perfluorocarboxílicos ofereceu boa seletividade e permitiu o desenvolvimento de métodos eficazes.

A etapa de derivação acarreta em aumento do tempo no preparo das amostras, consequentemente gera um impacto negativo na rotina clínica, como o aumento do custo da análise e uma demora maior na entrega do resultado ao médico e ao paciente. Além disto, um maior número de etapas durante o processo de extração pode acarretar em mais erros analíticos, levando a um método menos preciso. O desenvolvimento de um método de extração dos aminoácidos sem derivação e que ainda propicie ganho de sensibilidade na análise por espectrometria de massas em *tandem* possibilitaria a aplicação da nova estratégia bioanalítica no laboratório clínico e no estudo experimental da patogênese de alguns processos.

Aplicabilidade da dosagem de aminoácidos

Deficiências enzimáticas no metabolismo de um determinado aminoácido resultam na elevação ou no decréscimo da concentração fisiológica desses compostos e no aparecimento de sintomas clínicos, que usualmente não são específicos para uma única doença. Um ou vários aminoácidos podem ser biomarcadores para uma ou um grupo de doenças, portanto a análise simultânea de todos esses compostos é necessária para confirmar ou excluir uma deficiência.

Os erros inatos do metabolismo são clinicamente e bioquimicamente heterogêneos. Sua incidência combinada é de aproximadamente 1:4000 (MAK et al., 2013). A característica do perfil de vários aminoácidos, a presença de alguns aminoácidos ou alterações específicas levam, ou podem sugerir, um diagnóstico. Uma vez diagnosticada a síndrome, os pacientes com esses transtornos, e outros com defeitos metabólicos hereditários, necessitam de acompanhamento quantitativo dos aminoácidos para avaliar o controle metabólico e nutricional.

Uma doença importante e relacionada a desordens do ciclo da ureia é a ornitina-transcarbamilase (OTC) (BLAU et al., 2014). Essa doença é a mais frequente dentre os distúrbios do ciclo da uréia (1:50000) e acarreta em uma baixa concentração dos aminoácidos arginina e ornitina (LICHTER-KONECKI et al., 2013). Nesta síndrome, o recém-nascido em dois a três dias já apresenta sintomas (letargia, vômitos, convulsões) e pode entrar em coma por hiperamonemia. O prognóstico vai

depender do tempo que o recém-nascido ficou nesta condição trazendo como consequências, problemas de desenvolvimento leves até graves distúrbios neurológicos. Esta doença pode ser tratada por meio de uma dieta pobre em proteína e suplementação com os aminoácidos arginina e citrulina, ressaltando a importância de um diagnóstico rápido e preciso.

Outro exemplo importante de erros inatos do metabolismo associado aos aminoácidos é a doença da urina com odor de xarope de bordo. Neste caso há um acúmulo de certos aminoácidos de cadeia ramificada como a leucina, isoleucina, allo-isoleucina e valina (BLAU et al., 2014). Os sintomas iniciam-se assim que o recém-nascido recebe dieta proteica, sendo os principais a falta de apetite, sucção fraca, perda de peso, choro agudo e a presença de urina característica nestes casos com odor de xarope de bordo. Sintomas mais graves incluem edema cerebral, crises convulsivas, coma, podendo levar à morte. Como no caso da OTC, o tratamento consiste em uma dieta pobre em proteína, principalmente dos aminoácidos de cadeia ramificada, com suplementação nutricional, por meio de fórmulas lácteas especiais. A Tabela 1 mostra alguns distúrbios do metabolismo associado aos aminoácidos.

Tabela 1 - Aminoácidos, suas características e correlações biológicas.

(Continua)

Nome	Abreviação	Massa molecular (g/mol)	Interesse biológico	Matriz biológica
Ácido L-Aspartico	Asp	133	Tratamento de asparaginase (leucemia)	P,U
Ácido L-Glutâmico	Glu	147	Desordens ciclo da uréia	P,U
Ácido γ-Aminobutírico	GABA	103	Desordens SNC, neurotransmissores	P,U,CSF
Glicina	Gly	75	Hiperglicinemia não cetótica, acidúrias orgânicas	P,U,CSF
Hidroxi-L-prolina	Hyp	131	Hidroxiprolinemia	P,U
L-Alanina	Ala	89	hiperlactacidemia	P,U

Tabela 1 - Aminoácidos, suas características e correlações biológicas.

(Continuação)

Nome	Abreviação	Massa molecular (g/mol)	Interesse biológico	Matriz biológica
L-allo-Isoleucina	alle	131	Doença da urina com odor de xarope de bordo	P,U
L-Arginina	Arg	174	Desordens ciclo da uréia	P,U
L-Asparagina	Asn	132	Tratamento de asparaginase (leucemia)	P,U
L-Cisteína	Cys	121	Deficiência sulfito oxidase, homocistinúria	P,U
L-Citrulina	Cit	175	Desordens ciclo da uréia	P,U
L-Fenilalanina	Phe	165	Fenilcetonúria, hiperfenilalaninemia	P,U
L-Glutamina	Gln	146	hiperamonemia, Desordens ciclo da uréia	P,U
L-Histidina	His	155	histidinemia	P,U
L-Isoleucina	Ile	131	Doença da urina com odor de xarope de bordo	P,U
L-Leucina	Leu	131	Doença da urina com odor de xarope de bordo	P,U
L-Lisina	Lys	146	hiperlisinemia, cistinúria- lisinúria	P,U
L-Metionina	Met	149	homocistinúria, hipermeti- oninemia	P,U
L-Ornitina	Orn	132	Desordens ciclo da uréia	P,U
L-Prolina	Pro	115	hiperprolinemia tipo I, II	P,U
L-Serina	Ser	105	Deficiência vitamina B6, deficiência síntese B6	P,U
L-Tirosina	Tyr	185	Tirosinemia tipo I ou II	P,U

Tabela 1 - Aminoácidos, suas características e correlações biológicas.

(Conclusão)

Nome	Abreviação	Massa molecular (g/mol)	Interesse biológico	Matriz biológica
L-Treonina	Thr	119	Falência hepática	P,U
L-Triptofano	Trp	204	Síndrome Hartnup	P,U
L-Valina	Val	117	Doença da urina com odor de xarope de bordo	P,U
Taurina	Tau	125	Deficiência sulfito oxidase	P,U

Fonte: Adaptado de Piraud et al., (2003)

Atualmente tem sido relatado na literatura outras aplicações das análises de aminoácidos nos líquidos biológicos ou tecidos. Há diversos estudos propondo a caracterização do perfil de aminoácidos livres no plasma de pacientes com câncer e sua utilização como dado adicional na detecção e do estadiamento da patologia (LAI et al., 2005; MIYAGI et al., 2011). Mais estudos precisam ser realizados para estabelecer a real importância clínica do perfil de aminoácidos em pacientes com câncer, porém há estudos mostrando diferenças significativas em perfis de pacientes com diversos tipos de carcinoma oral de células escamosas (REDDY et al., 2012); carcinoma hepatocelular; leucemia mieloide aguda (MUSCARITOLI et al., 1999); câncer de pulmão, câncer de próstata, câncer colorretal, câncer de próstata (LAI et al., 2005). Um desses estudos aponta a glicina como um biomarcador de proliferação celular em células cancerígenas *in vitro*. Neste estudo os autores mostraram que a privação do fornecimento de glicina bem como o bloqueio da sua via de síntese ocasionou uma diminuição na taxa de proliferação (JAIN et al., 2012).

Alguns estudos vêm explorando o papel dos aminoácidos de cadeia ramificada na obesidade e no mecanismo de resistência à insulina. Os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) são particularmente sensíveis à ação inibitória da insulina na liberação de aminoácidos pelo músculo esquelético e o metabolismo desses aminoácidos são profundamente alterados em condições que caracterizam a

resistência à insulina, a deficiência de insulina, ou ambos. Doenças como obesidade, síndrome metabólica e diabetes *mellitus* exibem um aumento gradual da concentração plasmática de BCAA (ADEVA et al., 2012). Lynch e Adams (2014) mostraram em seu trabalho, os dois possíveis mecanismos para a resistência insulínica e a sinalização metabólica pelos BCAA, também como sua evolução para diabetes *mellitus* tipo 2. Há alguns estudos empregando a quantificação de leucina, isoleucina e valina (BCAA) por LC-MS/MS como marcador para predição de resistência insulínica em crianças e adolescentes com sobrepeso (MCCORMACK et al., 2013).

Esses achados mostram uma variedade de aplicações clínicas e experimentais onde uma ferramenta quantitativa para dosagens de aminoácidos pode ser empregada. O campo de aplicações para a quantificação de aminoácidos vem se expandindo, o que torna necessário o desenvolvimento de uma ferramenta versátil para esses fins.

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de um novo método para a quantificação de aminoácidos em matrizes biológicas. As etapas do trabalho foram:

- Padronizar as condições de detecção por espectrometria de massas em *tandem* dos aminoácidos: alanina, glicina, valina, leucina, isoleucina, treonina, serina, prolina, asparagina, ácido aspártico, metionina, hidroxiprolina, ácido glutâmico, fenilalanina, ornitina, glutamina, lisina, histidina, tirosina, triptofano, cistina, taurina, arginina, cisteína, histidina, ácido gama-aminobutírico, citrulina.
- Padronizar as condições de separação cromatográfica dos aminoácidos, sobretudo dos isômeros leucina, isoleucina e *allo*-isoleucina e o acoplamento com a espectrometria de massas em *tandem*.
- Desenvolver procedimentos para a extração dos analitos.
- Validar o método desenvolvido.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes

Acetonitrila (ACN), isopropanol e metanol (MeOH) todos graus HPLC foram obtidos da J.T. BAKER. Todos os demais reagentes foram obtidos da Sigma-Aldrich. A água ultrapura foi produzida por um sistema Milli-Q (Millipore Corporation).

Padrões

Os padrões SD 1 EZ Faast CG-FID contendo: cistina, cisteína, hidroxiprolina, treonina, isoleucina, ornitina, tirosina, alanina, GABA, leucina, fenilalanina, valina, arginina, glutamina, lisina, prolina, aspartato, asparagina, glicina, glutamato, citrulina, metionina, histidina e serina foram obtidos da Phenomenex.

As soluções de padrões contendo 100 mmol.L⁻¹ dos aminoácidos L-*allo*-isoleucina, L-alanina, L-arginina, L- asparagina, ácido L-aspartico, L-cistina, ácido L-glutâmico, L-glutamina, glicina, L-histidina, L-hidroxiprolina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptofano, L-tirosina e L-valina em ácido clorídrico (HCl) 0,1 mol.L⁻¹ e o padrão *Amino Acids Standards, Physiological* (A9906, Fluka) foram obtidos da Sigma-Aldrich.

Os padrões isotópicos *NSK-A Amino Acids Reference Standards* contendo glicina-¹³C₂; ¹⁵N, alanina-²H₄, valina-²H₈, leucina-²H₃, metionina-²H₃, fenilalanina-¹³C₆, tirosina-¹³C₆, ácido aspartico-²H₃, ácido glutâmico-²H₃, ornitina-²H₂, citrulina-²H₂ e arginina-²H₄; ¹³C₅ foram adquiridos da Cambridge Isotope Laboratories.

Os padrões isotópicos trans-4-hidroxi-L-prolina-2,5,5-D₃, L-valina-D₈, glicina-D₅, L-serina-2,3,3-D₃, DL-cistina-2,2',3,3,3',3'-D₆, ácido L-aspartico-2,3,3-D₃, L-fenilalanina-D₅, L-alanina-3,3,3-D₃, L-metionina-D₃, L-triptofano-2',4',5',6',7'-D₅, L-histidina-D₃, L-glutamina-2,3,3,4,4-D₅, L-prolina-2,5,5-D₃, ácido L-glutâmico-2,3,3,4,4-D₅, L-leucina-D₃, L-citrulina-2,3,3,4,4,5,5-D₇ e L-ornitina-2,3,3,4,4,5,5-D₇ foram obtidos da CDN Isotopes.

L-Arginina- ¹³C₆; ¹⁵N₄ e L-lisina-¹³C₆; ¹⁵N₂ foram adquiridos da Cambridge Isotopes.

Padrões de referência

Foram utilizados os padrões de aminoácidos em 0,1 mol.L⁻¹ de HCl (SRM 2389a) e os padrões *Metabolites in Human Plasma* (SRM 1950) do *National Institute of Standards and Technology* (NIST).

Controles de qualidade

Foram utilizados os controles de qualidade em dois níveis (*Amino acid kit*) fornecidos pelo ERNDIM (European research network for evaluation and improvement of screening, diagnosis and treatment of inherited disorders of metabolism)/MCA Laboratory (Queen Beatrix Hospital).

Colunas cromatográficas

As colunas Kinetex PFP (pentafluorofenil) 100 Å 1,7 µm, 30 x 2,10 mm, Luna HILIC (diol cross-linked) 200 Å 3 µm, 150 x 2,00 mm e Kinetex HILIC (sílica não ligada) 100 Å 1,7 µm, 50 x 2,10 mm foram obtidas da Phenomenex (Torrance, CA, USA).

As colunas BEH C18 1,7 µm 130 Å, 50 x 2,1 mm foram obtidas da Waters. Foram utilizadas colunas dedicadas para cada tipo de reagente de pareamento iônico.

Fases móveis

Nos testes utilizando cromatografia em fase reversa e de interação hidrofílica foram utilizadas combinações contendo MeOH, ACN e um tampão com sal volátil, como formiato de amônio em diferentes concentrações e proporções. Nos testes realizados com fase reversa com pareamento iônico foram utilizadas combinações de ACN com soluções de ácidos heptafluorobutírico (HFBA), perfluoropentanóico (NFPA) e tridecafluoroheptanóico (TDFHA) em diferentes concentrações e proporções.

Instrumentação

Foi utilizado um conjunto composto pelo sistema cromatográfico Acquity UPLC Open Architecture (bomba binária Acquity, amostrador CTC 2777, um forno de colunas, equipados com tubulações 0,005" ID x 100 cm) e pelo espectrômetro de massas em *tandem* do tipo triplo quadrupolo Xevo TQ-S operando com probe de eletrospray (ESI) no modo positivo (Waters). O controle dos módulos e aquisição dos dados foi efetuado pelo programa MassLynx MS TM V.4.1 (Waters Corporation, Milford, MA, USA).

Para o desenvolvimento dos métodos de aquisição os seguintes modos de aquisição foram realizados: varredura em um determinado intervalo de razão massa/carga (modo *full scan*), análise de íons produto (modo *daughters scan* e *scan wave DS*) e monitoramento de reações selecionadas (modo SRM). Diferentes parâmetros instrumentais foram utilizados dependendo do modo de aquisição com os seguintes valores típicos: temperatura de dessolvatação de 500°C, temperatura da fonte de 150°C e tensão do capilar de 1 kV. Nitrogênio foi utilizado como gás de dessolvatação e do cone com valores de 1000 L/Hr e ~1 L/Hr, respectivamente. Argônio a um fluxo de 0,15 mL/min foi utilizado na célula de colisão.

Desenvolvimento de método para precipitação proteica

Foi desenvolvido um protocolo para precipitação proteica da fração de plasma obtida em amostras de sangue total coletado em tubo com heparina lítica. Foram combinados em uma microplaca de 96 poços, 20 µL de plasma seguido de adição de 20 µL de padrão interno com aminoácidos isotopicamente marcados. Após 1 minuto de equilíbrio, foram adicionados 75 µL de metanol. A placa foi selada termicamente, agitada em agitador manual por 1 minuto e centrifugada por 15 minutos em 3700 rpm. Após a centrifugação, 50 µL do sobrenadante foram transferidos para um microplaca de fundo cônico e em seguida diluídos com 450 µL de fase móvel inicial. O protocolo está ilustrado na Figura 3.

Figura 3 – Esquema representativo do protocolo de precipitação proteica.

Análise das características físico-químicas dos analitos de interesse

Foram levantadas para o desenho experimental no banco de dados HMDB (*The Human Metabolome Database*) as propriedades físico-químicas massa molecular, solubilidade, constantes de dissociação e de partição dos aminoácidos AILE, ALA, ARG, ASN, ASP, CIT, CYT, CYS, GABA, GLN, GLU, GLY, HIS, HYP, ILE, LEU, LYS, MET, ORN, PHE, PRO, SER, TAU, THR, TRP, TYR e VAL.

Parâmetros cromatográficos

Foram analisados os fatores de eficiência da coluna (N), o fator de retenção (k), a seletividade (α), largura do pico (W) e a resolução (R).

Preparo das soluções

Os testes foram realizados com padrões de alta pureza obtidos comercialmente. Para evitar a saturação da coluna e do detector do espectrômetro de massas, utilizamos a faixa de concentração indicada pelo fabricante. As concentrações dos analitos e dos padrões marcados isotopicamente utilizadas para o afinamento dos parâmetros de detecção por espectrometria de massas foram de 1 mmol.L⁻¹ e 0,5 mmol.L⁻¹ (exceção da glicina-d₃: 2,5 mmol.L⁻¹), respectivamente.

Análises estatísticas

Foi utilizado o programa EP Evaluator® 11 (Data Innovations) para realizar a avaliação estatística dos dados obtidos no método final. O programa é composto por módulos baseado nos guias vigentes da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

Otimização da detecção

Ao todo foram otimizados 67 canais de SRM contendo duas transições de massas para cada um dos 26 aminoácidos de interesse e 19 aminoácidos marcados isotopicamente.

O primeiro parâmetro avaliado foi a geometria da fonte de ESI. A fonte de ESI possui duas coordenadas de posicionamento, uma coordenada de profundidade (Z) e uma coordenada de aproximação (X). Foram estabelecidas as coordenadas X e Y que propiciaram a melhor intensidade de sinal com a infusão direta de uma solução de glicina à 2,5 mmol.L⁻¹ no modo positivo. A glicina foi utilizada para estabelecer a posição que oferece a maior sensibilidade da sua ionização por possuir a menor sensibilidade em comparação aos outros aminoácidos.

Foram realizadas infusões diretas das soluções de cada aminoácido para otimização da sua detecção, inicialmente por *full scan* no intervalo de *m/z* 40-500. Posteriormente os espectros de dissociação dos íons precursores foram adquiridos utilizando energias de colisão variáveis. A análise dos espectros dos íons produtos permitiu definir as transições que seriam utilizadas para o monitoramento de cada aminoácido. Sempre que possível foi descartado perdas comuns como de H₂O e NH₃ para incremento de especificidade. Os perfis de dissociação foram avaliados por meio do modo *Scan Wave DS*, no qual a célula de colisão acumula os íons por meio de barreiras de DC e RF e sincroniza a injeção axial dos íons com o ciclo trabalho do segundo analisador aumentando a sensibilidade de detecção dos íons produtos. No entanto, o modo *Scan Wave DS* para acúmulo de alguns fragmentos com relação massa/carga menor que 50 foi ineficiente e nestes casos foi utilizada a função *daughters scan* para o monitoramento dos íons produtos.

