



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

**Desenvolvimento e validação do método DPX/UHPLC-MS/MS para determinação de levodopa, carbidopa, dopamina e 3-o-metildopa em amostras de plasma humano**

Lidia Miranda da Silva

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

RIBEIRÃO PRETO - SP

2022

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

Lidia Miranda da Silva

Desenvolvimento e validação do método DPX/UHPLC-MS/MS para determinação de levodopa, carbidopa, dopamina e 3-o-metildopa em amostras de plasma humano

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Eugênia Queiroz Nassur

Ribeirão Preto - SP

2022

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

Silva, Lidia Miranda da

Desenvolvimento e validação do método DPX/UHPLC-MS/MS para determinação de levodopa, carbidopa, dopamina e 3-o-metildopa em plasma humano. Ribeirão Preto, 2022

72 p. il.; 30cm

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

Orientadora: Nassur, Maria Eugênia Queiroz

1. Doença de Parkinson. 2. Levodopa, carbidopa e 3-o-metildopa. 3. Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em *tandem*. 4. Microextração dispersiva em ponteiras

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: Lidia Miranda da Silva

Título: **Desenvolvimento e validação do método DPX/UHPLC-MS/MS para determinação de levodopa, carbidopa, dopamina e 3-o-metildopa em plasma humano**

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

Aprovado em: \_\_/\_\_/\_\_

Banca examinadora

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

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

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

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

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

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

*A Deus, minha esperança e fortaleza. A Ele que me acompanha e me conhece no íntimo, que me AMA em minha humanidade: potencial e limitada, e que me desperta para valorizar e acolher cada vez mais a mim mesma e os meus processos.*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo (**USP**), à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (**FFCLRP**) e ao **Departamento de Química** pela formação, apoio institucional e instalações necessárias para realização do presente trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) – Código de Financiamento 001, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) pela concessão de bolsas e apoio financeiro ao desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

À **SAS-USP** e ao **Serviço de Promoção Social** - PUSP-RP pelo apoio e auxílios fornecidos durante o período de graduação e de pós-graduação.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Maria Eugênia Queiroz Nassur**, que também me iniciou na pesquisa científica, pela orientação, confiança, e contribuição para minha formação profissional.

Aos colegas de laboratório **Israel, Luis Felipe, Igor, Jonas, Caroline e Priscila** pela parceria, carinho e ajudas prestadas. Ao Israel também agradeço por ter sido o meu braço direito na execução deste trabalho, que foi bastante desafiador.

À **Profa. Dra. Andréa Rodrigues Chaves** e ao **Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira** pela participação e contribuições como membros da banca de Exame de Qualificação.

A todos os meus professores por cada ensinamento, pelo carinho e importante papel na minha formação e desenvolvimento pessoal e profissional.

A todos os funcionários e técnicos do Departamento de Química, pelo suporte, colaborações e atenção dispensada. Aos funcionários da moradia de pós-graduação (**CASA 12**) e aos do **Bandejão** pelo zelo e carinho.

A todos os colegas da **CASA 12** pelo companheirismo e momentos compartilhados.

Agradeço a todos que passaram em minha vida e aos momentos vividos, pois todos eles se tornaram uma nova oportunidade de crescimento e aprendizado.

Às minhas amigas **Euzane, Sâmya, Vania e Cássia** pela amizade, presença e cuidado, pelos momentos de distração, conhecimentos compartilhados e crescimento proporcionado a partir das nossas convivências.

Ao **Victor Barlow** por ser uma pessoa maravilhosa em minha vida, pela parceria e companheirismo e por tanto amor e cuidado comigo.

Aos meus irmãos **Leandro, Lívia, Laís, Luciana, Pedro e Adailton** (padrinho e irmão de coração) pela amizade, apoio, confiança, e amor incondicional. Minha sincera gratidão também a todos familiares que sempre me apoiaram e vibraram pelas minhas conquistas, dando-me forças para continuar a percorrer o meu caminho.

Aos meus pais, **Maria de Fátima e Juarez**, e à minha tia **Eva** (segunda mãe) por toda potência e força que me dão pelo exemplo de vida e fé e pelos gestos de amor; e pelas motivações, cuidado e orações de sempre.

A **Deus**, pela força e cuidado para que eu não desistisse mesmo nos momentos de desânimo, por cada detalhe nos processos que constituem a minha vida, e por acender em mim o desejo de fazer e dar sempre o meu melhor em todos os meus projetos.

“[...] Não prometo dar-lhe um jardim de flores  
Mas prometo a força pra poder plantá-lo  
E asseguro no cultivo estar bem junto, se  
preciso, lhe consolar  
Cantaremos a semente germinada, podaremos  
o que não puder crescer  
Cada poda há de ter ensinamento eu vou lhe  
ajudar a compreender...”

**(Mais Perto - Pe. Fábio de Melo)**

## RESUMO

SILVA, L. M. **Desenvolvimento e validação do método DPX-UHPLC-MS/MS para determinação de levodopa, carbidopa, dopamina e 3-o-metildopa em amostras de plasma humano.** 2022, 72f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

A Doença de Parkinson (DP) é a segunda patologia neurodegenerativa mais frequente na população mundial. É uma doença crônica, progressiva e complexa em sua expressão clínica. A DP está associada a deficiência de dopamina nas vias nigroestriatais, afetando diretamente o sistema motor. A terapia com o pró-fármaco dopaminérgico, levodopa, associado à carbidopa tem se configurado como o tratamento mais eficaz na minimização dos sintomas motores, melhorando a qualidade de vida dos pacientes, principalmente no estágio inicial da doença. No entanto, com a progressão da DP e mediante a complicações provocadas pelo tratamento prolongado com esses fármacos, ajustes das doses são necessárias. Neste contexto, métodos cromatográficos têm sido desenvolvidos e padronizados para a determinação dos níveis plasmáticos de carbidopa, levodopa e seus metabólitos. Estas determinações auxiliam na individualização do regime de dosagem dos fármacos prescritos e minimização dos efeitos adversos. Neste projeto, um método empregando as técnicas de microextração dispersiva em ponteira com a fase bifuncional *oasis* MCX e a cromatografia de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (UHPLC-MS/MS) foi padronizado e validado para determinação de levodopa, carbidopa e 3-o-metildopa em amostras de plasma humano. O procedimento DPX com a fase MCX demonstrou ser adequado para pré-concentrar os analitos e excluir interferentes da amostra biológica. A coluna Gold HILIC (2,1 mm x 100 mm x 1,9  $\mu$ m) utilizada, resultou em satisfatória separação dos analitos e em rápido tempo de análise (5 min). O método desenvolvido apresentou linearidade adequada nos intervalos de 50-600 ng.mL<sup>-1</sup> para a levodopa, 20-600 ng.mL<sup>-1</sup> para a carbidopa e 20-500 ng.mL<sup>-1</sup> para a 3-o-metildopa, com coeficientes de correlação (r) e de determinação (r<sup>2</sup>) maiores que 0,99. Os valores de precisão (CV) e os valores de exatidão (EPR) variaram, respectivamente, de 0,4 a 16,8% e de -0,3 a 16,2%. O paralelismo entre as retas obtidas com as curvas analíticas construídas com amostras de plasma e de água enriquecidas com os analitos foi demonstrado com teste t, a nível de significância de 5%, indicando efeito matriz pouco significativo. O método proposto foi aplicado com sucesso na determinação de levodopa, carbidopa e 3-o-metildopa em amostras de plasma.

**Palavras chave:** Doença de Parkinson; Levodopa, carbidopa e 3-o-metildopa; Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em *tandem*; Microextração dispersiva em ponteira.

## ABSTRACT

SILVA, L. M. **Development and validation of a DPX/UHPLC-MS/MS method for determination of levodopa, carbidopa, dopamine and 3-o-methyldopa in human plasma samples** 2022, 72f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Parkinson's Disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder in the world population. It is a chronic, progressive, and complex disease in its clinical expression. PD is associated with dopamine deficiency in the nigrostriatal pathways, directly affecting the motor system. Therapy with the dopaminergic drug levodopa associated with carbidopa has been the most effective treatment in minimizing motor symptoms, improving the quality of life of patients, especially in the initial stage of the disease. However, with PD progression and the complications caused by prolonged treatment with these drugs, dose adjustments are necessary. In this context, chromatographic methods have been developed to determine the plasma levels of carbidopa, levodopa, and their metabolites. These determinations support individualization of the drug dosing regimen and help to minimize adverse effects. In this project, a method comprising dispersive microextraction in tip with the mixed-mode MCX oasis phase and ultra-high performance chromatography coupled to mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) was standardized and validated for determination of levodopa, carbidopa, and 3-o-methyldopa in human plasma samples. During the sample preparation step, the DPX procedure with the MCX phase proved to pre-concentrate analytes and to exclude interferences adequately. The Gold HILIC column (2.1 mm x 100 mm x 1.9  $\mu\text{m}$ ) exhibited adequate separation efficiency and fast analysis time (5 min). The method showed linear ranges of 50–600  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 20–600  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , and 20–500  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  for levodopa, carbidopa, and 3-o-methyldopa, respectively, with correlation coefficients greater than 0.99. The method was precise and accurate with CV values ranging from 0.4 to 16.8% and RSD values ranging from -0.3% to 16.2%. The t test, at a significance level of 5%, demonstrated the parallelism between the lines obtained by constructing analytical curves with plasma and water samples enriched with the analytes, indicating a negligible matrix effect. The proposed method was successfully applied to determine levodopa, carbidopa, and 3-o-methyldopa in plasma.

**Keywords:** Parkinson's Disease; Levodopa, carbidopa and 3-o-methyldopa; Ultra-high Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry; Disposable Pipette Extraction (DPX)

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática do metabolismo e absorção da levodopa .....	20
<b>Figura 2.</b> Estrutura química, valores de log P e de pKa dos fármacos e metabólitos estudados .....	27
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática do mecanismo de separação observado na cromatografia líquida com interações hidrofílicas .....	28
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática das etapas procedimentais típicas da DPX.....	30
<b>Figura 5.</b> Representação das fragmentações e das estruturas das espécies químicas envolvidas nas transições m/z monitoradas para cada um dos analitos estudados.....	43
<b>Figura 6.</b> Cromatogramas dos analitos obtidos a partir das diferentes colunas cromatográficas avaliadas: a) no modo HILIC e b) no modo reverso .....	45
<b>Figura 7.</b> Estruturas dos analitos no pH da fase móvel (pH ~ 3).....	47
<b>Figura 8.</b> Representação estrutural da fase Gold HILIC na forma não ionizada e na forma ionizada (protonada) .....	48
<b>Figura 9.</b> Estrutura química da fase sorvente Oasis® MCX (Mixed-Mode Cation-eXchange and reversed-phase sorbent, Waters) .....	52
<b>Figura 10.</b> Avaliação das soluções de ácido fórmico 4% e ácido fosfórico 4% na sorção de carbidopa, 3-o-metildopa, levodopa, dopamina junto fase Oasis® MCX.....	52
<b>Figura 11.</b> Valores médios de áreas dos analitos obtidos a partir da avaliação dos volumes de 200 e 250 µL de plasma na microextração em ponteira com a fase Oasis® MCX.....	53
<b>Figura 12.</b> Avaliação do percentual de hidróxido de amônio na solução de dessorção .....	54
<b>Figura 13.</b> Avaliação do tempo de sorção dos analitos junto a fase MCX por microextração dispersiva em ponteira .....	55
<b>Figura 14.</b> Curvas analíticas médias para quantificação de levodopa, carbidopa e 3-o-metildopa pelo método DPX/UHPLC-MS/MS .....	58
<b>Figura 15.</b> Cromatogramas de íons produtos (íons de quantificação) da levodopa, carbidopa e 3-o-metildopa em plasma enriquecido (500 ng mL <sup>-1</sup> ).....	61

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Métodos LC-MS/MS disponíveis na literatura para quantificação de levodopa, carbidopa, a, 3-O-metildopa e dopamina em amostras de plasma.....	22
---	----

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Transições m/z e valores de voltagem do cone e de energia de colisão otimizados para cada analito e para os padrões internos.....	36
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros de linearidade dos analitos em estudo no método DPX/LC-MS/MS ...	57
<b>Tabela 3.</b> Precisão e exatidão (intra e interensaio) do método DPX/UHPLC-MS/MS na determinação de levodopa, carbidopa, dopamina e 3-o-metildopa em amostras de plasma ....	59
<b>Tabela 4.</b> Valores de coeficientes angulares médios das curvas construídas em plasma e em água e valores p obtido com teste estatístico t para avaliação do paralelismo das retas .....	60
<b>Tabela 5.</b> Concentrações plasmáticas determinadas (n = 3) em amostras de plasma.....	62

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3-OMD	3-o-metildopa
AADC	Aminoácido aromático descarboxilase
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHE	Barreira hematoencefálica
C8	Octilsilano
C18	Octadecilsilano
COMT	Catecol-O-metil-transferase
CQ	Controle de Qualidade
CQA	Controle de Qualidade Alto
CQB	Controle de Qualidade Baixo
CQM	Controle de Qualidade Médio
CV	Coefficiente de Variação
CLFN	Cromatografia Líquida de Fase Normal
CLFR	Cromatografia Líquida de Fase Reversa
DP	Doença de Parkinson
DPX	<i>Disposable Pipette Extraction</i> (Extração dispersiva em ponteiras)
EPR	Erro Padrão Relativo
ESI	<i>Electrospray ionization</i> (ionização por electrospray)
ESI <sup>+</sup>	<i>Electrospray ionization in positive mode</i> (ionização por electrospray no modo positivo)
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
HILIC	<i>Hydrophilic interaction liquid chromatography</i> (Cromatografia Líquida por Interações Hidrofílicas)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

LC-MS	<i>Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry</i> (Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas)
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry</i> (Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas em <i>Tandem</i> )
LIQ	Limite Inferior de Quantificação
LSQ	Limite Superior de Quantificação
MCX	<i>Mixed-Mode Cation-eXchange and reversed-phase sorbent</i> ( <i>Sorvente bifuncional troca catiônica/fase reversa</i> )
MIP	<i>Molecularly Imprinted Polymer</i> (Polímero molecularmente Impresso)
MRM	Monitoramento de reações múltiplas
OMS	Organização Mundial de Saúde
PI	Padrão Interno
PP	Precipitação de Proteínas
QSM	<i>Quaternary Solvent Manager</i> (Bomba Quaternária)
RAM	Restricted Access <i>Media</i> (Material de Acesso Restrito)
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Extração em Fase Sólida)
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i> (Cromatograma de Íons Totais)
UHPLC	<i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência)
UHPLC-MS/MS	<i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry</i> (Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas em <i>Tandem</i> )

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	grau Celsius
$\mu\text{g mL}^{-1}$	micrograma/mililitro
$\mu\text{L}$	microlitro
$\mu\text{m}$	micrômetro
eV	elétron-volt
kV	quilovolt
$\text{L h}^{-1}$	litro/hora
m/z	massa/carga
mg	miligrama
$\text{mg mL}^{-1}$	miligrama/mililitro
mL	mililitro
$\text{mL min}^{-1}$	mililitro/minuto
$\text{ng mL}^{-1}$	nanograma/mililitro
rpm	rotações por minuto
s	segundo
V	volt
v/v	volume/volume

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	18
1.1.	<b>A Doença de Parkinson .....</b>	<b>18</b>
1.2.	<b>Métodos LC-MS/MS na determinação de levodopa, carbidopa, dopamina e 3-o-metildopa em amostras de plasmas .....</b>	<b>21</b>
1.3.	<b>Cromatografia líquida com interação hidrofílica .....</b>	<b>27</b>
1.4.	<b>Microextração dispersiva em ponteira .....</b>	<b>29</b>
2.	OBJETIVOS .....	33
2.1.	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>33</b>
2.2.	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>33</b>
3.	MATERIAS E MÉTODOS .....	35
3.1.	<b>Padrões e reagentes.....</b>	<b>35</b>
3.2.	<b>Preparo das soluções padrões estoque e de trabalho.....</b>	<b>35</b>
3.3.	<b>Otimização das condições UHPLC-MS/MS .....</b>	<b>35</b>
3.3.1.	Condições MS/MS .....	35
3.3.2.	Condições cromatográficas .....	36
3.4.	<b>Amostras de plasma.....</b>	<b>37</b>
3.5.	<b>Preparo da amostra .....</b>	<b>37</b>
3.5.1.	Etapa prévia de Precipitação de Proteínas (PP) .....	37
3.5.2.	Otimização dos parâmetros DPX.....	37
3.6.	<b>Validação Analítica do método DPX/UHPLC-MS/MS .....</b>	<b>38</b>
3.6.1.	Preparo das amostras de controle de qualidade e curva analítica .....	38
3.6.2.	Linearidade.....	39
3.6.3.	Precisão e exatidão .....	39
3.6.4.	Efeito Residual .....	40
3.6.5.	Efeito da matriz .....	40

4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
<b>4.1.</b>	<b>Otimização das condições MS/MS.....</b>	<b>42</b>
<b>4.2.</b>	<b>Otimização das condições cromatográficas.....</b>	<b>44</b>
4.2.1.	Seleção da fase estacionária/coluna cromatográfica .....	44
4.2.2.	Avaliação das fases móveis para cada coluna analisada.....	49
4.2.3.	Avaliação do modo de eluição .....	50
4.2.4.	Volume de Injeção .....	50
<b>4.3.</b>	<b>Preparo da amostra .....</b>	<b>51</b>
4.3.1.	Etapa prévia de Precipitação de Proteínas (PP) .....	51
4.3.2.	Otimização dos parâmetros DPX.....	51
4.3.2.1.	Natureza/pH da solução de sorção.....	52
4.3.2.2.	Volume de amostra .....	53
4.3.2.3.	Solução de dessorção.....	54
4.3.2.4.	Tempo de sorção dos analitos.....	55
4.3.2.5.	Solventes de limpeza .....	56
<b>4.4.</b>	<b>Validação Analítica do método DPX/UHPLC-MS/MS .....</b>	<b>57</b>
4.4.1.	Linearidade.....	57
4.4.2.	Precisão e exatidão.....	58
4.4.3.	Efeito Residual .....	59
4.4.4.	Efeito da matriz .....	59
<b>4.5.</b>	<b>Análise de amostras de plasma .....</b>	<b>62</b>
5.	CONCLUSÃO .....	64
6.	REFERÊNCIAS.....	66

# INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson (DP) é um distúrbio neurológico, crônico e progressivo, clinicamente caracterizado pela presença de sintomas motores clássicos como bradicinesia, tremor de repouso, rigidez muscular e instabilidade postural<sup>1-4</sup>. A doença também está associada a sintomas não-motores como déficits olfatórios, constipação, distúrbios do comportamento do sono, prejuízo cognitivo, depressão e manifestações neuropsiquiátricas (demência, alucinações, delírios), os quais aparecem durante o curso da doença, tornando-a ainda mais incapacitante<sup>2,5-8</sup>.

Atualmente, a DP é a segunda doença neurodegenerativa mais frequente na população mundial e atinge principalmente a população idosa - cerca de 1% da população mundial com idade superior a 65 anos e mais de 4% da população com mais de 85 anos<sup>2,8-11</sup>. Estudos sugerem que com o aumento da expectativa de vida e consequente envelhecimento populacional, o número de casos da doença deve aumentar, provocando impactos cada vez maiores nas estruturas socioeconômicas e de saúde<sup>3,10-14</sup>.