Soluções-estoque dos padrões internos – aminoácidos marcados isotopicamente

Em uma balança analítica foram pesados os aminoácidos descritos na tabela abaixo e cada massa foi transferida individualmente para um tubo de polipropileno estéril (Falcon) com o volume apropriado (50 mL para a DL-Cystine- d_6 e 15 mL para os outros aminoácidos). Em seguida foram adicionamos 50 ou 10 mL de água ultrapura (DL-Cystine- d_6 ou demais aminoácidos, respectivamente). As dissoluções foram obtidas por agitação e sonicação por 5 minutos. Foram preparadas alíquotas das soluções de padrões isotópicos (4,5 mL para cistina- d_6 0,5 mmol.L⁻¹ e 450 µL das soluções estoque restantes).

Tabela 2 – Desenho das soluções estoque para os aminoácidos isotopicamente marcados utilizados como padrões internos.

Código	Aminoácidos isotopicamente marcados	Frasco (g)	Massa molecular (g/mol)	Conc. estoque (mmol.L ⁻¹)	Conc. estoque (mg.mL ⁻¹)
D-7186	trans-4-Hidroxi-L-prolina-2,5,5- d_3	0,1	134,15	5	0,671
D-1076	L-Valina- d_8	0,3	125,20	5	0,626
D-277	Glicina- d_5	5,0	80,10	25	2,003
D-1240	L-Serina-2,3,3- d_3	0,1	108,11	5	0,541
D-898	Ácido L-aspártico-2,3,3- d_3	0,1	136,12	5	0,681
D-1589	L-Fenil- d_5 -alanina	0,5	170,22	5	0,851
D-1297	L-Alanina-3,3,3- d_3	0,5	92,11	5	0,461
D-1292	L-Metionina- d_3	1,0	152,23	5	0,761
D-1522	L-Triptofano-2',4',5',6',7'- d_5	0,1	209,26	5	1,046
D-6679	L-Histidina- d_3	0,1	212,65	5	1,063
D-2532	L-Glutamina-2,3,3,4,4- d_5	0,1	151,18	50	7,559
D-6266	L-Prolina-2,5,5- d_3	0,3	118,15	5	0,591
D-899	Ácido L-glutâmico-2,3,3,4,4- d_5	0,1	152,16	5	0,761
D-1973	L-Leucina- d_3	0,5	134,19	5	0,671
D-7306	L-Citrulina-2,3,3,4,4,5,5- d_7	0,0	182,23	5	0,911
D-7319	L-Ornitina-2,3,3,4,4,5,5- d_7	0,1	175,67	5	0,878
CNLM-539-H	L-Arginina-U- ¹³ C ₆ ;U- ¹⁵ N ₄	0,3	220,59	5	1,103
CNLM-291-H	L-Lisina-U- ¹³ C ₆ ;U- ¹⁵ N ₂	0,3	227,05	5	1,135
D-5301	DL-Cistina-2,2',3,3,3',3'- d_6	0,1	246,33	0,5	0,123

Solução de uso dos padrões internos

Foram adicionados os volumes indicados na tabela abaixo em um balão volumétrico de 50 mL, o volume final foi ajustado para 50 mL com a adição de água ultrapura, e foram preparadas alíquotas de 5 mL.

Tabela 3 - Desenho da solução de uso para os aminoácidos isotopicamente marcados utilizados como padrões internos.

Código	Aminoácidos isotopicamente marcados	Solução estoque (mmol.L ⁻¹)	Adicionar para 50 mL (μL)	Conc. final (mmol.L ⁻¹)
D-7186	trans-4-Hidroxi-L-prolina-2,5,5- <i>d</i> ₃	5	400	40
D-1076	L-Valina- <i>d</i> ₈	5	400	40
D-277	Glicina- <i>d</i> ₅	25	400	200
D-1240	L-Serina-2,3,3- <i>d</i> ₃	5	400	40
D-5301	DL-Cistina-2,2',3,3,3',3'- <i>d</i> ₆	0,5	4000	40
D-898	Ácido L-aspártico-2,3,3- <i>d</i> ₃	5	400	40
D-1589	L-Fenil- <i>d</i> ₅ -alanina	5	400	40
D-1297	L-Alanina-3,3,3- <i>d</i> ₃	5	400	40
D-1292	L-Metionina- <i>d</i> ₃	5	400	40
D-1522	L-Triptofano-2',4',5',6',7'- <i>d</i> ₅	5	400	40
D-6679	L-Histidina- <i>d</i> ₃	5	400	40
D-2532	L-Glutamina-2,3,3,4,4- <i>d</i> ₅	50	400	400
D-6266	L-Prolina-2,5,5- <i>d</i> ₃	5	400	40
D-899	Ácido L-glutâmico-2,3,3,4,4- <i>d</i> ₅	5	400	40
D-1973	L-Leucina- <i>d</i> ₃	5	400	40
D-7306	L-Citrulina-2,3,3,4,4,5,5- <i>d</i> ₇	5	400	40
D-7319	L-Ornitina-2,3,3,4,4,5,5- <i>d</i> ₇	5	400	40
CNLM-539-H	L-Arginina-U- ¹³ C ₆ ;U- ¹⁵ N ₄	5	400	40
CNLM-291-H	L-Lisina-U- ¹³ C ₆ ;U- ¹⁵ N ₂	5	400	40

Ácido clorídrico à 0,1 mol.L⁻¹ em água

Em uma proveta adicionamos 417 μL de ácido hidrocloreídrico 37% a aproximadamente 45 mL de água ultrapura, em seguida completamos com água ultra até 50 mL.

Soluções estoque de aminoácidos para a curva de calibração 2

Para a quantificação, foram preparadas duas curvas de calibração independentes: uma a partir de uma solução comercial da Fluka que contém a maior parte dos aminoácidos, e outra que foi preparada *in house* contendo quatro aminoácidos (*allo*-isoleucina, asparagina, glutamina e glicina). Isso foi necessário, pois a curva comercial não continha esses aminoácidos e/ou os mesmos eram instáveis.

Foram preparadas as soluções estoque para os aminoácidos listados na tabela abaixo de acordo com a pureza dos mesmos que foram subsequentemente aliqüotadas (1 mL) e armazenadas à -80°C.

Tabela 4 – Desenho das soluções estoque de aminoácidos utilizadas para confecção da curva de calibração denominada 2.

Aminoácido	Frasco (g)	Massa molecular (g/mol)	Conc. estoque (mmol.L ⁻¹)	Conc. estoque (mg.mL ⁻¹)	Peso teórico em 10 mL (g)
L- <i>Allo</i> -isoleucina	0,025	131,17	10	1,31	0,0131
L-Asparagina	0,1	132,12	10	1,32	0,0132
L-Glutamina	1	146,14	10	1,46	0,0146
Glicina	1	75,07	10	0,75	0,0075

Soluções de limpeza forte e fraca do sistema de injeção

Soluções de isopropanol/água (1:1, volume/volume) e MeOH/água (1:4, volume/volume) foram preparadas para limpeza do sistema de injeção 2777, tanto de sua seringa quanto da sua válvula de injeção.

Soluções estoque de aminoácidos para preparo das soluções de validação

Foram preparadas as soluções estoque para os aminoácidos listados na tabela abaixo de acordo com a pureza dos mesmos. As soluções foram aliqüotadas e armazenadas à -80°C.

Tabela 5 – Desenho das soluções estoque utilizadas no preparo das soluções empregadas na validação analítica.

Aminoácido	Massa molecular (g/mol)	Peso teórico (g)	HCl 0,1 M (L)	Conc. final (mol.L ⁻¹)	Conc. final (mg.mL ⁻¹)	Pureza (%)	Peso corrigido (g)
Ácido L-aspártico	133,10	0,1331	0,01	0,10	13,6	98,0	0,1358
Ácido L-glutâmico	147,13	0,1471	0,01	0,10	14,9	99,0	0,1486
Ácido γ-aminobutírico	103,12	0,1031	0,01	0,10	10,4	99,0	0,1042
Glicina	75,07	0,0751	0,01	0,10	7,6	99,0	0,0758
Hidroxiprolina	131,13	0,1311	0,01	0,10	13,3	98,5	0,1331
L-Alanina	89,09	0,0891	0,01	0,10	9,1	98,0	0,0909
L- <i>Allo</i> -isoleucina	131,17	0,0131	0,01	0,01	1,3	99,0	0,0132
L-Arginina	210,66	0,2107	0,01	0,10	21,5	98,0	0,2150
L-Asparagina	132,12	0,1321	0,01	0,10	13,5	98,0	0,1348
L-Cistina	240,30	0,2403	0,01	0,10	24,5	98,0	0,2452
L-Citrulina	175,19	0,1752	0,01	0,10	17,9	98,0	0,1788
L-Fenilalanina	165,19	0,1652	0,01	0,10	16,9	98,0	0,1686
L-Glutamina	146,14	0,1461	0,01	0,10	14,8	99,0	0,1476
L-Histidina	209,63	0,2096	0,01	0,10	21,4	98,0	0,2139
L-Isoleucina	131,17	0,1312	0,01	0,10	13,4	98,0	0,1338
L-Leucina	131,17	0,1312	0,01	0,10	13,4	98,0	0,1338
L-Lisina	182,65	0,1827	0,01	0,10	18,6	98,0	0,1864
L-Metionina	149,21	0,1492	0,01	0,10	15,2	98,0	0,1523
L-Ornitina	168,62	0,1686	0,01	0,10	17,0	99,0	0,1703
L-Prolina	115,13	0,1151	0,01	0,10	11,6	99,0	0,1163
L-Serina	105,09	0,1051	0,01	0,10	10,6	99,0	0,1062
L-Taurina	125,15	0,1252	0,01	0,10	12,5	99,8	0,1254
L-Tirosina	181,19	0,1812	0,01	0,10	18,5	98,0	0,1849
L-Treonina	119,12	0,1191	0,01	0,10	12,2	98,0	0,1216
L-Triptofano	204,23	0,2042	0,01	0,10	20,8	98,0	0,2084
L-Valina	117,15	0,1172	0,01	0,10	12,0	98,0	0,1195

Curva de calibração – grupo 1

A curva de calibração 1 foi preparada a partir do kit de padrões Fluka (A9906, *Amino acid standards, physiological: acidics, neutrals, and basics*) contendo 22 aminoácidos de interesse na concentração de 0,5 μmol.mL⁻¹ em 0,2 N citrato de lítio, pH 2,2 contendo 0,1% fenol e 2% tiodiglicol. Essa solução foi diluída de acordo com a tabela abaixo em água grau HPLC produzindo seis pontos de curva de calibração.

Tabela 6 – Desenho da curva do grupo de aminoácidos denominado grupo 1.

	Padrão sigma (µL)	Água (µL)	Volume final (µL)	Concentração final (µmol.L ⁻¹)
CC 6	1200	800	2000	300
	Sol. CC 6 (µL)	Água (µL)	Volume final (µL)	Concentração final (µmol.L ⁻¹)
CC 1	33,3	966,7	1000,0	10,0
CC 2	62,5	937,5	1000,0	18,8
CC 3	125,0	875,0	1000,0	37,5
CC 4	250,0	750,0	1000,0	75,0
CC 5	500,0	500,0	1000,0	150,0

Foram realizadas alíquotas de 50 µL em microtubos e armazenadas à -80°C.

Curva de calibração – grupo 2

Foi preparada uma curva para o grupo 2 utilizando as soluções estoque a 10 mmol.L⁻¹ de L-*allo*-isoleucina, L-glutamina, L-asparagina e glicina de acordo com as tabelas abaixo. Foram realizadas alíquotas de 50 µL em microtubos e armazenadas em -80°C.

Tabela 7 – Desenho da elaboração da solução do ponto mais concentrado (CC 5) da curva de calibração do grupo de aminoácidos denominado grupo 2.

	Sol. glicina 10 mmol.L ⁻¹ (µL)	Sol. glutamina 10 mmol.L ⁻¹ (µL)	Sol. <i>allo</i> -isoleucina 10 mmol.L ⁻¹ (µL)	Sol. asparagina 10 mmol.L ⁻¹ (µL)	Água (µL)	Volume final (µL)
CC 5	80	100	20	20	780	1000

Tabela 8 – Desenho da construção da curva de calibração do grupo de aminoácidos 2 a partir da solução do ponto de calibração CC5.

	Sol. CC 5 (µL)	Água (µL)	Volume final (µL)
CC 1	25	475	500
CC 2	50	350	400
CC 3	100	300	400
CC 4	200	200	400

Tabela 9 – Concentrações finais para cada aminoácido da curva de calibração do grupo 2.

Concentrações curva grupo 2 ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)				
	Glicina	Glutamina	Asparagina	<i>Allo</i> -isoleucina
CC 1	50,0	62,5	12,5	12,5
CC 2	100,0	125,0	25,0	25,0
CC 3	200,0	250,0	50,0	50,0
CC 4	400,0	500,0	100,0	100,0
CC 5	800,0	1000,0	200,0	200,0

Preparo de amostras para a validação analítica

Diálise de plasma

Foi preparado um *pool* de plasma de amostras colhidas em tubo com heparina lítica, combinando amostras que seriam destinadas ao descarte. As amostras foram descaracterizadas e dialisadas por sete dias contra um tampão fosfato salino (PBS) sob agitação magnética e a 4°C com trocas diárias do tampão. O corte foi de 12.000-16.000 Da (saco de diálise de 25 angstroms de porosidade). A eliminação completa dos níveis basais dos aminoácidos foi verificada analisando séries temporais por LC-MS/MS.

Preparo das amostras em plasma dialisado

Utilizando o plasma dialisado e as soluções estoque de aminoácidos à 100 mmol.L⁻¹, com exceção da *allo*-isoleucina (10 mmol.L⁻¹) foram preparadas soluções com adição de aminoácidos em quantidades variadas, conforme descritas abaixo, onde cada concentração reflete a concentração máxima esperada em plasma humano.

Tabela 10 – Elaboração da solução mix de aminoácidos do grupo 1 com plasma dialisado a partir da solução estoque a 100 mmol.L⁻¹ de cada aminoácido. O volume final foi de 10 mL (2143 µL das soluções em 7857 µL de plasma dialisado).

Aminoácido	Conc. Final (µmol.L⁻¹)	Sol. estoque (µL)
Alanina	1500	150
Arginina	1000	100
Ácido aspártico	200	20
Cistina	300	30
Ácido glutâmico	600	60
Histidina	1000	100
Isoleucina	1000	100
Leucina	1500	150
Lisina	1500	150
Metionina	1000	100
Fenilalanina	1500	150
Prolina	1500	150
Serina	600	60
Treonina	600	60
Tirosina	1000	100
Valina	1500	150
Hidroxiprolina	1000	100
Citrulina	1000	100
Ornitina	1500	150
Taurina	600	60
GABA	30	3
Triptofano	1000	100

Tabela 11 - Elaboração da solução mix de aminoácidos do grupo 2 com plasma dialisado a partir da solução estoque a 100 mmol.L⁻¹ de cada aminoácido, com exceção da *allo*-isoleucina (10 mmol.L⁻¹). O volume final foi de 10 mL (1360 uL das soluções em 8640 uL de plasma dialisado).

Aminoácido	Conc. Final (µmol.L⁻¹)	Sol. estoque (µL)
<i>Allo</i> -isoleucina	1000	1000
Glutamina	1500	150
Asparagina	600	60
Glicina	1500	150

Linearidade

Utilizando a solução mix 1 e 2 e o plasma dialisado, foram preparados 11 níveis de linearidade para cada grupo conforme a tabela abaixo. Foram feitas alíquotas das soluções que foram armazenadas a -80°C.

Tabela 12 – Esquema de diluição das amostras de linearidade utilizando a solução de plasma com aminoácidos e plasma dialisado com adição de água.

Soluções	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11
Solução de plasma (mix 1 ou 2) (μL)	50	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
Solução de plasma com adição de H ₂ O (μL)	950	900	800	700	600	500	400	300	200	100	0

As concentrações calculadas para os pontos elaborados seguem abaixo:

Tabela 13 – Concentrações obtidas (μmol.L⁻¹) para cada aminoácido nos 11 níveis de linearidade elaborados para o grupo 1 e 2.

(Continua)

Aminoácidos	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11
Alanina	75	150	300	450	600	750	900	1050	1200	1350	1500
Arginina	50	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
Ácido aspártico	10	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200
Cistina	15	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300
Ácido glutâmico	30	60	120	180	240	300	360	420	480	540	600
Histidina	50	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
Isoleucina	50	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
Leucina	75	150	300	450	600	750	900	1050	1200	1350	1500
Lisina	75	150	300	450	600	750	900	1050	1200	1350	1500
Metionina	50	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
Fenilalanina	75	150	300	450	600	750	900	1050	1200	1350	1500
Prolina	75	150	300	450	600	750	900	1050	1200	1350	1500
Serina	30	60	120	180	240	300	360	420	480	540	600
Treonina	30	60	120	180	240	300	360	420	480	540	600
Tirosina	50	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
Valina	75	150	300	450	600	750	900	1050	1200	1350	1500
Hidroxiprolina	50	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
Citrulina	50	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
Ornitina	75	150	300	450	600	750	900	1050	1200	1350	1500
Taurina	30	60	120	180	240	300	360	420	480	540	600

Tabela 13 – Concentrações obtidas ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) para cada aminoácido nos 11 níveis de linearidade elaborados para o grupo 1 e 2.

(Conclusão)

Aminoácidos	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11
GABA	1,5	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
Triptofano	50	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
Allo-isoleucina	50	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
Glutamina	75	150	300	450	600	750	900	1050	1200	1350	1500
Asparagina	30	60	120	180	240	300	360	420	480	540	600
Glicina	75	150	300	450	600	750	900	1050	1200	1350	1500

Efeito matriz

De acordo com o desenho da linearidade em matriz descrita acima, foram feitas soluções, nos mesmos 11 níveis de concentração descritos, divididas em dois grupos, substituindo somente a matriz utilizada anteriormente (plasma dialisado) por água ultrapura.