Além disso, de acordo com o Estudo Carga Global de Doenças, Lesões e Fatores de Risco (2015) a Doença de Parkinson apresentou, dentre os distúrbios examinados, crescimento mais acelerado em termos de prevalência, deficiência e mortes. Foi também apontado que o número total de pessoas afetadas pela DP mais que dobrou globalmente de 1990 a 2015<sup>3</sup>.

Em relação à fisiopatologia, a DP compreende a perda seletiva de neurônios dopaminérgicos situados na porção compacta da substância negra, e o acúmulo de agregados proteicos citoplasmáticos (corpos de Lewy) nos neurônios remanescentes<sup>2,9</sup>. A perda neuronal progressiva ocasiona uma deficiência do neurotransmissor dopamina nas vias nigroestriatais, provocando um desequilíbrio do sistema motor - regulado pelo córtex cerebral e gânglios da base - e, por conseguinte, levando ao aparecimento dos sintomas motores da doença<sup>2,14,15</sup>.

Estes sintomas aparecem de modo lento e gradual, e tornam-se evidentes apenas quando há perda neuronal em torno de 50-60% e redução da dopamina do corpo estriado em cerca de 80-85%<sup>8-10</sup>. Adicionalmente, a falta de especificidade dos sintomas não-motores, mediante a complexidade da doença, impossibilita a realização de um diagnóstico ainda no estágio inicial<sup>16</sup>. Segundo Altmann (2018, p. 15)<sup>9</sup> a “latência observada entre o início da DP e do aparecimento das manifestações clínicas se deve possivelmente a mecanismos de compensação que permitem a manutenção e estabilidade das funções dos núcleos da base estável por vários anos”.

Por ser a progressão da DP lenta e gradual, torna-se difícil prever seu curso para cada

indivíduo acometido, já que a relação entre a progressão da doença e suas complicações não é linear – variando de caso a caso<sup>6</sup>.

Embora a origem da DP seja descrita como idiopática, evidências científicas sugerem que a patogênese da doença é multifatorial, sendo decorrente da combinação de fatores genéticos e ambientais<sup>3,6,8,9,11,14,17,18</sup>.

Devido à complexidade da DP em sua expressão clínica, admite-se a necessidade de desenvolvimento de abordagem de tratamento multidisciplinar, integrativa e individualizada, para abranger tanto os sintomas motores quanto não-motores<sup>7</sup>. Todavia, ainda não há uma terapia preventiva ou que promova a cura<sup>6</sup>.

Logo, o tratamento da DP é sintomático e direcionado, primariamente, ao controle dos sintomas motores por meio de terapias farmacológicas, sendo a levodopa - um precursor do neurotransmissor dopamina - o fármaco de referência na amenização destes sintomas, e capaz de proporcionar uma melhora significativa na qualidade de vida dos pacientes, principalmente na fase inicial do tratamento<sup>1,6</sup>.

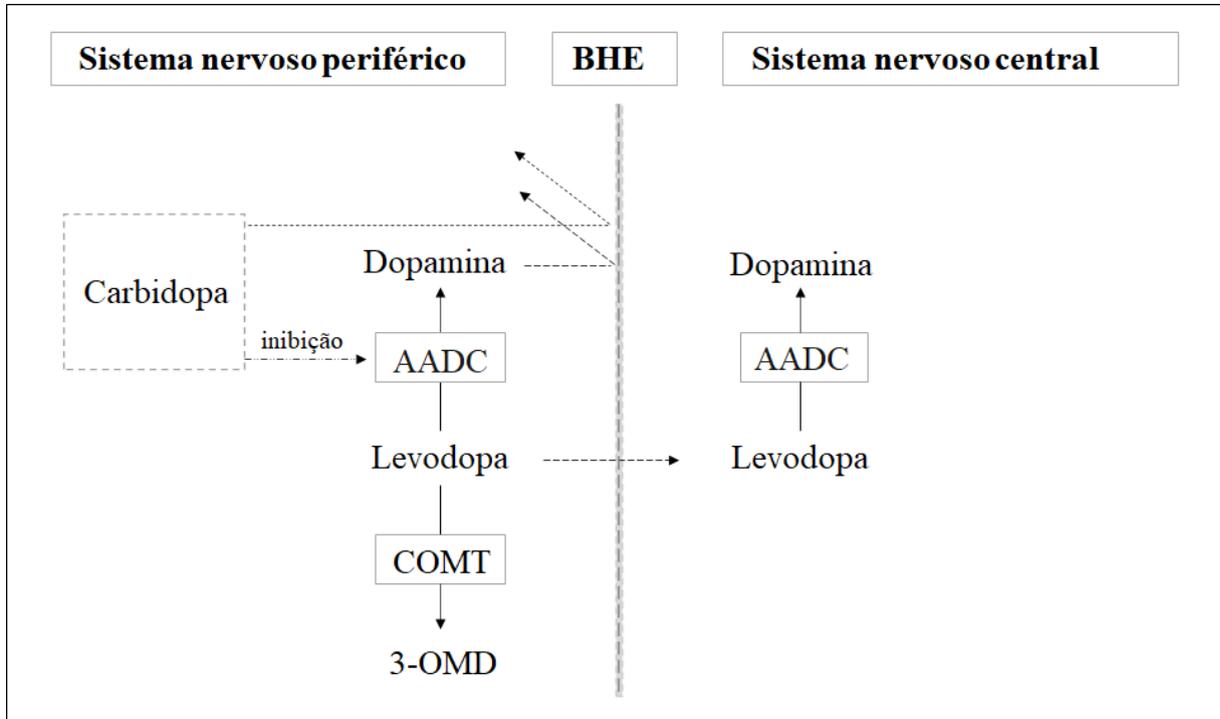
A eficácia desse fármaco está associada à sua capacidade de reestabelecer os níveis de dopamina no sistema nervoso central<sup>1</sup>. Ao ser administrada sistematicamente, a levodopa sofre vários processos bioquímicos (Figura 1): por atuação de aminoácidos aromáticos descarboxilase (AADC), presentes tanto no sistema nervoso central quanto no periférico, a levodopa é descarboxilada e convertida em dopamina; sendo, também, metabolizada pela catecol-O-metil-transferase (COMT) em 3-o-metildopa (3-OMD)<sup>19</sup>. As conversões periféricas diminuem a disponibilidade de levodopa no SNC e, em consequência, a produção de dopamina nessa região é reduzida. Esse mecanismo torna o uso isolado da levodopa inapropriado, já que a dopamina produzida no sistema periférico não atravessa a barreira hematoencefálica, e por isso não pode atuar no controle motor, além de ocasionar efeitos adversos como náuseas, vômitos, arritmias cardíacas e hipotensão<sup>20</sup>.

Neste sentido, para contornar esses efeitos e aumentar a disponibilidade de dopamina no SNC, a levodopa tem sido combinada a inibidores da AADC, como a carbidopa. Este fármaco não atravessa a barreira hematoencefálica e assim, não pode interferir no mecanismo de conversão de levodopa a dopamina no SNC, ao passo que também diminui o processo de metabolização da levodopa no trato gastrointestinal (SNP) (em outras palavras, bloqueia a conversão periférica da levodopa). Como resultado, a utilização da carbidopa reduz em torno de 4 a 5 vezes a dose de levodopa necessária a uma resposta clínica adequada<sup>20,21</sup>.

Assim, a levodopa não convertida perifericamente atravessa a barreira hematoencefálica e atinge o sistema nervoso central. No SNC os terminais sinápticos nigroestriatais sobreviventes

captam a levodopa, que é então descarboxilada em dopamina, a qual será estocada em vesículas e liberada na fenda sináptica, possibilitando então a regulação do sistema motor<sup>20,21</sup>.

**Figura 1.** Representação esquemática do metabolismo e absorção da levodopa



Fonte: autor - adaptado de Nishijima & Tomiyama (2016)<sup>20</sup>. \* BHE: Barreira hematoencefálica

No entanto, o uso prolongado da levodopa favorece o surgimento de flutuações motoras e discinesias, caracterizadas por movimentos involuntários e anormais<sup>1,22</sup>. As flutuações motoras mais observadas são a deterioração de final de dose (*wearing-off*), marcada pelo encurtamento da duração do efeito da levodopa, e as flutuações aleatórias (fenômeno *on-off*), caracterizadas pela alteração brusca do estado de mobilidade do paciente, independente do horário de administração das doses do fármaco<sup>1,22</sup>.

As flutuações na resposta farmacodinâmica para a levodopa entre a fase *wearing-off* e as discinesias levam ao encurtamento da janela terapêutica – faixa que compreende a concentração mínima e máxima do fármaco, em que se observa a eficácia do tratamento - aumentando a probabilidade de ocorrências de overdoses ou de doses não terapêuticas (ineficazes)<sup>20,23</sup>. Tais ocorrências podem ser evitadas e uma resposta clínica adequada pode ser mantida a partir do ajuste apropriado no regime de dosagem<sup>20,23</sup>.

Neste contexto, o ajuste de dosagem por meio da monitorização terapêutica torna-se fundamental. Por meio deste recurso clínico, é possível correlacionar as dosagens dos fármacos administradas com as concentrações plasmáticas ou séricas resultantes e, a partir disso, evitar ou prever precocemente a ocorrência de níveis tóxicos ou subterapêuticos em cada paciente.

Além disso, possibilita o ajuste individual da dosagem de acordo com as necessidades do paciente em cada estágio da doença, minimizando, assim, os efeitos adversos<sup>24,25,26</sup>.

Como suporte essencial na concretização da monitorização terapêutica e para alcance dos benefícios dessa prática aos pacientes com DP, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos de alta sensibilidade e seletividade para a determinação dos níveis plasmáticos de carbidopa, levodopa e dos seus metabólitos. Dentre as técnicas analíticas modernas, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem* (LC-MS/MS) tem sido amplamente utilizada na separação e quantificação de fármacos e espécies químicas de interesse biológico - como neurotransmissores em amostras biológicas<sup>27,28</sup>.

## **1.2. Métodos LC-MS/MS na determinação de levodopa, carbidopa, dopamina e 3-o-metildopa em amostras de plasmas**

Na LC-MS/MS, técnica analítica avançada, as análises são realizadas em curto espaço de tempo, com alta frequência analítica, e alta performance<sup>27,29</sup>. Com o acoplamento do sistema cromatográfico ao espectrômetro de massas, o método analítico torna-se ainda mais robusto, adicionando vantagens como detecção sensível e seletiva, elevada precisão e exatidão<sup>27</sup>.

Na espectrometria de massas, as determinações quantitativas ocorrem por meio da formação de íons, de sua separação - em função da razão entre massa e carga ( $m/z$ ) - e posterior detecção por um espectrômetro de massas. Este equipamento é constituído de sistema de introdução de amostra, uma fonte de ionização, um ou mais analisadores de massas, um detector e um sistema de dados. As análises feitas com o uso de dois ou mais analisadores são denominadas espectrometria de massas em *tandem* ou sequencial (MS/MS)<sup>30,31</sup>.

Análises MS/MS utilizando analisador do tipo triplo-quadrupolo no modo de varredura MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas) têm sido comumente empregadas para fins quantitativos, devido à alta seletividade que esta configuração atribui ao método ao permitir a seleção, transmissão e detecção apenas de íons de  $m/z$  específica<sup>16,25,30</sup>.

Atualmente, com as constantes inovações tecnológicas e mediante as diferentes modalidades e subdivisões da cromatografia<sup>27,32</sup>, há possibilidades variáveis de se desenvolver métodos seletivos e confiáveis para uma variedade de substâncias, nas mais complexas matrizes, pautando no conhecimento das propriedades físico-químicas dos analitos; na natureza da fase estacionária (FE) e da fase móvel (FM); e no conhecimento dos diferentes mecanismos separação cromatográfica<sup>27,32</sup>.

Diferentes métodos analíticos empregando LC-MS/MS vêm sendo desenvolvidos para determinação quantitativa de levodopa, carbidopa, dopamina e 3-o-metildopa (Quadro 1).

**Quadro 2.** Métodos LC-MS/MS disponíveis na literatura para quantificação de levodopa, carbidopa, a, 3-O-metildopa e dopamina em amostras de plasma

<b>Analito</b>	<b>Matriz (Volume - µL)</b>	<b>Preparo da amostra</b>	<b>Técnica de Análise</b>	<b>Coluna/Fase estacionária</b>	<b>Fase móvel (Modo de eluição)</b>	<b>Aplicação</b>	<b>LIQ (ng mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Referências (Ano)</b>
Levodopa, dopamina e outros neurotransmissores	Plasma de rato (150)	PP (Acetonitrila); extrato seco e reconstituído em metanol/água 1:1	UHPLC-MS/MS	ACQUITY UPLC BEH Amida (2,1 mm × 100 mm x 1,7 µm)	A: água contendo 0,2% de ácido fórmico e B: acetonitrila contendo 0,2 % de ácido fórmico (Eluição por gradiente)	Estudo animal	0,104 e 0,060	33 (2021)
Levodopa, carbidopa, benserazida dopamina e 3-OMD	Plasma (200)	PP (Acetonitrila); filtração: dispositivo Amicon Ultra-4. SPME (Capilar monolítico de sílica híbrida de aminopropil contendo partículas mesoporosas de SBA-15)	SPME-HILIC-MS/MS	ACQUITY UPLC BEH Amida (2,1 mm × 100 mm x 1,7 µm)	A: solução aquosa contendo 0,1% de ácido fórmico, B: acetonitrila (Eluição por gradiente)	Monitorização terapêutica e	22, 33, 170, 1,2 e 10	34 (2020)
Levodopa e carbidopa	Plasma Humano (200)	PP (acetonitrila contendo 40% de ácido tricloacético)	UHPLC-MS/MS	HSS T3 (2.1 mm x 100 mm x 1.8 µm)	A: 0,35% de ácido fórmico, B: metanol (Eluição por Gradiente)	Estudo farmacocinético	20 e 2,0	35 (2018)
Levodopa e dicloridrato de pramipexol	Plasma Humano (1000)	PP (Acetonitrila); filtração: filtro de membrana de 0,45 mm	UHPLC-ESI-MS/MS	Hypersil GOLD C18 (2,1 mm x 50 mm x 1,9 µm)	Á: água contendo 0,2% de ácido fórmico e B: metanol (90:10 v/v) (Eluição isocrática)	Estudo farmacocinético	60 e 0,100	36 (2018)
Levodopa e Carbidopa	Plasma de ratos	Extração líquido-líquido automatizada com 96 poços (acetato de etila : álcool n-butílico (1:1, v/v) contendo 1% de PFPA – reagente de pareamento iônico).	LC-MS/MS	Zorbax SB-AQ (3,0 mm × 100 mm; 3,5 µm)	A: água : 1,0 M de formiato de amônio : ácido fórmico (1000: 10: 5, v/v/v) + 0,1% de PFPA, B: acetonitrila (Eluição isocrática com 4% de B)	Estudos toxicocinéticos; Estudos in vivo	50 e 20	37 (2017)
Carbidopa	Plasma Humano (50) Urina (25)	PP (ácido perclórico 2 M). Derivatização com 2,4-pentanodiona sob condições ácidas, a 40 °C, por 60 min	UHPLC-ESI-MS/MS	HSS T3 (2,1 mm x 50 mm x 1,8 µm)	A: água contendo 0,1 % de ácido fórmico e B: acetonitrila (Eluição por gradiente)	Estudo farmacocinético	1 100	38 (2017)
Levodopa e carbidopa	Plasma Humano (200)	SPE (cartuchos de alumina, condicionamento: metanol e água Milli-Q; lavagem: água; eluição: 0,1% ácido fórmico)	HPLC-MS/MS	Phenomenex kinetex bifenil (3,0 mm x 50 mm; 2,6 µm)	Mistura de 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila (80/20, v/v); (Eluição isocrática)	Estudo de bioequivalência e farmacocinética	5,0 e 2,0	39 (2016)

Continua

Continuação do Quadro 1

Analito	Matriz (volume - µL)	Preparo de amostra	Técnica de Análise	Coluna	Condições cromatográficas (fase móvel)	Aplicação clínica	LIQ (ng mL <sup>-1</sup> )	Referências
Levodopa e MD01	Plasma de rato (50)	PP (acetonitrila contendo 2% de ácido fórmico); evaporação: fluxo de nitrogênio; reconstituição: água contendo 2% de ácido fórmico)	LC-ESI-MS/MS	Thermo Aquasil C18 (2,1 mm x 50 mm, 3 µm)	A: água contendo 0,2% de ácido fórmico, B acetonitrila (Eluição por gradiente)	Estudo farmacocinético	20	40 (2016)
Levodopa, carbidopa, entacapona, tocalpone, 3-OMD e dopamina	Plasma Humano (200)	PP (acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico)	HPLC-ESI-MS/MS	XBridge C8 (4,6 mm x 150 mm, 5 µm)	A: água, B: acetonitrila : metanol (90:10 v/v), ambos contendo 0,1% de ácido fórmico	Monitorização terapêutica	20; 30; 10; 10; 10 e 5,0	41 2015
Levodopa, carbidopa, 3-OMD e dopamina	Plasma Humano (400)	PP (acetonitrila contendo 0,05% ácido fórmico e 3 mmol/L de formiato de amônio); filtração: Filtro de seringa PVDF	HILIC-ESI-MS/MS	Atlantis HILIC - Waters (2,1 mm x 150 mm, 3 µm)	Acetonitrila : água (79:21, v/v) contendo 0,05% de ácido fórmico e 3 mmol/L de formiato de amônio; (Eluição isocrática)	Monitorização terapêutica	75; 65; 65; 20	26 (2014)
Levodopa	Plasma Humano (200)	PP (ácido perclórico)	HPLC-ESI-MS/MS	Pursuit® C18 (4,6 mm x 150 mm x 5 µm)	Metanol e água, (90:10, v/v) contendo ácido fórmico(0,5% v/v)	Estudo de bioequivalência	25	42 (2013)
Levodopa e carbidopa	Plasma de rato e de macaco (50)	PP (Acetonitrila contendo o reagente de derivatização fluorescamina; Incubação do sobrenadante a 37 °C por 60 min)	UHPLC-MS/MS	BEH C18 (2,1 mm x 50 mm x 1,7 µm)	A: 5mM formiato de amônio : ácido fórmico (1000:1, v/v), B: Acetona; (Eluição por gradiente)	Estudos Farmacocinéticos	5,0 e 3,0	43 (2013)
Levodopa, dopamina, L-α-metildopa e 3-OMD	Plasma de rato (50)	PP (Metanol contendo 1% de ácido fórmico)	HPLC-ESI-MS/MS	SB-C18 (4,6 mm x 250 mm x 5 µm)	A: solução aquosa contendo 0,5% de ácido fórmico, B: metanol (Eluição por gradiente)	Monitorização terapêutica e estudo de parâmetros farmacocinético	30	44 (2012)
Levodopa e carbidopa	Plasma Humano (250)	PP (ácido perclórico)	HPLC-ESI-MS/MS	ACE C18 (4,6 mm x 50 x 5 µm)	0,2% de ácido fórmico e acetonitrila (90:10 v/v)	Estudo farmacocinético	50 e 3,0	45 (2011)

Continua

Continuação do Quadro 1

Analito	Matriz (volume - $\mu\text{L}$ )	Preparo de amostra	Técnica de Análise	Coluna	Condições cromatográficas (fase móvel)	Aplicação clínica	LIQ ( $\text{ng mL}^{-1}$ )	Referências
Levodopa e 3-OMD	Plasma Humano (250)	PP (ácido perclórico)	HPLC-ESI-MS/MS	ACE C18 (4,6 mm x 50 mm x 5 $\mu\text{m}$ )	0,2% de ácido fórmico e acetonitrila (94: 6, v/v)	Estudo farmacocinético	50 e 25	46 (2011)
Levodopa	Plasma de rato (100)	PP (ácido perclórico 0,4 M)	HPLC-ESI-MS/MS	XTerra® ms C18 (2,1 mm x 150 mm x 5 $\mu\text{m}$ ) Pré-coluna Phenomenex C18 (4 mm x 20 mm x 5 $\mu\text{m}$ )	A: solução de acetato de amônio 10 mM contendo 0,1% de ácido fórmico, pH 3,8; B: acetonitrila (Eluição por gradiente)	Estudos Farmacocinéticos	50 e 12,5	47 (2010)
Levodopa, benserazida e 3-OMD	Soro (1000)	PP (metanol contendo 2% de ácido fórmico v/v); diluição do extrato: solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% v/v	HPLC-ESI-MS/MS	YMC PACK MB-ODS (150 mm x 2,1 mm, 3 $\mu\text{m}$ )	Metanol : ácido fórmico a 0,5% (30:70, v/v)	Estudo farmacocinético	50	48 (2010)
Carbengolina e Levodopa	Plasma Humano (100)	PP (acetonitrila contendo 20 mM de ácido fórmico para carbengolina e ácido perclórico para a levodopa)	LC-ESI-MS/MS	COSMOSIL 5C8-MS de fase reversa (2 mm x 150 mm x 5 $\mu\text{m}$ )	Metanol:água (10:90, v/v) (contendo ácido fórmico a 0,5% para a levodopa)	Análises de rotina	-	49 (2003)

3-OMD: 3-o-metildopa; HILIC-ESI-MS/MS: Cromatografia líquida com interação hidrofílica acoplada à espectrometria de massas *tandem* com ionização por electrospray; HPLC-MS/MS: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas *tandem*; HPLC-ESI-MS/MS: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas *tandem* com fonte de ionização por electrospray; LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas *tandem*; LC-ESI-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas *tandem* com fonte de ionização por electrospray; LIQ: limite inferior de quantificação; PFP: ácido perfluoropentanóico; PP: precipitação de proteínas; SPME: microextração em fase sólida; UHPLC-MS/MS: cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas *tandem*.

Os estudos sumarizados mostram um escopo, em que a maioria das análises dos compostos de interesse empregou o modo de cromatografia líquida em fase reversa (CLFR), com o uso majoritário de fase estacionária C18 (octadecilsilano). Estes trabalhos apresentaram diferenças que vão desde o preparo de soluções padrões e da amostra ao emprego de colunas C18 com diferentes tecnologias e funcionalidades, e apontaram ser adequada a aplicação do método padronizado às análises de amostras plasmáticas de pacientes em tratamento com levodopa e carbidopa.

No entanto, devido à baixa seletividade do modo reverso a compostos polares e hidrofílicos, como os fármacos estudados, manejos no preparo da amostra e na cromatografia foram realizados para alcance de maior retenção e separação adequada.

Destaca-se entre eles o emprego de agente de par iônico<sup>37</sup>; de processos de derivatização dos compostos, tornando-os menos polares<sup>38,43</sup>; de colunas funcionalizadas com grupos específicos, como a Kinetex bifenil com seletividade aromática, capaz de promover interações  $\pi$ - $\pi$  com os analitos<sup>39</sup>; de vazão de fase móvel baixa ( $< 0,300 \mu\text{L min}^{-1}$ )<sup>35,36,42,45,46</sup> e de fases móveis com proporções elevadas de água ( $> 90\%$ ), bem como a utilização de colunas com tecnologias capazes de suportar esse teor aquoso<sup>35</sup>.

Contudo, algumas dessas etapas, como a derivatização, tornam a análise muito laboriosa, aumentando o tempo de execução e interferindo na exatidão do método. Além disso, procedimentos que utilizam elevado conteúdo aquoso<sup>35</sup>, diminuem a detectabilidade das análises em sistemas espectrométrico com fonte de ionização por electrospray (ESI-MS), visto que desfavorecem o processo de dessolvatação durante a ionização. De maneira similar, o uso de reagentes de par iônico pode afetar a análise quantitativa em métodos bioanalíticos por espectrometria de massas, pois favorece a supressão do sinal analítico, prejudicando a sensibilidade do método<sup>50</sup>.

Neste sentido, novas abordagens de cromatografia, como a cromatografia líquida por interação hidrofílica (Hydrophilic Liquid Interaction Chromatograph, HILIC), com diferentes seletividades a classes de compostos polares e/ou iônicos vêm sendo adequadamente aplicadas, eliminando tais limitações. Assim, esta modalidade torna-se uma opção interessante a ser avaliada para os analitos em estudo<sup>50</sup>.

O trabalho desenvolvido por Vilhena et al (2014)<sup>26</sup> utilizando HILIC-MS/MS, por exemplo, foi realizado na determinação simultânea da carbidopa, levodopa, dopamina e 3-o-metildopa, apresentando ganhos em termos de retenção dos analitos e demonstrando ser adequada às análises destes compostos em amostras de plasma. Resultados satisfatórios foram também obtidos com os trabalhos desenvolvidos por Grecco (2020)<sup>34</sup> para análises desses

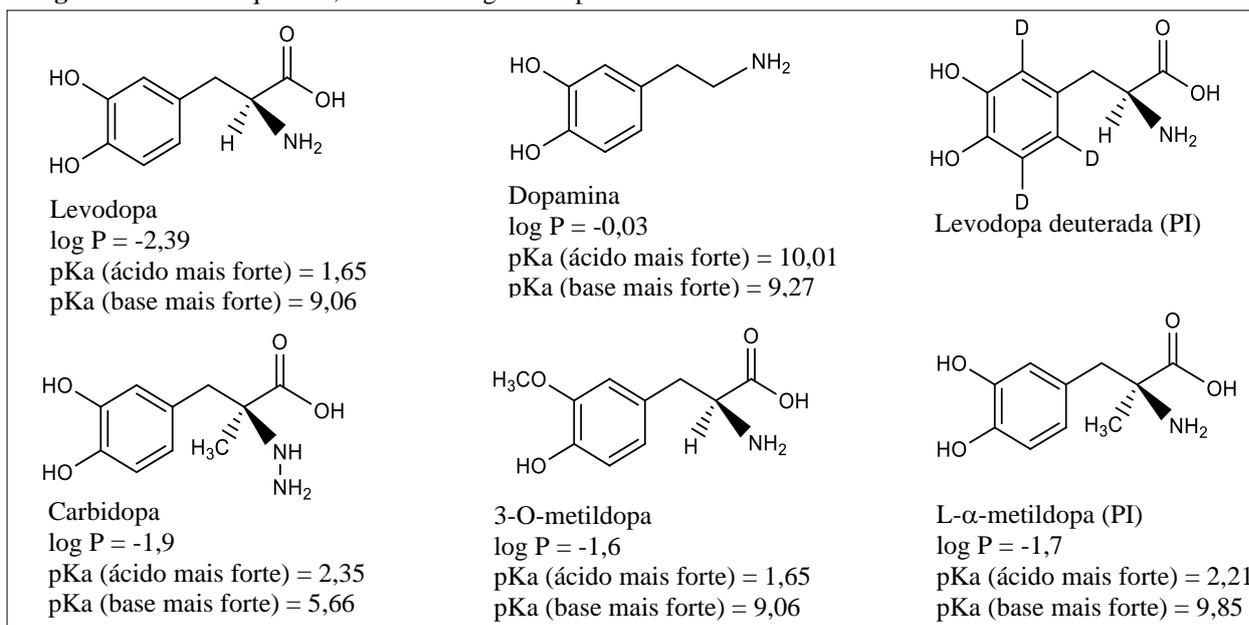
analitos e benserazida e, por Gao et al (2021)<sup>33</sup> na análise de neurotransmissores - incluindo a levodopa e a dopamina - empregando a HILIC (dados reportados no Quadro 1).

Ressalta-se que, de modo geral, os estudos levantados na literatura apontaram para o enorme efeito da matriz durante as análises dos fármacos - principalmente a levodopa - dada a complexidade da matriz biológica, tornando as análises desafiadoras. Nestes trabalhos, a resolução entre analitos e interferentes endógenos foi descrita como sendo capaz de auxiliar na redução da supressão de ionização. Assim, a minimização deste inconveniente pode ser realizada com foco no preparo da amostra e nas condições cromatográficas<sup>28</sup>.

Desse modo, faz-se necessária a otimização sistemática dos parâmetros cromatográficos para os analitos em estudo, apoiando-se na gama de possibilidades e variáveis possíveis de serem exploradas alternativamente, com vista à obtenção de uma análise que permita quantificar os analitos de maneira precisa e exata.

Considerando que a seletividade é o fator proeminente no processo cromatográfico, sendo a FE a variável mais influente neste fator, a pré-seleção e busca por FEs mais aprimoradas e adequadas (com estabilidade física, química e mecânica, tecnologias de minimização da interação analito-silicóis residuais e com funcionalidades compatíveis à classe de composto que se deseja estudar) facilita o processo de desenvolvimento de métodos cromatográficos<sup>51,52</sup>.

Mediante o panorama apresentado e considerando o número elevado de fases estacionárias (FE) com diferentes seletividades atualmente disponíveis, com o presente estudo propõe-se a avaliação de colunas cromatográficas nas modalidades HILIC e CLFR, considerando as estruturas e características físico-química dos compostos estudados (Figura 2) e os trabalhos descritos na literatura para as determinações dos compostos de interesse.

**Figura 2.** Estrutura química, valores de log P e de pKa dos fármacos e metabólitos estudados

Fonte: autor. Valores de log P e pKa(s) disponíveis nos Bancos de Dados DrugBank<sup>53</sup> e PubChem<sup>54</sup>

### 1.3. Cromatografia líquida com interação hidrofílica

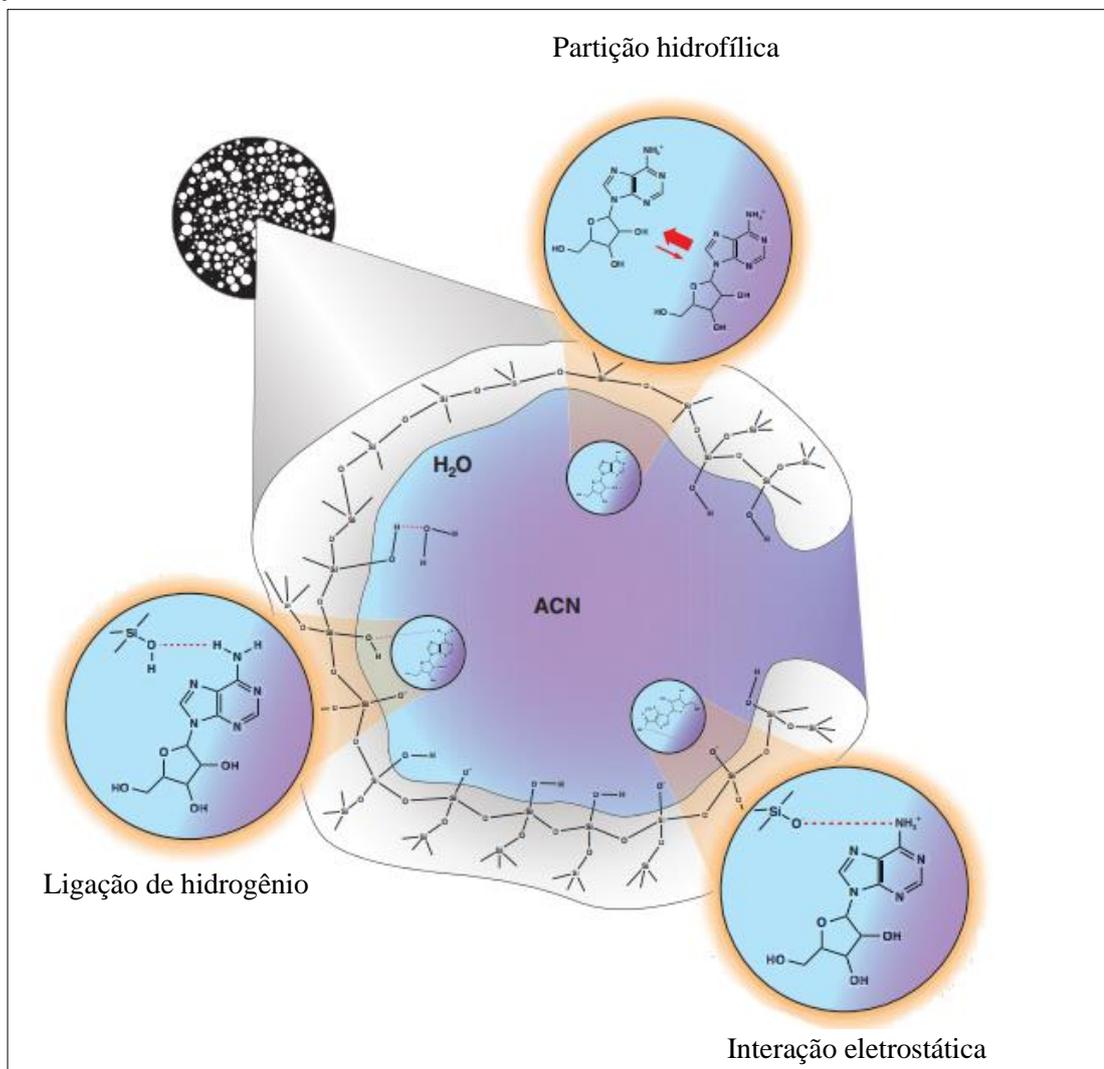
A cromatografia líquida com interação hidrofílica (HILIC) está se tornando cada vez mais um método de escolha para a análise de compostos polares e/ou iônicos<sup>55,56</sup>. Isso devido às limitações, como baixa retenção e resolução dessas classes de compostos em fase reversa e baixa solubilidade nas fases móveis típicas de cromatografia líquida em fase normal (CLFN) (apolares não aquosas). Somado ao número crescente de FEs aplicáveis a esta modalidade com seletividade a compostos iônicos<sup>55</sup>.

A HILIC pode ser descrita como uma modalidade de separação variante da cromatografia líquida em fase reversa, que faz uso de fases estacionárias polares<sup>57</sup>. Nessa modalidade, as FEs são semelhantes às utilizadas na cromatografia de fase normal (como sílica pura, sílica modificada com grupos amidas, cianos, aminos, ácidos sulfônicos, carboxilatos, diols, fases poliméricas polares ou fases zwitteriônicas) e as fases móveis similares às utilizadas no modo reverso (mistura de água e solventes orgânicos, tipicamente acetonitrila ou metanol), porém com conteúdo orgânico maior - cerca de 70 a 95 %<sup>55</sup>. A porção aquosa é imobilizada ou adsorvida na superfície da fase estacionária, formando uma fina camada de água que atua no mecanismo de separação<sup>57</sup>.

Na fase móvel típica desta modalidade a água apresenta uma força maior para eluir os analitos, assim nas análises com eluição por gradiente, a composição da fase móvel deve iniciar com menor quantidade de água e ir aumentando ao longo da análise, diminuindo proporcionalmente o conteúdo orgânico<sup>50,51</sup>.

O principal mecanismo de separação observado em HILIC é a partição hidrofílica dos analitos entre a camada de água imobilizada ou adsorvida sob a superfície da fase estacionária e o solvente orgânico da fase móvel. Porém, evidências sugerem que o mecanismo de sorção ocorre por uma combinação complexa de: a) partição hidrofílica; b) interações como ligações de hidrogênio entre os grupos polares dos compostos e a FE; e c) interações eletrostáticas entre os grupos funcionais ionizados dos analitos e da FE (Figura 3)<sup>57,58</sup>. Interações eletrostáticas entre o analito e grupos silanóis residuais, também podem ser observadas. Além disso, em determinadas condições, interações de Van der Waals entre partes hidrofóbicas de uma FE e a parte apolar dos analitos podem ser verificadas<sup>57,58</sup>.

**Figura 3.** Representação esquemática do mecanismo de separação observado na cromatografia líquida com interações hidrofílicas



Fonte: adaptado de Thermo Scientific <sup>57</sup>

Dentre as vantagens mais notórias dos métodos HILIC, destacam-se: (a) eficiente sorção/resolução de substâncias polares ou iônicas junto à fase estacionária; (b) baixos valores

de contra-pressão, em razão da baixa viscosidade da fase móvel - rica em solvente orgânico; (c) aumento na detectabilidade e sensibilidade analítica quando acoplada a sistemas ESI-MS; e d) compatibilidade com técnicas de extração que utilizam maior teor de solvente orgânico, possibilitando a injeção direta do extrato ao sistema cromatográfico<sup>57,59</sup>. Entre as desvantagens desta modalidade, pode-se citar a necessidade de tempos maiores de equilíbrio da coluna; formas de picos muitas vezes distorcidos comparados à CLFR e menor precisão nas medidas de pH da fase móvel, devido ao alto teor de solvente orgânico<sup>57</sup>.

Durante o desenvolvimento do método analítico, o preparo da amostra é fundamental para isolar os analitos, concentrá-los e eliminar interferentes da amostra, reduzindo, assim, o efeito da matriz e melhorando a performance do método<sup>28</sup>. Essa etapa é indispensável nas análises de matrizes complexas como as matrizes biológicas, em razão dos vários componentes endógenos e substâncias exógenos que a constituem<sup>28</sup>.

Nas últimas décadas, novas estratégias de preparo da amostra foram desenvolvidas, sendo direcionadas à simplificação e miniaturização das técnicas extração, favorecendo o emprego de menores volumes de solventes orgânicos e de amostras. Neste contexto, podemos destacar a técnica de microextração dispersiva em ponteira (Disposable Pipette Extraction - DPX)<sup>28,60</sup>.

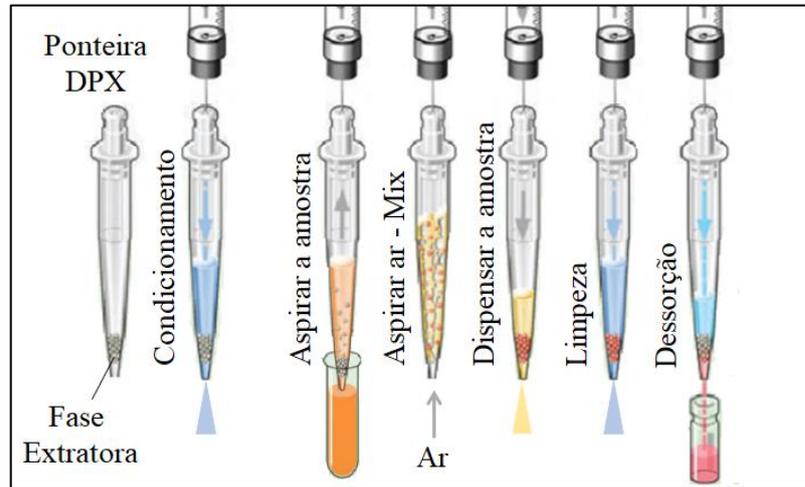
#### **1.4. Microextração dispersiva em ponteira**

A Microextração dispersiva em ponteiras é uma técnica recente de preparo de amostra, desenvolvida em 2003 pelo Dr. William Brewer (Universidade da Carolina do Sul, EUA). É considerada uma variante da extração em fase sólida convencional (Solid Phase Extraction, SPE) e baseia-se no rápido equilíbrio de sorção dos analitos presentes na amostra e a fase sorvente<sup>60,61</sup>. Na DPX a extração ocorre em fase sólida dispersiva, favorecendo, assim, a interação entre analito e a fase extratora<sup>60-63</sup>.