Arraste

As amostras L1 e L11, preparadas para o experimento de linearidade foram utilizadas na avaliação de arraste do sistema cromatográfico e de injeção.

Precisão

Utilizando a solução mix 1 e 2 e o plasma dialisado com adição de água, foram preparados 3 níveis de precisão (PREC 1, PREC 2 e PREC 3) para cada grupo conforme a tabela abaixo. As amostras foram aliquotadas e armazenadas a -80°C .

Tabela 14 - Esquema de diluição das amostras de precisão utilizando a solução de plasma com adição dos aminoácidos e plasma dialisado com adição de água.

Soluções	PREC 1	PREC 2	PREC 3
Solução de plasma (mix) (μL)	50	200	500
Solução de plasma com adição de H_2O (μL)	950	800	500

As concentrações previstas para os pontos elaborados seguem abaixo:

Tabela 15 - Concentrações obtidas ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) para cada aminoácido nos 3 níveis de precisão elaborados para o grupo 1 e 2.

Aminoácidos	PREC 1	PREC 2	PREC 3
Ácido aspártico	10	40	100
Ácido glutâmico	30	120	300
Alanina	75	300	750
<i>Allo</i> -isoleucina	50	200	500
Arginina	50	200	500
Asparagina	30	120	300
Cistina	15	60	150
Citrulina	50	200	500
Fenilalanina	75	300	750
GABA	1,5	6	15
Glicina	75	300	750
Glutamina	75	300	750
Hidroxiprolina	50	200	500
Histidina	50	200	500
Isoleucina	50	200	500
Leucina	75	300	750
Lisina	75	300	750
Metionina	50	200	500
Ornitina	75	300	750
Prolina	75	300	750
Serina	30	120	300
Taurina	30	120	300
Tirosina	50	200	500
Treonina	30	120	300
Triptofano	50	200	500
Valina	75	300	750

Limite de quantificação

Foram elaboradas duas soluções de plasma com adição de 100 μL das soluções mix 1 e 2 em 900 μL de plasma dialisado para cada grupo. A partir dessas soluções foram preparados sete níveis de diluição com uma solução de plasma adicionado de água (10:90, H_2O :Plasma dialisado). As amostras foram aliquoteadas e armazenadas a -80°C .

Tabela 16 - Esquema de diluição das amostras de limite de quantificação (LOQ) utilizando a solução de plasma com aminoácidos e plasma dialisado com adição de água.

Soluções	LOQ 1	LOQ 2	LOQ 5	LOQ 10	LOQ 20	LOQ 50	LOQ 100
Solução de plasma adicionado de padrão (µL)	1000	500	200	100	50	20	10
Solução de plasma com adição de H ₂ O (µL)	0	500	800	900	950	980	990

As concentrações das soluções estão especificadas na tabela abaixo:

Tabela 17 - Concentrações obtidas (µmol.L⁻¹) para cada aminoácido nos níveis de limite de quantificação elaborados para o grupo 1 e 2.

Aminoácido	LOQ 1	LOQ 2	LOQ 5	LOQ 10	LOQ 20	LOQ 50	LOQ 100
Ácido aspártico	20	10	4	2	1	0,4	0,2
Ácido glutâmico	60	30	12	6	3	1,2	0,6
Alanina	150	75	30	15	7,5	3	1,5
<i>Allo</i> -isoleucina	100	50	20	10	5	2	1
Arginina	100	50	20	10	5	2	1
Asparagina	60	30	12	6	3	1,2	0,6
Cistina	30	15	6	3	1,5	0,6	0,3
Citrulina	100	50	20	10	5	2	1
Fenilalanina	150	75	30	15	7,5	3	1,5
GABA	3	1,5	0,6	0,3	0,15	0,06	0,03
Glicina	150	75	30	15	7,5	3	1,5
Glutamina	150	75	30	15	7,5	3	1,5
Hidroxiprolina	100	50	20	10	5	2	1
Histidina	100	50	20	10	5	2	1
Isoleucina	100	50	20	10	5	2	1
Leucina	150	75	30	15	7,5	3	1,5
Lisina	150	75	30	15	7,5	3	1,5
Metionina	100	50	20	10	5	2	1
Ornitina	150	75	30	15	7,5	3	1,5
Prolina	150	75	30	15	7,5	3	1,5
Serina	60	30	12	6	3	1,2	0,6
Taurina	60	30	12	6	3	1,2	0,6
Tirosina	100	50	20	10	5	2	1
Treonina	60	30	12	6	3	1,2	0,6
Triptofano	100	50	20	10	5	2	1
Valina	150	75	30	15	7,5	3	1,5

Exatidão

Foram armazenadas amostras de plasma obtidas no laboratório do Grupo Fleury que foram coletadas para a realização da quantificação de aminoácidos em plasma pela metodologia realizada no laboratório *Quest Nichols Diagnostics*. As amostras foram descaracterizadas e armazenadas à -20°C em tubo de alíquota.

Foram avaliadas também amostras do programa de acreditação do *European Research Network for evaluation and improvement of screening, Diagnosis and treatment of Inherited disorders of Metabolism* (ERNDIM) dos anos 2011, 2012, 2013 e 2014, contendo oito amostras de plasma liofilizadas em cada série. As amostras foram ressuspendidas em água ultrapura, homogeneizadas, alíquotadas e armazenadas à -20°C.

O material de referência certificado *Metabolites in Human Plasma* (SRM 1950) foi adquirido do NIST, com certificado válido até 30 de setembro de 2016, e armazenado à -80°C. O SRM 1950 é composto por plasma humano “normal”. O plasma foi obtido de 100 indivíduos em jejum com coleta em tubos com heparina lítica.

Avaliação da regressão linear para a calibração

As concentrações dos analitos nas amostras foram calculadas utilizando os resultados da curva de calibração, que é definida como a relação entre a resposta do instrumento e concentrações conhecidas de analito. Para avaliar a distribuição da variância dentro de todo o intervalo das curvas de calibração elaboradas foi empregado um teste para avaliar a homoscedasticidade do método. Utilizamos o teste F (distribuição de Snedecor) dentro de um intervalo de confiança de 99%. Considera-se que, se F calculado é maior que o F tabelado as variâncias não são uniformes ao longo da curva e, portanto, o método é heteroscedástico (FRANCISCO, 2008). Evidenciado heteroscedasticidade do método, o modelo dos mínimos quadrados para determinar a melhor regressão linear ponderada que permita distribuir a variância da forma mais uniforme dentro do intervalo da curva de calibração é empregado. O cálculo dos fatores de ponderação foi realizado empiricamente por meio de

ponderações bem usuais tais como $1/x$, $1/2$, $1/x$, $1/x^2$, $1/y$, $1/2$, $1/y$ e $1/y^2$ como uma “aproximação de variância”.

Equação 1:

$$\%RE = \frac{C_{exp} - C_{nom}}{C_{nom}} \times 100$$

O fator de ponderação mais adequado foi escolhido com base no cálculo do erro relativo percentual (%RE), o qual compara a concentração obtida através da equação resultante da regressão (C_{exp}), com a concentração teórica ou nominal (C_{nom}) através da Equação 1 (ALMEIDA; CASTEL-BRANCO; FALCÃO, 2002).

O erro relativo percentual (%RE), foi avaliado pelos seus valores em função da concentração. O melhor fator de ponderação foi aquele que resultou na menor soma dos valores de %RE ao longo do intervalo de concentrações.

Validação

Os ensaios de validação foram realizados segundo as normas regentes estabelecidas pelo CLSI, descrito no documento EP10-A3 *Preliminary Evaluation of Quantitative Clinical Laboratory Methods; Approved Guideline* (CLSI, 2006), utilizando o programa EP Evaluator para análise dos dados.

Os ensaios de validação foram realizados seguindo o esquema mostrado na figura abaixo:

Figura 4 - Representação esquemática do desenho da validação analítica do método desenvolvido.

Critérios de aceitação da validação

Para validação do método quantitativo para os aminoácidos escolhidos foram utilizados os erros obtidos através da variação biológica intra e inter indivíduo desses compostos em humanos. Ricos e colaboradores (1999), calcularam com base na literatura os erros totais, as imprecisões e bias desejáveis para a quantificação dos aminoácidos em plasma (Tabela 18).

CVi é o coeficiente de variação biológica intra-indivíduos, o CVg é o coeficiente de variação inter-indivíduos ou intra-grupos. O erro total permitido é calculado pela soma da imprecisão (erro aleatório) com a inexatidão (erro sistemático). O erro aleatório é calculado exclusivamente sobre o coeficiente de variação intra-indivíduo, representando uma análise de reprodutibilidade, já o erro sistemático engloba tanto a variação intra e inter-indivíduos (RICÓS et al., 1999).

Tabela 18 - Tabela de erros totais adaptada de Ricos e colaboradores (2014). I é imprecisão, B é bias e TE é erro total. CV_i= coeficiente de variação biológica intra-indivíduos e CV_g= coeficiente de variação inter-indivíduos ou intra-grupos.

Analito	Variação biológica		Especificação Desejada			Especificação mínima		
	CV _i	CV _g	I(%)	B(%)	TE(%)	I(%)	B(%)	TE(%)
Ácido aspártico	31,2	55,1	15,6	15,8	41,6	23,4	23,7	62,4
Ácido glutâmico	46,4	79,9	23,2	23,1	61,4	34,8	34,6	92,1
Alanina	14,7	55,8	7,4	14,4	26,6	11,0	21,6	39,8
Arginina	19,3	34,1	9,7	9,8	25,7	14,5	14,7	38,6
Asparagina	12,3	28	6,2	7,6	17,8	9,2	11,5	26,7
Citrulina	21,4	43,9	10,7	12,2	29,9	16,1	18,3	44,8
Fenilalanina	9,5	40,6	4,8	10,4	18,3	7,1	15,6	27,4
Glicina	11,8	40,3	5,9	10,5	20,2	8,9	15,7	30,3
Glutamina	12,1	22	6,1	6,3	16,3	9,1	9,4	24,4
Hidroxiprolina	34,5	56,7	17,3	16,6	45,1	25,9	24,9	67,6
Histidina	9,7	27,2	4,9	7,2	15,2	7,3	10,8	22,8
Isoleucina	15,5	45,5	7,8	12	24,8	11,6	18,0	37,2
Leucina	14,8	44	7,4	11,6	23,8	11,1	17,4	35,7
Lisina	11,5	38,2	5,8	10	19,5	8,6	15,0	29,2
Metionina	14,7	43,4	7,4	11,5	23,6	11,0	17,2	35,4
Ornitina	18,4	54,9	9,2	14,5	29,7	13,8	21,7	44,5
Prolina	17	104,4	8,5	26,4	40,5	12,8	39,7	60,7
Serina	12,8	42,8	6,4	11,2	21,7	9,6	16,8	32,6
Taurina	30,6	44	15,3	13,4	38,6	23,0	20,1	58,0
Tirosina	10,5	61	5,3	15,5	24,1	7,9	23,2	36,2
Treonina	17,9	33,1	9	9,4	24,2	13,4	14,1	36,3
Triptofano	22,7	152,6	11,4	38,6	57,3	17,0	57,9	85,9
Valina	10,6	40,1	5,3	10,4	19,1	8,0	15,6	28,7

Avaliação da linearidade

O ensaio de linearidade foi construído utilizando 11 níveis de concentração para cada analito. As concentrações foram obtidas pela mistura do plasma adicionado de aminoácidos (solução mix) com o plasma dialisado. As concentrações estimadas buscaram proporcionar ao método uma linearidade 30% acima do intervalo de referência, por muitas vezes superando os níveis patológicos descritos para diversas

doenças. As soluções foram analisadas após a execução do protocolo de precipitação proteica. Os 11 níveis foram processados em triplicata técnica no mesmo dia.

Utilizamos o método polinomial para a análise dos dados que primeiramente avalia a não linearidade comparando os ajustes de um polinômio não linear com um polinômio linear. Secundariamente, se o melhor ajuste é encontrado no polinômio não linear comparamos se a diferença entre o polinômio não linear e o polinômio linear é menor que o *bias* permitido (50% do erro total). As regras para linearidade devem ser provenientes de regras para o *bias*, e devem ser inferior ou igual a essas regras. Regras para o *bias* devem ser inferior ou igual a regras para os erros totais permitidos (NCCLS, 2003). O valor do desvio e o coeficiente padrão foram calculados em cada nível, além de um *pool* do desvio padrão e coeficiente de variação para todos os níveis. O teste de Bartlett foi executado para verificar se o desvio padrão é constante em todos os níveis. Se o desvio padrão é constante, foi utilizada uma regressão comum para os cálculos; se o desvio não foi constante para todos os níveis foi utilizada outra forma regressão ponderada. Valores de preestabelecidos (X) são atribuídos valores dos espécimes na regressão. Os valores das medições repetidas foram inseridos (Y). Foram determinados um "melhor" ajuste polinomial aos dados. O melhor polinômio é o linear. Alternativamente, pode ser uma curva quadrática ou cúbica. O desvio da linearidade foi calculado, sendo a diferença entre os valores ajustados do melhor polinomial e a linha. Se qualquer não linearidade excede desvio de linearidade admissível, os dados são considerados não lineares. Caso contrário, é linear.

Avaliação do limite de quantificação

O desenho do experimento para avaliação do limite de quantificação foi feito com base no documento EP-17A (NCCLS, 2004a). Os limites de quantificação foram avaliados em intervalos de 5 a 7 níveis de concentração diariamente por 20 dias. Os critérios para aceitação do limite de quantificação é um coeficiente de variação máximo de 20% dentro de um intervalo de confiança de 95% entre as quantificações obtidas durante os dias de análise.

Avaliação de arraste

A avaliação do arraste dentro do sistema cromatográfico e do sistema de injeção foi realizado seguindo as orientações sugeridas pelo programa EP Evaluator. Onze replicatas da amostra baixa (L) e dez replicatas da amostra alta (H) foram processadas e analisadas na seguinte ordem: L1, L2, L3, H1, H2, L4, H3, H4, L5, L6, L7, L8, H5, H6, L9, H7, H8, L10, H9, H10, L11. A média e o desvio padrão das replicatas L2, L3, L6, L7 e L8 (amostra baixa seguida de amostra baixa) foram calculadas. A média e o desvio padrão das replicatas L4, L5, L9, L10 e L11 (amostra baixa seguida de amostra alta) foram calculadas. O índice de arraste foi considerado a diferença entre a média alta-baixa e a média baixa-baixa. O limite de erro aceito foi de três vezes o desvio padrão das replicatas baixas seguidas de amostras baixas.

Avaliação de precisão

Utilizando o protocolo descrito no documento EP5-A (NCCLS, 2004b) foi realizado um ensaio preliminar para estabelecer o desvio padrão para cada espécie obtido em um mesmo dia, em até 20 replicatas técnicas. Após o ensaio preliminar, foram realizadas análises em duplicatas diárias de dois a três níveis de concentração para cada analito, por 20 dias.

O programa calcula o desvio padrão do ensaio preliminar. Este desvio padrão preliminar é multiplicado por um fator definido pelo usuário (geralmente 5,5) para calcular a diferença máxima aceitável entre repetições. Qualquer valor cujo ultrapasse esse valor máximo é declarado um *outlier*, e todo o dia é excluído da análise. O erro total permitido foi retirado da Tabela 18 e foi considerado o erro randômico de 25%, pois no programa não é possível inserir a imprecisão de forma direta, o intervalo de confiança estabelecido foi de 95%.

Avaliação da exatidão

A exatidão do método foi avaliada com amostras provenientes do programa de referência ERNDIM e com o material de referência certificado do NIST. O método foi

também comparado ao método por LC-MS/MS do laboratório americano *Quest Diagnostics*. O ERNDIM fornece os valores médios dosados em laboratórios de todo o mundo que são quantificados por diferentes metodologias. Foram analisadas de 20 a 50 amostras para cada aminoácido, excluindo a *allo*-isoleucina, onde as amostras positivas de pacientes e amostras do programa de acreditação são raras. O material de referência em plasma do NIST apresenta valores quantificados para 16 aminoácidos em diferentes métodos. Os aminoácidos alanina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, treonina, tirosina, valina foram quantificados por LC-MS/MS, CG-TOF-MS com derivação por N-(tert-butildimetilsilil)-N-metil-trifluoracetamida (MTBSTFA) e CG-TOF-MS com derivação por cloroformiato de propila (PCF). Os aminoácidos arginina, ácido glutâmico, ornitina e fenilalanina foram quantificados por LC-MS/MS. O material foi processado e quantificado em duplicata em dois dias distintos. Foram calculadas as médias dos valores e seus desvios padrão e comparados diretamente com os valores e incertezas fornecidos pelo NIST. Os valores foram considerados equivalentes dentro dos erros aceitáveis para cada aminoácido descritos na Tabela 18.

Foi impossível estimar a precisão dos métodos de referência (Quest e ERNDIM), então os métodos foram considerados com uma precisão semelhante, com o mesmo desvio padrão do método desenvolvido.

Para avaliar os dados através do programa EP Evaluator foi utilizada a regressão Passing-Bablok, que não é distorcida por valores discrepantes. Os métodos comparados são considerados estatisticamente idênticos, se no intervalo de confiança de 95% para a inclinação inclui o valor 1,00 e para a intercepção inclui o valor 0. O erro total permitido foi considerado conforme a Tabela 18.

Avaliação do efeito matriz

A avaliação do efeito matriz foi realizada utilizando amostras da linearidade em plasma e soluções aquosas elaboradas com o protocolo de linearidade. Utilizando 11 níveis de concentração para cada analito, as concentrações foram obtidas pela mistura do plasma adicionado de aminoácidos (solução mix) com o plasma dialisado

ou com água ultrapura. As soluções e amostras foram analisadas após a execução do protocolo de precipitação proteica. Os 11 níveis, das amostras e das soluções aquosas, foram processados em triplicata técnica no mesmo dia. A comparação entre a resposta obtida pelas amostras em matriz biológica e as soluções aquosas foram realizadas e a tolerância para a variação da resposta foi de 25% (KORFMACHER, 2004).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Propriedades dos analitos de interesse

Os aminoácidos são compostos orgânicos que contêm um grupo amino ($-\text{NH}_2$), um grupo carboxil ($-\text{COOH}$) ligados por um carbono. Eles se diferenciam pela presença de um grupo R. Quimicamente, as propriedades ácido-base características de cada aminoácido, bem como a diversidade dos seus grupos R e suas interações, dão complexidade à análise conjunta de diferentes aminoácidos. As diferentes solubilidades e propriedades ácido-base dos aminoácidos fornecem a base para sua separação.