Nesta técnica, emprega-se uma microponteira convencional (de 1 ou 5 mL), na qual uma fase sorvente (ou extratora) dispersível é contida, livremente, entre dois filtros. O filtro inferior retém a fase extratora e ao mesmo tempo funciona como uma barreira permeável que possibilita o fluxo livre e bidirecional de fluidos (aspirar/dispensar). Já o filtro superior é semipermeável e deve impedir a passagem de possíveis contaminantes para o interior da ponteira<sup>60,62</sup>. As ponteiras DPX podem ser acopladas à uma seringa para realização de extração em modo manual, considerando lotes pequenos de amostras; ou empregadas a sistemas automatizados para análises em escalas maiores<sup>60,63</sup>.

Em geral, um procedimento típico de DPX contempla 5 etapas: a) condicionamento da fase sorvente; b) aspiração da amostra; c) aspiração de ar; d) limpeza do sorvente; e) dessorção dos analitos (Figura 4)<sup>60,61,64</sup>.

**Figura 4.** Representação esquemática das etapas procedimentais típicas da DPX



Fonte: adaptado de GERSTEL<sup>65</sup>

Inicialmente a fase extratora é condicionada com solventes adequados para ativação dos sítios de ligação. Em seguida, a amostra líquida é aspirada para o interior da ponteira. A subsequente aspiração de ar promove a dispersão da fase sorvente na amostra, formando uma mistura entre essas fases. Como resultado, há um aumento na superfície de contato entre a fase sorvente e os analitos e, por consequência, uma extração rápida e eficiente. Após atingir o tempo de equilíbrio dinâmico (geralmente segundos), a mistura formada pode ser dispensada. Feito isso, a limpeza da fase sorvente é realizada, requerendo a aplicação de um solvente que seja capaz de remover os componentes endógenos presentes na matriz sem eliminar os compostos de interesse<sup>60,62</sup>. Por fim, o solvente ou solução de dessorção é aspirado com ar e dispensado, devendo favorecer a eluição dos analitos. O eluato pode, então, ser injetado diretamente em um sistema cromatográfico ou evaporado e reconstituído em fase móvel<sup>60</sup>.

A fim de garantir uma melhor eficiência na recuperação dos analitos e na limpeza da amostra, a otimização de parâmetros como volume de amostra, tempo de sorção dos analitos, natureza e volume da solução de limpeza e da solução de dessorção deve ser realizada. O controle desses parâmetros é necessário para se atingir uma boa repetibilidade<sup>28</sup>.

Somado a isso, a seleção criteriosa da fase sorvente e dos solventes a serem empregados nas diferentes etapas da extração possibilita a obtenção de uma técnica mais seletiva. Para tanto, a escolha dessas fases deve ser orientada pela natureza dos analitos de interesse e pelo conhecimento da composição da matriz de análise<sup>60</sup>.

Como reportado nos trabalhos de revisão de Pinto e Queiroz (2015)<sup>60</sup> e Oliveira e Lanças (2018)<sup>62</sup>, a DPX vem sendo amplamente utilizada com notória repercussão e excelentes resultados na determinação de pesticidas em alimentos, na área ambiental e de drogas de abuso em amostras biológicas, na área forense. A utilização dessa técnica na determinação de fármacos em fluidos biológicos é ainda pouco retratada na literatura científica<sup>28,66</sup>.

Vantagens como a variedade de fases sorventes disponíveis comercialmente; a possibilidade de emprego alternativo de fases seletivas sintetizadas em escala laboratorial (como as fases MIP e RAM); o uso de pequenas quantidades de fase sorvente e de menores volumes de solventes orgânicos e de amostra; a capacidade de automatização; e a extração rápida e eficiente dos analitos faz da DPX uma técnica de preparo de amostra muito promissora<sup>60,61,64,66,67</sup>. O que justifica a escolha desta técnica no desenvolvimento de um método para análise dos compostos em estudo.

Neste contexto, com o presente projeto propõe-se o desenvolvimento de um novo método DPX-UHPLC-MS/MS, avaliando a fase extratora comercial Oasis® MCX (Mixed-Mode Cation-eXchange and reversed-phase sorbent), para determinação de levodopa, carbidopa, dopamina e 3-o-metildopa em plasma humano.

# **OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Desenvolver e validar um método analítico associando as técnicas DPX e UHPLC-MS/MS para quantificação simultânea de levodopa, carbidopa, dopamina e 3-o-metildopa em amostras de plasma humano.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Otimizar os parâmetros MS/MS e as condições cromatográficas para a análise dos fármacos e metabólitos em estudo;
- Otimizar as condições de extração - DPX;
- Validar o método analítico DPX/UHPLC-MS/MS conforme normas da ANVISA (2017) para determinação de levodopa, carbidopa, dopamina e 3-o-metildopa em amostras de plasma.

# **MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3. MATERIAS E MÉTODOS

#### 3.1. Padrões e reagentes

Os padrões analíticos levodopa, carbidopa e dopamina foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, USA) e a 3-o-metildopa da Toronto Research Chemicals (North York, Canadá). O padrão interno levodopa deuterada (levodopa d3) foi obtido da Sigma Aldrich e a L- $\alpha$ -metildopa da Toronto Research Chemicals. Acetonitrila (ACN) grau HPLC, metanol, ácido fórmico, ácido clorídrico (37%), ácido fosfórico (85%) e o hidróxido de amônio (28%) foram adquiridos da Sigma Aldrich. Água ultrapura foi obtida em sistema Milli-Q (Millipore, São Paulo, Brasil).

#### 3.2. Preparo das soluções padrões estoque e de trabalho

Soluções estoques de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  foram preparadas, individualmente, para os padrões analíticos e internos, dissolvendo-os em uma mistura de metanol com 0,05% de ácido clorídrico. Cada solução estoque foi diluída em acetonitrila para obtenção de soluções intermediárias de  $25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  para os padrões analíticos e  $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  para os padrões internos. A partir dessas soluções foram obtidas as soluções de trabalho adequadas a cada experimento. Todas as soluções foram preparadas sob proteção da luz, transferidas para frascos âmbar e armazenadas a  $-80 \text{ } ^\circ\text{C}$ .

#### 3.3. Otimização das condições UHPLC-MS/MS

O desenvolvimento do método analítico foi realizado em um equipamento UHPLC-MS/MS (Waters® Corporation, Milford, MA, USA). Primeiramente foi feita a otimização dos parâmetros espectrométricos de massas (MS/MS) para monitorar os íons dos analitos, e em seguida foi realizada a otimização dos parâmetros cromatográficos.

##### 3.3.1. Condições MS/MS

As análises MS/MS foram realizadas em sistema de espectrometria de massas em *tandem* equipado com analisador do tipo triplo quadrupolo Xevo® TQ-D (Waters, Milford, MA, USA) e com uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI). As análises foram conduzidas no modo de ionização positivo e no modo de varredura MRM.

A otimização dos parâmetros MS/MS foi efetuada a partir da infusão direta de soluções padrões dos analitos e dos PIs preparadas em uma mistura de acetonitrila/água contendo 0,2% de ácido fórmico (50:50 v/v). Os parâmetros individuais dos analitos - transições m/z, voltagem

do cone e energia de colisão foram otimizados manualmente de forma a favorecer a intensidade do sinal analítico. Para cada analito foram selecionadas três transições MS/MS, sendo uma para quantificação e outras duas para confirmação (Tabela 1). Os demais parâmetros (parâmetros de operação) foram: voltagem do capilar (3,5 kV); temperatura da fonte (300 °C); temperatura de dessolvatação (300 °C); fluxo do gás de dessolvatação (700 L.h<sup>-1</sup>) e fluxo do gás de cone (150 L.h<sup>-1</sup>). Como gás de dessolvatação foi empregado nitrogênio (99,9%) e como gás de colisão foi utilizado argônio com grau de pureza de 99.9999%. O processamento e aquisição dos dados foram realizados com os *softwares* QuanLynx e MassLynx 4.1.

**Tabela 1.** Transições m/z e valores de voltagem do cone e de energia de colisão otimizados para cada analito e para os padrões internos

Analito	Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)		Voltagem do Cone (V)	Energia de colisão (eV)
		Íon de quantificação	Íons de confirmação		
Levodopa	198	152	139 e 181	23	10, 15 e 10*
Carbidopa	227,1	181	70,8 e 122,9	26	13, 15 e 25
Dopamina	154	136,9	90,9 e 118,8	20	10, 20 e 17
3-o-metildopa	211,9	153	148,9 e 92,9	25	15, 20 e 25
Levodopa-d3	201	154,1	182,9 e 140,9	23	13, 10 e 15
L- $\alpha$ -metildopa	212,1	139,1	166,1	25	15,14

\* Respetivos valores de energia de colisão referentes ao íon de quantificação e aos íons de confirmação.

### 3.3.2. Condições cromatográficas

Para a otimização das condições cromatográficas uma solução padrão contendo todos os analitos na concentração de 100 ng mL<sup>-1</sup> foi injetada automaticamente no sistema cromatográfico por meio de um amostrador, mantido à 10 °C. Foram avaliadas diferentes fases estacionárias; diferentes composições de fases móveis; os modos de eluição isocrático e por gradiente; e volumes de injeção da amostra de 5 e 10  $\mu$ L.

As FEs foram pré-selecionadas considerando o caráter hidrofílico apresentados pelos analitos e o escopo apresentado na literatura para as análises desses compostos. Assim, as colunas 1) Hypersil Gold HILIC (2,1 mm x 100 mm x 1,9  $\mu$ m) e 2) ACQUITY BEH Amida (2,1 mm x 100 mm x 1,7  $\mu$ m) foram avaliadas no modo HILIC e as colunas 3) Ascentis Express RP-Amida (3,0 mm x 100 mm x 2,7  $\mu$ m) e 4) Kinetex C18 (100 mm x 2,1 mm x 1,7  $\mu$ m) no modo reverso. Os experimentos foram realizados respeitando a concentração de solvente orgânico adequada a cada modalidade de cromatografia.

Os cromatogramas selecionados para fins de comparação das colunas cromatográficas foram os obtidos com as melhores condições de fase móvel analisada para cada coluna.

A condição otimizada e empregada na separação cromatográfica dos analitos foi a realizada no modo HILIC; com o emprego da coluna Gold HILIC; fase móvel constituída por água contendo 0,2% de ácido fórmico (solvente A), acetonitrila contendo 0,2% de ácido fórmico (solvente B) e metanol contendo 0,2% de ácido fórmico (solvente C) na proporção 25:75:05 v/v/v; no modo de eluição isocrático e com volume de injeção de amostra de 5  $\mu\text{L}$ . A coluna cromatográfica foi mantida a 40 °C e a vazão da fase móvel a 0.300 mL  $\text{min}^{-1}$ .

Para realizar as determinações quantitativas UHPLC-MS/MS foi utilizada a padronização interna, empregando os padrões levodopa d3 e L- $\alpha$ -metildopa.

### **3.4. Amostras de plasma**

As amostras de plasma branco (isenta dos fármacos), com sorologia negativa para hepatite B e C, HIV, chagas, HTLV I/II, TGP e sífilis, foram cedidas pelo Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP - USP). Estas amostras foram enriquecidas com os analitos para a otimização das variáveis DPX e validação analítica.

### **3.5. Preparo da amostra**

#### **3.5.1. Etapa prévia de Precipitação de Proteínas (PP)**

A PP foi realizada em eppendorf® contendo 250  $\mu\text{L}$  de plasma branco enriquecidos com os padrões internos e os padrões analíticos à concentração plasmática final de 500 ng  $\text{mL}^{-1}$ , e 250  $\mu\text{L}$  de uma solução de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  4% - agente precipitante. A mistura foi submetida à agitação em vórtex durante 1 minuto e centrifugada a 14000 rpm, em temperatura de 5 °C e durante 20 minutos. Foram coletados 400  $\mu\text{L}$  de sobrenadante, que foi submetido ao protocolo DPX.

#### **3.5.2. Otimização dos parâmetros DPX**

Para a realização da extração, ponteiras DPX de 1 mL foram recheadas com 60 mg da fase bifuncional Oasis MCX. Inicialmente a fase MCX foi condicionada com 200  $\mu\text{L}$  de metanol, seguido de 200  $\mu\text{L}$  de uma solução de ácido fosfórico 4% (v/v). 400  $\mu\text{L}$  do sobrenadante coletado na etapa de precipitação de proteínas foram aspirados para o interior da ponteira e em seguida aspirou-se ar durante 60 segundos para a promoção do equilíbrio de sorção entre a amostra e a fase extratora. A etapa de limpeza foi realizada com dois ciclos de

300 µL da solução de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 4%, seguido de 1 ciclo de 150 µL de uma mistura água/acetonitrila (90:10 v/v). A dessorção dos analitos foi realizada com 150 µL de uma mistura acetonitrila:água:hidróxido de amônio 28% (75:15:10 v/v/v). O eluato obtido foi diluído em fase móvel contendo 0,5% de ácido fórmico numa proporção 1:1 (v/v) e então, analisado conforme as condições cromatográficas otimizadas.

Para alcançar a condição de extração otimizada foram avaliados os seguintes parâmetros DPX: a) natureza do solvente de extração: ácido fórmico 4% (pH = 1,42) e ácido fosfórico 4% (pH = 1,88); b) volumes de amostra de 200 e 250 µL; c) soluções de dessorção: acetonitrila (ACN); ACN/H<sub>2</sub>O/NH<sub>4</sub>OH (75:15:10 v/v/v) e ACN/H<sub>2</sub>O/NH<sub>4</sub>OH (80:15:05 v/v/v) e d) tempo de sorção dos analitos: 30 e 60s.

Para reduzir a degradação dos analitos as amostras foram manuseadas sob baixa exposição a luz.

### **3.6. Validação Analítica do método DPX/UHPLC-MS/MS**

A validação do método DPX/UHPLC-MS/MS foi realizada conforme procedimentos e normas regulamentadas pela ANVISA (2017)<sup>68</sup>. Os parâmetros de validação analítica linearidade, precisão, exatidão, efeito residual e efeito da matriz foram avaliados em amostras de plasma branco enriquecidas com os padrões internos e com os analitos em diferentes concentrações.

#### **3.6.1. Preparo das amostras de controle de qualidade e curva analítica**

Alíquotas de 250 µL de plasma branco foram transferidas para tubos Eppendorf® de 2 mL. Em seguida foram adicionados 50 µL da solução dos padrões internos e 50 µL da solução de trabalho contendo todos os analitos em estudo. As amostras foram então processadas conforme etapas PP e DPX otimizadas, e injetadas no sistema cromatográfico.

As curvas analíticas foram preparadas nas faixas de concentração de 50 - 600 ng mL<sup>-1</sup> para levodopa e para a dopamina, 20 - 600 ng mL<sup>-1</sup> para a carbidopa e 20 - 500 ng mL<sup>-1</sup> para a 3-o-metildopa e com concentração fixa de 500 ng mL<sup>-1</sup> para os PIs.

As faixas de concentrações plasmáticas usadas na construção das curvas analíticas foram definidas com base nos valores normalmente determinados nos plasmas de pacientes com a Doença de Parkinson. As amostras CQ de concentração baixa, média e alta foram definidas de acordo com os valores de limite inferior e superior de quantificação.

### 3.6.2. Linearidade

Para avaliar a linearidade do método as curvas analíticas foram construídas e avaliadas em triplicata, plotando-se a razão entre os valores de área do analito e do padrão interno (área do analito/área do PI) em função da concentração nominal dos analitos.

Para cada composto, a curva de calibração foi utilizada para confirmar a relação linear entre os valores plotados nos eixos x e y. A equação linear e os coeficientes de correlação (r) e de determinação ( $r^2$ ) foram determinados por meio da regressão linear. Assim, a linearidade do método foi considerada adequada quando os valores de r e  $r^2$  obtidos a partir das curvas admitidas foram maiores ou iguais a 0,99.

Para verificar a adequação das curvas obtidas às determinações quantitativas foi calculado o valor do coeficiente de variação (CV) para cada calibrador. Assim, as curvas foram aprovadas/aceitas quando os valores de CV (Equação 1) foram menores ou igual a 20% da concentração nominal do limite inferior de quantificação (LIQ) e menor que 15% para os demais calibradores.

O teste de falta de ajuste (*Lack-of-fit*) com nível de significância de 5% foi também realizado para verificar o ajuste do modelo matemático utilizado (linear). O método foi considerado aplicável e bem ajustado quando o valor de  $p$  calculado foi maior que 0,05 (5%)<sup>69</sup>.

### 3.6.3. Precisão e exatidão

A precisão e exatidão intraensaio (ensaios realizados em um mesmo dia) e interensaio (ensaios realizados em dias consecutivos) foram avaliadas em quintuplicata ( $n = 5$ ), a partir das análises das amostras de plasma enriquecidas com os PIs e com analitos nas concentrações correspondentes ao limite inferior de quantificação (LIQ); controle de qualidade baixo (CQB); controle de qualidade médio (CQM); controle de qualidade alto (CQA) e limite superior de quantificação (LSQ) definidos para cada composto.

A precisão foi determinada a partir do cálculo do Coeficiente de Variação (CV, Equação 1) e a exatidão por meio do cálculo do Erro Padrão Relativo (EPR, Equação 2). O método foi considerado preciso e exato quando os valores de CV e ERP foram menores ou iguais a 20% para o LIQ e menores que 15% para o LSQ e os controles de qualidade (CQs).

$$CV = \left( \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Concentração média experimental}} \right) * 100\% \quad \text{Equação 1}$$

$$EPR = \left( \frac{\text{Conc.média experimental} - \text{valor nominal}}{\text{Valor nominal}} \right) * 100\% \quad \text{Equação 2}$$

#### **3.6.4. Efeito Residual**

Para avaliar o efeito residual três injeções de uma mesma amostra de plasma branco, isenta dos padrões analíticos e dos PIs, foram realizadas, sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma amostra processada do LSQ. As respostas analíticas obtidas foram comparadas com aquelas obtidas de amostras processadas do LIQ.

A análise do efeito residual realizada a partir do método desenvolvido esteve de acordo com as normas estabelecidas pela ANVISA (2017) quando, nas amostras de plasma branco, os valores de áreas de picos interferentes no tempo de retenção do analito foram inferiores a 20% do valor de área do analito nas amostras processadas do LIQ e à 5% da área apresentada pelo PI.

#### **3.6.5. Efeito da matriz**

O efeito da matriz foi avaliado por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas em solução aquosa (na ausência da matriz) e em plasma. Para isso, foram construídas curvas em água, em triplicata, estabelecidas com os mesmos níveis de concentração empregados nas curvas analíticas construídas em plasma.

O paralelismo das retas foi avaliado por meio de teste estatístico (teste t) com nível de significância de 5%.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para desenvolver um método seletivo e sensível para a determinação simultânea de levodopa, carbidopa, dopamina e 3-o-metildopa, otimizou-se os parâmetros espectrométricos (MS/MS), cromatográficos (LC) e de extração (DPX).