As informações físico-químicas mais relevantes ao desenvolvimento do trabalho como massa molecular, solubilidade, constantes de dissociação dos grupos ionizáveis (K) e coeficientes de partição (P) foram verificadas em bancos de informação metabolômica (Tabela 19).

Tabela 19 - Propriedades físico-químicas dos aminoácidos de interesse.

(Continua)

	Massa molecular (g/mol)	pKa ($-\text{COOH}$)	pKa ($-\text{NH}_2$)	LogP	Estrutura
AILE	131,17	2,79	9,59	-1,5
ALA	89,09	2,47	9,48	-2,8

Tabela 19 - Propriedades físico-químicas dos aminoácidos de interesse.

(Continuação)

	Massa molecular (g/mol)	pKa (-COOH)	pKa (-NH ₂)	LogP	Estrutura
ARG	174,20	2,41	12,41	-3,2
ASN	132,12	2,0	8,43	-4,3
ASP	133,10	1,7/5,11	9,61	-3,5
CIT	175,19	2,27	9,23	-3,9

Tabela 19 - Propriedades físico-químicas dos aminoácidos de interesse.

(Continuação)

	Massa molecular (g/mol)	pKa (-COOH)	pKa (-NH ₂)	LogP	Estrutura
CYS	121,16	2,35	9,05	-2,8
GABA	103,12	4,53	10,22	-2,9
GLN	146,14	2,15	9,31	-4,0
GLY	75,07	2,31	9,24	-3,4

Tabela 19 - Propriedades físico-químicas dos aminoácidos de interesse.

(Continuação)

	Massa molecular (g/mol)	pKa (-COOH)	pKa (-NH ₂)	LogP	Estrutura
HIS	155,15	1,85	9,44	-3,6
HYP	131,13	1,64	10,62	-3,7
ILE	131,17	2,79	9,59	-1,5
LEU	131,17	2,79	9,52	-1,6

Tabela 19 - Propriedades físico-químicas dos aminoácidos de interesse.

(Continuação)

	Massa molecular (g/mol)	pKa (-COOH)	pKa (-NH ₂)	LogP	Estrutura
LYS	146,19	2,74	10,29	-3,2
MET	149,21	2,53	9,5	-2,2
PHE	165,19	2,47	9,45	-1,2
PRO	115,13	1,94	11,33	-2,6

Tabela 19 - Propriedades físico-químicas dos aminoácidos de interesse.

(Continuação)

	Massa molecular (g/mol)	pKa (-COOH)	pKa (-NH ₂)	LogP	Estrutura
SER	105,09	2,03	8,93	-3,9
TAU	125,15	1,5	9,34	-2,6
THR	119,12	2,21	9	-3,5
TRP	204,23	2,54	9,4	-1,1

Tabela 19 - Propriedades físico-químicas dos aminoácidos de interesse.

(Conclusão)

	Massa molecular (g/mol)	pKa (-COOH)	pKa (-NH ₂)	LogP	Estrutura
TYR	181,19	2,0	9,19	-1,5
VAL	117,15	2,30	9,72	-2,26

Fonte: The Human Metabolome Database (HMDB, 2014).

Foi eleita a técnica de ionização por *eletrospray* no modo positivo para a detecção dos aminoácidos. Alternativamente, ionização no modo negativo poderia ser empregada. No entanto, a maioria dos aminoácidos investigados apresentou maior sensibilidade no modo de ionização positiva, conforme relatado na literatura (DELL; KOELLENSPERGER; HANN, 2012). Portanto, os parâmetros e configurações de fragmentação só foram otimizados para aminoácidos ionizados positivamente. Após análises do pKa (COOH), foi verificado que o pH ajustado em 3 seria o mais adequado para favorecer a forma catiônica dos aminoácidos em parte, respeitando o limite de pH para a coluna utilizada. O tampão formiato de amônio foi escolhido como primeiro eluente dos compostos dada sua volatilidade e compatibilidade com ionização por *eletrospray*.

Eletrospray (ESI)

A fonte de ESI foi configurada para detecção em modo positivo através do programa MassLynx. Os ajustes iniciais foram os da geometria da fonte *Z-Spray* (Figura 5). A coordenada X (distância do cone) foi a primeira a ser ajustada através da intensidade de sinal obtida dos íons produtos do aminoácido glicina (76>30; 76>48).

Tabela 20 - Intensidade de sinal na monitoração dos fragmentos do aminoácido Glicina em diferentes coordenadas X.

ESI – Eixo X			
Coordenadas		Intensidade de sinal	
X	Z	76>48	76>30
5	7	181087	199587
5,5	7	217944	214928
6	7	188542	199268
6,5	7	106248	122776

Com o ajuste da coordenada X em 5,5 (Tabela 20), foram realizados os ajustes para a coordenada Z (profundidade) (Tabela 21).

Tabela 21 - Intensidade de sinal na monitoração dos fragmentos do aminoácido glicina em diferentes coordenadas Z.

ESI – Eixo Z			
Coordenadas		Intensidade de sinal	
X	Z	76>48	76>30
5,5	7	117334	121511
5,5	6	118542	127485
5,5	5	136245	158006
5,5	4	140225	167201
5,5	3	147896	179542
5,5	2	162363	192048
5,5	1	148124	168985

Esses parâmetros foram definidos e serão utilizados para análises posteriores. O emprego de uma fonte de ionização ortogonal para análise de amostras biológicas (Figura 5) em grande escala é muito importante para limitar a introdução de interferentes presentes na amostra e na fase móvel (NIESSEN, 1999).

Figura 5 – Esquema de funcionamento da fonte de ionização em pressão atmosférica ZSpray (WATERS, 2015).

Otimização da detecção por espectrometria de massas em *tandem*

A otimização dos parâmetros de tensão do capilar de *eletrospray* e cone, temperatura da fonte de ionização, temperatura de dessolvatação e fluxo de dessolvatação foram ajustados em função do sinal da corrente iônica total (TIC) inicialmente pela infusão direta do aminoácido glicina. A glicina foi escolhida por apresentar a menor sensibilidade de detecção em comparação aos outros aminoácidos.

Com os parâmetros padronizados no MS *tuning* (ajuste da máquina), feito por meio de infusão combinada das soluções padrão, foram configurados canais para detecção dos 19 padrões interno isotopicamente marcados e seus respectivos

fragmentos utilizando as ferramentas de varredura de íons (*Scan Wave DSTM* e *Daughters Scan*) conforme mostrado na Tabela 23. A ferramenta *Scan Wave DSTM* se mostrou ineficaz para nossa necessidade, pois apresentou limitações na faixa de massas baixas ($< m/z$ 60). Essa modalidade de varredura de íons utiliza recursos da célula de colisão para aumentar a sensibilidade da detecção por meio da sincronia do acúmulo/liberação de íons no segundo quadrupolo. No entanto, apesar de seu potencial de aumentar a sensibilidade dos espectros no modo varredura foi constatado um decréscimo significativo da sensibilidade e a impossibilidade da detecção de fragmentos menores que m/z 60. Optou-se então pela utilização do modo *Daughters Scan*, onde foi obtido um espectro de massas mais abrangente (Figura 6 e Figura 7).

Tabela 22 - Condições de aquisição e transições selecionadas para cada um dos 26 aminoácidos analisados.

(Continua)

Aminoácido	Precursor		Produto	Dwell(s)	Cone(V)	Colisão (eV)
Ácido aspártico	134.00	>	74.00	0.009	16.00	12.00
Ácido aspártico	134.00	>	88.00	0.009	16.00	10.00
Ácido glutâmico	148.00	>	84.00	0.009	18.00	14.00
Ácido glutâmico	148.00	>	102.00	0.009	18.00	10.00
Alanina	90.00	>	44.00	0.009	16.00	8.00
Alanina	90.00	>	90.00	0.009	16.00	2.00
Allo-isoleucina	132.10	>	69.00	0.010	20.00	16.00
Allo-isoleucina	132.10	>	86.00	0.010	20.00	10.00
Arginina	175.10	>	60.00	0.010	16.00	12.00
Arginina	175.10	>	70.00	0.010	10.00	40.00
Asparagina	133.00	>	74.00	0.009	18.00	14.00
Asparagina	133.00	>	87.00	0.009	18.00	8.00
Cistina	241.27	>	74.00	0.009	26.00	20.00
Cistina	241.27	>	152.00	0.009	26.00	16.00
Citrulina	176.00	>	70.00	0.009	14.00	20.00
Citrulina	176.00	>	113.00	0.009	14.00	16.00
Fenilalanina	166.00	>	103.00	0.010	14.00	26.00
Fenilalanina	166.00	>	120.00	0.010	10.00	35.00
GABA	104.00	>	45.00	0.050	10.00	16.00
GABA	104.00	>	87.00	0.050	10.00	10.00
Glicina	76.00	>	30.00	0.009	30.00	4.00
Glicina	76.00	>	30.10	0.009	30.00	6.00
Glutamina	147.00	>	84.00	0.009	18.00	16.00

Tabela 22 - Condições de aquisição e transições seleccionadas para cada um dos 26 aminoácidos analisados.

(Conclusão)

Aminoácido	Precursor		Produto	Dwell(s)	Cone(V)	Colisão (eV)
Glutamina	147.00	>	101.00	0.009	18.00	10.00
Hidroxiprolina	132.00	>	68.00	0.009	16.00	20.00
Hidroxiprolina	132.00	>	86.00	0.009	10.00	40.00
Histidina	156.00	>	83.00	0.010	10.00	22.00
Histidina	156.00	>	110.00	0.010	8.00	35.00
Isoleucina	132.10	>	69.00	0.010	20.00	16.00
Isoleucina	132.10	>	86.00	0.010	20.00	10.00
Leucina	132.10	>	30.00	0.010	20.00	14.00
Leucina	132.10	>	86.00	0.010	20.00	10.00
Lisina	147.10	>	56.00	0.010	14.00	26.00
Lisina	147.10	>	84.00	0.010	14.00	14.00
Metionina	150.00	>	56.00	0.010	18.00	14.00
Metionina	150.00	>	104.00	0.010	18.00	10.00
Ornitina	133.10	>	70.00	0.050	16.00	14.00
Ornitina	133.10	>	116.00	0.050	16.00	8.00
Prolina	116.00	>	43.00	0.009	12.00	22.00
Prolina	116.00	>	70.00	0.009	8.00	40.00
Serina	106.00	>	60.00	0.009	18.00	8.00
Serina	106.00	>	88.00	0.009	18.00	8.00
Taurina	126.00	>	30.00	0.009	26.00	12.00
Taurina	126.00	>	44.00	0.009	26.00	16.00
Tirosina	182.10	>	91.00	0.010	18.00	24.00
Tirosina	182.10	>	136.00	0.010	18.00	14.00
Treonina	120.10	>	56.00	0.009	20.00	12.00
Treonina	120.10	>	74.00	0.009	20.00	10.00
Triptofano	205.10	>	118.00	0.010	12.00	24.00
Triptofano	205.10	>	188.00	0.010	12.00	10.00
Valina	118.10	>	55.00	0.010	18.00	18.00
Valina	118.10	>	72.00	0.010	18.00	8.00

Pelo modo *IntelliStartTM* foi realizada a optimização da detecção dos 26 aminoácidos (Tabela 22). O *IntelliStartTM* trata-se de uma interface programa e *hardware* que contempla uma bomba de infusão com um programa de aquisição inteligente, a partir da massa dos compostos precursores e selecciona, fragmenta e monitora a intensidade do sinal dos fragmentos gerados com uma energia de colisão

específica. O *IntelliStart*TM possibilitou a busca e otimização automática dos fragmentos por meio de rampas de energia de colisão. Porém em grande parte dos casos a otimização teve que ser aprimorada manualmente, pois alguns fragmentos detectados em aminoácidos não marcados, não encontravam correspondências com os detectados em padrões com marcação isotópica (Tabela 23).

Tabela 23 - Aminoácidos marcados isotopicamente analisados por ionização em *electrospray* no modo positivo. Fragmentos obtidos por dissociação induzido por colisão (CID) com parâmetros de energias configurados com base na otimização de aminoácidos não marcados.

Padrão interno	Percursor		Produto	Dwell(s)	Cone(V)	Colisão (eV)
Ácido aspártico- <i>d</i> ₃	137.00	>	91.00	0.009	16.00	8.00
Ácido glutâmico- <i>d</i> ₅	153.00	>	88.00	0.009	18.00	14.00
Alanina- <i>d</i> ₃	93.00	>	47.00	0.009	16.00	8.00
Arginina- ¹³ C ₆ - ¹⁵ N ₄	185.00	>	75.00	0.010	10.00	24.00
Cistina- <i>d</i> ₆	247.30	>	123.00	0.009	26.00	20.00
Citrulina- <i>d</i> ₇	183.00	>	166.00	0.009	14.00	20.00
Fenilalanina- <i>d</i> ₅	171.00	>	125.00	0.010	10.00	12.00
Glicina- <i>d</i> ₂	78.00	>	32.00	0.009	16.00	4.00
Glutamina- <i>d</i> ₅	152.00	>	88.00	0.009	18.00	16.00
Hidroxiprolina- <i>d</i> ₃	135.00	>	71.00	0.009	10.00	16.00
Histidina- <i>d</i> ₃	159.00	>	113.00	0.010	8.00	12.00
Leucina- <i>d</i> ₃	135.00	>	89.00	0.010	20.00	10.00
Lisina- ¹³ C ₆ - ¹⁵ N ₂	155.00	>	90.00	0.010	14.00	14.00
Metionina- <i>d</i> ₃	153.00	>	107.00	0.010	18.00	10.00
Ornitina- <i>d</i> ₇	140.00	>	77.00	0.050	16.00	14.00
Prolina- <i>d</i> ₃	119.00	>	73.00	0.009	8.00	12.00
Serina- <i>d</i> ₃	109.00	>	63.00	0.009	18.00	8.00
Triptofano- <i>d</i> ₅	210.00	>	192.00	0.010	12.00	10.00
Valina- <i>d</i> ₈	126.00	>	80.00	0.010	18.00	8.00

Alguns fragmentos de abundância significativa também não foram selecionados pelo *IntelliStart*TM e, portanto, os procedimentos para aprimoramento das detecções das massas foram realizados manualmente (Figura 8).

Utilizando modos como *Daughters Scan* ou *Scan Wave DS*, os fragmentos foram observados em diferentes condições para verificar a melhor sensibilidade em fragmentos de alta especificidade (Figura 6 e Figura 7).

Figura 6 - Espectros de massas do aminoácido alanina isotopicamente marcado (Alanina- d_4 $m/z=94$) em modo ScanWave DS (a), não apresenta fragmentação. Espectro de massas em modo *Daughters Scan* (b), mostrando fragmentação.

O modo *IntelliStart™* apesar de ser promovido pelo fabricante do instrumento como uma alternativa amigável e aceleradora do desenvolvimento de métodos mostrou-se limitada necessitando a intervenção manual em quase todos os casos. Uma falha recorrente foi a escolha automática de fragmentos pouco específicos. Perante essa limitação, a análise e otimização cuidadosa de todos os analitos visando

não apenas obter uma boa sensibilidade, mas também a escolha de fragmentos que permitissem identificar com maior especificidade um aminoácido frente aos outros presentes endogenamente foi amplamente explorada durante grande parte do desenvolvimento do método.

Figura 7 - Espectros de massas do aminoácido glicina isotopicamente marcada ($m/z=78$) em modo *ScanWave* (a), não apresenta fragmentação. Espectro de massas em modo *Daughters* (b), mostrando fragmentação.

Figura 8 - Espectros de massas de íons produto do aminoácido fenilalanina isotopicamente marcado (íon precursor $m/z = 172$) em diferentes energias de colisão: (a) 30 eV; (b) 26 eV; (c) 22 eV; (d) 19 eV; (e) 16 eV.

Figura 9 – Monitoramento por SRM (transição 90>62) da alanina. Energia de colisão de 4 eV a 11 eV. Melhor resposta obtida na energia de colisão em 6 eV marcada em vermelho.

Após a padronização individual para os analitos foram construídos os canais de detecção por SRM para o desenvolvimento do método cromatográfico.

Cromatografia líquida (LC)

O conjunto de analitos estudados apresenta boa detecção por espectrometria de massas, porém incluem isômeros, isóbaros e muitos fragmentos são compartilhados entre diferentes analitos. Dessa forma, a cromatografia líquida tem um peso significativo complementando a especificidade da espectrometria de massas, pois espectrômetros de massas tipo triplo quadrupolo são equipamentos de baixa resolução de massas, conseguindo diferenciar moléculas com 1 Da de diferença de massa/carga.

O processo de separação dos aminoácidos foi realizado por cromatografia líquida nas modalidades de alta eficiência (HPLC) e ultra eficiência (UPLC). Foram testadas quatro tipos de colunas com três princípios químicos diferentes.

Cromatografia em fase reversa baseada na fase pentafluorofenil

A primeira coluna a ser utilizada foi a coluna de fase reversa de pentafluorofenil propila (PFP) 2,6 μm (diâmetro da partícula) 50 x 2,1 mm (dimensões da coluna). O PFP promove interações dipolo-dipolo com solutos polares, além de estabelecer ligações de hidrogênio e interação hidrofóbica. A presença do anel aromático oferece uma retenção mais elevada para compostos aromáticos. A soma dessas características tornava essa coluna especialmente interessante para a análise de aminoácidos, sobretudo para a análise de isômeros polares.

Com a análise de PFP não obtivemos retenção cromatográfica aceitável para parte dos compostos, obtendo um fator de retenção $k=0,5$ na separação de leucina, aminoácido de cadeia ramificada de grande interesse para essa aplicação.

A concentração do tampão foi analisada, porém mesmo usando concentrações muito elevadas para um sistema acoplado a espectrometria de massas, não houve melhora na retenção dos compostos, apenas resposta das áreas dos picos cromatográficos (Figura 10).

Figura 10 – Efeito da concentração de formiato de amônio na resposta de alguns aminoácidos medido em função da área integrada.

Interação hidrofílica

As colunas HILIC são alternativas para compostos que não são retidos em fase reversa. O princípio da HILIC é baseado na partição dos analitos entre a fase móvel (com elevada concentração orgânica) e a camada de solvatação que se forma em torno da fase estacionária. Essa fase estacionária pode ser simplesmente sílica ou ter grupos químicos ligados a ela possibilitando a presença de outros tipos de interações.

A primeira coluna de escolha foi a Kinetex 1,7 μm sílica (diâmetro da partícula) (Phenomenex) 50 x 2,1 mm (dimensão da coluna). Uma coluna sem a presença de poros no núcleo de suas partículas que conferem uma menor dispersão da amostra. A fase utilizada é a sílica não ligada. Primeiramente foi calculado o volume da coluna e a coluna foi lavada 20 vezes o seu volume com uma fase móvel de no mínimo 5% de água. Foram testados diversos gradientes, com alterações na composição de água/acetonitrila e alterações no fluxo.

A melhor separação dos isômeros *allo*-isoleucina, isoleucina e leucina foi obtida com um fluxo de 0,3 mL/min com as fases A: formiato de amônio 50 mmol.L⁻¹ pH=3,2 e B: acetonitrila, com condição inicial de 8% de A, em 8 minutos 11% de A, 10 minutos

em 30% de A, 12 minutos em 40% de A, em 12,5 minutos foi restabelecida a condição inicial se mantendo até 15 minutos para equilibrar a coluna (Figura 11).

Figura 11 - Perfil cromatográfico da separação de leucina (TR=5,65 min), isoleucina (TR=5,99 min) e *allo*-isoleucina (TR=6,17 min), respectivamente, obtido utilizando a coluna Kinetex HILIC 1,7 μ m. Transição de massa 132.1>30 específico para leucina e transição de massa 132.1>69 presente na isoleucina e *allo*-isoleucina.

A HILIC Kinetex com suporte de sílica apresentou problemas de estabilidade e dificuldade no condicionamento da coluna resultando em frequentes alterações nos tempos de retenção. Mesmo fornecendo picos cromatográficos com largura de 0,12

min o que corresponde a uma eficiência de $N=100.000$ para alguns compostos, ela foi ineficaz na resolução dos isômeros de interesse pela linha de base ($R_s=1,36$; $R_s=0,9$). A baixa estabilidade inviabilizaria a aplicação dessa coluna na rotina clínica.

Em seguida foi avaliada a coluna HILIC Diol Cross-linked Luna 3 μm (diâmetro da partícula) 2,1 x 100 mm (dimensão da coluna). Trata-se de uma coluna HILIC, com grupos diol como suporte polar substituindo os grupos silanóis livres da superfície da sílica que podem resultar em interações inespecíficas como troca iônica.

Para condicionamento da coluna e formação da camada de solvatação foram estabelecidos 18 minutos de concentração inicial do método desenvolvido.

Utilizando as fases A: 40% Acetonitrila, 60% Formiato de amônio, 10 mmol.L⁻¹ e B: 95% Acetonitrila em 5% Formiato de amônio, 10mmol.L⁻¹ o modo de gradiente iniciou com 0% de A, 8 minutos em 6% A, 10 minutos em 43% A, 12 minutos em 62% de A, 12,5 minutos até 15 minutos foram retomadas as condições iniciais (Figura 12).

Figura 12 – Perfil cromatográfico dos isômeros leucina (1), isoleucina (2) e *allo*-isoleucina (3) obtido utilizando a coluna HILIC Diol Cross-linked Luna. Detalhes metodológicos, vide texto.

A coluna HILIC Diol Cross-linked Luna apresentou melhor reprodutibilidade, porém com a resolução entre os isômeros, $R_{1,2}=0,4$, $R_{2,3}=0.58$, pior que a primeira coluna testada (Figura 12).

Os resultados mostraram um método aplicável à rotina clínica tendo em vista o tempo de análise necessário, mesmo comparada a outras metodologias publicadas (LANGROCK; CZIHAL; HOFFMANN, 2006), mostrando a possibilidade de processar uma amostra em 15 minutos (Figura 13). Porém a estratégia se mostra pouco robusta por ser extremamente dependente de um condicionamento extenso e cuidadoso, e preferencialmente com bombas cromatográficas exclusivas para esse propósito.

Figura 13 – Perfil cromatográfico final obtido pela análise com coluna Luna HILIC Diol

3 μm em 15 minutos contendo 26 aminoácidos. Solução de aminoácidos 50 nmol.mL^{-1} em HCl 0,1 mol.L^{-1} . Detalhes metodológicos, vide texto.

Pareamento iônico

Outra estratégia empregada para a retenção de compostos polares é o pareamento iônico. Na literatura verificamos a aplicação de pareamento iônico para análise de aminoácidos, explorada inicialmente por Chaimbault e colaboradores (1999), multiplicada e otimizada em outros estudos (CHAIMBAULT et al., 1999; PETRITIS et al., 2000, 2002; KWON; MOINI, 2001; QU et al., 2002; PIRAUD et al., 2005a, 2005b, 2003; ARMSTRONG; JONSCHER; REISDORPH, 2007; DE PERSON; CHAIMBAULT; ELFAKIR, 2008; LIU; BEEGLE; KANIK, 2008; WATERVAL et al., 2009; HARDER; KOLETZKO; PEISSNER, 2011; LE et al., 2014).

A utilização de pareamento iônico resulta em grande flexibilidade na separação de compostos polares, pois a retenção pode ser modulada pelo uso de diferentes aditivos de pareamento iônico, concentrações e pHs, sem a necessidade de valores extremos pH para a fase móvel (por exemplo, $\text{pH} < 2,5$ ou > 8) (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010). Trabalhos anteriores já descreveram a utilização bem-sucedida de ácidos carboxílicos perfluorados no pareamento de íons como agentes para a separação de muitos aminoácidos (PETRITIS et al., 2000; PIRAUD et al., 2005b). O uso de ácidos carboxílicos fluorados em pareamento iônico em fase reversa, não só aumenta a sensibilidade de aminoácidos não derivados, como permite a análise por espectrometria de massas uma vez que esses ácidos são suficientemente voláteis (PETRITIS et al., 2000).

Utilizamos uma coluna de UPLC com partícula porosa de 1,7 μm , com a tecnologia BEH (*Ethylene Bridged Hybrid*) ligada a uma cadeia C18. Devida à estabilidade química intrínseca da tecnologia de partículas híbridas, uma faixa ampla de pH é utilizável com essa coluna (pH 1-12), permitindo que uma separação versátil e robusta seja possível durante o desenvolvimento do método. As colunas BEH 1,7 μm utilizadas possuem dimensão de 2,1 x 50 mm e seu volume morto (incluindo o da tubulação) foi de 120 μL a um fluxo de 300 $\mu\text{L/min}$ ($T_0 = 0,4$ minutos).

Foram avaliados os três reagentes de pareamento iônico indicados pelo trabalho de Piraud (2005b): HFBA, NFPA e TDFHA.

Ácido heptafluorobutírico (HFBA)

O primeiro pareante testado foi o de cadeia mais curta (HFBA) e em baixa concentração (1 mmol.L^{-1}) com precaução com relação a possibilidade de causar supressão iônica na detecção por espectrometria de massas. Os resultados indicaram que não houve retenção satisfatória dos compostos. Consequentemente foi necessário o aumento gradativo nas concentrações do pareante. A concentração de 5 mmol.L^{-1} resultou de fato em melhor retenção, porém com picos que não apresentavam um formato gaussiano. Obtivemos um aumento da retenção com a concentração do pareante em 10 mmol.L^{-1} em gradiente com 0-50% de ACN em fluxo de $300 \mu\text{L/min}$, com $5 \mu\text{L}$ de volume de injeção, utilizando solução de aminoácidos $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em HFBA 10 mmol.L^{-1} conforme mostrado na Figura 14 e Tabela 24.

Figura 14 – Cromatograma obtido pelo canal de SRM da leucina (TIC) mostrando os isômeros *allo*-isoleucina (1), isoleucina (2) e leucina (3). Detalhes metodológicos, vide texto.

Tabela 24 - Parâmetro cromatográficos obtidos na separação dos isômeros *allo*-isoleucina, isoleucina e leucina. Tempo de retenção (TR) em minutos, fator de retenção (k), seletividade (α) e resolução (R). Detalhes metodológicos, vide texto.

	TR	k	α	R
<i>Allo</i> -isoleucina	7,8	18,5	-	-
Isoleucina	8,03	19,1	1,03	0,92
Leucina	8,65	20,6	1,08	2,48

Ácido tridecafluoroheptanóico (TDFHA)

Na literatura havia o relato que o pareante de cadeia mais longa, TDFHA era um dos mais adequados para a retenção de pequenos peptídeos polares usando concentrações na faixa de 0,5-5 mmol.L⁻¹ (PETRITIS et al., 2000, 2002; PIRAUD et al., 2003; ARMSTRONG; JONSCHER; REISDORPH, 2007). Foi avaliada inicialmente a concentração de 5 mmol.L⁻¹ do pareante na fase A e ACN na fase B e foi obtida uma boa retenção, porém sem separação dos isômeros de interesse. A seguir, foi aumentada a concentração do pareante para 10 mmol.L⁻¹ com a exploração intensa de composição da fase B, porém os aminoácidos *allo*-isoleucina e isoleucina continuaram coeluído, apresentando baixa seletividade (Figura 15). Como as dosagens dos três isômeros são importantes para o diagnóstico da doença da urina com odor de xarope de bordo e adicionalmente a solubilidade do TDHFA é baixa dificultando o uso de concentrações mais elevadas, essa estratégia foi descartada.

Figura 15 – Cromatograma do canal de SRM da leucina (tempo de retenção (TR)=7,28 min), apresentando baixa resolução em relação a isoleucina (TR=7,33 min) e *allo*-isoleucina (TR=7,33 min) que coeluem. Detalhes metodológicos, vide texto.

Ácido Perfluoropentanóico NFPA

Foi referenciado em recentes artigos o uso de NFPA para reter e separar vários aminoácidos (PETRITIS et al., 2000, 2002; KWON; MOINI, 2001; PIRAUD et al., 2005b). Liu e colaboradores (2008) desenvolveram uma metodologia quantitativa de análise de 20 aminoácidos utilizando 5 mmol.L⁻¹ de NFPA.

Os testes com o NFPA foram iniciados em 5 mmol.L⁻¹ em gradiente linear de 0-50% ACN em fluxo de 300 µL/min, coluna cromatográfica em 50°C, com 5 µL de volume de injeção, utilizando solução de aminoácidos 10 µmol.L⁻¹ em NFPA 5 mmol.L⁻¹ em 10 minutos de corrida. Foi possível obter retenção de vários compostos e resolução entre os isômeros conforme mostrado na Figura 16 e Tabela 25.

Figura 16 - Cromatograma do canal de SRM da leucina (TIC): (1) *allo*-isoleucina; (2) isoleucina; (3) leucina. Detalhes metodológicos, vide texto.

Tabela 25 - Parâmetros cromatográficos obtidos na separação dos isômeros *allo*-isoleucina, isoleucina e leucina por pareamento iônico com NFPA 5 mmol.L⁻¹ em coluna BEH C18 1,7 µm. Tempo de retenção (TR) em minutos, fator de retenção (k), seletividade (α) e resolução (R). Detalhes metodológicos, vide texto.

	TR	k	α	R
<i>Allo</i> -isoleucina	4,89	11,2	-	-
Isoleucina	5,14	11,9	1,06	1,35
Leucina	5,46	12,65	1,06	1,78

Os aminoácidos de maior polaridade apresentaram menor retenção e coeluíram. Mesmo com a especificidade das fragmentações otimizadas para os canais de SRM individuais, essa coeluição pode interferir na sensibilidade do método. O gradiente cromatográfico se inicia com 100% de fase aquosa, limitando, portanto, a possibilidade de modulações pela proporção de solvente orgânico. A concentração do pareante foi então elevada a 10 mmol.L⁻¹ mantendo o mesmo gradiente, temperatura e fluxo anterior e não foi obtida resolução entre os isômeros leucina, isoleucina e *allo*-isoleucina. O gradiente foi alterado, aumentando apenas a proporção da fase orgânica

que foi de 0-70% num tempo total de 8 minutos. Os resultados estão apresentados na Figura 17 e Tabela 26.

Figura 17 - Cromatograma do canal de SRM da leucina (TIC): (1) *allo*-isoleucina; (2) isoleucina; (3) leucina. Otimização cromatográfica com NFPA 10 mmol.L⁻¹. Detalhes metodológicos, vide texto.

Tabela 26 - Parâmetros cromatográficos obtidos na separação dos isômeros *allo*-isoleucina, isoleucina e leucina por pareamento iônico com NFPA 10 mmol.L⁻¹ em coluna BEH C18 1,7 µm. Tempo de retenção (TR) em minutos, fator de retenção (k), seletividade (α) e resolução (R). Detalhes metodológicos, vide texto.

	TR	k	α	R
<i>Allo</i> -isoleucina	6,48	15,2	-	-
Isoleucina	6,78	15,95	1,05	1,58
Leucina	7,2	17	1,07	2,00

Com a otimização da separação cromatográfica com NFPA 10 mmol.L⁻¹ e o aumento da proporção do solvente orgânico, foi possível observar um aumento no fator de retenção com manutenção da seletividade e aumento da resolução (Tabela 26). Porém aminoácidos como valina, histidina e metionina apresentaram um pico

cromatográfico largo com baixa eficiência (Figura 18). A histidina, metionina e valina apresentaram eficiências de $N = 731$, $N = 690$ e $N = 615$, respectivamente.

Figura 18 – Cromatogramas dos aminoácidos histidina, metionina e valina, respectivamente utilizando gradiente com NFPA 10 mmol.L⁻¹ e acetonitrila (0-70% acetonitrila em 8 minutos). Detalhes metodológicos, vide texto.

Por tratar-se de um método de UPLC, preferimos trocar a coluna cromatográfica e realizar novos testes. A nova coluna BEH C18 foi equilibrada, lavada com solvente orgânico 20 vezes seu volume e posteriormente disponibilizada para o condicionamento cromatográfico. Há relatos na literatura sobre a perda de eficiência da coluna ao longo do tempo e a importância de se lavar a coluna com 100% de

solvente orgânico após o uso de pareantes (PIRAUD et al., 2005b; LIU; BEEGLE; KANIK, 2008).

O método foi reiniciado com NFPA 2 mmol.L⁻¹ em gradiente de 0-50% ACN em fluxo de 300 µL/min, com 5 µL de volume de injeção, utilizando uma solução de aminoácidos à 10 µmol.L⁻¹ em NFPA 2 mmol.L⁻¹ em 10 minutos de corrida. Como mostra a Figura 19, obtivemos a melhor separação de isômeros. Foi realizada uma série de corridas para avaliar a robustez, onde essa se mostrou favorável a escolha do método.

O método cromatográfico final apresentou fatores de retenção entre 0,40 e 21 e boa resolução entre os aminoácidos de maior criticidade, *allo*-isoleucina, isoleucina e leucina. Esses três isômeros foram resolvidos com excelência, garantindo que o aumento da concentração desses compostos não leve a coeluição e repetição na rotina clínica (Figura 19). Os aminoácidos glutamina e lisina também eram outro ponto de alta criticidade, pois frente à resolução unitária do analisador triplo quadrupolo eles possuem a mesma massa aparente. Eles foram separados com boa resolução (Figura 20) e (Tabela 27).

Figura 19 - Cromatograma do canal de SRM da leucina (TIC): (1) *allo*-isoleucina ; (2) isoleucina e (3) leucina utilizando gradiente com NFPA 2 mmol.L⁻¹ e acetonitrila (0-50% acetonitrila em 10 minutos). Detalhes metodológicos, vide texto.

Figura 20 – Perfil cromatográfico final obtido pela análise com coluna C18 BEH 1,7 μm em 11 minutos contendo 26 aminoácidos. Solução de aminoácidos 50 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ em água ultrapura. Detalhes metodológicos, vide texto.

Tabela 27 – Tempos de retenção obtidos no método cromatográfico final.

(Continua)

Aminoácido	Tempo de retenção (minutos)
Taurina	0,42
Hidroxiprolina	0,65
Ácido aspártico	0,68
Asparagina	0,72
Serina	0,74
Glutamina	0,82
Glicina	0,84
Treonina	0,94
Ácido glutâmico	0,97
Alanina	1,12
Citrulina	1,12
Prolina	1,27
Ornitina	3,83

Tabela 27 – Tempos de retenção obtidos no método cromatográfico final.

(Conclusão)

Histidina	4,08
Valina	4,49
Metionina	4,55
Lisina	5,27
Tirosina	5,61
Arginina	6,39
Allo-isoleucina	6,90
Isoleucina	7,20
Leucina	7,66
Fenilalanina	8,60
Triptofano	8,65

Comparado aos outros pareantes testados, o NFPA mostrou uma retenção moderada, permitindo a seletividade dos compostos, provavelmente por um menor comprimento na cadeia de carbono. O uso deste pareante proporcionou uma boa separação cromatográfica mesmo em baixas concentrações, o que é extremamente interessante pois a solubilidade desses compostos não é alta. A interação de compostos de baixa solubilidade em altas concentrações aliada a análise de amostras biológicas poderia levar a uma precipitação no sistema cromatográfico. Além disso, outro aspecto importante em relação ao pareamento iônico é a perda de sensibilidade no processo de ionização por *eletrospray*. A possibilidade de utilizar esse pareante em baixas concentrações favorece ainda mais a sua escolha. As concentrações de pareantes, incluindo o NFPA, utilizadas no estudo de Petritis e colaboradores (2002) foram de 0,5 a 2 mmol.L⁻¹. Eles relataram que a supressão iônica não foi significativa (menor que 1,4 vezes) utilizando essas concentrações.

Ponderação curva de calibração

O teste F relevou uma diferença significativa de variâncias entre os dois extremos da reta de calibração quando o valor experimental foi comparado com o valor tabelado, evidenciado que os conjuntos dos dados são heteroscedástico (F calculado > F tabelado). Na rotina laboratorial alguns métodos muitas vezes

apresentam um amplo intervalo analítico de concentração e, portanto, é de se esperar que a variância em cada ponto da reta seja diferente (ALMEIDA; CASTEL-BRANCO; FALCÃO, 2002). Uma vez que o critério de homoscedasticidade não foi atendido, foi aplicado o modelo de regressão linear ponderado. Os somatórios dos erros relativos percentuais (%RE) gerados a partir de cada fator de ponderação encontram-se resumidos na Tabela 28. Para todos os conjuntos de dados o fator de ponderação que permitiu uma melhor distribuição da variância foi a aproximação da variância $1/X^2$ que foi empregado em todas as curvas de calibração para o cálculo das amostras de valores desconhecidos e amostras da validação.

Tabela 28 - Cálculo da somatória do Erro Relativo percentual (%RE) para avaliação do fator de ponderação mais adequado a ser aplicado nas curvas de calibração para cada aminoácido.