### 4.1. Otimização das condições MS/MS

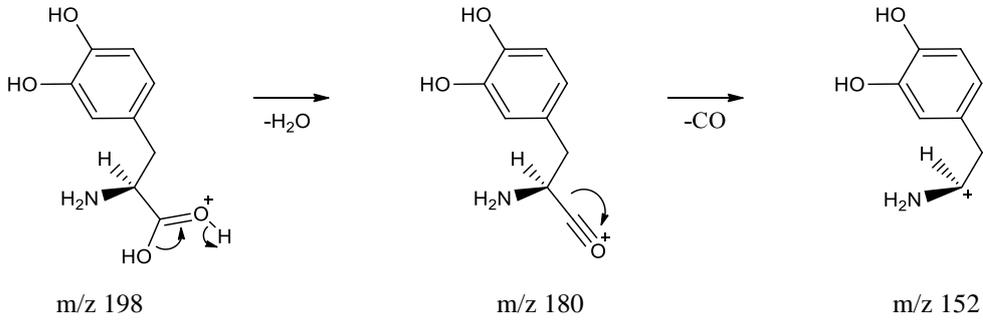
Dentre as transições  $m/z$  observadas para cada composto estudado as mais sensíveis e seletivas foram:  $m/z$  198  $\rightarrow$   $m/z$  152 para a levodopa;  $m/z$  227,1  $\rightarrow$   $m/z$  181 para a carbidopa;  $m/z$  154  $\rightarrow$   $m/z$  136,9 para a dopamina e  $m/z$  212  $\rightarrow$   $m/z$  153 para a 3-o-metildopa, as quais foram utilizadas para realização das análises quantitativas. As demais condições MS/MS otimizadas são as apresentadas na Tabela 1 (seção 3.3.1).

Na ionização por ESI em modo positivo, a carga positiva pode ser encontrada em qualquer um dos heteroátomos presentes na estrutura do o analito<sup>70</sup>, levando a diferentes possibilidades de fragmentação. As fragmentações e as prováveis estruturas dos íons envolvidos nas transições  $m/z$  monitoradas para os analitos estão representadas na Figura 5.

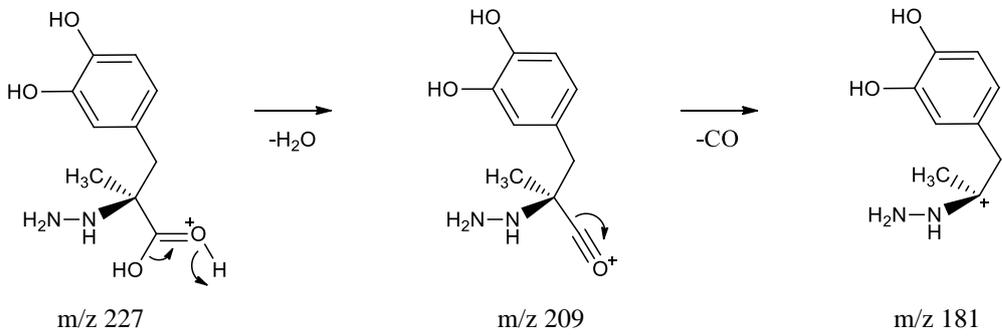
Os íons precursores para cada analito foram seus respectivos íons moleculares protonados  $[M + H]^+$ . Os íons de quantificação da levodopa e da carbidopa foram formados a partir da perda neutra de 46 unidades de massa, sofrida pelos seus íons moleculares. Primeiro, houve a liberação de uma molécula de água ( $H_2O$ , 18 u) formando um íon intermediário (acílio) e depois a liberação de uma molécula de monóxido de carbono ( $CO$ , 28 u) formando o íon estável (imínio)<sup>70</sup>. O íon molecular da dopamina sofreu uma perda neutra de 17 unidades de massas correspondentes à liberação de uma molécula de amônia ( $NH_3$ )<sup>70</sup>. A formação do íon de quantificação da 3-o-metildopa ocorreu com perda de massa de 59 unidades, correspondente a liberação de uma molécula de dióxido de carbono ( $CO_2$ , 44 u) e de radical metila ( $\cdot CH_3$ , 15 u)<sup>71</sup>.

**Figura 5.** Representação das fragmentações e das estruturas das espécies químicas envolvidas nas transições  $m/z$  monitoradas para cada um dos analitos estudados.

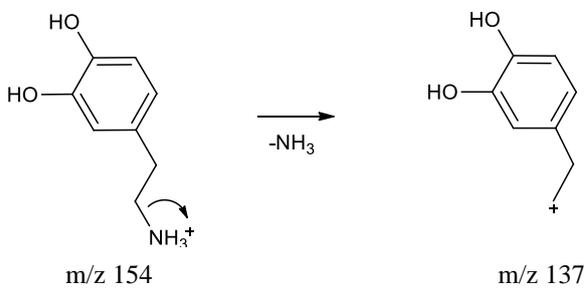
### Levodopa



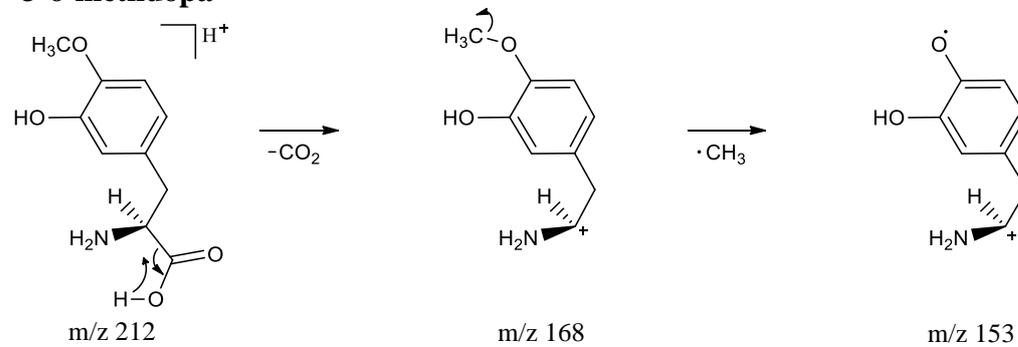
### Carbidopa



### Dopamina



### 3-o-metildopa



Fonte: autor

## **4.2. Otimização das condições cromatográficas**

### **4.2.1. Seleção da fase estacionária/coluna cromatográfica**

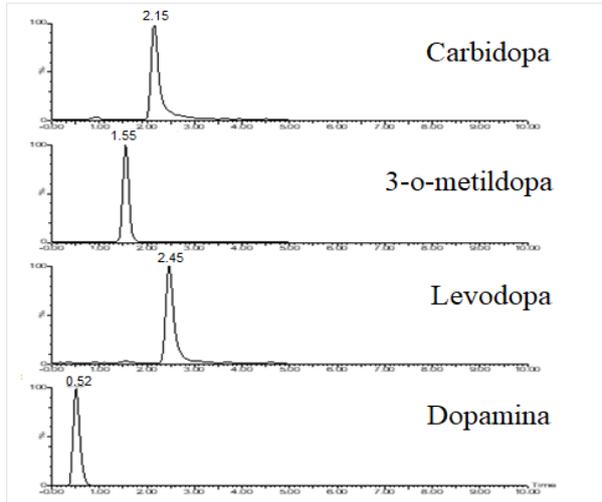
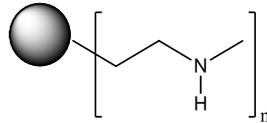
A seleção da fase estacionária/coluna foi a primeira condição avaliada para otimização das condições cromatográficas. Dentre as colunas cromatográficas analisadas, as colunas 1 e 2 (HILIC) apresentaram as melhores separações cromatográficas e maiores tempo de retenção. As colunas 3 e 4 (fase reversa) apresentaram baixa seletividade para os analitos, demonstrada pela baixa retenção desses compostos e pelos picos pouco resolvidos (Figura 6).

Além disso, uma maior detectabilidade analítica foi observada no modo HILIC, sendo esta, então, a modalidade escolhida para realizar as análises. Entre as colunas HILIC, a Gold HILIC resultou em baixa retenção para a dopamina. Já a coluna BEH AMIDA apresentou seletividade para todos os analitos, sendo, inicialmente, a coluna selecionada para as análises no presente trabalho.

**Figura 6.** Cromatogramas dos analitos obtidos a partir das diferentes colunas cromatográficas avaliadas: a) no modo HILIC e b) no modo reverso

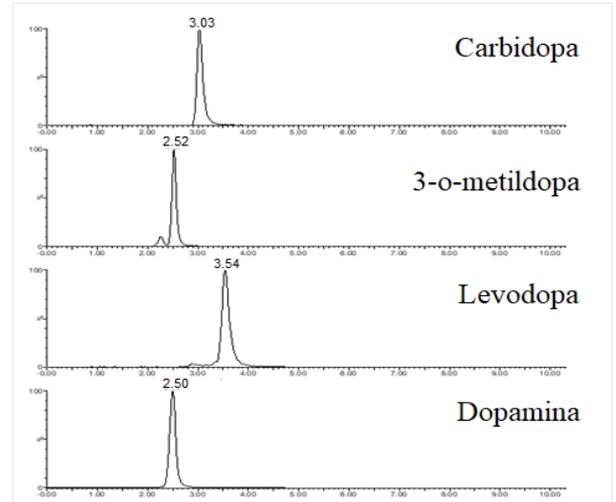
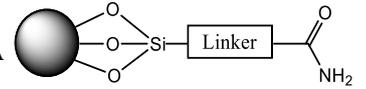
a)

Thermo Scientific Gold HILIC



Fase móvel: água contendo 0,2% de ácido fórmico/acetonitrila (20:80 v/v).

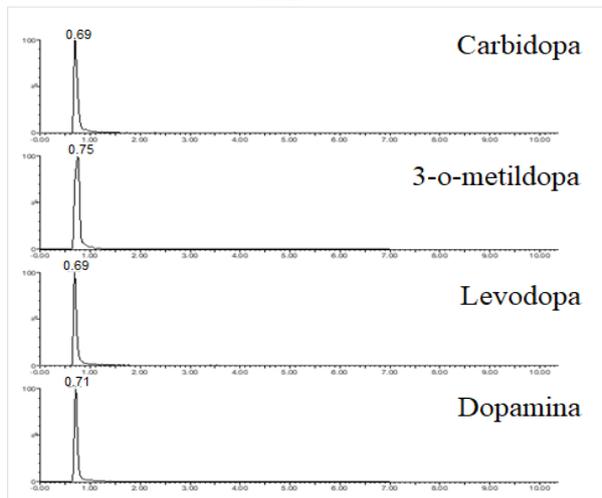
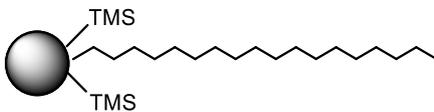
ACQUITY BEH AMIDA



Fase móvel: água contendo 0,1% de ácido fórmico/acetonitrila (20:80 v/v).

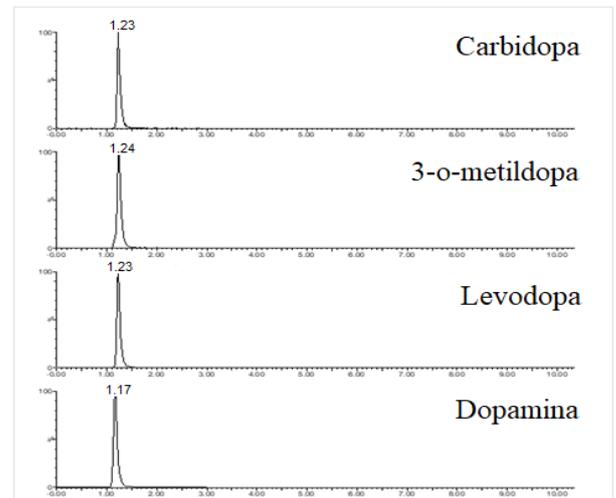
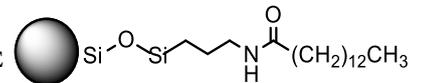
b)

KINETEX C18



Fase móvel: água contendo 0,1% de ácido fórmico/acetonitrila (70:30 v/v).

SUPELCO RP AMIDE



Fase móvel: água contendo 0,1% de ácido fórmico/acetonitrila (60:40 v/v).

Fonte: autor

Como mostrado na Figura 6, em relação às separações no modo reverso, a baixa retenção foi muito evidente com o emprego da coluna Kinetex C18. Esta coluna apresenta uma FE cuja funcionalidade possibilita um mecanismo de separação que se baseia, majoritariamente, em interações hidrofóbicas; revelando, portanto, a seletividade reduzida desta FE para moléculas de média a alta polaridade, tais quais são os analitos em estudo<sup>42,52,72</sup>. Na Kinetex C18, os picos dos analitos estiveram próximos ao volume morto (0,58 min). Sendo assim, para uma retenção mais adequada dos compostos nesse tipo de coluna, o uso de reagente de par iônico ou procedimento de derivatização para diminuir a polaridade das moléculas faz-se necessário.

Em contrapartida, por possuir um grupo amida (polar) embutido, a fase RP-Amida possibilitou maiores interações com os analitos, em relação à Kinetex C18. Comparada às fases C18 clássicas, a fase RP-Amida apresenta maior seletividade para composto polares, em especial aos que atuam estabelecendo ligações de hidrogênio<sup>52,73</sup>, configurando-se numa FE alternativa de fase reversa para a referida classe de compostos<sup>52</sup>. No entanto, a resolução dos analitos junto a esta fase foi menor comparada às fases HILIC.

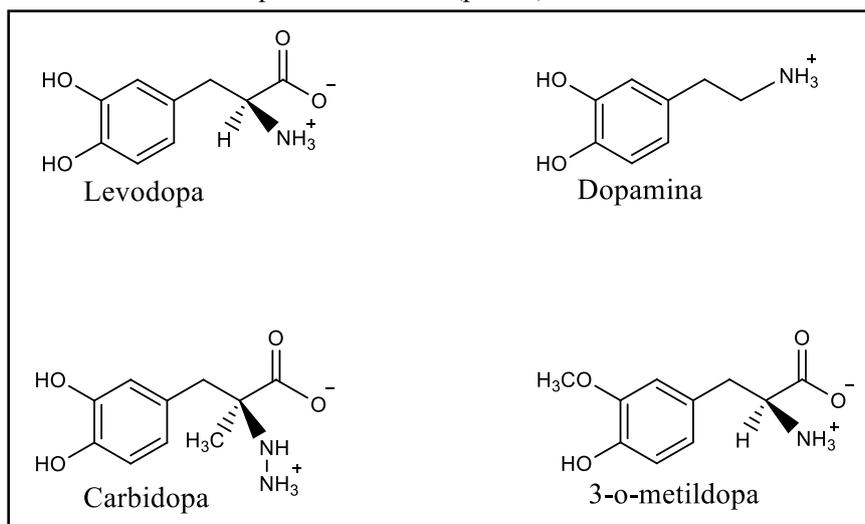
O cromatograma obtido com a coluna BEH Amida demonstra a boa seletividade desta FE para determinar os analitos de maneira simultânea.

De acordo com o guia técnico de separações HILIC<sup>57</sup> as fases estacionárias de sílica com grupos amidas quimicamente ligados configuram-se como a terceira opção mais aplicada em HILIC. Isto por apresentar boa seletividade para uma variedade de analitos hidrofílicos, resultando em análises com adequadas retenção e separação para essa classe de compostos<sup>52,55,57</sup>.

Sabe-se que a fase móvel pode interferir na seletividade do método cromatográfico, sendo o pH altamente influente nas análises de compostos iônicos/ionizáveis<sup>27</sup>. Desse modo, dois fatores importantes a serem considerados na separação cromatográfica dessa classe de compostos são a influência do pH da fase móvel em suas ionizações e na ionização de determinadas fases estacionárias, o que afeta diretamente a sorção dos analitos<sup>42,50,52,57,74</sup>.

Os analitos estudados apresentam grupamentos fortemente ácidos e básicos. Nas condições das fases móveis utilizadas (pH ~ 3), esses compostos estiveram em suas formas básicas ionizadas e zwitteriônica (Figura 7). Considerando o valor de pKa dos analitos, por exemplo: levodopa pKa (fortemente ácido) = 1,65 e pKa (fortemente básico) = 9,06, a maior quantidade das espécies presentes estavam com ambos os grupamentos na forma ionizada.

**Figura 7.** Estruturas dos analitos no pH da fase móvel (pH ~ 3)



Fonte: autor

As colunas HILIC com grupo amida, como a coluna BEH amida apresentam-se neutras em ampla faixa de pH de fases móveis, sendo assim, pouco afetadas por essas fases e, por consequência, exercem baixa ou nenhuma atividade de troca iônica (as interações eletrostáticas atrativas ou repulsivas são pouco observadas junto a essas fases)<sup>57</sup>.

Em um estudo realizado por Fountain et al (2010)<sup>51</sup>, por exemplo, foram avaliadas diferentes fases estacionárias HILIC, por LC-MS/MS, na separação de diferentes moléculas polares básicas e ácidas, ionizáveis e não ionizáveis e, dentre as FEs avaliadas a ACQUITY BEH Amida - de mesmas especificações que a empregada no presente trabalho - apresentou a maior capacidade de sorção, independente do pH da fase móvel.

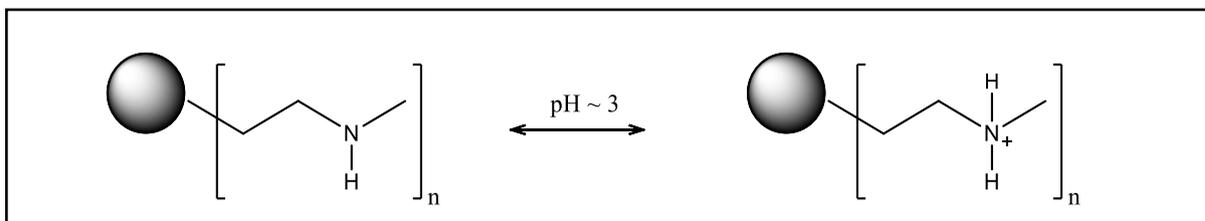
Desse modo, sugere-se que as separações junto à coluna BEH amida ocorreram principalmente pelo mecanismo de partição hidrofílica e por interações por ligação de hidrogênio ou dipolares, pois a fase HILIC com grupo amida apresenta-se neutra na fase móvel utilizada.

Já a coluna Gold HILIC avaliada no presente estudo foi fortemente afetada pelo pH da fase móvel empregada, o que repercutiu no mecanismo de separação e na sorção/retenção dos analitos, principalmente da dopamina.

No pH de fase móvel utilizada a coluna Gold HILIC apresenta carga positiva, proveniente da protonação do grupo amina, fornecendo, assim, alta atividade de troca aniônica<sup>57</sup> (Figura 8). Neste sentido, forças repulsivas são observadas entre a FE e o grupo com carga positiva dos analitos. O efeito de repulsão eletrostática foi verificado pela baixa sorção apresentada pela dopamina. Isto porque esse composto fornece em sua estrutura apenas um grupo ionizável, grupo amina, o qual apresenta carga também positiva na condição de análise.

Para a levodopa, carbidopa e a 3-o-metildopa o efeito de repulsão não foi pronunciado, como pode ser observado pela boa sorção dessas substâncias junto à coluna, já que em suas formas zwitteriônicas há uma estabilização das cargas.

**Figura 8.** Representação estrutural da fase Gold HILIC na forma não ionizada e na forma ionizada (protonada)



Fonte: autor

Diante disso, é importante ressaltar que interações eletrostáticas podem ser exploradas no modo HILIC com o emprego de FEs com propriedade de troca iônica e em que os analitos sejam ionizáveis, agregando vantagens à separação cromatográfica (embora a partição apresente-se como mecanismo de sorção predominante na HILIC, as interações eletrostáticas podem atuar promovendo um mecanismo de sorção bimodal)<sup>50,57</sup>. Posto isto, devido à propriedade de troca aniônica observada na coluna Gold HILIC, esta seria mais adequada na retenção e separação de compostos ácidos, neutros hidrofílicos<sup>57</sup>, ou zwitteriônicos, como observado.

Embora a coluna BEH Amida tenha apresentado maior afinidade para os analitos estudados em comparação às demais colunas avaliadas, tal coluna não pode ser empregada nas determinações quantitativas desses compostos em plasma. Isso porque, mesmo tendo apresentado uma separação aceitável e um bom tempo de retenção nas análises feitas em soluções padrões, ao analisar amostras de plasma branco enriquecida com analitos houve uma diminuição pronunciada do sinal analítico (na detectabilidade), devido ao efeito de supressão iônica observado na zona correspondente aos tempos de retenção dos analitos. Diferentes testes foram, então, realizados visando separar os interferentes dos compostos de interesse, deslocando-os da zona de supressão para minimizar o efeito matriz. Entretanto, não foi obtido êxito.

Além disso, as respostas analíticas geradas a partir das análises conduzidas junto a BEH Amida na etapa de validação não apresentaram boa repetibilidade. A coluna Gold HILIC foi então selecionada e avaliada, obtendo-se resultados satisfatórios (precisos e exatos) quando realizados os experimentos de validação.

Nesta primeira etapa de seleção das colunas, também foi avaliado a intensidade dos sinais analíticos. A maior detectabilidade observada no modo HILIC ocorreu devido à maior

compatibilidade das fases móveis típicas dessa modalidade em sistemas LC-ESI-MS. Nesse sistema, o maior conteúdo orgânico (mais volátil) dessas fases favorece o processo de dessolvatação/ionização. De modo inverso, por requerer fases móveis com maior teor aquoso, a cromatografia em fase reversa apresenta dessolvatação desfavorecida e, em consequência, menor detectabilidade; sendo, portanto, a HILIC mais vantajosa nesse aspecto<sup>52,57</sup>.

#### **4.2.2. Avaliação das fases móveis para cada coluna analisada**

Para fins de comparação e seleção da fase estacionária, diferentes condições de fases móveis foram avaliadas com vista à obtenção da melhor resposta cromatográfica junto a cada uma das colunas analisadas. Dentre as fases móveis avaliadas, a melhor condição cromatográfica obtida para cada uma das colunas foi a apresentada na Figura 6, representada anteriormente. Essas fases geraram curto tempo de análise, cromatogramas com picos definidos e com boa intensidade do sinal analítico.

A coluna empregada nas determinações quantitativas foi a Gold HILIC, assim, será dado ênfase apenas aos resultados experimentais obtidos a partir dela.

Apesar da fase móvel definida junto a coluna Gold HILIC (Figura 6) ter apresentado bons resultados com as injeções dos padrões analíticos, as análises em amostras de plasma e validação analítica do método foram realizadas com a seguinte fase móvel: água contendo 0,2% de ácido fórmico (solvente A), acetonitrila contendo 0,2% de ácido fórmico (solvente B) e metanol contendo 0,2% de ácido fórmico (solvente C) na proporção 25:75:05 v/v/v. Embora a utilização desta fase tenha apresentado redução dos tempos de retenção dos analitos, foi observada boa separação cromatográfica, melhora na simetria dos picos e redução de ruídos na linha de base para a levodopa e a carbidopa.

A natureza do aditivo ácido empregado, bem como a porcentagem desse aditivo avaliada em fase móvel, teve por base as descrições dos trabalhos levantados na literatura (Quadro 1, seção 1.2.). Neste sentido, o ácido fórmico foi avaliado nos solventes A, B e C em concentrações 0,1 e 0,2%. No presente trabalho a FM testada com 0,2% do aditivo ácido fórmico nos três solventes culminou em uma melhor ionização dos analitos (maior intensidade de sinal) comparado às fases sem aditivo e com o aditivo a 0,1%.

A adição de metanol (solvente C) na fase móvel- na proporção de 25:75:05 (v/v/v) dos solventes A:B:C - melhorou o formato dos picos dos analitos.

#### 4.2.3. Avaliação do modo de eluição

A avaliação do modo de eluição foi realizada de maneira concomitante às fases móveis. Nessas análises foram observados resultados que variaram de adequada separação, para eluição por gradiente, mas com sinais pouco intensos e/ou com picos não simétricos à coeluição de alguns analitos (baixa resolução cromatográfica) em modo isocrático. Esses resultados apontam a importância e efeito da composição/proporção dos solventes da fase móvel na seletividade do método e na ionização dos analitos em estudo.

Dentre os modos de eluição avaliados com fase móvel composta por água:acetonitrila:metanol (25:75:05 v/v/v) com ácido fórmico a 0,2% nos três solventes, uma melhor performance cromatográfica foi obtida no modo isocrático. Cada corrida cromatográfica foi concluída em 5 minutos, incluindo o tempo de equilíbrio da fase móvel na coluna.

#### 4.2.4. Volume de Injeção

Dentre os volumes de injeção avaliados, o volume de 5  $\mu\text{L}$  foi o selecionado para realizar os estudos, pois resultou em picos mais estreitos e simétricos e em respostas analíticas mais precisas.

Com a injeção das amostras de plasmas tratadas foi possível observar distorções no formato do pico dos analitos, o que pode estar associado à diferença entre a composição da amostra processada por DPX e a fase móvel. No entanto, comparando os cromatogramas resultantes da injeção de 5 e 10  $\mu\text{L}$ , foi possível observar uma minimização das distorções e da assimetria nos picos dos analitos quando injetados apenas 5  $\mu\text{L}$ .

Além disso, uma maior repetibilidade nos valores de área foi obtida com o menor volume de injeção. Assim, embora o volume de injeção de 10  $\mu\text{L}$  tenha resultado em maiores valores de área, o volume de 5  $\mu\text{L}$  foi o selecionado para realizar os estudos, uma vez que, alinhado aos fatores já citados, resultou em valores de área satisfatórios para a quantificação dos analitos.

A existência de picos mais estreitos, com menor dispersão da amostra, reflete uma maior eficiência cromatográfica<sup>27</sup>. Assim, podemos também afirmar, a partir dos resultados obtidos, que as análises realizadas com o volume de 5  $\mu\text{L}$  promoveram uma melhor eficiência de separação.

No aspecto considerado, os dados experimentais estiverem coerentes com a literatura: de acordo com Collins et al (2006)<sup>27</sup>, o volume de injeção de amostra influencia a eficiência de uma coluna; de modo tal que volumes menores - representando uma porcentagem menor da

capacidade total do volume da coluna cromatográfica empregada - favorecem a eficiência de separação. Em estudo realizado por Ruta et al (2010)<sup>75</sup> com colunas HILIC, foi demonstrado que quando injetado volumes de amostras mais baixos houve a manutenção da eficiência cromatográfica, enquanto que o aumento do volume acarretou em perdas significativas de eficiência.

### **4.3. Preparo da amostra**

#### **4.3.1. Etapa prévia de Precipitação de Proteínas (PP)**

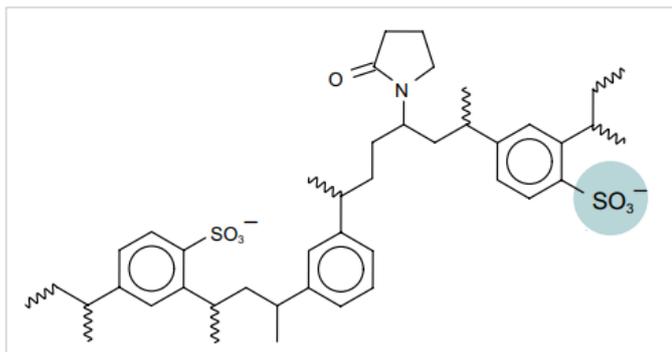
As análises realizadas ao longo do desenvolvimento do presente projeto mostraram um pronunciado efeito da matriz plasmática sobre os sinais dos analitos. Deste modo, para obtenção de melhor *clean up* das amostras de plasma (remoção de proteínas e fosfolipídeos) e redução do efeito de supressão dos íons dos analitos, ocasionado pelos endógenos interferentes, uma etapa prévia de precipitação de proteínas foi realizada.

Segundo Kole et al (2011)<sup>28</sup> a combinação de técnicas analíticas, como a PP e SPE, tem sido empregada aumentando a robustez do método e a performance analítica. Vale lembrar que a DPX é uma técnica de extração que ocorre em fase sólida dispersiva, enquadrando-se, portanto, nos méritos descritos.

#### **4.3.2. Otimização dos parâmetros DPX**

A otimização das condições de extração foi realizada de modo univariado - avaliando-se um parâmetro por vez enquanto se fixa os demais parâmetros - visando a obtenção de uma maior eficiência de extração dos analitos. Para a otimização dos parâmetros DPX (natureza/pH da solução de extração, tempo de sorção dos analitos, volumes de amostra e solução de dessorção) foram realizadas análises em triplicata. A seleção da fase MCX (Figura 9) como fase sorvente aplicada à extração dos analitos estudados teve por base o conhecimento das estruturas e das propriedades ácido-básicas dos analitos (Figura 2, seção 1.2.).

**Figura 9.** Estrutura química da fase sorvente Oasis® MCX (Mixed-Mode Cation-eXchange and reversed-phase sorbent, Waters)

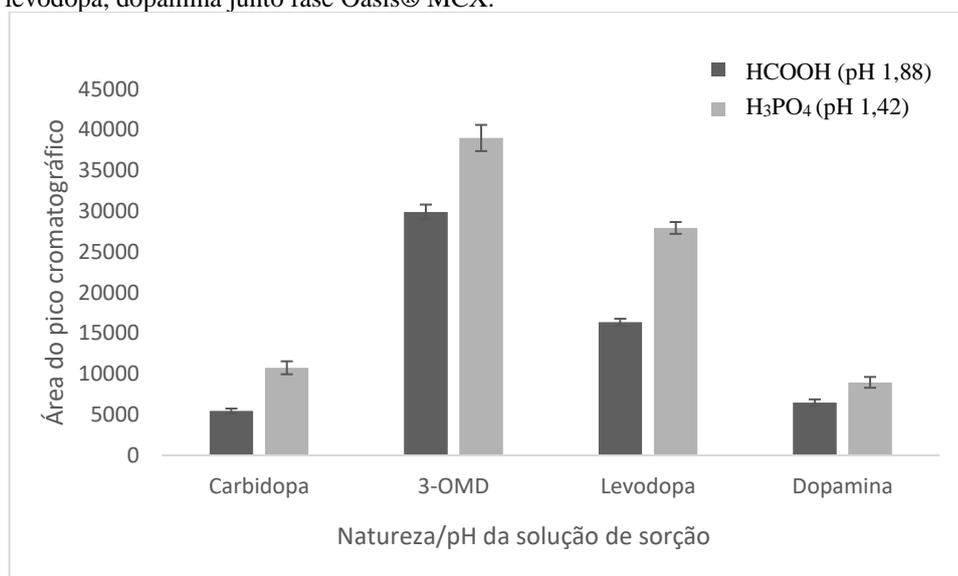


Fonte: Waters Corporation (2010)<sup>76</sup>

#### 4.3.2.1. Natureza/pH da solução de sorção

Em razão da presença dos grupos sulfônicos ( $\text{SO}_3^-$ ), a fase MCX comporta-se como forte trocadora de cátions, sendo, portanto, seletiva aos analitos quando estes estão em suas formas básicas ionizadas (carregados positivamente)<sup>27,76,77</sup>. Para ionização dos grupos básicos dos compostos estudados é necessário o controle e a manutenção de um meio com pH ácido e que favoreça a interação analito-fase sorvente pelo mecanismo de troca catiônica<sup>27</sup>. Neste sentido, a eficiência da sorção dos analitos foi avaliada em solução de ácido fórmico 4% (pH = 1,88) e em ácido fosfórico 4% (pH = 1,42), Figura 10.

**Figura 10.** Avaliação das soluções de ácido fórmico 4% e ácido fosfórico 4% na sorção de carbidopa, 3-o-metildopa, levodopa, dopamina junto fase Oasis® MCX.



Fonte: autor. \*(concentração dos analitos 500ng/mL)

O aumento das áreas dos picos cromatográficos observado para todos os analitos com o emprego de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  4% demonstra uma melhor eficiência dessa solução na ionização dos grupos básicos dos analitos e, conseqüentemente, uma maior interação destes com os grupos sulfônicos

da fase sorvente.

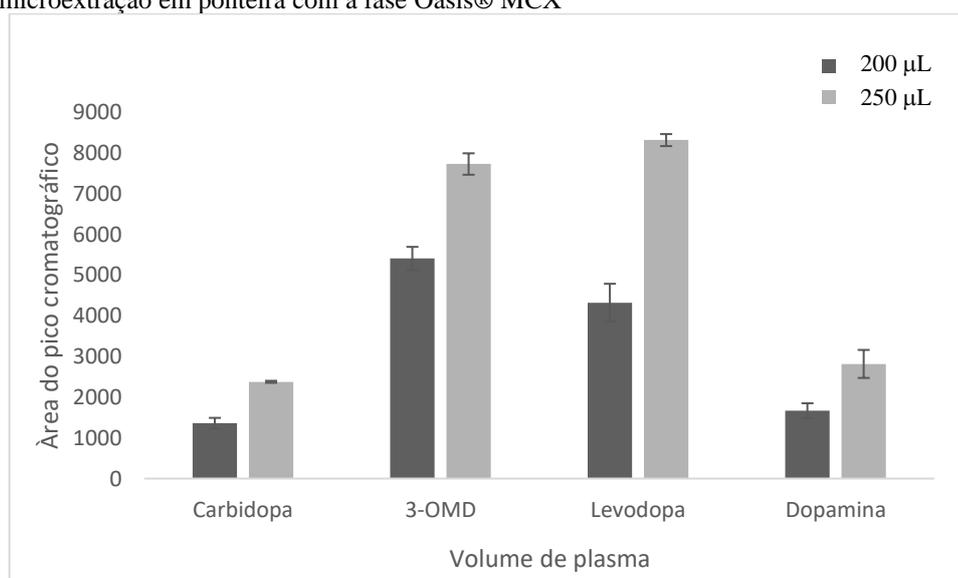
Em geral, um meio que apresente pH com pelo menos duas unidades abaixo do valor de pKa de analitos básicos é necessário para que haja a retenção desses compostos junto a uma fase de troca catiônica forte, como a MCX<sup>77</sup>. Devido à natureza anfotérica dos analitos, com exceção da dopamina, o pH do meio foi avaliado em valores muito abaixo do pKa básico de cada composto, favorecendo, assim, suas formas positivamente carregadas. Portanto, teoricamente, em ambas as soluções ácidas avaliadas, os analitos estariam ionizados e favoreceriam o mecanismo de troca catiônica.

Entretanto, foi observado experimentalmente, que, embora as soluções avaliadas tenham apresentado valores de pH próximos (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>: 1,42 e HCOOH: 1,88) os valores de área obtidos com a solução de ácido fosfórico foram maiores, demonstrando que mesmo uma variação pequena no valor de pH do meio pode ter interferido de maneira significativa na ionização e consequente sorção dos analitos com a fase MCX, com exceção da dopamina em que a variação de área foi menos expressiva.

#### 4.3.2.2. Volume de amostra

Tendo definido a solução a ser empregada no processo de sorção dos analitos, avaliou-se, por meio da DPX, volumes de 200 e 250 µL de amostra de plasma branco enriquecido com os analitos (Figura 11) visando a obtenção de melhores respostas analíticas.

**Figura 11.** Valores médios de áreas dos analitos obtidos a partir da avaliação dos volumes de 200 e 250 µL de plasma na microextração em ponteira com a fase Oasis® MCX



Fonte: autor.

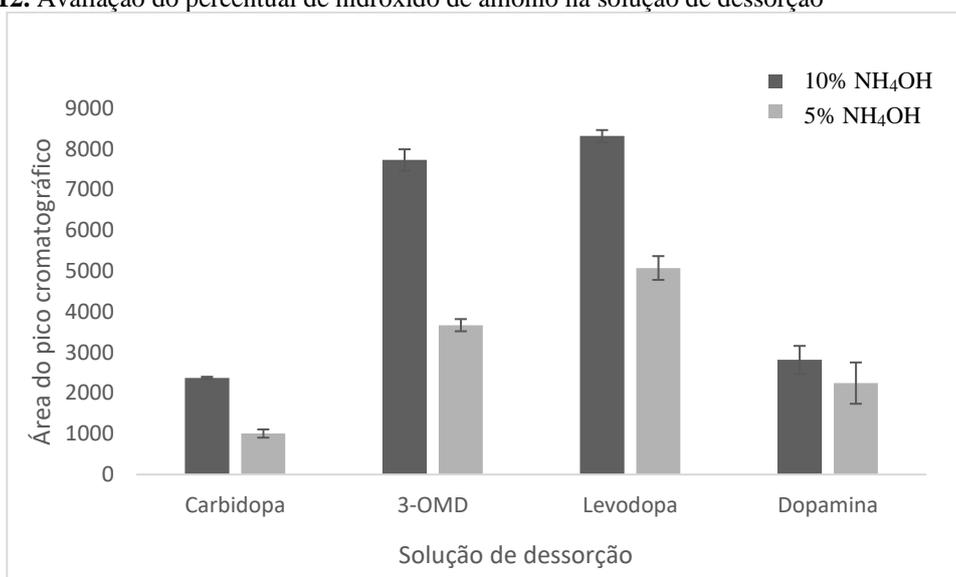
As análises realizadas com o volume de 250  $\mu\text{L}$  resultaram em maiores valores de áreas para todos os analitos e menores desvios para a carbidopa, 3-o-metildopa e levodopa. Assim, este volume foi selecionado para aplicação na DPX na etapa de otimização seguinte.

#### 4.3.2.3. Solução de dessorção

A otimização desse parâmetro visou a obtenção de adequada dessorção dos analitos. Foram avaliadas as seguintes soluções na dessorção dos analitos: ACN; ACN:H<sub>2</sub>O:NH<sub>4</sub>OH (75:15:10 v/v/v) e ACN:H<sub>2</sub>O:NH<sub>4</sub>OH (80:15:05 v/v/v).

O emprego da acetonitrila resultou em baixa dessorção dos analitos, não sendo possível, assim, quantificá-los com precisão. Já as dessorções realizadas com soluções basificadas com hidróxido de amônio resultaram em respostas analíticas quantificáveis (Figura 12).

**Figura 12.** Avaliação do percentual de hidróxido de amônio na solução de dessorção



Fonte: autor.

O emprego de solução básica visou à minimização da interação dos analitos com o grupo sulfônico (carregado negativamente) da fase sorvente pela predominância dos analitos em sua forma ácida (negativamente carregada) alcançada a partir do aumento do pH do meio e também pela maior afinidade dos íons amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) provenientes da solução de dessorção pela fase MCX<sup>27</sup>. A solução de maior percentual de hidróxido de amônio (composição dessorvente ACN:H<sub>2</sub>O:NH<sub>4</sub>OH (75:15:10 v/v/v)) resultou em maiores áreas para todos os analitos, mostrando a influência do teor da base na diminuição da afinidade dos analitos pela fase trocadora. Essa mistura dessorveu satisfatoriamente os analitos e foi selecionada como solução de dessorção para a realização da DPX com a fase MCX.