(Continua)

Acido aspártico		Metionina		Acido glutâmico	
Ponderacao	%RE	Ponderacao	%RE	Ponderacao	%RE
sem	9,08	sem	7,13	sem	39,30
1/X	5,94	1/X	5,00	1/X	17,59
1/X^2	6,03	1/X^2	5,59	1/X^2	10,92
1/X^1/2	7,22	1/X^1/2	5,76	1/X^1/2	25,12
1/Y	6,07	1/Y	4,96	1/Y	18,13
1/Y^2	6,10	1/Y^2	5,61	1/Y^2	10,99
1/Y^1/2	7,31	1/Y^1/2	5,82	1/Y^1/2	25,68
Arginina		Ornitina		Prolina	
Ponderacao	%RE	Ponderacao	%RE	Ponderacao	%RE
sem	16,95	sem	11,47	sem	7,94
1/X	8,91	1/X	6,96	1/X	6,25
1/X^2	6,54	1/X^2	6,52	1/X^2	6,47
1/X^1/2	12,17	1/X^1/2	8,54	1/X^1/2	6,26
1/Y	8,94	1/Y	7,01	1/Y	6,16
1/Y^2	6,59	1/Y^2	6,56	1/Y^2	6,50
1/Y^1/2	12,20	1/Y^1/2	8,73	1/Y^1/2	6,36
Cistina		Serina		Taurina	
Ponderacao	%RE	Ponderacao	%RE	Ponderacao	%RE
sem	26,46	sem	36,60	sem	75,62
1/X	19,46	1/X	21,01	1/X	42,75
1/X^2	18,17	1/X^2	18,38	1/X^2	34,83
1/X^1/2	20,92	1/X^1/2	26,55	1/X^1/2	50,72
1/Y	19,56	1/Y	21,29	1/Y	44,45
1/Y^2	18,30	1/Y^2	18,60	1/Y^2	36,36
1/Y^1/2	20,97	1/Y^1/2	27,80	1/Y^1/2	54,18
Citrulina		Treonina		Fenilalanina	
Ponderacao	%RE	Ponderacao	%RE	Ponderacao	%RE
sem	16,59	sem	26,38	sem	6,69
1/X	11,42	1/X	20,02	1/X	5,44
1/X^2	9,35	1/X^2	18,94	1/X^2	5,08
1/X^1/2	13,84	1/X^1/2	22,55	1/X^1/2	6,28
1/Y	11,64	1/Y	20,14	1/Y	5,82
1/Y^2	9,52	1/Y^2	18,60	1/Y^2	5,22
1/Y^1/2	13,99	1/Y^1/2	22,64	1/Y^1/2	6,48

Tabela 28 - Cálculo da somatória do Erro Relativo percentual (%RE) para avaliação do fator de ponderação mais adequado a ser aplicado nas curvas de calibração para cada aminoácido.

(Conclusão)

GABA		Triptofano		Glutamina	
Ponderacao	%RE	Ponderacao	%RE	Ponderacao	%RE
sem	21,92	sem	46,25	sem	23,68
1/X	12,04	1/X	18,25	1/X	18,46
1/X^2	9,80	1/X^2	12,86	1/X^2	16,75
1/X^1/2	16,30	1/X^1/2	25,19	1/X^1/2	21,07
1/Y	12,22	1/Y	18,78	1/Y	19,17
1/Y^2	9,81	1/Y^2	13,85	1/Y^2	127,37
1/Y^1/2	16,44	1/Y^1/2	26,87	1/Y^1/2	21,46
Hidroxiprolina		Valina		Histidina	
Ponderacao	%RE	Ponderacao	%RE	Ponderacao	%RE
sem	19,95	sem	13,19	sem	10,54
1/X	10,68	1/X	7,74	1/X	6,89
1/X^2	8,06	1/X^2	6,74	1/X^2	5,73
1/X^1/2	14,48	1/X^1/2	10,01	1/X^1/2	8,47
1/Y	10,84	1/Y	7,91	1/Y	7,00
1/Y^2	8,16	1/Y^2	6,72	1/Y^2	5,79
1/Y^1/2	14,61	1/Y^1/2	10,14	1/Y^1/2	8,54
Isoleucina		Allo-isoleucina		Asparagina	
Ponderacao	%RE	Ponderacao	%RE	Ponderacao	%RE
sem	6,88	sem	11,15	sem	58,35
1/X	4,09	1/X	9,49	1/X	41,66
1/X^2	4,55	1/X^2	8,90	1/X^2	30,73
1/X^1/2	5,01	1/X^1/2	10,39	1/X^1/2	48,26
1/Y	4,14	1/Y	9,81	1/Y	42,22
1/Y^2	4,58	1/Y^2	9,12	1/Y^2	30,99
1/Y^1/2	5,06	1/Y^1/2	10,61	1/Y^1/2	48,68
Lisina		Glicina			
Ponderacao	%RE	Ponderacao	%RE		
sem	28,17	sem	34,06		
1/X	14,33	1/X	25,64		
1/X^2	9,02	1/X^2	20,50		
1/X^1/2	19,72	1/X^1/2	29,59		
1/Y	14,51	1/Y	26,64		
1/Y^2	9,17	1/Y^2	117,42		
1/Y^1/2	19,88	1/Y^1/2	30,19		

Validação

Controle de qualidade

As amostras de controle liofilizadas utilizadas durante a validação do método foram dosadas em 20 laboratórios selecionados, que obtiveram bom desempenho (pontuação de desempenho <3 no programa ERNDIM EQA). O valor atribuído é o valor médio obtido nos laboratórios. A coluna com o intervalo de laboratórios mostra a gama de medições reportadas por estes laboratórios (Tabela 29).

Tabela 29 - Valores estabelecidos pelo MCA Lab para os dois níveis de controles comercializados após a análise em 20 laboratórios de bom desempenho no programa ERNDIM.

Aminoácido	Nível 1			Nível 2		
	Valor calculado ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Intervalo dos laboratórios ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)		Valor calculado ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Intervalo dos laboratórios ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	
Ácido aspártico	21,7	15	33	80,9	66	92
Ácido glutâmico	144	104	198	253	208	296
Alanina	265	248	308	896	820	1041
Arginina	8,65	5	12	493	448	572
Asparagina	82,9	66	102	201	171	241
Cistina	31,9	26	39	69,6	57	82
Citrulina	6,63	5	9	414	383	470
Fenilalanina	344	314	383	690	620	776
Glicina	514	477	565	1017	926	1112
Glutamina	460	393	507	1093	986	1195
Hidroxiprolina	45,9	26	56	98	80	109
Histidina	190	169	215	392	341	439
Isoleucina	46,5	43	51	392	363	417
Leucina	21	17	24	880	813	963
Lisina	252	213	300	497	442	649
Metionina	76,9	72	82	231	219	246
Ornitina	157	141	172	619	584	693
Prolina	241	226	269	572	534	635
Serina	109	100	122	419	390	454
Taurina	209	194	234	409	379	453
Tirosina	233	217	248	917	817	1025
Treonina	208	190	228	412	375	443
Triptofano	115	88	138	290	221	365
Valina	404	372	453	812	747	900

Para a aceitação das rotinas realizadas durante o período de validação, foram analisados no mínimo dois controles de cada nível em cada rotina analítica. Os critérios para aceitação foram valores com, no máximo, 2,5 desvios padrão.

Tabela 30 - Valores calculados médios obtidos durante a validação analítica.

Aminoácidos	Valor calculado (μmol.L⁻¹)	Média nível 1 (μmol.L⁻¹)	Acurácia	Valor calculado (μmol.L⁻¹)	Média nível 2 (μmol.L⁻¹)	Acurácia
Ácido aspártico	21,7	29,5	136%	80,9	93,7	116%
Ácido glutâmico	144	169,5	118%	253	287,1	113%
Alanina	265	258,3	97%	896	855,1	95%
Arginina	8,65	13,8	160%	493	431,8	88%
Asparagina	82,9	75,4	91%	201	190,8	95%
Citrulina	6,63	6,6	100%	414	374,6	90%
Fenilalanina	344	308,1	90%	690	616,9	89%
Glicina	514	463,2	90%	1017	944,8	93%
Glutamina	460	419,8	91%	1093	986,5	90%
Hidroxiprolina	45,9	45,5	99%	98	92,4	94%
Histidina	190	169,7	89%	392	347,7	89%
Isoleucina	46,5	41,1	88%	392	379,5	97%
Leucina	21	24,5	117%	880	794,3	90%
Lisina	252	225,8	90%	497	446,3	90%
Metionina	76,9	71	92%	231	213	92%
Ornitina	157	143,6	91%	619	574,5	93%
Prolina	241	247,3	103%	572	524,6	92%
Serina	109	102	94%	419	351	84%
Taurina	209	212	101%	409	432	106%
Tirosina	233	210	90%	917	771,3	84%
Treonina	208	182	88%	412	381	92%
Triptofano	115	142	123%	290	308	106%
Valina	404	355	88%	812	712	88%

Linearidade

De acordo com a CLSI, a linearidade é a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (NCCLS, 2003). Aplicando o método polinomial foram analisados os dados obtidos em triplicata. Os dados foram inseridos programa EP Evaluator, onde foram aplicados testes estatísticos para avaliar a equação mais adequada: linear, quadrática ou cúbica, conforme mostrado nas equações abaixo.

Cálculo da equação regressão

Ordem Regressão polinomial

1ª $y = b_0 + b_1 x$

2ª $y = b_0 + b_1 x + b_2 x^2$

3ª $y = b_0 + b_1 x + b_2 x^2 + b_3 x^3$

Tabela 31 – Valores de não linearidade obtidos no ensaio de linearidade e seus respectivos intervalos para cada aminoácido.

Aminoácido	Não linearidade permitida	Não linearidade máxima observada	Intervalo de linearidade ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	
			Mínimo	Máximo
Ácido aspartico	20,80%	4,16%	10	200
Ácido glutâmico	30,70%	Zero	30	600
Alanina	13,30%	Zero	75	1500
Allo-isoleucina	12,40%	8,68%	50	1000
Arginina	12,80%	Zero	50	1000
Asparagina	8,90%	Zero	30	600
Cistina	10,00%	2,00%	15	300
Citrulina	14,90%	4,47%	50	1000
Fenilalanina	9,20%	4,60%	75	1500
GABA	10,00%	Zero	1,5	30
Glicina	10,10%	Zero	75	1500
Glutamina	8,20%	5,74%	75	1500
Hidroxiprolina	22,60%	Zero	50	1000
Histidina	7,60%	3,04%	50	1000
Isoleucina	12,40%	Zero	50	1000
Leucina	11,90%	4,76%	75	1500
Lisina	9,80%	0,98%	75	1500
Metionina	11,80%	5,90%	50	1000
Ornitina	14,80%	2,96%	75	1500
Prolina	20,30%	2,03%	75	1500
Serina	10,80%	Zero	30	600
Taurina	19,30%	Zero	30	600
Tirosina	12,10%	3,63%	50	1000
Treonina	12,10%	6,05%	30	600
Triptofano	28,60%	8,58%	50	1000
Valina	9,60%	2,88%	75	1500

O programa examina os modelos de ordem maior, coeficientes de regressão não linear (2ª e 3ª ordem), e reporta se eles são estatisticamente significantes. Se não forem significantes, os dados são considerados lineares. Se a não linearidade foi significativa para algum aminoácido, foi avaliada a importância desta não linearidade comparando o modelo linear (1ª ordem) com os demais modelos (2ª e 3ª ordem). Se as diferenças entre os modelos foram maiores que o critério de erro definido foi considerada a inexistência de linearidade aceitável para o intervalo. Foi avaliada a qualidade do ajuste como aceitável (se $p \geq 0,05$) ou ruim (se $p < 0,05$), utilizando uma estatística padrão tratamento de regressão repetição. O protocolo EP6 assume que o polinômio fornece um ajuste aceitável para os dados.

Os resultados obtidos mostram que a linearidade foi atingida para todo o intervalo testado para todos os analitos quantificados pelo método. Todos os ensaios mostraram uma não linearidade abaixo dos limites estabelecidos (Tabela 31).

Limite de quantificação

Os limites de quantificação obtidos foram satisfatórios para a aplicação clínica do método na quantificação de aminoácidos em amostras de plasma, utilizando como parâmetro os valores de referência utilizados no laboratório *Quest Diagnostics*. Os limites de quantificação não foram satisfatórios para os aminoácidos GABA e cistina, os quais foram excluídos do método de quantificação em plasma.

Tabela 32 – Limites de quantificação observados para cada aminoácido, destacando aminoácidos que não atingiram o limite de quantificação desejado.

(Continua)

Aminoácido	LOQ ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
Ácido aspártico	1,3
Ácido glutâmico	3
Alanina	7,4
Allo-isoleucina	3,5
Arginina	3,6
Asparagina	4,3
Cistina	5,7
Citrulina	2,7
Fenilalanina	18,2

Tabela 32 – Limites de quantificação observados para cada aminoácido, destacando aminoácidos que não atingiram o limite de quantificação desejado.

(Conclusão)

Aminoácido	LOQ ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
GABA	>2,2
Glicina	69,8
Glutamina	23,4
Hidroxiprolina	2,9
Histidina	6,9
Isoleucina	5
Leucina	8,2
Lisina	2,7
Metionina	5,7
Ornitina	7,5
Prolina	4,3
Serina	10,4
Taurina	17,5
Tirosina	15,7
Treonina	4,7
Triptofano	5,3
Valina	3,7

Arraste

Após a avaliação dos dados do ensaio de arraste no programa Ep Evaluator, foi observado à ausência de arraste significativo na análise de todos os aminoácidos quantificados. Todas as amostras baixas (L) quantificadas não excederam o limite de 3 desvios padrões da média entre sequências de amostras baixas. Então o sistema como um todo está apto a quantificar amostras nos níveis altos testados sem acarretar nenhum prejuízo significativo nas amostras subsequentes.

Tabela 33 – Dados obtidos na análise do ensaio de arraste, onde os valores destacados mostram que os desvios padrões estão abaixo do limite máximo permitido.

Aminoácido	Amostra baixa (L) ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Amostra alta (H) ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	DP		DP	
			L-L	H-L	Limite	Arraste
Ácido aspartico	10	200	0,5	0,3	1,5	0,6
Ácido glutâmico	30	600	1,1	0,8	3,3	0,8
Alanina	75	1500	2,6	3,1	7,8	0,2
Allo-isoleucina	50	1000	2,0	0,5	6,0	-0,1
Arginina	50	1000	1,7	1,7	5,1	1,9
Asparagina	30	600	0,9	0,5	2,8	-0,5
Citrulina	50	1000	1,4	1,5	4,1	2,1
Fenilalanina	75	1500	2,5	3,2	7,4	2,5
Glicina	75	1500	4,9	4,7	14,7	1,4
Glutamina	75	1500	1,7	1,7	5,0	0,3
Hidroxiprolina	50	1000	2,0	3,1	5,9	2,8
Histidina	50	1000	3,2	2,6	9,5	2,2
Isoleucina	50	1000	1,8	1,3	5,3	0,7
Leucina	75	1500	2,8	2,4	8,3	1,0
Lisina	75	1500	1,9	3,5	5,6	2,5
Metionina	50	1000	1,8	0,8	5,3	1,5
Ornitina	75	1500	2,4	2,1	7,1	2,6
Prolina	75	1500	2,3	1,9	7,0	1,5
Serina	30	600	0,7	1,4	2,1	-0,3
Taurina	30	600	0,8	1,2	2,4	0,5
Tirosina	50	1000	2,4	4,7	7,3	3,7
Treonina	30	600	1,3	1,6	4,0	1,5
Triptofano	50	1000	2,4	2,2	7,2	3,7
Valina	75	1500	1,9	2,6	5,8	1,0

Precisão

Para o ensaio de imprecisão os três níveis dos dois grupos foram nomeados como PRECL1, PRECL2 e PRECL3. Uma precisão preliminar para estabelecer uma regra de rejeição para “outliers” foi realizada pela dosagem de 20 amostras no mesmo dia de cada nível. Abaixo estão os coeficientes de variação obtidos nessa análise.

Tabela 34 – Valores de coeficiente de variação (CV%) observados no ensaio preliminar de precisão intradia.

Aminoácido	Nível Precisão	CV %	Aminoácido	Nível Precisão	CV %
Alanina	PRECL1	5,9	Isoleucina	PRECL1	1,9
Alanina	PRECL2	4,8	Isoleucina	PRECL2	5,1
Alanina	PRECL3	6,2	Isoleucina	PRECL3	3,1
Allo-isoleucina	PRECL1	3	Leucina	PRECL1	4,7
Allo-isoleucina	PRECL2	2,7	Leucina	PRECL2	4,1
Allo-isoleucina	PRECL3	2,3	Leucina	PRECL3	4,5
Arginina	PRECL1	2,7	Lisina	PRECL1	4,9
Arginina	PRECL2	3,7	Lisina	PRECL2	3,9
Arginina	PRECL3	3,1	Lisina	PRECL3	3,3
Asparagina	PRECL1	4,4	Metionina	PRECL1	2,6
Asparagina	PRECL2	6,1	Metionina	PRECL2	3,2
Asparagina	PRECL3	4	Metionina	PRECL3	3,2
Ácido aspártico	PRECL1	5,7	Ornitina	PRECL1	2,5
Ácido aspártico	PRECL2	3,6	Ornitina	PRECL2	2,1
Ácido aspártico	PRECL3	3,1	Ornitina	PRECL3	3,1
Citrulina	PRECL1	2,3	Fenilalanina	PRECL1	4,9
Citrulina	PRECL2	2,1	Fenilalanina	PRECL2	3,4
Citrulina	PRECL3	3,4	Fenilalanina	PRECL3	3,5
Cistina	PRECL1	3,8	Prolina	PRECL1	1,9
Cistina	PRECL2	3,1	Prolina	PRECL2	4,3
Cistina	PRECL3	3,7	Prolina	PRECL3	3,3
GABA	PRECL1	6,6	Serina	PRECL1	7,1
GABA	PRECL2	2,5	Serina	PRECL2	4,1
GABA	PRECL3	2,7	Serina	PRECL3	5,2
Ácido glutâmico	PRECL1	6	Taurina	PRECL1	5,8
Ácido glutâmico	PRECL2	4	Taurina	PRECL2	3,4
Ácido glutâmico	PRECL3	3	Taurina	PRECL3	5,7
Glutamina	PRECL1	7,1	Treonina	PRECL1	4,6
Glutamina	PRECL2	3,9	Treonina	PRECL2	2,5
Glutamina	PRECL3	3,2	Treonina	PRECL3	3,5
Glicina	PRECL1	16	Triptofano	PRECL1	3,9
Glicina	PRECL2	12,4	Triptofano	PRECL2	4,3
Glicina	PRECL3	12,7	Triptofano	PRECL3	6
Histidina	PRECL1	3,8	Tirosina	PRECL1	6,1
Histidina	PRECL2	3,1	Tirosina	PRECL2	5,5
Histidina	PRECL3	3	Tirosina	PRECL3	3,8
Hidroxiprolina	PRECL1	4,7	Valina	PRECL1	2,8
Hidroxiprolina	PRECL2	2,8	Valina	PRECL2	5,3
Hidroxiprolina	PRECL3	3,4	Valina	PRECL3	3,1

Os coeficientes de variação obtidos mostram uma boa precisão nos ensaios preliminares. As análises prosseguiram por 20 dias para a determinação dos desvios padrões intra-ensaio e desvio padrão total. Na tabela abaixo podemos evidenciar os resultados obtidos após a análise dos dados no programa EP Evaluator e compará-lo com as colunas com erros desejáveis e mínimos (RICÓS et al., 1999).