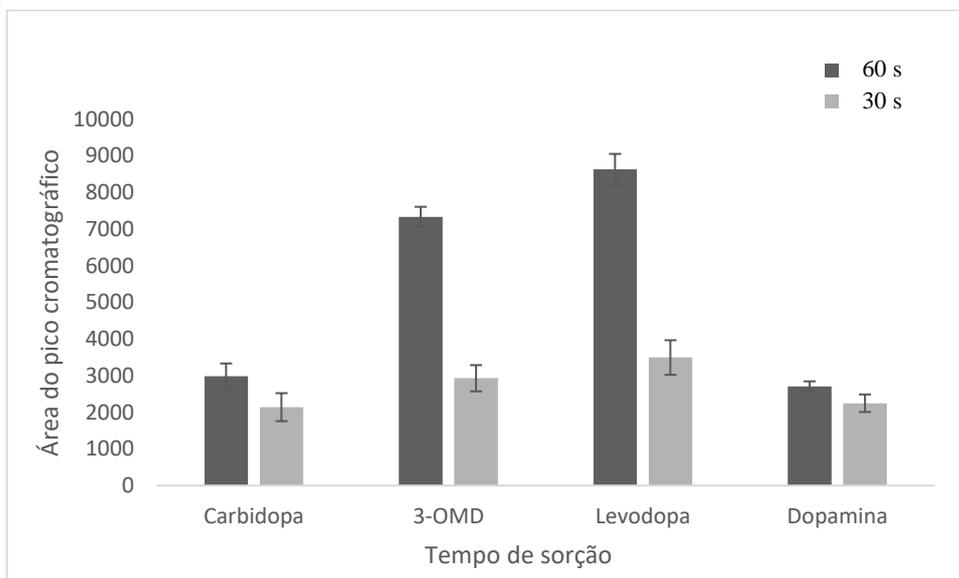
O volume de dessorção de 150  $\mu\text{L}$  foi o mínimo empregado para garantir uma mistura

dinâmica entre a fase sorvente e a solução no interior da ponteira e concentrar os analitos.

#### 4.3.2.4. Tempo de sorção dos analitos

Tendo otimizado a natureza/pH da solução de sorção, volume de amostra e o solvente de dessorção buscou-se avaliar o tempo de sorção dos analitos junto a fase MCX. Na microextração dispersiva em ponteira o tempo de equilíbrio de sorção dos analitos ocorre de maneira rápida, em aproximadamente 30 segundos<sup>60</sup>, devido à mistura completa entre analito e fase sorvente promovida pela aspiração de ar. Desse modo, os tempos de sorção de 30 e 60 segundos foram também avaliados visando uma melhor eficiência de extração alcançada em menor intervalo de tempo (Figura 13).

**Figura 13.** Avaliação do tempo de sorção dos analitos junto a fase MCX por microextração dispersiva em ponteira



Fonte: autor.

Conforme os resultados ilustrados na Figura 13, as respostas analíticas alcançadas com tempo de sorção de 60 segundos foram maiores para todos os analitos comparadas às observadas no tempo de 30 segundos. Deste modo, o tempo de 60 segundos na sorção dos analitos foi definido para a realização das extrações nos experimentos subsequentes. Intervalos de tempo superiores a 60 segundos não foram avaliados, para não deixar o procedimento de extração moroso.

A maior eficiência de extração dos analitos em 60 segundos se deve ao estabelecimento de um número maior de interações (maior tempo de contato) entre os analitos e os sítios ativos disponíveis da fase sorvente, por meio do equilíbrio dinâmico atingido entre a fase sorvente e os analitos.

#### 4.3.2.5. *Solventes de limpeza*

Os solventes de limpeza utilizados para remover os compostos endógenos adsorvidos durante a extração foram os sugeridos em protocolo estabelecido pelo fabricante da fase MCX.

A etapa de limpeza empregando solvente fraco - solução de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  4% - e depois um solvente mais forte  $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$  (90:10 v/v) possibilitou a limpeza da fase sorvente sem que houvesse perdas significativas dos analitos. O emprego de dois ciclos de 300  $\mu\text{L}$  de solvente ácido na etapa de limpeza foi necessário para que houvesse a eliminação de proteínas da fase sorvente (o volume e a quantidade de ciclos nesta etapa foram definidos a partir da observação visual da eliminação de toda “espuma” formada no interior da ponteira em decorrência das proteínas presente nas amostras). Já o volume de 150  $\mu\text{L}$  do solvente mais forte foi o mínimo empregado para garantir uma mistura dinâmica no interior da ponteira, sendo suficiente na limpeza, sem dessorver os analitos.

Durante a otimização dos parâmetros DPX, etapas de evaporação e reconstituição do eluato foram realizadas com vista à obtenção de um extrato de composição semelhante à fase móvel. No entanto, as análises resultantes de tais procedimentos geraram perdas consideráveis nos sinais dos analitos, não sendo possível observar resposta analítica para a carbidopa. Com a injeção direta do eluato no sistema cromatográfico, os picos dos analitos apresentaram-se divididos e distorcidos. Houve também queda da intensidade do sinal analítico dos analitos. Dessa forma, alguns testes foram realizados diluindo o eluato em fase móvel e em fase móvel acidificada com diferentes concentrações de ácido fórmico, visando a neutralização da base adicionada na etapa de dessorção DPX. Uma melhor resposta analítica e melhora no formato dos picos dos analitos foi obtida quando o eluato foi diluído em fase móvel contendo 0,5% de ácido fórmico na proporção 1:1. Essa condição foi então incrementada à etapa final do procedimento DPX otimizado.

Vale ressaltar que as diferentes porcentagens de ácido fórmico no extrato final DPX foram avaliadas qualitativamente. Dos testes realizados para concentrações superiores a 0,5% de ácido fórmico no eluato houve separação de fases. Devido a isso, ficou estabelecida a solução 0,5% de ácido fórmico em fase móvel para diluição do extrato final.

As implicações da composição do extrato injetado diretamente no sistema cromatográfico (sem a devida diluição) na resposta analítica pode estar associada à possível mudança na ionização dos analitos provocadas por um extrato de composição mais básica, interferindo, assim, no sinal MS/MS dos analitos por ESI em modo positivo (conforme se aumenta o pH do meio, uma dada concentração de moléculas dos analitos tende a se apresentar

na forma carregada negativamente). Tais implicações puderam ser minimizadas com a etapa procedimental de diluição otimizada e adicionada.

As condições DPX foram otimizadas e a fase Oasis MCX demonstrou boa eficiência para concentrar os analitos.

#### 4.4. Validação Analítica do método DPX/UHPLC-MS/MS

Sendo otimizados os parâmetros espectrométricos, cromatográficos e de extração, o método DPX/UHPLC-MS/MS foi validado para determinação simultânea de levodopa, carbidopa e 3-o-metildopa em amostras de plasma. A dopamina não foi quantificada por não apresentar precisão de acordo com as normas da ANVISA (2017).

##### 4.4.1. Linearidade

O método DPX/UHPLC-MS/MS desenvolvido apresentou resposta linear nos intervalos de concentração de 50 a 600 ng mL<sup>-1</sup> para a levodopa, de 20 a 600 ng mL<sup>-1</sup> para a carbidopa e de 20 a 500 ng mL<sup>-1</sup> para a 3-o-metildopa. Os valores de coeficientes de determinação ( $r^2$ ) e de correlação ( $r$ ) obtidos a partir das curvas analíticas geradas foram adequados ( $> 0,99$ ), indicando boa linearidade nas faixas avaliadas para cada composto. O limite inferior de quantificação foi definido como a menor concentração determinada quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis, sendo os valores obtidos satisfatórios, levando em consideração os valores de concentração plasmática relatadas na literatura<sup>15,26</sup>.

O teste estatístico aplicado aos pontos da curva de calibração para avaliar o modelo linear demonstrou que a nível de significância de 0,05 não houve evidência significativa de falta de ajuste. Desta forma o modelo matemático (linear) obtido para cada curva pode ser adequadamente usado para quantificação<sup>70</sup>.

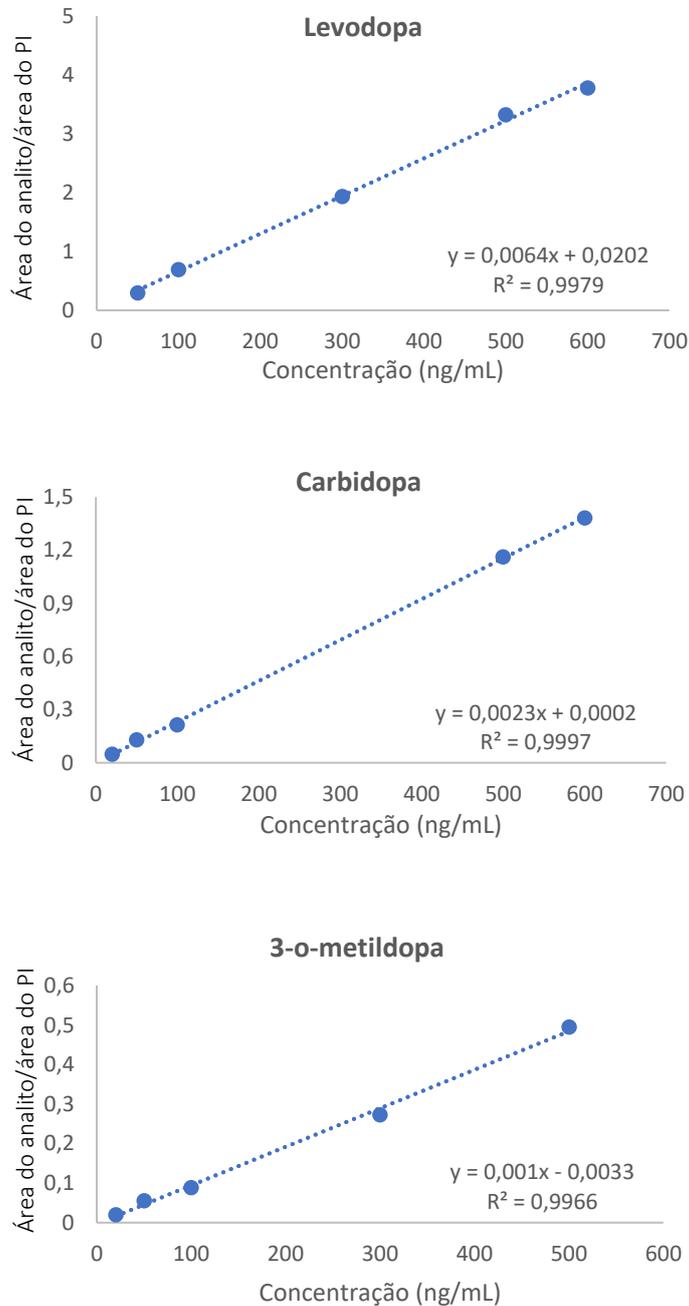
Os parâmetros de linearidade do método desenvolvido estão ilustrados na Tabela 2 e as curvas analíticas médias utilizadas para quantificação de cada analito estão representadas na Figura 14.

**Tabela 2.** Parâmetros de linearidade dos analitos em estudo no método DPX/LC-MS/MS

Analito	Intervalo linear (ng mL <sup>-1</sup> )	Equação de regressão	r	r <sup>2</sup>	LIQ (ng mL <sup>-1</sup> )	LOF (valor p)	Padrão Interno
Levodopa	50-600	$y = 0,0064x + 0,0202$	0,9989	0,9979	50	0,3593	Levodopa d3
Carbidopa	20-600	$y = 0,0023x + 0,0002$	0,9998	0,9997	20	0,9985	L- $\alpha$ -metildopa
3-OMD	20-500	$y = 0,0010x - 0,0033$	0,9983	0,9966	20	0,9093	L- $\alpha$ -metildopa

LOF: Lack of Fit (nível de 5%); 3-OMD: 3-o-metildopa

**Figura 14.** Curvas analíticas médias para quantificação de levodopa, carbidopa e 3-o-metildopa pelo método DPX/UHPLC-MS/MS



Fonte: autor

#### 4.4.2. Precisão e exatidão

A exatidão e a precisão do método desenvolvido foram avaliadas nas concentrações referentes aos limites inferior e superior de quantificação e aos controles de qualidade baixo, médio e alto. Os valores de exatidão e precisão intra e interensaio obtidos estão ilustrados na Tabela 3. O método apresentou-se preciso e exato, com valores de CV e EPR concernentes com os limites estabelecidos pela ANVISA (2017).

**Tabela 3.** Precisão e exatidão (intra e interensaio) do método DPX/UHPLC-MS/MS na determinação de levodopa, carbidopa, dopamina e 3-o-metildopa em amostras de plasma

Analito	Concentração (ng mL <sup>-1</sup> )	Precisão (CV, %)		Exatidão (EPR, %)	
		Intraensaio	Interensaio	Intraensaio	Interensaio
Levodopa	50 (LIQ)	12,4	12,5	-13,6	-9,1
	100 (CQB)	14,9	15,0	4,9	-5,2
	300 (CQM)	8,5	3,5	-0,3	-5,1
	500 (CQA)	1,5	1,3	3,2	2,4
	600 (LSQ)	4,4	6,1	-2,2	-1,7
Carbidopa	20 (LIQ)	14,7	16,8	-13,2	15,0
	50 (CQB)	0,4	4,9	14,5	9,5
	300 (CQM)	2,9	6,2	-15,0	-15,0
	500 (CQA)	0,2	15,0	-10,1	6,0
	600 (LSQ)	7,1	15,0	-15,2	7,2
3-OMD	20 (LIQ)	14,2	10,8	16,2	10,6
	50 (CQB)	7,3	2,6	14,7	15,0
	100 (CQM)	10,5	9,5	-6,2	-8,9
	300 (CQA)	0,6	0,5	-5,8	-5,6
	500 (LSQ)	14,9	3,7	2,1	-12,2

#### 4.4.3. Efeito Residual

As análises realizadas demonstraram que não houve efeito residual significativo, pois não houve aparecimento de picos interferentes nos tempos de retenção dos analitos e nem aumento significativo no sinal desses compostos - os valores de áreas dos picos cromatográficos obtidos com as amostras de plasma branco injetadas antes e após a injeção de amostra LSQ foram inferiores a 20% da resposta analítica obtida para as amostras processadas do LIQ e à 5% para os padrões internos.

#### 4.4.4. Efeito da matriz

O efeito da matriz foi avaliado pela comparação dos coeficientes angulares médios obtidos a partir das curvas construídas em plasma e em água. A ausência do efeito da matriz pode ser indicada pelo paralelismo das retas. O paralelismo das retas foi demonstrado a partir da

avaliação estatística, utilizando o teste t com nível de significância de 5% ( $p > 0,05$ ) (Tabela 4 e Anexo 1).

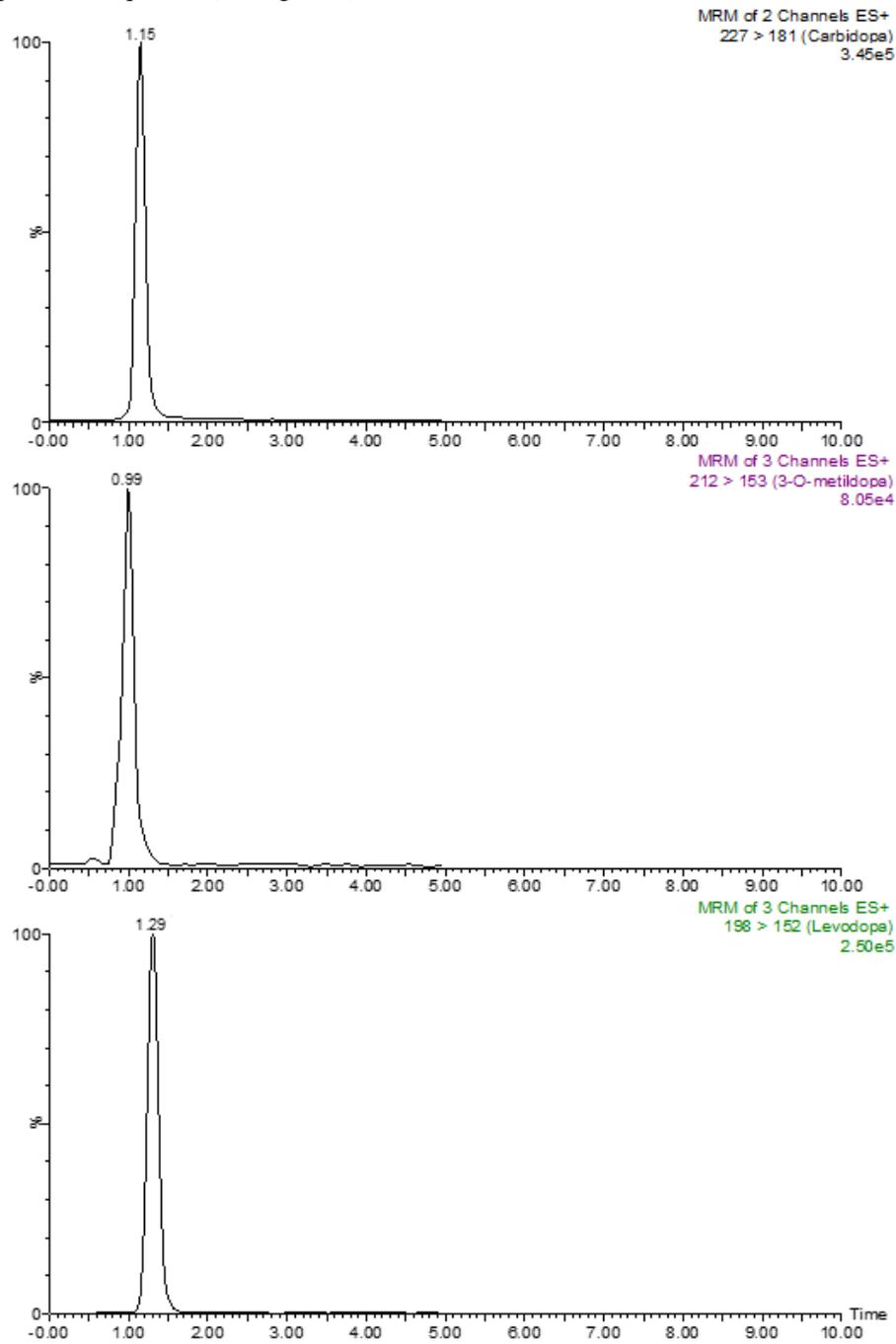
**Tabela 4.** Valores de coeficientes angulares médios das curvas construídas em plasma e em água e valores p obtido com teste estatístico t para avaliação do paralelismo das retas

<b>Analito</b>	<b>Coef. Angular médio plasma</b>	<b>Coef. Angular médio água</b>	<b>Teste t (valor p)</b>
Levodopa	0,0064	0,0066	0,2761
Carbidopa	0,0023	0,0024	0,4505
3-o-metildopa	0,001	0,0008	0,1424

Conforme observado na Tabela 4, os valores p foram maiores que 0,05 demonstrando o paralelismo das retas obtidas com as curvas em plasma e em água e apontando assim, para a ausência de efeito matriz significativo.

A Figura 15 ilustra o cromatograma obtido com análise de amostra de plasma enriquecido pelo método DPX/UHPLC-MS/MS desenvolvido e validado no presente estudo.