Tabela 35 – Valores de coeficiente de variação total para o ensaio de precisão realizado durante 20 dias. As concentrações em três níveis de precisão (PREC 1, 2 e 3) foram avaliadas e comparadas aos valores desejáveis ou mínimos obtidos na tabela Ricos e colaboradores (2014). Os destaques em vermelho mostram os aminoácidos que não estavam de acordo com os parâmetros estabelecidos na literatura.

Aminoácidos	Imprecisão				
	PREC 1 (%)	PREC 2 (%)	PREC 3 (%)	Desejável (%)	Mínimo (%)
Ácido aspártico	8	4,3	4,3	15,6	23,4
Ácido glutâmico	4,9	5,3	5,6	23,2	34,8
Alanina	6,6	6,1	7,4	7,4	11,0
Arginina	3,5	3,5	5,1	9,7	14,5
Asparagina	5,3	5,3	5,3	6,2	9,2
Citrulina	3,7	7,3	4,5	10,7	16,0
Fenilalanina	11,1	9,1	12,9	4,8	7,1
Glicina	---	14	14,1	5,9	8,9
Glutamina	---	5,8	8,3	6,1	9,1
Hidroxiprolina	10,3	6,9	8,7	17,3	25,9
Histidina	5,1	4,1	4,5	4,9	7,3
Isoleucina	4,8	3,9	4,2	7,8	11,6
Leucina	5,3	4,1	2,8	7,4	11,1
Lisina	3,7	3,7	2,4	5,8	8,6
Metionina	5,6	4,9	5,5	7,4	11,0
Ornitina	3,9	5,1	4,0	9,2	13,8
Prolina	3,6	3,8	4,7	8,5	12,8
Serina	5,8	3,7	3,9	15,3	9,6
Taurina	10,3	11,7	13,1	5,3	23,0
Tirosina	11,9	9,3	10,8	5,3	7,9
Treonina	7,4	5,5	6,0	9,0	13,4
Triptofano	5,2	5,3	11,0	11,4	17,0
Valina	5,0	4,9	3,3	5,3	8,0
Allo-isoleucina	4,8	3,8	5,4	---	---

Os aminoácidos destacados em vermelho estão em desacordo com os critérios estabelecidos. Após uma criteriosa análise dos cromatogramas e dos controles de qualidade foram observadas alterações cromatográficas apenas no fim de algumas corridas cromatográficas, especificamente no perfil do padrão interno fenilalanina- d_5 , que, no entanto, mostrou que os valores dos controles de qualidade estavam dentro dos parâmetros de aceitação. A fenilalanina- d_5 é utilizada no cálculo de diluição isotópica para os aminoácidos fenilalanina e tirosina. O efeito isotópico resultante da marcação com cinco átomos de deutério do padrão poderia ser uma das fontes de imprecisão para a fenilalanina e conseqüentemente para tirosina também. Padrões internos isotópicos baseados em ^{13}C substituirão posteriormente o deuterado e provavelmente reduzirão a imprecisão. Na análise minuciosa do aminoácido glicina, não observamos alterações cromatográficas significantes e nem alterações nos controles de qualidade. Verificamos uma variação de sensibilidade na detecção da glicina durante as análises, porém a relação sinal/ruído continuava satisfatória. A diluição isotópica da glicina é baseada em um padrão deuterado que difere em duas unidades de massas do analito. Nessa faixa de massa molecular a interferência pelo isotópologo (M+2) seria desprezível, mas poderia estar associado ao desempenho analítico inferior apresentado por esse aminoácido. Conseqüentemente, um padrão baseado em ^{13}C e ^{15}N substituirá o deuterado.

Exatidão

Os resultados da comparação de métodos tanto com o laboratório de referência, *Quest Nichols Diagnostics* e com amostras do programa de qualidade para erros inatos do metabolismo ERNDIM estão apresentados na Tabela 36. Os resultados de bias, *slope* e intercepto foram obtidos através da regressão de passing-bablok.

Para a validação foram selecionadas amostras de forma aleatória, conforme a demanda para a quantificação de aminoácidos no laboratório. Pela baixa estabilidade de alguns analitos, como a glutamina (PERRY; HANSEN, 1969), as amostras eram obtidas e logo processadas, sem uma pré-seleção com relação aos valores de cada

analito. Assim possuímos um conjunto de dados, em sua grande parte, com uma distribuição não normal.

Tabela 36- Valores finais obtidos nos experimentos comparação de métodos para determinação da exatidão. As colunas determinadas como desejável e mínimo indicam dos erros estabelecidos para cada aminoácido. Valores em verde: dentro dos erros desejáveis ou mínimos. Valores em vermelho: fora dos erros estabelecidos.

Aminoácidos	Erros obtidos		Erros estabelecidos		Passing-bablok (IC =95%)			
	Bias(%)	Bias (%)	Bias (%)	Bias (%)	Coef.	Coef.	$\beta = 1$ (slope)	$\alpha = 0$ (intercepto)
	Nichols	ERNDIM	Desejável	Mínimo	Corr. (R) Nichols	Corr. (R) ERNDIM		
Ácido aspártico	51,5	7,5	15,8	23,7	0,850	0,985	sim	sim
Ácido glutâmico	9,0	22,4	23,1	34,6	0,727	0,814	sim	sim
Alanina	-6,0	-7,9	14,4	21,6	0,972	0,997	sim	sim
Arginina	-1,3	-8,3	9,8	14,7	0,834	0,999	sim	sim
Asparagina	7,2	-7,7	7,6	11,5	0,332	0,989	sim	sim
Citrulina	3,4	1,4	12,2	18,3	0,760	0,999	sim	sim
Fenilalanina	-0,5	8,0	10,4	15,6	0,731	0,998	sim	sim
Glicina	-7,4	1,4	10,5	15,7	0,625	0,990	sim	sim
Glutamina	-9,0	17,1	6,3	9,4	0,827	0,914	sim	sim
Hidroxiprolina	-17,3	6,4	16,6	24,9	0,849	0,970	sim	sim
Histidina	-10,0	-4,8	7,2	10,8	0,830	0,996	sim	sim
Isoleucina	-7,0	-9,0	12,0	18,0	0,882	0,997	sim	sim
Leucina	-9,5	-5,9	11,6	17,4	0,833	1,000	sim	sim
Lisina	-4,0	-3,1	10,0	15,0	0,831	0,999	sim	sim
Metionina	-13,3	-12,5	11,5	17,2	0,959	0,998	sim	sim
Ornitina	-11,4	-3,5	14,5	21,7	0,859	0,999	sim	sim
Prolina	-14,7	-12,3	26,4	39,7	0,801	0,999	sim	sim
Serina	-19,5	-12,2	11,2	16,8	0,810	1,000	sim	sim
Taurina	-12,2	-1,8	13,4	20,1	0,723	0,998	sim	sim
Tirosina	-19,9	-2,8	15,5	23,2	0,616	1,000	sim	sim
Treonina	-1,4	-6,8	9,4	14,1	0,963	0,972	sim	sim
Triptofano	0,9	18,7	38,6	57,9	0,468	0,998	sim	sim
Valina	-2,3	-3,2	10,4	15,6	0,965	0,994	sim	sim
Allo-isoleucina	---	0,5	---	---	---	1,000	sim	sim

Passing-bablok é definido como um método para estimar parâmetros de inclinação e interceptação de um experimento de comparação de métodos usando um procedimento não-paramétrico (NCCLS, 2002). Ao usar a regressão passing-bablok

assumimos que: (1) o método X não está livre de erro aleatório; (2) a distribuição dos erros de medição é usualmente anormal; (3) os valores esperados x e y não são uma amostra aleatória de uma distribuição normal (os métodos são comparados através de uma vasta gama de concentrações que abrange valores de pessoas saudáveis e doentes e os valores extremos (*outliers*) não são necessariamente erros grosseiros de medição; eles podem ser causados por diferentes propriedades dos métodos, com respeito à especificidade ou a susceptibilidade a interferências e não devem ser removidos do cálculo sem razão experimental) e (4) a variação dos erros de medição não é constante ao longo da gama de concentrações; de fato, a variabilidade aumenta com a magnitude das medições (PASSING; BABLOK, 1983; PASSING, 1984).

Ao analisar a Tabela 36, podemos observar que existe a equivalência estatística tanto em comparação ao método da *Quest Nichols*, quando em comparação ao programa ERNDIM. Na comparação de métodos com a *Nichols* observamos que os valores de bias obtidos estão dentro dos critérios de erros estabelecidos, com exceção do ácido aspártico, que apresenta bias elevado. Ao analisar o experimento realizado observamos que intervalo analisado é bem restrito, nas 38 amostras analisadas no método X (*Nichols*) foram reportados resultados de 2 a 14 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Entretanto os principais fatores que podem ser associados a elevação do aminoácido nas análises do método Y são os fatores pré analíticos, já que é extensamente relatada o aumento de ácido aspártico em diversas condições, como contaminação do plasma com plaquetas e células brancas, que contem 500 vezes mais ácido aspártico em seu interior, e a transformação de asparagina em ácido aspártico quando as amostras são armazenadas por um longo período (PERRY; HANSEN, 1969).

Para avaliar a exatidão inequívoca do método desenvolvido foi utilizado um material de referência certificado. O material de referência é constituído por um conjunto de padrões certificados em matriz biológica, produzido e verificado por métodos de referência. Os valores expressos nesses materiais são tidos como exatos pois atendem a diferentes critérios como rastreabilidade com relação à padrões primários de referência, outros métodos de referência e cada valor certificado é acompanhado por uma incerteza em um nível de confiança estabelecido (ZUNGER et

al., 2000). Para realizar a verificação do método utilizamos o material SRM 1950 fornecido pelo NIST.

Tabela 37 – Valores reportados pelo NIST para o material de referência certificado – Metabólitos em plasma humano (SRM 1950) correlacionados aos valores obtidos pela quantificação por meio do método desenvolvido.

	Aminoácido	Concentração certificada ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Incerteza (IC 95%)	Concentração medida ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	DP
LC-MS/MS, GC-TOF-MS (MTBSTFA), e GC-TOF-MS (PCF)	Alanina	300,0	26,0	302,4	11,9
	Glicina	245,0	16,0	235,4	2,3
	Histidina	72,6	3,6	68,9	1,0
	Isoleucina	55,5	3,4	54,6	0,6
	Leucina	100,4	6,3	97,3	2,0
	Lisina	140,0	14,0	134,6	0,9
	Metionina	22,3	1,8	19,9	0,1
	Prolina	177,0	9,0	171,4	0,3
	Serina	95,9	4,3	74,1	0,8
	Treonina	119,5	6,1	103,1	0,5
	Tirosina	57,3	3,0	54,5	0,9
	Valina	182,2	10,4	171,5	2,3
LC-MS/MS	Arginina	81,4	2,3	78,9	1,2
	Ácido glutâmico	67,0	18,0	67,4	0,3
	Ornitina	52,1	2,8	63,2	0,4
	Fenilalanina	51,0	7,0	56,5	0,0

Na Tabela 37 podemos verificar que os valores obtidos para os aminoácidos disponíveis no material de referência certificado analisado estão em sua grande maioria dentro da própria incerteza dos valores fornecidos.

Efeito matriz

O efeito matriz é definido como a interferência por componentes da matriz analisada que não estão relacionados ao analito (KORFMACHER, 2004). As fontes de interferência podem surgir de várias fontes, porém no caso de análises em matrizes biológicas, a interferência pode ser oriunda de componentes da própria matriz. Os efeitos de matriz podem resultar em supressão ou amplificação artefactual do sinal do

analito resultando em erros significativos na precisão e exatidão das análises. Na avaliação entre amostras aquosas e amostras em plasma com a mesma concentração pudemos observar a ausência de efeito matriz significativo. As comparações mostraram, em sua grande maioria, um efeito matriz abaixo de 25% (Figura 20). O aminoácido alanina mostrou uma resposta entre 20 a 35% em relação à amostra aquosa. Porém, ao longo dos experimentos de validação foi verificada uma excelente precisão (Tabela 35) e correlação com valores de material de referência certificado (Tabela 37) para esse aminoácido.

Figura 20 – Resposta normalizada (%) dos 26 aminoácidos analisados em uma solução aquosa versus a análise em amostras de plasma contendo a mesma concentração.

Comparação com métodos descritos na literatura

Comparando o método que foi desenvolvido e validado neste estudo com métodos existentes na literatura, podemos concluir que foi alcançado o objetivo do trabalho no desenvolvimento dessa plataforma. A Tabela 38 elucida os limites

analíticos descritos nas metodologias encontradas na literatura, onde são quantificadas amostras em plasma, incluindo em destaque os limites do método desenvolvido nesse estudo.

Tabela 38 – Levantamento de dados analíticos de métodos quantitativos desenvolvidos para análise em matrizes biológicas publicados na literatura. A última linha (destacada em azul) se refere ao método desenvolvido nesse trabalho.

Método	Limite de quantificação ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Precisão (CV%)	Linearidade ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Tempo corrida (min)	Número de aminoácidos analisados	Allo-isoleucina	Referência
UPLC-MS/MS	1	3,1 – 10,8%	Não citado	13,3	22	N	(HARDER; KOLETZKO; PEISSNER, 2011)
UPLC-MS/MS	10 – 287	$\leq 40\%$	0 - 1000	30	52	S	(WATERVAL et al., 2009)
GC-MS	0,05 – 0,5	$\leq 14\%$	0,05 – 200	7	18	N	(KRUMPOC HOVA et al., 2015)
LC-MS/MS	0,1 – 0,25	$\leq 20\%$	0,1 - 100	20	17	N	(KRUMPOC HOVA et al., 2015)
HILIC-MS	Não citado	$\leq 20\%$	0,03 - 200	40	19	N	(KRUMPOC HOVA et al., 2015)
LC-MS/MS	0,1 – 10 (injetados)	6,1 – 112,4	0 - 4000	30	44	S	(PIRAUD et al., 2005a)(PIRAUD et al., 2005b)
LC-MS/MS	Não citado	1,8 – 85,3	1,56 - 3200	32	25	N	(ARMSTRONG; JONSCHER; REISDORPH, 2007)
GC-MS	0,3 – 30	$\leq 14,1$	0,3 - 2000	30	30	S	(KASPAR et al., 2008)
UPLC-MS/MS	1,3 – 69,8 (113 fmol - 6 pmol inj.)	$\leq 14,1$	10 - 1500	11	24	S	

Mesmo com limites de quantificação mais elevados que alguns métodos (KASPAR et al., 2008; HARDER; KOLETZKO; PEISSNER, 2011; KRUMPOCHOVA et al., 2015), a metodologia atende plenamente as concentrações encontradas em indivíduos saudáveis ou portadores de patologias como erros inatos do metabolismo. Para a aplicação desse método a outras finalidades que exijam um limite de

quantificação menor, serão necessárias pequenas alterações no protocolo de preparo das amostras, pois a sensibilidade obtida representa 113 fmol a 6 pmol injetados no sistema. Por outro lado o método se beneficia de um amplo intervalo de linearidade, bem superior a outros métodos (WATERVAL et al., 2009; KRUMPOCHOVA et al., 2015).

5 CONCLUSÃO

O método desenvolvido foi extensivamente validado e mostrou aplicabilidade no diagnóstico de erros inatos do metabolismo. Os resultados de linearidade, limite de quantificação, arraste, efeito matriz, precisão e exatidão são extremamente satisfatórios e dentro dos critérios de aceitação estabelecidos na literatura. O emprego de materiais de referência permitiu uma maior rastreabilidade e comparabilidade do método.

A análise de regressão linear para cada um dos analitos favoreceu a distribuição dos erros dentro do intervalo desejado. Com a ausência de arraste no sistema cromatográfico é possível quantificar amostras contendo valores elevados dos analitos com segurança.

Vários trabalhos previamente publicados não permitiam a determinação simultânea de citrulina, ornitina e arginina que são indispensáveis no diagnóstico das doenças do ciclo da ureia. Os isômeros isoleucina, *allo*-isoleucina e leucina foram separados pela linha de base, possibilitando diagnósticos diferenciais na doença da urina com odor de xarope de bordo.

O preparo de amostras simplificado contendo poucas etapas e o uso de apenas 20 µL de plasma é igualmente relevante pois este tipo de análise está frequentemente associada a amostras pediátricas.

O tempo de análise é o menor dentre os métodos já descritos na literatura combinado a um preparo de amostras simplificado baseado em placas de 96 poços. Essas características possibilitam a análise de um número elevado de amostras em tempos menores possibilitando um diagnóstico precoce, que é de extrema importância no caso dos erros inatos do metabolismo.

Com pequenos ajustes, o método pode ser adaptado a outras matrizes biológicas como urina e líquido e a outros usos como quantificação absoluta de proteínas por meio de hidrólise ácida seguida da quantificação dos resíduos.

REFERÊNCIAS¹

ADEVA, M. M.; CALVIÑO, J.; SOUTO, G.; DONAPETRY, C. Insulin resistance and the metabolism of branched-chain amino acids in humans. **Amino Acids**, v. 43, n. 1, p. 171–181, 2012.

ALMEIDA, A. M.; CASTEL-BRANCO, M. M.; FALCÃO, A. C. Linear regression for calibration lines revisited: Weighting schemes for bioanalytical methods. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 774, n. 2, p. 215–222, 2002.

ARMSTRONG, M.; JONSCHER, K.; REISDORPH, N. A. Analysis of 25 underivatized amino acids in human plasma using ion-pairing reversed-phase liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, n. 16, p. 2717–2726, 30 ago. 2007.