**Figura 15.** Cromatogramas de íons produtos (íons de quantificação) da levodopa, carbidopa e 3-o-metildopa em plasma enriquecido ( $500 \text{ ng mL}^{-1}$ )



#### 4.5. Análise de amostras de plasma

Para avaliar a aplicabilidade do método padronizado, cinco amostras de plasma branco foram enriquecidas com os fármacos estudados e 3-*o*-metildopa, considerando os valores de concentração plasmática relatadas para os analitos nos trabalhos levantados (Quadro 1, seção 1.2.). A Tabela 5 mostra os resultados obtidos para as concentrações plasmáticas determinadas. Os CV das replicatas (n=3) foram inferiores a 14,5% e nenhuma substância interferente foi observada no tempo de retenção dos analitos.

**Tabela 5.** Concentrações plasmáticas determinadas (n = 3) em amostras de plasma

Amostras	Concentração determinada (ng mL <sup>-1</sup> ) (CV %)		
	<i>Levodopa</i>	<i>Carbidopa</i>	<i>3-<i>o</i>-metildopa</i>
1	511 (10,4)	179 (5,6)	48 (14,3)
2	248 (2,1)	86 (14,2)	41 (7,9)
3	450 (7,7)	123 (11,2)	52 (13,3)
4	404 (8,6)	129 (3,9)	32 (13,5)
5	395 (4,0)	102 (6,0)	34 (14,5)

**CONCLUSÃO**

## 5. CONCLUSÃO

A técnica DPX utilizando a fase bifuncional MCX utilizando a fase bifuncional MCX apresentou seletividade e capacidade de sorção adequada para todos os analitos. A otimização dos parâmetros DPX associada à etapa prévia de precipitação de proteínas favoreceram a seletividade e sensibilidade analítica do método e contribuíram para a minimização do efeito da matriz. O principal mecanismo envolvido na microextração ocorreu por troca catiônica e o emprego de solução de dessorção com adição de solução básica favoreceu a eluição quantitativa dos analitos. A diluição do extrato obtido da DPX com solução ácida minimizou a distorção dos picos dos analitos nos cromatogramas, proveniente da diferença entre as composições do extrato e da FM.

O método DPX/UHPLC-MS/MS, empregando a coluna Gold HILIC, apresentou curto tempo de análise seletividade e sensibilidade analítica adequadas para a determinação simultânea de levodopa, carbidopa e 3-o-metildopa em amostras de plasma. A faixa de linearidade deste método é condizente com os intervalos terapêuticos dos fármacos em estudo.

Os parâmetros de validação analítica avaliados estão em conformidade às normas da ANVISA (2017). O método proposto foi aplicado com êxito na determinação de levodopa, carbidopa e 3-o-metildopa em amostras de plasma.

De acordo com os parâmetros de validação analítica avaliados, o método DPX/UHPLC-MS/MS padronizado é adequado para a determinação de levodopa, carbidopa e 3-o-metildopa em amostras de plasma para fins de monitorização terapêutica.

## **REFERÊNCIAS**

## 6. REFERÊNCIAS

1. Macuglia, G. R. Avaliação das funções executivas e de alterações do humor em pacientes com doença de Parkinson. (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012).
2. WHO. Neurological Disorders: Public Health Challenges. *World Heal. Organ.* (2006).
3. Bill, F. & Foundation, M. G. Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* **17**, 939–953 (2018).
4. Alexoudi, A., Alexoudi, I. & Gatzonis, S. Parkinson's disease pathogenesis, evolution and alternative pathways: A review. *Rev. Neurol. (Paris)*. **174**, 699–704 (2018).
5. Stocchi, F. & Torti, M. *Chapter Twenty-Seven - Constipation in Parkinson's Disease. International Review of Neurobiology* vol. 134 (Elsevier Inc., 2017).
6. Kalia, L. V & Lang, A. E. Parkinson's disease. *Lancet* **386**, 896–912 (2015).
7. Pfeiffer, R. F. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Park. Relat. Disord.* **22**, S119–S122 (2016).
8. Bekris, L. M., Mata, I. F. & Zabetian, C. P. The Genetics of Parkinson Disease. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* **23**, 228–242 (2010).
9. Altmann, V. Aspectos genéticos, ambientais e suas interações na suscetibilidade e farmacogenética da doença de Parkinson. (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2018).
10. Wirdefeldt, K., Adami, H.-O., Cole, P., Trichopoulos, D. & Mandel, J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur. J. Epidemiol.* S1–S58 (2011) doi:10.1007/s10654-011-9581-6.
11. Dumurgier, J. & Tzourio, C. Epidemiology of neurological diseases in older adults. *Rev. Neurol. (Paris)*. **176**, 642–648 (2020).
12. Lau, L. M. L. de & Breteler, M. M. B. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* **5**, 525–535 (2006).
13. Janca, A. Parkinson's disease from WHO perspective and a public health point of view. *Parkinsonism Relat. Disord.* **9**, 3–6 (2002).
14. Artigas, N. R. Avaliação das alterações posturais na doença de Parkinson e suas relações com aspectos motores, biopsicossociais e funcionais. (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2019).
15. Ribeiro, R. P. Determinação de levodopa, carbidopa, entacapona, tolcapona, 3-o-metildopa e dopamina em plasma humano utilizando CLAE-EM/EM. (Universidade Federal do Paraná, 2014).
16. Oliveira, I. G. de C. Desenvolvimento do método SALLE-UHPLC-MS/MS para a determinação de anandamida e 2-araquidonoilglicerol em amostras de encéfalos de ratos submetidos a modelo animal da Doença de Parkinson. (Universidade de São Paulo, 2020).

17. Shastry, B. S. Parkinson disease: etiology, pathogenesis and future of gene therapy. *Neurosci. Res.* **41**, 5–12 (2001).
18. Vargas, D. M. de. Assinaturas transcricionais das doenças de Alzheimer e Parkinson: reguladores mestres e novas abordagens terapêuticas. (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2018).
19. Kaakkola, S. Clinical pharmacology, therapeutic use and potential of COMT inhibitors in Parkinson's Disease. *Drugs* **59**, 1233–1250 (2000).
20. Nishijima, H. & Tomiyama, M. What mechanisms are responsible for the reuptake of levodopa-derived dopamine in parkinsonian striatum? *Front. Neurosci.* **10**, 1–9 (2016).
21. Goole, J. & Amighi, K. Levodopa delivery systems for the treatment of Parkinson's disease : An overview. *Int. J. Pharm.* **380**, 1–15 (2009).
22. David, F. J. *et al.* Progressive resistance exercise and Parkinson's Disease: A review of potential mechanisms. *Park. Dis.* **2011**, 1–10 (2012).
23. Dhall, R. & Kreitzman, D. L. Advances in levodopa therapy for Parkinson disease: Review of RYTARY (carbidopa and levodopa) clinical efficacy and safety. *Neurology* **86**, S13–S24 (2016).
24. Republic, C. & Republic, C. Therapeutic drug monitoring of atypical antipsychotic drugs. **64**, 387–401 (2014).
25. Souza, I. D. de. Desenvolvimento de fases monolíticas de sílica híbrida para microextração em sorvente empacotado (MEPS) de fármacos em amostras de plasma e análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS). (Universidade de São Paulo, 2015).
26. Vilhena, R. de O. *et al.* A new HILIC-MS/MS method for the simultaneous analysis of carbidopa, levodopa, and its metabolites in human plasma. *J. Chromatogr. B* **967**, 41–49 (2014).
27. Collins, C. H., Braga, G. L. & Bonato, P. S. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. in *Fundamentos de cromatografia* (ed. Editora da Unicamp) 273–398 (2006).
28. Kole, P. L., Venkatesh, G., Kotecha, J. & Sheshala, R. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. *Biomed. Chromatogr.* **25**, 199–217 (2011).
29. Collins, C. H., Silva, C. R., Faria, A. M., Collins, K. E. & Jardim, I. C. S. F. The Search for more pH stable stationary phases for High Performance Liquid Chromatography. *J. Braz. Chem. Soc.* **20**, 604–612 (2009).
30. Skoog, D. A., West, D. M., Holler, J. F. & Crouch, S. R. Espectrometria de Massas. in *Fundamentos de Química Analítica* (ed. Cengage Learning) 797–813 (2015).
31. Paiva, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S. & Vyvyan, J. R. Espectrometria de Massas - Parte 1: teoria básica, instrumentação e técnicas de amostragem. in *Introdução à espectroscopia* (ed. Learning, C.) 103–134 (2015).

32. Collins, C. H. Princípios básicos de cromatografia. in *Fundamentos de cromatografia* (ed. Editora da Unicamp) 17–45 (2006).
33. Gao, L. *et al.* Fast determination of 16 circulating neurotransmitters and their metabolites in plasma samples of spontaneously hypertensive rats intervened with five different Uncaria. *J. Chromatogr. B* **1179**, 1–9 (2021).
34. Grecco, C. F., Miranda, L. F. C. & Costa Queiroz, M. E. Aminopropyl hybrid silica monolithic capillary containing mesoporous SBA-15 particles for in-tube SPME-HILIC-MS/MS to determine levodopa, carbidopa, benserazide, dopamine, and 3-O-methyldopa in plasma samples. *Microchem. J.* **157**, 1–9 (2020).
35. Ferreira, M. S. *et al.* Sensitive LC-MS/MS method for quantitation of levodopa and carbidopa in plasma: application to a pharmacokinetic study. *Bioanalysis* **10**, 1567–1576 (2018).
36. Mohamed, D., Hegazy, M. A., Elshahed, M. S., Toubar, S. S. & Helmy, M. I. Novel contribution to the simultaneous monitoring of pramipexole dihydrochloride monohydrate and levodopa as co-administered drugs in human plasma utilizing UPLC-MS/MS. *Eur. J. Mass Spectrom.* **24**, 397–407 (2018).
37. Chi, J., Ling, Y., Jenkins, R. & Li, F. Quantitation of levodopa and carbidopa in rat plasma by LC-MS/MS: The key role of ion-pairing reversed-phase chromatography. *J. Chromatogr. B* **1054**, 1–9 (2017).
38. Merbel, N. C. Van De, Bronsema, K. J., Gorman, S. H. & Bakhtiar, R. Sensitivity improvement of the LC-MS/MS quantification of carbidopa in human plasma and urine by derivatization with 2, 4-pentanedione. *J. Chromatogr. B* **1064**, 62–67 (2017).
39. Kakarla, S., Kodali, G. & Seru, G. Selective and rapid LC-MS/MS method for the simultaneous quantitation of levodopa and carbidopa in human plasma using alumina SPE cartridges. *Indo Am. J. Pharm. Sci.* **3**, 905–915 (2016).
40. Yang, G. *et al.* Development and validation of an LC-MS/MS method for simultaneous quantification of levodopa and MD01 in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study of mucuna pruriens extract. *Biomed. Chromatogr.* **30**, 1506–1514 (2016).
41. Ribeiro, R. P. *et al.* Simultaneous determination of levodopa, carbidopa, entacapone, tolcapone, 3-O-methyldopa and dopamine in human plasma by an HPLC-MS/MS method. *Bioanal.* **7**, 207–220 (2015).
42. Martins, H. F., Pinto, D. P., Nascimento, V. de A., Marques, M. A. S. & Amendoeira, F. C. Determination of levodopa in human plasma by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS): application to a bioequivalence study. *Quim. Nova* **36**, 171–176 (2013).
43. Junnotula, V. & Perez, H. L. Development and validation of a simple and sensitive method for quantification of levodopa and carbidopa in rat and monkey plasma using derivatization and UPLC-MS/MS. *J. Chromatogr. B* **926**, 47–53 (2013).

44. Cho, Y. A. *et al.* Development and validation of an LC-ESI-MS/MS method for simultaneous determination of levodopa, dopamine, L- $\alpha$ -methyldopa and 3-O-methyldopa in rat plasma. *J. Pharm. Investig.* **42**, 361–368 (2012).
45. César, I. da C. *et al.* Development and validation of a high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-MS/MS method for the simultaneous quantitation of levodopa and carbidopa in human plasma. *J. Mass Spectrom.* **46**, 943–948 (2011).
46. César, I. da C. *et al.* Simultaneous quantitation of levodopa and 3-O-methyldopa in human plasma by HPLC-ESI-MS/MS: Application for a pharmacokinetic study with a levodopa/benserazide formulation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **56**, 1094–1100 (2011).
47. Jiang, W. *et al.* Simultaneous determination of L-dopa and its prodrug (S)-4-(2-acetamido-3-ethoxy-3-oxopropyl)-1,2-phenylene diacetate in rat plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **53**, 751–754 (2010).
48. Pan, L. *et al.* Simultaneous determination of levodopa, benserazide and 3-O-methyldopa in human serum by LC-MS-MS. *Chromatographia* **72**, 627–633 (2010).
49. Igarashi, K., Hotta, K., Kasuya, F., Abe, K. & Sakoda, S. Determination of cabergoline and L-dopa in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **792**, 55–61 (2003).
50. Lanças, F. M. Cromatografia Líquida com Interação Hidrofílica ( HILIC ). *Sci. Chromatogr.* **2**, 49–57 (2010).
51. Fountain, K. J., Xu, J., Diehl, D. M. & Morrison, D. Influence of stationary phase chemistry and mobile-phase composition on retention, selectivity, and MS response in hydrophilic interaction chromatography. *J. Sep. Sci.* **33**, 740–751 (2010).
52. Maldaner, L., Collins, C. H. & Jardim, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. *Quim. Nova* **33**, 1559–1568 (2010).
53. Drugbank. disponível em: <<https://go.drugbank.com/drugs/DB01235>>. Acesso em: 12 Mar. 2020.
54. PubChem. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Levodopa>>. Acesso em: 12 Mar. 2020.
55. Silva, C. G. A. da, Bottoli, C. B. G. & Collins, C. H. Cromatografia por interações hidrofílicas (HILIC): Estado da arte e aplicações. *Quim. Nova* **39**, 210–220 (2016).
56. Danaceau, J. P., Chambers, E. E. & Fountain, K. J. *Rapid and simultaneous analysis of plasma catecholamines and metanephrines using Mixed-Mode SPE and Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC) for clinical research.*
57. Thermo Scientific. *Thermo Scientific HILIC Separations.* Technical Guide.
58. Buszewski, B. & Noga, S. Hydrophilic interaction liquid chromatography ( HILIC ) - a powerful separation technique. *Anal. Bioanal. Chem.* **402**, 231–247 (2012).

59. Mccalley, D. V. Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds? *J. Chromatogr. A* **1171**, 46–55 (2007).
60. Pinto, M. A. L. & Queiroz, M. E. C. Extração em ponteiros descartáveis: fundamentos teóricos e aplicações. *Sci. Chromatogr.* **7**, 101–108 (2015).
61. Pena-Abaurrea, M., Torre, V. S. G. de la & Ramos, L. Ultrasound-assisted extraction followed by disposable pipette purification for the determination of polychlorinated biphenyls in small-size biological tissue samples. *J. Chromatogr. A* **1317**, 223–229 (2013).
62. Oliveira, T. C. & Lanças, F. M. Extração de pesticidas em amostras de alimentos através de sorção em ponteiros descartáveis. *Sci. Chromatogr.* **10**, 243–255 (2018).
63. Lambert, S. Disposable pipette tip extraction - leaner, greener sample preparation. *Chomatography Today* 12–14 (2009).
64. Fernandes, V. C., Domingues, V. F., Mateus, N. & Delerue-matos, C. Comparison of Disposable Pipette Extraction and Dispersive Solid-Phase Extraction in the QuEChERS Method for Analysis of Pesticides in Strawberries. *J. Chromatogr. Sci.* **52**, 1339–1345 (2014).
65. GERSTEL. SPE dispersiva rápida com GERSTEL-DPX. [http://www.gerstel.com/en/SPE-dispersiva\\_DPX\\_pt.htm](http://www.gerstel.com/en/SPE-dispersiva_DPX_pt.htm).
66. Tomasin, G. S., Silva, W. R., Elias, B., Maria, N. & Coelho, M. Highly sensitive determination of Cu ( II ) ions in hemodialysis water by F AAS after disposable pipette extraction ( DPX ) using *Moringa oleifera* as solid phase. *Microchem. J.* **161**, (2021).
67. Guan, H., Brewer, W. E., Garris, S. T. & Morgan, S. L. Disposable pipette extraction for the analysis of pesticides in fruit and vegetables using gas chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1217**, 1867–1874 (2010).
68. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, in *RDC No 166 , 24 Julho 2017*. p. 22, 2017.
69. Ramsey, F. L. & Schafer, D. W. *The statistical sleuth - a course in methods of data analysis*. (1997).
70. Miranda, L. F. C. Desenvolvimento da fase monolítica de sílica híbrida com os grupos amino e ciano para a determinação de aminoácidos em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos através do acoplamento direto da técnica in-tube SPME ao sistema MS/MS. (Universidade de São Paulo, 2019).
71. Demarque, D. P., Crotti, A. E. M., Vessecchi, R., Lopes, J. L. C. & Lopes, N. P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. *Nat. Prod. Rep.* **33**, 432–455 (2016).
72. Michotte, Y., Moors, M., Deleu, I. D., Herregodts, P. & Ebinger, G. Simultaneous determination of levodopa , carbidopa , 3-O-methyldopa and dopamine in plasma using high-

- performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **5**, 659–664 (1987).
73. Sigma Aldrich. Ascentis® Express RP-Amide, 2.7 µm HPLC Column. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/53918u?lang=pt&region=BR>>. Acesso em: 15 Mar. 2020
74. Guo, Y. & Gaiki, S. Retention and selectivity of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A* **1218**, 5920–5938 (2011).
75. Ruta, J., Rudaz, S., Mccalley, D. V, Veuthey, J. & Guillarme, D. A systematic investigation of the effect of sample diluent on peak shape in hydrophilic interaction liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1217**, 8230–8240 (2010).
76. Waters Corporation. *Oasis sample extraction products: Chemistry & formats*. Technical note. USA. (2010).
77. Waters Corporation. *Sample Preparation*. Disponível em: <[www.waters.com/webassets/cms/library/docs/IcSP.pdf](http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/IcSP.pdf)>. Acesso em: 20 Set. 2021.

Anexo 1. Dados obtidos pelo teste t na avaliação do paralelismo das retas resultantes das curvas construídas em plasma e em água. Teste realizado em Software Excel (Microsoft®)

### Levodopa

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	Plasma	Água
Mean	0,006406501	0,006550413
Variance	9,9093E-08	4,886E-08
Observations	3	3
Pooled Variance	7,39765E-08	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	4	
t Stat	-0,648032628	
P(T<=t) one-tail	0,276141915	
t Critical one-tail	2,131846786	
P(T<=t) two-tail	0,55228383	
t Critical two-tail	2,776445105	

### Carbidopa

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	Plasma	Água
Mean	0,00236371	0,002309822
Variance	4,83995E-09	4,91949E-07
Observations	3	3
Pooled Variance	2,48394E-07	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	4	
t Stat	0,132424221	
P(T<=t) one-tail	0,450521509	
t Critical one-tail	2,131846786	
P(T<=t) two-tail	0,901043018	
t Critical two-tail	2,776445105	

### 3-o-metildopa

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	Plasma	Água
Mean	0,000975088	0,000813036
Variance	4,75254E-08	4,22764E-09
Observations	3	3
Pooled Variance	2,58765E-08	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	4	
t Stat	1,233804079	
P(T<=t) one-tail	0,142407404	
t Critical one-tail	2,131846786	
P(T<=t) two-tail	0,284814809	
t Critical two-tail	2,776445105	