BADAWY, A. A.; MORGAN, C. J.; TURNER, J. A. Application of the Phenomenex EZ:faast trade mark amino acid analysis kit for rapid gas-chromatographic determination of concentrations of plasma tryptophan and its brain uptake competitors. **Amino Acids**, v. 34, n. 4, p. 587–596, 2008.

BADAWY, A. A. B. The EZ:Faast Family of Amino Acid Analysis Kits: Application of the GC-FID Kit for Rapid Determination of Plasma Tryptophan and Other Amino Acids. In: ALTERMAN, M. A.; HUNZIKER, P. (Ed.). **Amino Acid Analysis: Methods and Protocols**. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2012. 828p. 153–164.

BECKER, S.; KORTZ, L.; HELMSCHRODT, C.; THIERY, J.; CEGLAREK, U. LC-MS-based metabolomics in the clinical laboratory. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 883-884, p. 68–75, 2012.

BLAU, N.; DURAN, M.; GIBSON, K. M. **Laboratory guide to the methods in biochemical genetics**. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 2008.

BLAU, N.; DURAN, M.; GIBSON, M. K.; DIONISI-VICI, C. **Physician's guide to the diagnosis, treatment, and follow-up of inherited metabolic diseases**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014.

CASSETTA, B.; TAGLIACOZZI, D.; SHUSHAN, B.; FEDERICI, G. Development of a method for rapid quantitation of amino acids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MSMS) in plasma. **Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC**, v. 38, n. 5, p. 391–401, 2000.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

CHACE, D. H.; SHERWIN, J. E.; HILLMAN, S. L.; LOREY, F.; CUNNINGHAM, G. C. Use of phenylalanine-to-tyrosine ratio determined by tandem mass spectrometry to improve newborn screening for phenylketonuria of early discharge specimens collected in the first 24 hours. **Clinical Chemistry**, v. 44, p. 2405–2409, 1998.

CHAIMBAULT, P.; PETRITIS, K.; ELFAKIR, C.; DREUX, M. Determination of 20 underivatized proteinic amino acids by ion-pairing chromatography and pneumatically assisted electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 855, n. 1, p. 191–202, 1999.

CLSI. **EP10-A3 Preliminary Evaluation of Quantitative Clinical Laboratory Measurement Procedures ; Approved Guideline**. Wayne, 2006.

DE PERSON, M.; CHAIMBAULT, P.; ELFAKIR, C. Analysis of native amino acids by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry: comparative study between two sources and interfaces. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 43, n. 2, p. 204–215, fev. 2008.

DELL, M.; KOELLENSPERGER, G.; HANN, S. Analysis of Underivatized Amino Acids: Zwitterionic Hydrophilic Interaction Chromatography Combined with Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry. In: ALTERMAN, M. A.; HUNZIKER, P. (Ed.). **Amino Acid Analysis: Methods and Protocols**. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2012. 828.

DELL'MOUR, M.; JAITZ, L.; OBURGER, E.; PUSCHENREITER, M.; KOELLENSPERGER, G.; HANN, S. Hydrophilic interaction LC combined with electrospray MS for highly sensitive analysis of underivatized amino acids in rhizosphere research. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 6-7, p. 911–922, 2010.

FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K. A. I.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. **Science**, v. 246, n. 6, p. 64–70, 1989.

FRANCISCO, A. M. A. **Estudo da lamotrigina em doentes epilépticos submetidos a monitorização veeg**. 2008. Universidade de Coimbra, 2008.

HARDER, U.; KOLETZKO, B.; PEISSNER, W. Quantification of 22 plasma amino acids combining derivatization and ion-pair LC-MS/MS. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 879, n. 7-8, p. 495–504, 2011.

HARDY, D. T.; HALL, S. K.; PREECE, M. A.; GREEN, A. Quantitative determination of plasma phenylalanine and tyrosine by electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 73–75, 2002.

HMDB. **Human Metabolome Database**. Disponível em: <<http://www.hmdb.ca/>>. Acesso em: 15 jun. 2014.

HUŠEK, P. Simultaneous profile analysis of plasma amino and organic acids by capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 669, n. 2, p. 352–357, 1995.

HUŠEK, P. Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 717, n. 1-2, p. 57–91, 1998.

HUŠEK, P.; MATUCHA, P.; VRÁNKOVÁ, A.; ŠIMEK, P. Simple plasma work-up for a fast chromatographic analysis of homocysteine, cysteine, methionine and aromatic amino acids. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 789, n. 2, p. 311–322, 2003.

JAIN, M.; NILSSON, R.; SHARMA, S.; MADHUSUDHAN, N.; KITAMI, T.; SOUZA, A. L.; KAFRI, R.; KIRSCHNER, M. W.; CLISH, C. B.; MOOTHA, V. K. Metabolite Profiling Identifies a Key. **Science**, v. 336, n. May, p. 1040–1044, 2012.

KASPAR, H.; DETTMER, K.; GRONWALD, W.; OEFNER, P. J. Automated GC–MS analysis of free amino acids in biological fluids. **Journal of Chromatography B**, v. 870, n. 2, p. 222–232, 2008.

KASPAR, H.; DETTMER, K.; GRONWALD, W.; OEFNER, P. J. Advances in amino acid analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 2, p. 445–452, 2009.

KORFMACHER, W. A. **Using mass spectrometry for drug metabolism studies**. Boca Raton: CRC, 2004.

KRUMPOCHOVA, P.; BRUYNEEL, B.; MOLENAAR, D.; KOUKOU, A.; WUHRER, M.; NIESSEN, W. M. A.; GIERA, M. Amino acid analysis using chromatography–mass spectrometry: An inter platform comparison study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 114, p. 398–407, 2015.

KUSHNIR, M. M.; ROCKWOOD, A. L.; NELSON, G. J.; TERRY, A. H.; MEIKLE, a W. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of urinary free cortisol. **Clinical chemistry**, v. 49, n. 6 Pt 1, p. 965–7, 2003.

KWON, J. Y.; MOINI, M. Analysis of underivatized amino acid mixtures using high performance liquid chromatography/dual oscillating nebulizer atmospheric pressure microwave induced plasma ionization-mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 12, n. 1, p. 117–22, 2001.

LACEY, J.; CASETTA, B.; DANIELS, S.; NIMKAR, S.; MATERN, D. Evaluation of an iTRAQ™ Reagent Amino Acid Analysis Kit for the Rapid Quantitation of Amino Acids in Plasma. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 18, p. S19–S23, 2007.

LAI, H. S.; LEE, J. C.; LEE, P. H.; WANG, S. T.; CHEN, W. J. Plasma free amino acid profile in cancer patients. **Seminars in Cancer Biology**, v. 15, n. 4, p. 267–276, 2005.

LANGROCK, T.; CZIHAL, P.; HOFFMANN, R. Amino acid analysis by hydrophilic interaction chromatography coupled on-line to electrospray ionization mass spectrometry. **Amino Acids**, v. 30, n. 3, p. 291–297, 2006.

LE, A.; NG, A.; KWAN, T.; CUSMANO-OZOG, K.; COWAN, T. M. A rapid, sensitive method for quantitative analysis of underivatized amino acids by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS). **Journal of Chromatography B**, v. 944, p. 166–174, 2014.

LEINENBACH, A.; PANNEE, J.; DÜLFFER, T.; HUBER, A.; BITTNER, T.; ANDREASSON, U.; GOBOM, J.; ZETTERBERG, H.; KOBOLD, U.; PORTELIUS, E.; BLENNOW, K. Mass spectrometry-based candidate reference measurement procedure for quantification of amyloid- β in Cerebrospinal fluid. **Clinical Chemistry**, v. 60, p. 987–994, 2014.

LICHTER-KONECKI, U.; CALDOVIC, L.; MORIZONO, H.; SIMPSON, K. **Ornithine transcarbamylase deficiency**. Seattle, WA: NCBI, 2013.

LIU, D.-L.; BEEGLE, L. W.; KANIK, I. Analysis of Underivatized Amino Acids in Geological Samples Using Ion-Pairing Liquid Chromatography and Electrospray Tandem Mass Spectrometry. **Astrobiology**, v. 8, n. 2, p. 229–241, 2008.

LYNCH, C. J.; ADAMS, S. H. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 10, n. 12, p. 723–736, 2014.

MAGERA, M. J.; LACEY, J. M.; CASETTA, B.; RINALDO, P. Method for the determination of total homocysteine in plasma and urine by stable isotope dilution and electrospray tandem mass spectrometry. **Clinical chemistry**, v. 45, n. 9, p. 1517–22, 1999.

MAK, C. M.; LEE, H. C. H.; CHAN, A. Y. W.; LAM, C. W. Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update. **Critical reviews in clinical laboratory sciences**, v. 50, n. 6, p. 142–62, 2013.

MCCORMACK, S. E.; SHAHAM, O.; MCCARTHY, M. a; DEIK, A. a; WANG, T. J.; GERSZTEN, R. E.; CLISH, C. B.; MOOTHA, V. K.; GRINSPOON, S. K.; FLEISCHMAN, A. Circulating Branched-chain Amino Acid Concentrations Are

Associated with Obesity and Future Insulin Resistance in Children and Adolescents. **Pediatric Obesity**, v. 8, n. 1, p. 52–61, 2013.

MEESTERS, R. Bioanalytical LC separation techniques for quantitative analysis of free amino acids in human plasma. **Bioanalysis**, v. 5, n. 4, p. 495–512, 2013.

MIYAGI, Y.; HIGASHIYAMA, M.; GOCHI, A.; AKAIKE, M.; ISHIKAWA, T.; MIURA, T.; SARUKI, N.; BANDO, E.; KIMURA, H.; IMAMURA, F.; MORIYAMA, M.; IKEDA, I.; CHIBA, A.; OSHITA, F.; IMAIZUMI, A.; YAMAMOTO, H.; MIYANO, H.; HORIMOTO, K.; TOCHIKUBO, O.; MITSUSHIMA, T.; YAMAKADO, M.; OKAMOTO, N. Plasma Free Amino Acid Profiling of Five Types of Cancer Patients and Its Application for Early Detection. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. e24143, 2011.

MOORE, S.; STEIN, W. H. CHROMATOGRAPHY OF AMINO ACIDS ON SULFONATED POLYSTYRENE RESINS. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 192, p. 663–681, 1951.

MUSCARITOLI, M.; CONVERSANO, L.; PETTI, M. C.; TORELLI, G. F.; CASCINO, A.; MECAROCCHI, S.; ANNICCHIARICO, M. A.; ROSSI FANELLI, F. Plasma amino acid concentrations in patients with acute myelogenous leukemia. **Nutrition**, v. 15, n. 3, p. 195–9, 1999.

NCCLS. **EP9-A2 Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples ; Approved Guideline — Second Edition**. Wayne, 2002.

NCCLS. **EP6-A Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach, Approved Guideline**. Wayne, 2003.

NCCLS. **EP17-A Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantification: Approved Guideline**. Wayne, 2004a.

NCCLS. **EP5-A2 Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods ; Approved Guideline — Second Edition**. Wayne, 2004b.

NIESSEN, W. M. A. State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 856, n. 1-2, p. 179–197, 1999.

PASSING, H.; BABLOK, W. Comparison of Several Regression Procedures for Method Comparison Studies and Determination of Sample Sizes Application of linear regression procedures for method comparison studies in Clinical Chemistry , Part II. **Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry**, v. 22, n. 6, p. 431–445, 1984.

PASSING, H.; BABLOK, W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression

procedures for method comparison studies in Clinical Chemistry, Part 1. **Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry**, v. 21, n. 11, p. 709–720, 1983.

PERRY, T. L.; HANSEN, S. Technical pitfalls leading to errors in the quantitation of plasma amino acids. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 25, n. 1, p. 53–58, 1969.

PETRITIS, K.; BRUSSAUX, S.; GUENU, S.; ELFAKIR, C.; DREUX, M. Ion-pair reversed-phase liquid chromatography-electrospray mass spectrometry for the analysis of underivatized small peptides. **Journal of Chromatography A**, v. 957, n. 2, p. 173–185, 2002.

PETRITIS, K.; CHAIMBAULT, P.; ELFAKIR, C.; DREUX, M. Parameter optimization for the analysis of underivatized protein amino acids by liquid chromatography and ionspray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 896, n. 1-2, p. 253–263, 2000.

PIRAUD, M.; VIANEY-SABAN, C.; BOURDIN, C.; ACQUAVIVA-BOURDAIN, C.; BOYER, S.; ELFAKIR, C.; BOUCHU, D. A new reversed-phase liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for analysis of underivatized amino acids: evaluation for the diagnosis and the management of inherited disorders of amino acid metabolism. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, n. 22, p. 3287–3297, 2005a.

PIRAUD, M.; VIANEY-SABAN, C.; PETRITIS, K.; ELFAKIR, C.; STEGHENS, J. P.; MORLA, A.; BOUCHU, D. ESI-MS/MS analysis of underivatized amino acids: A new tool for the diagnosis of inherited disorders of amino acid metabolism. Fragmentation study of 79 molecules of biological interest in positive and negative ionisation mode. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 17, n. 12, p. 1297–1311, 2003.

PIRAUD, M.; VIANEY-SABAN, C.; PETRITIS, K.; ELFAKIR, C.; STEGHENS, J.-P.; BOUCHU, D. Ion-pairing reversed-phase liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometric analysis of 76 underivatized amino acids of biological interest: a new tool for the diagnosis of inherited disorders of amino acid metabolism. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, n. 12, p. 1587–1602, 2005b.

PITT, J. J.; EGGINGTON, M.; KAHLER, S. G. Comprehensive screening of urine samples for inborn errors of metabolism by electrospray tandem mass spectrometry. **Clinical chemistry**, v. 48, n. 11, p. 1970–80, 2002.

QU, J.; WANG, Y.; LUO, G.; WU, Z.; YANG, C. Validated quantitation of underivatized amino acids in human blood samples by volatile ion-pair reversed-phase liquid chromatography coupled to isotope dilution tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 9, p. 2034–2040, 2002.

RASHED, M. S.; OZAND, P. T.; BUCKNALL, M. P.; LITTLE, D. Diagnosis of inborn errors of metabolism from blood spots by acylcarnitines and amino acids profiling using automated electrospray tandem mass spectrometry. **Pediatric research**, v. 38, n. 3, p. 324–331, 1995.

REDDY, I.; J. SHERLIN, H.; RAMANI, P.; PREMKUMAR, P.; NATESAN, A.; CHANDRASEKAR, T. Amino acid profile of saliva from patients with oral squamous cell carcinoma using high performance liquid chromatography. **Journal of Oral Science**, v. 54, n. 3, p. 279–283, 2012.

RICÓS, C.; ALVAREZ, V.; CAVA, F.; GARCÍA-LARIO, J. V; HERNÁNDEZ, a; JIMÉNEZ, C. V; MINCHINELA, J.; PERICH, C.; SIMÓN, M. Current databases on biological variation: pros, cons and progress. **Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation**, v. 59, n. 7, p. 491–500, 1999.

RIGAS, P. G. Post-column labeling techniques in amino acid analysis by liquid chromatography. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 405, n. 25, p. 7957–92, 2013.

ROLINSKI, B.; ARNECKE, R.; DAME, T.; KREISCHER, J.; OLGEMÖLLER, B.; WOLF, E.; BALLING, R.; HRABÉ DE ANGELIS, M.; ROSCHER, A. a. The biochemical metabolite screen in the Munich ENU Mouse Mutagenesis Project: determination of amino acids and acylcarnitines by tandem mass spectrometry. **Mammalian Genome**, v. 11, n. 7, p. 547–551, 2000.

ROSEN, H. A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 67, n. 1, p. 10–15, 1957.

SCHULZE, a; KOHLMUELLER, D.; MAYATEPEK, E. Sensitivity of electrospray-tandem mass spectrometry using the phenylalanine/tyrosine-ratio for differential diagnosis of hyperphenylalaninemia in neonates. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 283, n. 1-2, p. 15–20, 1999.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. Third Edit ed. Hoboken: Wiley, 2010. v. 22

SPACKMAN, D. H.; STEIN, W. H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Analytical chemistry**, v. 30, n. 7, p. 1190–1206, 1958.

STADLER, S.; GEMPEL, K.; BIEGER, I.; PONTZ, B. F.; GERBITZ, K. D.; BAUER, M. F.; HOFMANN, S. Detection of neonatal argininosuccinate lyase deficiency by serum tandem mass spectrometry. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 24, n. 3, p. 370–8, 2001.

STREIT, F.; ARMSTRONG, V. W.; OELLERICH, M. Rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry routine method for simultaneous determination of sirolimus, everolimus, tacrolimus, and cyclosporin A in whole blood. **Clinical Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 955–958, 2002.

TANAKA, K.; WAKI, H.; IDO, Y.; AKITA, S.; YOSHIDA, Y.; YOSHIDA, T.; MATSUO, T. Protein and Polymer Analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 2, n. 8, p. 151–153, 1988.

VOLMER, D. A.; MENDES, L. R. B. C.; STOKES, C. S. Analysis of vitamin D metabolic markers by mass spectrometry: Current techniques, limitations of the “gold standard” method, and anticipated future directions. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 34, n. 1, p. 2–23, jan. 2015.

WATERS. **SQ-Detector-2---Single-Quadrupole-Detection**. Disponível em: <http://www.waters.com/waters/pt_BR/SQ-Detector-2---Single-Quadrupole-Detection/nav.htm?cid=134631584&locale=pt_BR>. Acesso em: 15 out. 2015.

WATERVAL, W. a H.; SCHEIJEN, J. L. J. M.; ORTMANS-PLOEMEN, M. M. J. C.; HABETS-VAN DER POEL, C. D.; BIERAU, J. Quantitative UPLC-MS/MS analysis of underivatized amino acids in body fluids is a reliable tool for the diagnosis and follow-up of patients with inborn errors of metabolism. **Clinica Chimica Acta**, v. 407, n. 1-2, p. 36–42, 2009.

ZHANG, T.; ZHANG, C.; CHEN, W.; ZHAO, H.; ZHANG, J.; ZHOU, W.; ZENG, J.; WANG, J.; WANG, D. Quantification of hemoglobin A1c by off-line HPLC separation and liquid chromatography-tandem mass spectrometry: a modification of the IFCC reference measurement procedure. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 0, n. 0, p. 1–8, 10 jan. 2015.

ZUNGER, A.; HULL, R.; OSGOOD, R. M.; SAKAKI, H. **Reference materials in analytical chemistry**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2000. v. 40